



HAL
open science

Digestion anaérobie sur une ferme : évaluation du pouvoir méthanogène de substrats et étude de micropolluants

Billy Osborne Homeky

► **To cite this version:**

Billy Osborne Homeky. Digestion anaérobie sur une ferme : évaluation du pouvoir méthanogène de substrats et étude de micropolluants. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0346 . tel-01665490

HAL Id: tel-01665490

<https://theses.hal.science/tel-01665490>

Submitted on 16 Dec 2017

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



THÈSE

Soutenance effectuée le 14 Décembre 2015
pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine
(mention Génie des Procédés et des Produits)

Par
Billy Osborne HOMEKY

Digestion anaérobie sur une ferme : évaluation du pouvoir méthanogène de substrats et étude de micropolluants

Composition du jury :

- Rapporteurs :** Christophe DAGOT, Professeur, ENSIL, Limoges
Thierry RIBEIRO, MCF HDR, Lasalle-Beauvais, Beauvais
- Examineurs :** Joachim HANSEN, Professeur, Université du Luxembourg
Michel FICK, Professeur, Université de Lorraine
- Membres invités :** Bruno CHANUDET-BUTTET, Ingénieur Noremat
Thomas LENDORMI, MCF, Université de Bretagne-Sud
Marie-Noëlle PONS, DR CNRS, LRGP, Nancy
- Encadrants :** Olivier POTIER, MCF HDR, Université de Lorraine (Directeur de thèse)
Nouceiba ADOUANI, MCF, Université de Lorraine (Codirecteur de thèse)

Sur ton chemin si tu trébuches...Alors tu marches ! Relève-toi et persévère.
(K. Montejano)

*Chaque adversité, chaque échec, chaque chagrin, porte en lui la semence d'une
réussite équivalente ou supérieure.*
(N. Hill)

Cela semble toujours impossible jusqu'à ce qu'on le fasse.
(N. Mandela)

A mon Père, John HOMEKY

Liste des communications liées à cette thèse

Communications écrites

Osborne Homeky, B., Adouani, N., Potier, O. and Pons, M.-N. 2016. Anaerobic codigestion of cow slurry with grass silage: Effect of silage duration. *Environ. Prog. Sustainable Energy*, 35: 1374–1380. doi:10.1002/ep.12361

Homeky B., Adouani N., Potier O., Pons MN., 2013. Anaerobic co-digestion of cow manure with grass silage: rapid assessment of effectiveness. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, Numéro 104 – 2013 ISSN: 1775-335X ; ISBN: 978-2-910239-78-7, Ed. SFGP, Paris, France. 6 pages.

Homeky B., Adouani N., Potier O., Pons MN., 2013. Valorisation par méthanisation des résidus agricoles : étude de la co-digestion du lisier avec l’herbe ensilée et le lactosérum. Séminaire Ecole doctorale RP2E du 17/01/2013, 6 pages.

Communications orales

Homeky B., Adouani N., Potier O., Wedraogo T.N. Pons MN. 2014. Anaerobic co-digestion of cow slurry with grass silage: effect of silage duration. 5th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation - August 25-28, 2014 - Rio de Janeiro, Brazil

Homeky B., Adouani N., Potier O., Pons MN., 2013. Valorisation par méthanisation des résidus agricoles: cas d'une ferme en polyculture. Séminaire Ecole doctorale RP2E du 17 Janvier 2013

Poster

Homeky B., Adouani N., Potier O., Pons MN., 2013. Anaerobic co-digestion of cow manure with grass silage: rapid assessment of effectiveness. XIVème congrès SFGP 2013 du 8 au 10 Octobre 2013.

Remerciements

Je remercie Gabriel WILD et Laurent FALK, directeurs successifs du LRGP, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et permis d'y développer ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement mes directeurs de thèse Olivier POTIER et Nouceiba ADOUANI pour leur appui scientifique, leur gentillesse, leur temps qu'ils m'ont accordé et les conseils précieux qu'ils m'ont prodigués. Merci de m'avoir donné les moyens de « digérer » cette thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Marie-Noëlle PONS qui a été un soutien durant les étapes clés de ma thèse, et grâce à qui j'ai pu accéder au laboratoire pendant les vacances d'été et d'hiver afin de maintenir le réacteur continu en régime.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ces travaux de recherche.

Merci à Joachim HANSEN pour le séjour court mais fructueux effectué dans son laboratoire, pour la mise en place du réacteur continu. Merci à Christophe DAGOT et à Martin AINA pour avoir accompagné mes premiers pas dans l'univers de la recherche scientifique, et Jean-Noël LOUVET pour son éternelle bienveillance. Merci à Bruno Chanudet-Buttet de la société Norematt pour l'aide à la collecte des herbes et l'aiguillage pour les interprétations.

Je remercie également les membres d'ECCMA pour m'avoir enseigné les méthodes analytiques. Merci beaucoup à Steve PONTVIANNE pour son aide au développement de méthode analytique, à Hélène POIROT pour les précieux coups de main pour les métaux lourds, et Xavier FRAMBOISIER pour sa disponibilité.

Je remercie de même l'ensemble des personnels de l'atelier mécanique pour leur disponibilité et leur diligence durant la mise en place du réacteur continu.

Je remercie l'ensemble des services administratif, informatique et sécurité du LRGP, et le secrétariat de l'ED RP2E pour leur diligence.

Je remercie mes collègues de bureau que sont Amine, Aziz, Dinh, et Yuhai pour le merveilleux partage au cours de ces années.

Merci aux collègues (doctorants, post-doctorants, ingénieurs) que j'ai côtoyés : aux collègues de l'équipe Sols et Eaux, Mélina, Salim, Juan Carlos, Yao, les Dégs rp2e...

Merci à Jean-Pierre LECLERC pour m'avoir transmis sa passion de la course en nature.

Merci aux différents stagiaires pour avoir apporté leur pierre à l'édifice. Gracias Paolitta, Merci Cécile, Choukrane Mariem, Merci Nùria, Thank you Chango and Laura.

Ma profonde gratitude à mes relecteurs Karen, Moïta, Saturnin et Steeven.

Merci à mon père, mon frère Oswald, ma famille, Karen, Steeven, Tiburce, mes bienveillant(e)s.

Sommaire

Introduction générale.....	17
Chapitre I : Revue bibliographique	20
I.1. La digestion anaérobie	22
I.1.1. Les étapes de la digestion anaérobie	22
I.1.1.1. L'hydrolyse	24
I.1.1.2. L'acidogénèse	24
I.1.1.3. L'acétogénèse	24
I.1.1.4. La méthanogénèse.....	25
I.1.2. Les paramètres influents de la digestion anaérobie	26
I.1.2.1. Température	26
I.1.2.2. pH.....	27
I.1.2.3. L'azote ammoniacal.....	27
I.1.2.4. Les Acides Gras Volatils (AGV)	27
I.1.2.5. La charge organique.....	28
I.1.2.6. Le Temps de Rétention Hydraulique	28
I.1.2.7. Le ratio C/N	29
I.1.3. La co-digestion anaérobie.....	29
I.1.3.1. Utilisation de l'herbe comme co-substrat	30
I.1.3.2. Utilisation du lactosérum comme co-substrat.....	31
I.2. Impact des micropolluants sur le procédé de digestion anaérobie	32
I.2.1. Généralités sur les micropolluants.....	32
I.2.2. Effet des antibiotiques utilisés sur les fermes bovines	32
I.2.2.1. La tétracycline.....	35
I.2.2.2. La tylosine.....	36
I.2.2.3. La spiramycine.....	38
I.2.3. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).....	39
I.2.4. Les métaux lourds.....	43
I.3. Synthèse bibliographique	45
CHAPITRE II : Matériels et Méthodes.....	47
II.1. Substrats utilisés et dispositifs expérimentaux	49
II.1.1. Substrats utilisés.....	49
II.1.1.1. Le lisier bovin.....	49
II.1.1.2. Les lactosérums	50
II.1.1.3. L'herbe	50
II.1.2. Dispositifs expérimentaux.....	50
III.1.2.1. Les tests de biodégradabilité anaérobie en batch ou Potentiel Biochimique de Méthane (en anglais BMP).....	50
III.1.2.2. Le réacteur continu.....	52

II.2. Méthodes.....	53
II.2.1. Matières Sèches (MS)	53
II.2.2. Matière Organique (MO)	54
II.2.3. Composition en CHNS.....	54
II.2.4. Analyse des fibres	54
II.2.4.1. Appareillage pour l'analyse des fibres	55
II.2.4.2. Fibres résistants aux détergents acides (ADF)	56
II.2.4.3. Fibres résistants aux détergents neutres (NDF).....	56
II.2.4.4. Fibres brutes (CF).....	56
II.2.4.5. La lignine.....	56
II.2.5. Ammonium	57
II.2.6. Volume de biogaz produit.....	57
II.2.7. Composition du biogaz produit.....	58
II.2.8. Teneur en métaux lourds	58
II.2.9. Mesure des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).....	59
II.2.9.1. Extraction des HAP par ASE (Accelerated Solvent Extraction) ..	59
II.2.9.2. Elimination de la chlorophylle	61
II.2.9.3. Dosage des HAP par HPLC	62
Chapitre III : Co-digestion anaérobie de substrats	63
III.1. Co-digestion du lisier bovin avec de l'herbe ensilée : effet de la durée d'ensilage.....	65
III.1.1. Caractérisation du lisier et de l'herbe	65
III.1.2. Production de biogaz	68
III.1.3. Evolution des teneurs en CH ₄ et CO ₂	69
III.1.4. Production de méthane.....	72
III.1.5. Rendement de production de méthane.....	74
III.1.6. Teneurs en métaux lourds	77
III.2. Co-digestion du lisier bovin avec de l'herbe ensilée et du lactosérum de chèvre.....	80
III.2.1. Caractérisation du lisier, de l'herbe et du lactosérum.....	80
III.2.2. Production de biogaz	82
III.2.3. Evolution des teneurs en CH ₄	85
III.2.4. Production de méthane.....	88
III.2.5. Rendement de méthane	90
III.2.6. Teneurs en métaux lourds	93
III.3. Co-digestion du lisier bovin avec du lactosérum de vache	95
III.3.1. Caractérisation des substrats	95
III.3.2. Production de biogaz	96
III.3.3. Evolution des teneurs en CH ₄	98

III.3.4. Production de méthane.....	99
III.4. Conclusion partielle.....	101
III.4.1. Utilisation de l’herbe et/ou du lactosérum comme substrat.....	101
III.4.2. Effets comparés du lactosérum de chèvre et du lactosérum de vache.....	102
Chapitre IV : Etude des micropolluants	104
IV.1. Suivi qualitatif de l’herbe de bord de route.....	106
IV.1.1. Caractérisation des échantillons	106
IV.1.2. Suivi des métaux lourds.....	109
IV.1.2.1. Aluminium	110
IV.1.2.2. Arsenic	111
IV.1.2.3. Cadmium.....	112
IV.1.2.4. Chrome.....	113
IV.1.2.5. Cuivre.....	114
IV.1.2.6. Manganèse	115
IV.1.2.7. Nickel.....	116
IV.1.2.8. Plomb	117
IV.1.2.9. Zinc	118
IV.1.3. Suivi des hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	119
IV.1.4. Conclusion partielle.....	122
IV.2. Effet des antibiotiques sur le procédé.....	123
IV.2.1. Effet de la tétracycline sur le procédé.....	123
IV.2.1.1. Test batch.....	123
III.2.1.1.1. Caractérisation des substrats	123
IV.2.1.1.2. Production de biogaz.....	124
IV.2.1.1.3. Evolution des teneurs en CH ₄	128
IV.2.1.1.4. Production de méthane.....	129
IV.2.1.1.5. Vitesses de réaction et profils de baisse de production.....	133
IV.2.1.2. Test en réacteur continu.....	134
IV.2.1.2.1. Production de biogaz.....	135
IV.2.1.2.2. Production de méthane.....	137
IV.2.1.2.3. Teneur en CH ₄	139
IV.2.1.2.4. Evolution des paramètres du milieu.....	140
IV.2.1.2.5. Evolution des métaux lourds.....	143
IV.2.1.3. Conclusion partielle.....	146
IV.2.2. Effet de la spiramycine sur le procédé.....	147
IV.2.2.1. Test en réacteur batch	147
IV.2.2.1.1. Caractérisation du substrat.....	147
IV.2.2.1.2. Production de biogaz.....	148
IV.2.2.1.3. Evolution des teneurs en CH ₄	152

IV.2.2.1.4. Production de méthane.....	153
IV.2.2.1.5. Vitesses de production de méthane et profils de baisse de production	156
IV.2.2.2. Test en réacteur continu.....	157
IV.2.2.2.1. Production de biogaz.....	157
IV.2.2.2.2. Production de méthane.....	160
IV.2.2.2.3. Teneur en CH ₄	162
IV.2.2.2.4. Evolution des paramètres du milieu.....	162
IV.2.2.2.5. Evolution des teneurs en métaux lourds	165
IV.2.2.3. Conclusion partielle	167
IV.2.3. Effet de la tylosine sur le procédé en réacteur batch	168
IV.2.3.1. Caractérisation du substrat	168
IV.2.3.2. Production de biogaz.....	169
IV.2.3.3. Evolution des teneurs en CH ₄	173
IV.2.3.4. Production de méthane.....	174
IV.2.3.5. Vitesses de production de méthane et profils de baisse de production	177
IV.2.3.5. Conclusion partielle	178
IV.2.4. Comparaison des profils de baisse des antibiotiques en batch	179
Conclusion générale et perspectives	183
Références bibliographiques	188
Annexes.....	197

Liste des figures

Figure I.1 : Schéma simplifié des processus de digestion anaérobie (Moletta, 2008).....	23
Figure I.2 : Modes d'action et cibles des antibiotiques (Potier et al., 2014).....	33
Figure I.3 : La tétracycline (Source : www.chemspider.com).....	36
Figure I.4 : La tylosine (Source : www.chemspider.com).....	37
Figure I.5 : La spiramycine (Karray et al., 2007).....	38
Figure I.6 : Région Baie (Bay-region) et Région K (K-region) de la molécule de phénanthrène.....	40
Figure II.1 : Tests BMP en incubation à 37 °C dans l'armoire thermorégulatrice	51
Figure II.3 : Schéma (non à l'échelle) de la coupe longitudinale du réacteur continu	53
Figure II.4 : Appareillage pour l'analyse des fibres	55
Figure II.5 : Dispositif de mesure de volume de gaz.....	57
Figure II.6 : Vue générale de l'ASE	60
Figure II.7 : Evaporateur TurboVap LV.....	61
Figure III.1 : Volumes cumulés de biogaz des tests de co-digestion du lisier avec l'herbe ensilée pendant 3, 5, 8 et 36 semaines.....	69
Figure III.2 : Evolution des teneurs en CH ₄ et CO ₂ des tests de co-digestion avec l'herbe ensilée	71
Figure III.3 : Production cumulée de méthane pour les tests de co-digestion anaérobie de lisier avec les herbes ensilées pendant 3, 5, 8 et 36 semaines	73
Figure III.4 : Rendement de méthane pour les tests de co-digestion anaérobie de lisier avec les herbes ensilées pendant 3, 5, 8 et 36 semaines	75
Figure III.6 : Evolution des teneurs en CH ₄ dans les duplicats de chaque mélange testé	86
Figure III.7 : Evolution des teneurs de CH ₄ pour les tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre.....	87
Figure III.9 : Rendements de méthane pour les tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre	91
Figure III.10 : Volumes cumulés de biogaz pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache.....	97
Figure III.11 : Evolution des teneurs en CH ₄ pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache....	98
Figure III.12 : Volume cumulé de CH ₄ pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache	100
Figure IV.1 : Pourcentage final de baisse de production de biogaz en présence de tétracycline	125
Figure IV.2 : Volume cumulé moyen de biogaz pour le test batch avec de la tétracycline (Tet).....	126
Figure IV.3 : Evolution du pourcentage de baisse de biogaz au cours du temps	127
Figure IV.4 : Temps nécessaire pour atteindre une production cumulée de biogaz	127
Figure IV.5 : Evolution des teneurs en CH ₄ des tests batch avec la tétracycline (Tet)	129
Figure IV.6 : Pourcentage de baisse de méthane en fonction de la concentration de tétracycline.....	130
Figure IV.7 : Volume cumulé de méthane pour les tests batch avec la tétracycline (Tet).....	131
Figure IV.8 : Evolution du pourcentage de baisse de méthane au cours du temps avec la tétracycline.....	132
Figure IV.9 : temps nécessaire pour atteindre une production cumulée de méthane	132
Figure IV.11 : Pourcentages de baisse au cours de l'expérience en fonction de la teneur en tétracycline.....	134
Figure IV. 12 : Production de biogaz pour le test en continu avec la tétracycline	135
Figure IV. 13 : Baisse de la production de biogaz au cours du temps pour le test en continu avec la tétracycline ...	135
Figure IV.14 : Pourcentage de baisse en fonction des concentrations de tétracycline en réacteur continu	137
Figure IV.15 : Production de méthane pour le test continu avec la tétracycline	137
Figure IV. 16 : Baisse de la production de méthane au cours du temps pour le test en continu avec la tétracycline	137

Figure IV.17 : Pourcentage de baisse en fonction des concentrations de tétracycline en réacteur continu	139
Figure IV.18 : Teneur en CH ₄ au cours du temps pour le test en continu avec tétracycline	139
Figure IV.19 : Taux de matières sèches et matière organique, et ratio C/N pour le test en continu avec la tétracycline	141
Figure IV.20 : Evolution du pH pour le test en continu avec la tétracycline	142
Figure IV.21 : Evolution de l'azote ammoniacal et de la conductivité au cours du test en continu avec la tétracycline	143
Figure IV.22 : Evolution des teneurs en aluminium, chrome, cuivre manganèse et nickel au cours du test en continu avec la tétracycline	144
Figure IV.23 : Evolution des teneurs en plomb et zinc au cours du test en continu avec la tétracycline	145
Figure IV.24 : Evolution du pourcentage de baisse du biogaz en fonction de la concentration de spiramycine	149
Figure IV.25 : Volume moyen cumulé de biogaz pour les tests batch avec la spiramycine	150
Figure IV.26 : Evolution du pourcentage de baisse de biogaz au cours du temps pour le test avec la spiramycine .	151
Figure IV.27 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de biogaz pour le test avec la spiramycine	151
Figure IV.28 :Teneur en méthane des tests batch avec la spiramycine	152
Figure IV.29 : Evolution du pourcentage de baisse de méthane en fonction de la concentration de spiramycine.....	153
Figure IV.30 : Volume moyen cumulé de méthane pour les tests batch avec la spiramycine	154
Figure IV.31 : Evolution du pourcentage de baisse de méthane au cours du temps pour le test avec la spiramycine	155
Figure IV.32 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de méthane pour le test avec la spiramycine	155
Figure IV.33 : Vitesses de production de méthane en m ³ _{CH₄} par jour par m ³ de réacteur et pourcentages de baisse par rapport au témoin des tests batch de spiramycine	156
Figure IV.34 : Production de biogaz pour le test en continu avec la spiramycine	158
Figure IV.35 : Evolution du pourcentage de baisse de biogaz pour le test en continu avec la spiramycine	158
Figure IV.36 : Evolution de la baisse de biogaz en fonction des concentrations de spiramycine	159
Figure IV.37 : Production de méthane pour le test en continu avec la spiramycine.....	160
Figure IV.38 : Pourcentage de baisse de méthane pour le test en continu avec la spiramycine	160
Figure IV.39 : Pourcentage de baisse de méthane en fonction de la concentration de spiramycine	161
Figure IV.40 : Evolution de la teneur en CH ₄ pour le test en continu avec la spiramycine	162
Figure IV.41 : Evolution des pourcentages de matières sèche et de matière organique pour le test en continu avec la spiramycine	163
Figure IV.42 : Valeurs de pH pour le test en continu avec la spiramycine	163
Figure IV.44 : Evolution de l'azote ammoniacal et de la conductivité pour le test en continu avec la spiramycine....	164
Figure IV.45 : Evolution des teneurs en aluminium, cuivre et chrome pour le test en continu avec la spiramycine ..	165
Figure IV.46 : Evolution du manganès, du nickel, du plomb et du zinc pour le test en continu avec la spiramycine .	166
Figure IV.47 : Baisse de biogaz en fonction de la concentration de tylosine	170
Figure IV.48 : Volume moyen cumulé de biogaz pour les tests batch avec la tylosine	171
Figure IV.49 : Baisse de la production de biogaz pour le test avec la tylosine	172
Figure IV.50 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de biogaz pour le test avec la tylosine.....	172
Figure IV.51 : Teneur en méthane des tests batch avec la tylosine	173
Figure IV.52 : Pourcentage final de baisse de méthane pour le test avec la tylosine	175
Figure IV.53 : Volume moyen cumulé de méthane pour les tests batch avec la tylosine	175
Figure IV.54 : Pourcentage de baisse de méthane pour le test avec la tylosine	176
Figure IV.55 : Temps nécesssaire pour atteindre un volume de méthane pour le test avec la tylosine.....	177

Figure IV.56 : Vitesses de production de méthane en $m^3_{CH_4}$ par jour et par m^3 de réacteur et pourcentages de baisse par rapport au témoin des tests batch de tylosine 177

Figure IV.57 : Profils de baisse de production des antibiotiques aux concentrations testées en batch 180

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Données de la littérature sur l'effet de quelques antibiotiques sur la production de biogaz pendant la digestion anaérobie. <i>Source : Sara et al., 2013</i>	35
Tableau I.2 : 16 HAPs considérés comme toxiques par l'US-EPA	41
Tableau II.1 : Composition des tests BMP	51
Tableau III.1: Caractérisation des résidus agricoles (Matières Sèches: MS, Matière Organique : MO, Ammonium et ration C/N)	66
Tableau III.2 : Analyse des fibres sur l'herbe ensilée séchée	66
Tableau III.3 : Composition des batch, ratio d'herbe ensilée, ammonium et pH en fin d'expérience	67
Tableau III.4 : Production de biogaz des tests de co-digestion et gain de production	68
Tableau III.5 : Production de méthane des tests de co-digestion et pourcentage d'amélioration	72
Tableau III.6 : Rendements de méthane des tests de co-digestion et pourcentage d'amélioration	76
Tableau III.7a : Teneurs limites en éléments traces métalliques pour les normes NF U 44-041 et NF U 44-051.....	77
Tableau III.7b : Teneurs en métaux en entrée et sortie de batch	79
Tableau III.8 : Caractérisation du lisier, de l'herbe et du lactosérum (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)	81
Tableau III.9 : Analyse des fibres sur l'herbe ensilée séchée	81
Tableau III.10 : Composition des batch, ratio d'herbe ensilée, ammonium et pH en fin d'expérience	82
Tableau III.11 : Production de biogaz des tests de co-digestion du lisier avec l'herbe ensilée et le lactosérum et pourcentage d'amélioration	83
Tableau III.12 : Production de méthane pour le test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe et le lactosérum de chèvre.....	88
Tableau III.13 : Rendements finaux des tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre	92
Tableau III.14 : Teneurs en métaux en entrée et sortie de batch	94
Tableau III.15 : Caractérisation des substrats (Matière Sèche: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)	95
Tableau III.16 : Composition des batch	96
Tableau III.17 : Production cumulée de biogaz pour le test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe et le lactosérum de vache	97
Tableau III.18 : Production cumulée de méthane pour le test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe et le lactosérum de vache	100
Tableau III.19 : Volumes cumulés de biogaz et de méthane sur 38 jours pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de chèvre	103
Tableau III.20 : Volumes cumulés de biogaz et de méthane sur 38 jours pour le test de co-digestion du lisier bovin avec le lactosérum de vache	103
Tableau IV.1 : Pourcentages de matières sèches (MS), matière organique (MO) et ratio C/N des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) de l'année 2012.....	107
Tableau IV.2 : Pourcentages de matières sèches (MS), matière organique (MO) et ratio C/N des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) de l'année 2013.....	108
Tableau IV.3 : Teneurs limites en métaux lourds (Norme NF U 44-051).....	109
Tableau IV.4 : Teneur en aluminium des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) 2013	110
Tableau IV.5 : Teneur en arsenic des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013	111
Tableau IV.6 : Teneur en cadmium des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013	112
Tableau IV.7 : Teneur en cadmium des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013	113

Tableau IV.8 : Teneur en cuivre des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013.	114
Tableau IV.9 : Teneur en manganèse des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013	115
Tableau IV.10 : Teneur en nickel des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept.) des années 2012 et 2013	116
Tableau IV.11 : Teneur en plomb des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013	117
Tableau IV.12 : Teneur en zinc des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013 ..	118
Tableau IV.13 : Teneurs en HAPs (exprimées en µg/g de matière sèche) des échantillons d'herbe de la campagne de mai 2013.....	120
Tableau IV.14 : Teneurs en HAPs (exprimées en µg/g de matière sèche) des échantillons d'herbe de la campagne de septembre 2013.....	121
Tableau IV.15 : Caractérisation du lisier pour le test en batch de la tétracycline (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ratio C/N).....	123
Tableau IV.16 : Composition des batch, ammonium et pH en fin d'expérience.....	124
Tableau IV.17 : Volume total de biogaz produit pour le test batch avec la tétracycline (Tet).....	125
Tableau IV.18 : Volumes de méthane produits pour les tests batch avec la tétracycline (Tet).....	129
Tableau IV.19 : Caractérisation du digestat et du lisier pour le test en continu de la tétracycline	135
Tableau IV.21 : Caractérisation des substrats (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)	148
Tableau IV.22 : Composition des batch, ammonium et pH en fin d'expérience.....	148
Tableau IV.23 : Volume de biogaz produit pour le test batch avec la spiramycine (Spi)	149
Tableau IV.24 : Volume moyen de méthane pour les tests batch avec la spiramycine (Spi).....	153
Tableau IV.19 : Caractérisation du digestat et du lisier pour le test en continu de la spiramycine	157
Tableau IV.20 : Caractérisation des substrats (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)	169
Tableau IV.21 : Composition des batch, ammonium et pH en fin d'expérience.....	169
Tableau IV.22 : Volume de biogaz produit pour le test batch avec la tylosine (Tyl).....	170
Tableau IV.23 : Volume moyen de méthane pour les tests batch avec la tylosine (Tyl)	174
Tableau IV.24 : Pourcentages de baisse en biogaz et méthane pour les concentrations d'antibiotiques testées	179
A.4. Coordonnées des points de prélèvements d'herbe de bordure de route.....	205
A.6. Paramètres de la méthode d'extraction par ASE	207
A.7. Conditions opératoires pour l'analyse des HAP par HPLC.....	208
A.8. Liste des antibiotiques utilisés sur la ferme expérimentale de la Bouzule.....	209

Liste des abréviations

ADF : Acid Detergent Fibers

AGV : Acides Gras Volatils

APHA : American Public Health Association

BMP : BioMethane Potential

CF : Crude Fibers

DCO : Demande Chimique en Oxygène

EPA : Environment Protection Agency

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

L_{CH_4}/Kg_{MO} : Litre de méthane produit par kilogramme de matière organique ajoutée

$m^3_{biogaz}\cdot jour^{-1}\cdot m^{-3}_{réacteur}$: mètre cube de biogaz produit par jour et par mètre cube de réacteur

$m^3_{CH_4}\cdot jour^{-1}\cdot m^{-3}_{réacteur}$: mètre cube de méthane produit par jour et par mètre cube de réacteur

mL_{CH_4}/g_{MO} : Millilitre de méthane produit par kilogramme de matière organique ajoutée

MO : Matière Organique

MS : Matières Sèches

NDF : Neutral Detergent Fibers

Ratio C/N: Ratio carbone – azote

rpm: revolution per minute (tour par minute)

Spi : Spiramycine

Tet : Tétracycline

TRH: Temps de Rétention Hydraulique

Tyl : Tylosine

Introduction générale

L'augmentation de la population mondiale entraîne un besoin de plus en plus grand de produits agroalimentaires et une utilisation de plus en plus importante d'énergie. Face à l'épuisement des ressources énergétiques fossiles dont la disponibilité est limitée et le réchauffement climatique qui peut être lié à leurs utilisations, l'intérêt pour les différentes filières d'énergies renouvelables est croissant. Depuis quelques années, il existe un renouveau général pour la digestion anaérobie, qui permet de produire un biogaz riche en ressources énergétiques (méthane, hydrogène) à partir de ressources renouvelables et de délaissés agricoles plus ou moins facilement fermentescibles. En effet, depuis septembre 2001, la directive européenne 2001/77/CE reconnaît le biogaz comme une énergie renouvelable. Encore appelée méthanisation, la digestion anaérobie présente des avantages énergétiques, environnementaux, économiques, politiques et sociaux. La mise en place d'une unité de méthanisation permet de réduire la durée de stockage à l'air libre des effluents d'élevage, et limite donc les odeurs et les émissions de méthane dans l'atmosphère. D'un point de vue politique, l'énergie provenant de la valorisation du biogaz permet à la France de se rapprocher de sa contrainte pour l'horizon 2020 qui est de 23% d'énergie renouvelable dans sa consommation totale. La loi de transition énergétique votée en juillet 2015 qui a défini cet objectif, vise l'atteinte de 32% en 2030. Même s'il ne représente que 2,2% des énergies renouvelables produites en France (Ministère de l'écologie, 2014), le biogaz est un produit avantageux car il est stockable, transportable, substituable aux carburants fossiles, et comparativement à d'autres filières d'énergie renouvelable, présente l'avantage de ne pas avoir une production intermittente. Ce procédé encourage le traitement des résidus agricoles, et la production d'énergie assure un complément de revenus pour les exploitants. La digestion anaérobie des effluents d'élevage est un peu moins développée en France que dans les autres pays d'Europe. L'Allemagne par exemple qui concentre plus de la moitié des installations possède 6700 digesteurs, contre 460 en France. Cependant, il convient de noter que le modèle écologique français est éthiquement préférable que celui allemand, en ce sens que seuls les résidus sont destinés aux digesteurs en France alors qu'en Allemagne des cultures pouvant être destinées à l'alimentation sont aussi incorporées. Cet écart est en phase d'être réduit car, conscient que la France est le premier potentiel agricole européen, le gouvernement réaxe sa politique de développement sur la méthanisation à la ferme. Dans cette optique, un appel à projet a été lancé pour mettre en place 1500 digesteurs d'ici 2017. La diversité des déchets organiques que peut transformer une unité de méthanisation donne lieu à des projets collectifs où les agriculteurs s'associent aux collectivités. Dans ce cas de figure, les agriculteurs fournissent typiquement des résidus agricoles et les collectivités fournissent des déchets verts ou parfois même des boues de station d'épuration. Face à ces divers enjeux, la problématique prioritaire consiste en la valorisation énergétique des résidus de divers origines et caractéristiques tout en maîtrisant la conduite du procédé de valorisation, mais aussi en respectant l'environnement. En effet, le digestat issu de la digestion anaérobie est un bon sujet à l'épandage agricole et permet

d'éviter l'apport d'engrais artificiels à fort impact environnemental. Cependant il peut – s'il contient des polluants – contaminer les sols, et ainsi les cours d'eau avoisinant ou les aquifères par ruissellement de pluie ou infiltration. Le croisement des différentes directives cadres sur l'eau (DCE) conduit à identifier une cinquantaine de substances considérées comme des micropolluants. Dans une logique préventive, une attention particulière est alors portée aux micropolluants présents dans les divers substrats destinés à la digestion. Ces micropolluants peuvent être regroupés en trois grandes catégories : organiques, minéraux et biologiques. La classe des organiques regroupe entre autres les antibiotiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tandis que la classe des minéraux regroupe les métaux lourds. On retrouve les antibiotiques dans le lisier suite à la médication des bovins de la ferme. Ces antibiotiques, de par leurs effets antibactériens peuvent dans un premier temps affecter la production d'énergie, et ensuite persister dans le digestat et constituer une source de pollution environnementale. Les HAPs sont faiblement présents dans le lisier, mais sont potentiellement plus présents dans les herbes exposées à une source de pollution de type gaz d'échappement des voitures. Ils sont majoritairement difficilement dégradables par la digestion anaérobie, et 16 d'entre eux ont été répertoriés comme dangereux. Quant aux métaux lourds initialement présents dans le lisier et les herbes de bordure de route, ils ne sont pas dégradés par les réactions de la digestion anaérobie, et se retrouvent alors dans le digestat. Si les principales réactions de la digestion anaérobie sont bien connues, l'impact des micropolluants sur le procédé reste peu étudié. La majorité des études a quelque peu élucidé leurs effets dans la digestion anaérobie des boues résiduaires de stations d'épuration urbaines, mais renseigne peu sur le cas du lisier bovin qui s'avère être une matrice hétérogène et complexe.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de démonstration de méthanisation à l'échelle d'une exploitation agricole. Il a été développé au sein de l'Université de Lorraine, en prenant comme appui la ferme expérimentale « La Bouzule ». Il vient donc en appui à la filière agricole qui assurait, fin 2012, 35% de la production de biogaz en France avec des installations de petite taille dites « à la ferme », et des installations de tailles plus importantes dites « centralisées ». Au nombre des 389 unités de méthanisation réparties sur le territoire français en fin d'année 2013, 140 sont des installations agricoles. Pour le projet « Bouzule », l'idée générale est de rendre la ferme autonome énergétiquement. Les résidus disponibles sur cette exploitation agricole de type « polyculture » sont le lisier et le fumier provenant d'un élevage de vaches laitières, de bovins à viande et de chèvres, ainsi que du lactosérum provenant de la fromagerie. Comme la disponibilité en résidus varie au cours de l'année, notamment en fonction de la présence des animaux dans les étables, il peut être nécessaire d'inclure des ressources provenant de l'extérieur, comme par exemple de l'herbe provenant des coupes le long des routes départementales avoisinantes.

La première partie des travaux de cette thèse a donc concerné l'étude des conditions opératoires assurant une valorisation efficace des substrats disponibles sur la ferme et de l'herbe provenant des routes environnantes de la ferme. Le digesteur de la Bouzule n'étant pas en fonctionnement

au début de la thèse, les différentes configurations d'alimentation de ce dernier ont été testées en laboratoire. Le lisier bovin, l'herbe de bord de route, et les lactosérums de chèvre et de vache ont été étudiés en co-digestion anaérobie qui consiste en la digestion simultanée des substrats.

La seconde partie qui concerne l'étude des micropolluants présente le suivi en termes de métaux lourds et de HAPs des herbes de bord de routes destinées à servir de co-substrat pour le digesteur. Le suivi a été effectué sur deux ans et permet d'évaluer l'impact qu'auront ces herbes sur la qualité sanitaire du digestat, si elles sont incorporées au digesteur. Ensuite cette seconde partie a étudié en réacteur batch et en réacteur continu l'impact des trois antibiotiques les plus utilisés sur la ferme de la Bouzule. L'étude vise à identifier dans quelles proportions ces antibiotiques affectent la production de biogaz (et de méthane), et d'émettre des approches explicatives sur le déroulement de leurs effets.

Chapitre I : Revue bibliographique

Ce premier chapitre présente dans un premier temps les principales étapes de la digestion anaérobie, ainsi que les paramètres influents qui assurent le bon fonctionnement du procédé. Il présente également la co-digestion anaérobie qui est de plus en plus utilisée à des fins de rentabilité et de gestion de tous les déchets présents sur une ferme.

Dans un second temps, la recherche est portée sur les micropolluants qu'on peut retrouver dans les méthaniseurs de ferme, leur occurrence, leurs effets et leur biodégradabilité. Un accent particulier est posé sur les antibiotiques dont l'utilisation est croissante face à l'intensification des élevages.

I.1. La digestion anaérobie

Appelée également méthanisation, il s'agit d'un processus biologique naturel de dégradation de la matière organique en absence d'oxygène et de molécules oxydées, réalisé par une communauté microbienne complexe. Elle conduit à la production d'un biogaz énergétique riche en méthane et un effluent qu'on appelle digestat, assimilable à de l'engrais organique (Moletta, 2008). Ce digestat est composé des molécules organiques non dégradées et des composés minéraux.

I.1.1. Les étapes de la digestion anaérobie

On distingue généralement, quatre étapes successives dans la digestion anaérobie comme le montre la figure I.1: l'hydrolyse, l'acidogenèse, l'acétogenèse et la méthanogenèse (Moletta, 2008). Ces processus font appel à un ensemble de micro-organismes interdépendants, aux métabolismes particuliers et spécifiques (pH, température, sensibilité à des composés particuliers...), classés dans trois groupes à savoir :

- les bactéries hydrolytiques et fermentatives (hydrolyse et acidogenèse) ;
- les bactéries acétogènes (acétogenèse) ;
- les archées méthanogènes acétoclastes ou hydrogénophiles (méthanogenèse).

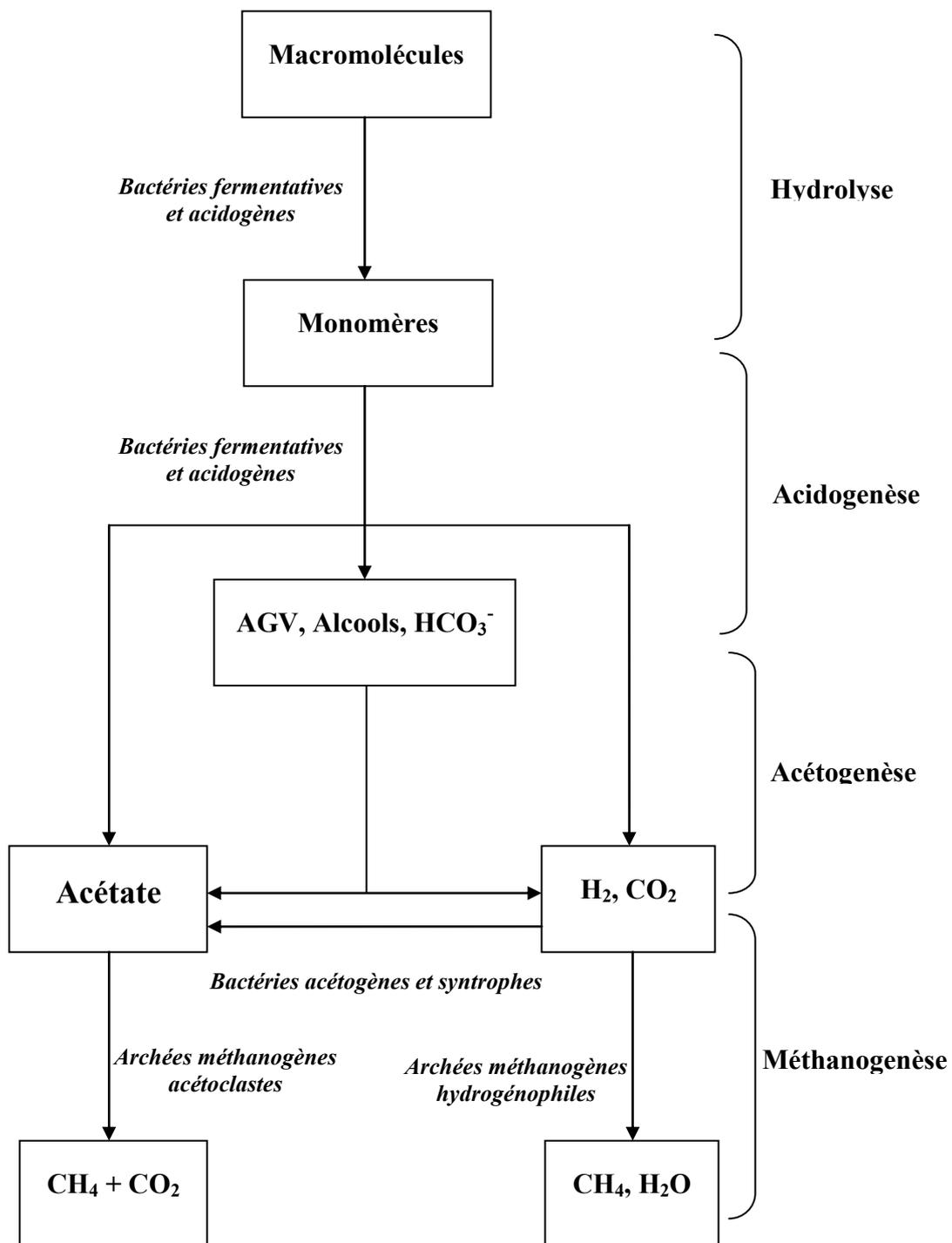


Figure I.1 : Schéma simplifié des processus de digestion anaérobie (Moletta, 2008).

Les quatre phases de la méthanisation sont étroitement liées, mais présentent des cinétiques de réaction différentes. Les voies de formation du méthane sont les voies acétoclaste et hydrogénéophile qui contribuent respectivement à 70% et 30% de la production.

I.1.1.1. L'hydrolyse

Cette première étape réductrice est la seule étape extra-cellulaire et est un processus de dépolymérisation (Palmisano et Barlaz, 1996). Les bactéries hydrolytiques secrètent des enzymes qui dégradent les polymères organiques en monomères. Elle est souvent l'étape limitante dans la digestion anaérobie puisque l'hydrolyse des macromolécules et des particules organiques est généralement lente du fait de la structure de la matière organique (Moletta, 2008). Selon la nature biochimique du substrat et l'accessibilité de la matière organique aux enzymes hydrolytiques, les vitesses réactionnelles vont varier. Les constantes de cinétique de cette étape sont les plus faibles et varient entre $0,02 \text{ j}^{-1}$ et $2,88 \text{ j}^{-1}$ (Moletta, 2011). Cette étape permet la solubilisation des macromolécules permettant alors leur transport sous forme d'oligomères au travers de la membrane bactérienne. Les macromolécules sont coupées progressivement en monomères solubles par des enzymes extracellulaires (cellulases, hydrolases, amylases...).

Les principales espèces microbiennes impliquées sont aérobies, anaérobies facultatives et appartiennent aux genres *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Enterobacteroides*, *Propionibacterium* et *Butivibrio*. Leur gamme de pH optimal de fonctionnement se situe entre 4,5 et 6,3, et leur temps de reproduction est de quelques heures. Elles présentent une sensibilité à la présence de lignine qui ralentit considérablement leur action de dégradation.

I.1.1.2. L'acidogénèse

Réalisée par le même genre de micro-organismes rencontrés pendant la phase d'hydrolyse, l'étape d'acidogénèse permet de métaboliser, dans la cellule bactérienne, les monomères issus de l'étape d'hydrolyse. Les métabolites finaux sont des acides gras à courtes chaînes (C2 à C6) de type AGV (acides acétiques, butyriques, valériques...), des alcools, de l'azote ammoniacal, du dihydrogène et du dioxyde de carbone. Elle peut provoquer, en cas de surcharge organique, un dégazage d'hydrogène et une diminution du pH, qui, lié à la présence d'acétate ou d'autres AGV, peut provoquer une inhibition des microorganismes acétogènes et méthanogènes, et donc un arrêt des processus de digestion anaérobie (Thiele, 1991). Les constantes de cinétiques pour cette étape vont de $0,56 \text{ j}^{-1}$ à $70,6 \text{ j}^{-1}$ (Moletta, 2011). Cette étape présente une sensibilité à la présence de H_2S , de NH_3 , de sels et d'antibiotiques.

I.1.1.3. L'acétogénèse

Cette phase conduit à la production des substrats principaux de la méthanogénèse à savoir : l'acide acétique, l'hydrogène et le dioxyde de carbone.

L'acétogénèse fait intervenir trois groupes de microorganismes :

- les « homoacétogènes », qui utilisent des hexoses simples, des composés monocarbonés et l'hydrogène pour former de l'acétate comme produit exclusif,

- les « acétogènes syntrophes », qui transforment les AGV en acétate et H₂,
- les sulfato-réductrices qui peuvent avoir une des fonctions précédentes (en présence de sulfates).

Les vitesses réactionnelles d'acétogénèse sont soumises à des problèmes d'inhibition par la présence d'hydrogène qui modifie l'équilibre thermodynamique de la réaction globale (transfert interspécifique d'hydrogène). Leurs constantes de cinétiques sont comprises entre 7,7 j⁻¹ et 17,1 j⁻¹ (Moletta, 2011). Les bactéries syntrophiques effectuent des réactions à variation d'enthalpie libre positive. Dans les milieux naturels, elles nécessitent pour pouvoir se réaliser une seconde bactérie qui élimine une des molécules produites, transformant ainsi la réaction endergonique en réaction exergonique, et donc de générer l'énergie nécessaire au microorganisme (Moletta, 2002).

Les acétogènes présentent des temps de division variant entre 1 et 4 jours, d'où leur reproduction plus lente que celle des hydrolytiques, et leur gamme de pH optimal se situe entre 6,8 et 7,5. L'accumulation d'hydrogène conduit irrémédiablement à l'arrêt de l'acétogénèse, induisant une accumulation importante d'AGV et donc une baisse du pH, inhibant ainsi l'étape de méthanogénèse (Moletta, 2011). Outre l'hydrogène, elles sont aussi sensibles à la présence de H₂S, de NH₃, de sels, d'antibiotiques et à la variation de température. Cette phase est donc une étape clé de la digestion anaérobie.

I.1.1.4. La méthanogénèse

C'est l'étape finale et spécifique de la fermentation méthanique. Elle conduit à la réduction du carbone en méthane et elle est réalisée par des microorganismes très spécialisés. Le temps de division des microorganismes est le plus lent (4 – 15 jours) et leurs constantes cinétiques sont comprises entre 2 j⁻¹ et 453 j⁻¹ (Moletta 2011). Leur gamme de pH optimal est comprise entre 6,8 et 7,5, et elles présentent une forte sensibilité aux variations de pH, à la température, et aux fortes teneurs de cuivre et de sels.

Anaérobies stricts, ils appartiennent à un même groupe d'archaébactéries qui se subdivise en : méthanobactériales (*Methanobacterium*), méthanococcales (*Methanococcus*) et méthanomicrobiales (*Methanomicrobium*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*).

Il existe deux grandes voies de formation du méthane :

- La voie acétoclastique où l'acide acétique est transformé en méthane :



- La voie hydrogénophile où c'est le mélange CO₂ / H₂ qui est utilisé :



Lors de la production du méthane, la voie acétoclastique est majoritaire représente 65 à 70 % de la production totale (Pavlostathis et Giraldo-Gomez, 1991). Cependant, l'activité des méthanogènes hydrogénophiles est importante car elle est responsable de la teneur en hydrogène du milieu et de son maintien à une pression partielle basse. Un dysfonctionnement de cette étape entraîne une augmentation de la pression partielle de l'hydrogène qui est un inhibiteur des bactéries acétogènes. Ceci entraînera un début de dysfonctionnement puis l'arrêt de l'acétogénèse (Burton & Turner, 2003), qui impactera par la suite la méthanogénèse.

I.1.2. Les paramètres influents de la digestion anaérobie

I.1.2.1. Température

Selon la température de fonctionnement du réacteur, on peut distinguer trois types de digestion anaérobie à savoir : psychrophile (5°C à 20°C), mésophile (20 à 45°C) et thermophile (45°C à 60°C). Les microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie sont très sensibles aux variations de température qui affectent la décomposition de la matière organique, et donc la production d'hydrogène et de méthane (Mao et al., 2015).

La plupart des réacteurs fonctionnent en mésophile (30 – 40°C) ou en thermophile (50 – 60°C) avec des optima de fonctionnement de 37°C et 55°C respectivement. La digestion thermophile permet d'obtenir de meilleures performances en termes de rendement de méthane et d'élimination de la DCO (Moletta, 2011), et résulte en une meilleure hygiénisation¹ du digestat (Sahlström, 2003 ; Bagge et al., 2005). Aussi, l'augmentation de la température accélérant les vitesses de réaction (loi d'Arrhenius), elle permet de travailler à des temps de séjour plus courts que dans les réacteurs mésophiles. Le passage de 38 °C à 55 °C a permis à Hedge et Pullammanappalil (2007) de produire 95% du méthane escompté après 11 jours au lieu de 27 jours initialement en mésophile.

Néanmoins, la digestion mésophile est plus utilisée, car elle assure une meilleure stabilité de la population microbienne et limite les coûts relatifs à l'apport en chaleur nécessaire pour le maintien de la température du réacteur, notamment dans les pays froids. De plus, à température mésophile, les risques d'inhibition par l'ammoniaque suite à la minéralisation des protéines sont réduits car moins récurrents que dans les réacteurs thermophiles (Angelidaki et Ahring, 1994 ; Sanchez et al., 2000). La meilleure configuration pour optimiser la digestion anaérobie consiste en un réacteur thermophile pour les premières étapes d'hydrolyse et acidogénèse pour assurer la dépolymérisation des particules organiques, et en un réacteur mésophile pour la méthanogénèse pour assurer la stabilité de la production

¹ L'hygiénisation des boues est le traitement qui permet de réduire à un niveau non détectable les agents pathogènes présents. Elle **se fait souvent** par chaulage, séchage ou compostage thermique.

I.1.2.2. pH

Le pH influence le métabolisme des différents microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie, et donc la production de méthane. Le pH du milieu réactionnel est un paramètre clé de l'efficacité du procédé puisque selon les étapes de la digestion, les populations microbiennes ne présentent pas le même pH de fonctionnement optimal. Le taux de croissance des méthanogènes est fortement réduit à un pH inférieur à 6,6 (Mosey et Fernandes, 1989) et est optimal autour de pH 7,0. Quant aux bactéries hydrolytiques et acidogènes, leur taux de croissance optimal survient à un pH compris entre 5,5 et 6,5 (Kim et al., 2003 ; Yu et Fang, 2002). L'utilisation d'une série de deux digesteurs (le premier pour l'hydrolyse et l'acidogénèse, et le second pour l'acétogénèse et la méthanogénèse) est donc la configuration idéale pour assurer une digestion efficace, mais rajoute des contraintes économiques. Assurer une bonne digestion avec un digesteur unique revient donc à définir un pH favorable à la survie et à l'activité des espèces microbiennes de la digestion anaérobie. Pour une cuve de digestion, le pH pour le déroulement de la digestion se situe entre 6,5 et 8 (Weiland, 2010), mais pour un fonctionnement optimal du procédé, il doit être idéalement compris entre 6,8 et 7,2 (Chen et al., 2008).

I.1.2.3. L'azote ammoniacal

L'ammoniaque et l'ion ammonium constituent les deux formes d'azote inorganique soluble. Cependant en digestion anaérobie, l'ammoniaque a été désignée comme la principale source d'inhibition à cause de son caractère hydrophobe et de sa capacité à traverser la membrane cellulaire et à pénétrer le contenu cellulaire des microorganismes (Gallert et al., 1998, Chen et al., 2008). Les archées méthanogènes sont les plus sensibles à sa présence. En deçà de 200 mg/L, l'azote ammoniacal favoriserait la digestion anaérobie (Liu et Sung, 2002). Les concentrations inhibitrices présentent une grande variabilité allant de 1,7 à 14 g/L, du fait des nombreux facteurs contrôlant l'inhibition (Chen et al., 2008). Ces facteurs sont le pH, la température, la présence d'ions et l'acclimatation. Moletta (2008) renseigne qu'une concentration entre 1500 mg/L et 3000 mg/L est modérément inhibitrice, tandis qu'au-delà de 3000 mg/L on observe une forte inhibition.

I.1.2.4. Les Acides Gras Volatils (AGV)

Les acides gras volatiles sont des produits intermédiaires importants de la digestion anaérobie. Le fonctionnement du procédé dépend de l'efficacité de la régulation entre leur formation et leur dégradation. Leur accumulation réduit le pouvoir tampon du digesteur. S'en suit une diminution du pH, qui lorsqu'elle devient importante entraîne l'inhibition de la méthanogénèse. Cette inhibition survient à des concentrations en AGV totaux de l'ordre de 2 à 3 g/L (Degrémont, 1989). L'accumulation en AGV est liée à un excès de charge organique, notamment pour les méthanogènes acétoclastiques qui ne sont plus en nombre suffisant pour métaboliser l'acétate (Angelidaki et Ahring, 1995).

Des études ont montré que les acides propionique et butyrique sont les plus inhibiteurs pour les méthanogènes. Boone et Xun (1987) ont montré qu'une concentration en acide propionique de 3 g/L est inhibitrice pour le procédé. Pullammanappali et al., (2001) ont par la suite trouvé que l'accumulation d'acide propionique n'était pas la cause, mais plutôt une conséquence de l'inhibition.

I.1.2.5. La charge organique

La charge organique représente la quantité de biomasse fermentescible introduite quotidiennement dans un réacteur par unité de volume, exprimée en $\text{kg.m}^{-3}.\text{jour}^{-1}$ de MS ou de MO. C'est un facteur qui permet d'évaluer la quantité maximale de matière organique qu'un procédé donné peut transformer sans qu'il n'y ait d'incidence sur les performances. Il faut noter qu'au-delà de 15% de teneur en matières sèches, on parle de digestion par voie sèche par opposition à la digestion par voie humide. Un excès de charge organique se produit lorsque la quantité de matière organique entrante surpasse la capacité de dégradation de la communauté microbienne. La dégradation est donc partielle et entraîne une accumulation des AGV, l'acidification du réacteur, la chute du pH, et donc la diminution des rendements de méthane et d'épuration.

Les charges organiques généralement appliquées aux digesteurs vont de 1 à 5 $\text{kg}_{\text{MO}}.\text{m}^{-3}.\text{jour}^{-1}$ (Tchobanoglous et al., 2003 ; FNR, 2006). Ces valeurs sont choisies inférieures aux capacités maximales des digesteurs pour éviter l'instabilité du procédé (Björnsson et al., 2000).

I.1.2.6. Le Temps de Rétention Hydraulique

Le Temps de Rétention Hydraulique (TRH) représente le temps de résidence moyen du substrat dans le digesteur. Selon que le digesteur soit mésophile ou thermophile, il est déterminant dans le taux de conversion de la biomasse. En effet, le TRH doit être suffisamment long afin de permettre la mise en place de la communauté microbienne, et d'éviter une surcharge hydraulique. Un TRH trop court aura pour conséquence le lessivage des méthanogènes, dont le temps de doublement de population avoisine 30 jours (Gerardi, 2003), et par la suite une accumulation des AGV.

Le TRH est généralement court avec les substrats facilement biodégradables (15 – 30 jours), et peut atteindre 100 jours pour les substrats difficilement biodégradables (Lindorfer et al., 2007 ; FNR, 2010 ; Weiland, 2010). Outre le temps de développement des microorganismes méthanogènes (15 jours minimum), le TRH minimum est également fonction des substrats à valoriser. Pour un digesteur destiné à valoriser des substrats lignocellulosiques dont la dégradation est lente, il conviendra d'effectuer un prétraitement destiné à améliorer leur digestibilité si on veut opérer à des temps de séjour avoisinants 30 jours.

I.1.2.7. Le ratio C/N

Pour assurer leurs fonctions métaboliques, les bactéries nécessitent un rapport convenable dans la quantité de carbone et d'azote présente dans le milieu. Le maintien de ce ratio à une valeur optimale est nécessaire pour ne pas provoquer l'accumulation du carbone ou de l'azote qui pourrait conduire à une inhibition de la digestion (Hassan et Nelson, 2012). Un ratio C/N trop faible augmente le risque d'inhibition à l'ammoniacque et limite l'utilisation du carbone par les méthanogènes, tandis qu'un ratio trop élevé affecte le maintien de la biomasse cellulaire et diminue la production de biogaz (Mao et al., 2015). Généralement, le ratio C/N considéré comme optimal pour la digestion anaérobie est compris entre 20 et 35 (Mao et al., 2015). Cependant, il a été montré que la gamme optimale peut être étendue, et varier entre 15 et 45 selon la technologie du réacteur et la nature des substrats (Atandi et al., 2012).

I.1.3. La co-digestion anaérobie

La viabilité économique de la digestion anaérobie passe par l'amélioration et/ou la maîtrise de la quantité d'énergie fournie (Mata Alvarez et al., 2000). Dans le cas d'une méthanisation à la ferme et pour faire face à la variabilité en quantité et en qualité du lisier au cours de l'année, selon que les animaux sont en stabulation ou pas, il convient de trouver un moyen de maintenir l'énergie délivrée par le procédé. La co-digestion anaérobie répond à cette problématique. Elle consiste en l'ajout simultané de plusieurs substrats organiques dans le digesteur, afin d'assurer une alimentation constante en matières organiques.

Dans les digesteurs où le lisier est le substrat principal, la co-digestion est réalisée en ajoutant de l'herbe, du lactosérum, des résidus de culture ou encore des déchets solides municipaux (Callaghan et al., 1999 ; Hartmann et al., 2005 ; Lehtomaki et al., 2007 ; Parawira et al., 2008 ; Neves et al., 2009). Ces études ont montré que la co-digestion améliorait les performances du procédé, et donc la viabilité économique. La production de méthane qui en résulte est supérieure à la somme des productions des substrats digérés séparément (Mata Alvarez et al., 2014). En effet, la co-digestion représente une solution pour les problèmes rencontrés lors de la monodigestion de substrats, notamment le faible pouvoir tampon dans le cas de l'herbe (Thamsiriroj et al., 2012) et le faible apport en matière organique dans le cas du lisier (Mata Alvarez et al., 2014). C'est un procédé qui permet une meilleure gestion des résidus agricoles générés sur une exploitation, car considéré comme un paramètre clé dans la rentabilité technico-économique des installations de méthanisation (Balussou et al., 2012).

Les co-substrats communément utilisés en co-digestion sont donc caractérisés par une forte teneur en carbone, facilement biodégradable de préférence. Ce qui leur confère un fort ratio C/N, un faible pouvoir tampon et une forte production d'AGV selon le niveau de biodégradabilité. Ces paramètres s'accordent bien avec le lisier qui présente un faible ratio C/N, et possède un fort pouvoir tampon qui contribue à stabiliser le pH à une valeur favorable aux méthanogènes.

L'utilisation de co-substrat permet aussi de réduire les risques d'inhibition à l'azote ammoniacal, grâce à l'effet de dilution consécutive à leur ajout (Wang et al., 2012 ; Astals et al., 2012).

L'amélioration de la production de méthane en co-digestion est surtout liée à l'ajout de matière organique, qui augmente donc la charge organique. Néanmoins au-delà d'un certain seuil, la surcharge organique peut conduire à l'inhibition du procédé (Robra et al., 2010 ; Marañon et al., 2012).

1.1.3.1. Utilisation de l'herbe comme co-substrat

Parmi les sources végétales énergétiques (après le maïs et le blé), l'herbe est aussi un substrat à fort potentiel énergétique. Suite à une analyse de cycle de vie, il a été montré que l'utilisation d'herbe comme co-substrat améliore les performances environnementales de la digestion anaérobie (De Vries et al., 2012). L'herbe est chargée en carbone et représente un sujet intéressant pour la co-digestion. Cependant, son incorporation dans le méthaniseur n'implique pas forcément une amélioration du rendement du procédé, du fait de sa nature lignocellulosique. En effet, jusqu'à 75% de la matière organique contenue dans l'herbe est sous forme de cellulose, d'hémicellulose et de lignine (Xie et al., 2011). L'hydrolyse microbienne des matériaux lignocellulosiques est lente (Atandi et al., 2012), car ils sont difficiles à dégrader par la population microbienne (Aslanzadeh et al., 2011). La structure cristalline de la cellulose qui agit comme une barrière et la nature hydrophobe de la lignine, confèrent aux matériaux lignocellulosiques une faible digestibilité et impliquent une faible vitesse d'adaptation de la population microbienne (Lindorfer et al., 2008). La forte liaison entre la lignine et la (hémi)cellulose contribue aussi au ralentissement de la dégradation des fibres (Fan et al., 1981).

Plusieurs techniques de pré-traitement ont dès lors été élaborées pour améliorer la biodégradabilité de l'herbe. L'étape de prétraitement est cruciale pour effectuer la conversion du matériel lignocellulosique tout en conservant un temps de séjour moyen. Cette étape permet la séparation et la solubilisation des composés majeurs que sont la lignine, l'hémicellulose et la cellulose, et améliore ainsi la digestibilité et la production de méthane. Les méthodes physiques de prétraitement comme le broyage, l'irradiation et l'extrusion sont souvent utilisées pour réduire la cristallinité et améliorer les transferts de masse ; ce qui permet une meilleure hydrolyse enzymatique. Il arrive néanmoins à grande échelle, selon la méthode physique utilisée, que l'énergie à fournir soit supérieure au contenu énergétique théorique du matériel à prétraiter. On distingue aussi des méthodes physico-chimiques comme l'explosion à vapeur ou à l'ammoniaque, des méthodes chimiques utilisant une solution acide ou alcaline ou ionique, ou encore biologique utilisant des microorganismes spécifiques qui modifient la structure ou la composition du matériel lignocellulosique (Menon et Rao, 2012). Parmi les techniques qui ont prouvé leur efficacité, la réduction de taille et l'ensilage sont celles qui nécessitent le moins d'apport énergétique :

- La réduction de la taille des particules

Elle s'effectue par broyage des échantillons et résulte en l'obtention de particules de tailles avoisinant 2 cm. Le broyage détériore la structure cristalline de la cellulose agissant comme une barrière, et crée donc des brèches à travers lesquelles la cellulose et l'hémicellulose deviennent accessibles pour les microorganismes. Ceci permet une augmentation de la surface de contact avec les microorganismes, et donc l'accélération des réactions (Moorhead et al., 1993 ; Mshandete et al., 2006), tout en facilitant le mélange du digesteur.

- L'ensilage de l'herbe

C'est une technique qui permet de préserver la valeur nutritive des plantes pour une utilisation ultérieure. Le procédé consiste à placer les plantes en conditions anaérobies, où des bactéries lactiques transforment les sucres solubles en acides organiques majoritairement lactiques pour atteindre un pH inférieur à 5 (Weinberg et al., 2003). La présence d'air dans l'ensilage favorise le développement des microorganismes aérobie (les champignons et les levures) (Woolford et al., 1990). Les réactions de dégradation aérobie réduisent la teneur en nutriments des plantes ensilées et la présence de champignons implique une altération de sa qualité biologique. Pour assurer une fermentation rapide de l'ensilage et sa stabilisation, les additifs sont de plus en plus utilisés. Ces additifs représentent 9% des coûts de l'ensilage et se déclinent en plusieurs types : stimulants pour la fermentation, inhibiteurs de fermentation, inhibiteurs de dégradation aérobie, nutriments ou absorbants. La qualité d'un ensilage peut ainsi être évaluée à partir de l'apparence, l'odeur, la texture, la perte de masse, le pH, les produits finaux et la microbiologie.

L'utilisation d'herbe ensilée comme co-substrat permet d'améliorer la production de biogaz, car le procédé favorise la production de sources de méthane notamment des alcools et des acides organiques (Hermann et al., 2011). Des études antérieures ont évalué l'effet du ratio d'herbe et de la charge organique en co-digestion anaérobie du lisier bovin et de l'herbe (Wang et al., 2010 ; USDA-NASS, 2014). L'étude la plus pertinente a montré une amélioration de la production de méthane lorsque l'apport de matière organique de l'herbe représente moins de 40% de l'alimentation, avec un optimum à 30% (Lehtomaki et al., 2007). De Moor et al. (2013) ajoutent que l'addition d'enzyme influence positivement la réduction de la teneur en matière sèche, et donc de la viscosité.

I.1.3.2. Utilisation du lactosérum comme co-substrat

Outre la production de lait, les fermes agricoles peuvent posséder une chaîne de production de fromage qui génère du lactosérum comme résidu. On distingue le lactosérum doux et le lactosérum acide selon le procédé de fabrication qui conditionne leur teneur en acide lactique. Le fort potentiel de biodégradabilité du lactosérum acide due à sa forte teneur en lactose (66 à 74%) (FAO, 1998), en fait un sujet intéressant pour la co-digestion anaérobie. Cependant la monodigestion du lactosérum, sans correcteur de pH, conduit à de faibles rendements puisque le

procédé est exposé à une acidification rapide (Comino et al., 2012). Considérant le pouvoir tampon du lisier, la co-digestion se présente donc comme une alternative intéressante pour la valorisation du lactosérum. Le lactosérum représente 5% des co-substrats utilisés (Mata Alvarez et al., 2014).

Son utilisation à hauteur de 65% du volume total d'alimentation a résulté en une augmentation de biogaz de 79% (Comino et al., 2012). En passant de l'utilisation d'un réacteur à un système de deux réacteurs en série, Bertin et al. (2013) ont amélioré la production de méthane de 40% en co-digérant le lisier bovin et le lactosérum dans un rapport volumique 50:50.

I.2. Impact des micropolluants sur le procédé de digestion anaérobie

I.2.1. Généralités sur les micropolluants

Les micropolluants (ou encore micro-contaminants) sont des molécules présentes dans les écosystèmes, à des concentrations traces allant du ng/L au µg/L, et qui sont susceptibles de causer des nuisances aux organismes (Luo et al., 2014). Les effets nocifs peuvent être observables à court, moyen, ou le plus souvent à long terme. Les effets des micropolluants sur les écosystèmes sont très variables, et ne dépendent pas uniquement du niveau de concentration mais aussi de la biodisponibilité, la bioaccumulation, la persistance, la spéciation, et d'autres paramètres physiques et chimiques (Gourlay, 2004). Les micropolluants, de par leurs origines, peuvent être classés en 3 grands groupes à savoir : organique, minéral, et biologique.

I.2.2. Effet des antibiotiques utilisés sur les fermes bovines

Les antibiotiques sont des substances organiques qui possèdent une activité antibactérienne capable de tuer les bactéries ou d'inhiber leur croissance et leur métabolisme (Kanfer et al., 1998 ; Du et Liu, 2012).

Selon leurs modes d'action, on peut les diviser en cinq groupes (Figure I.2) : (1) inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, (2) inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique, (3) inhibition de la synthèse protéique, (4) inhibition du métabolisme de l'ADN et (5) inhibition compétitive par production d'antimétabolites (Potier et al., 2014).

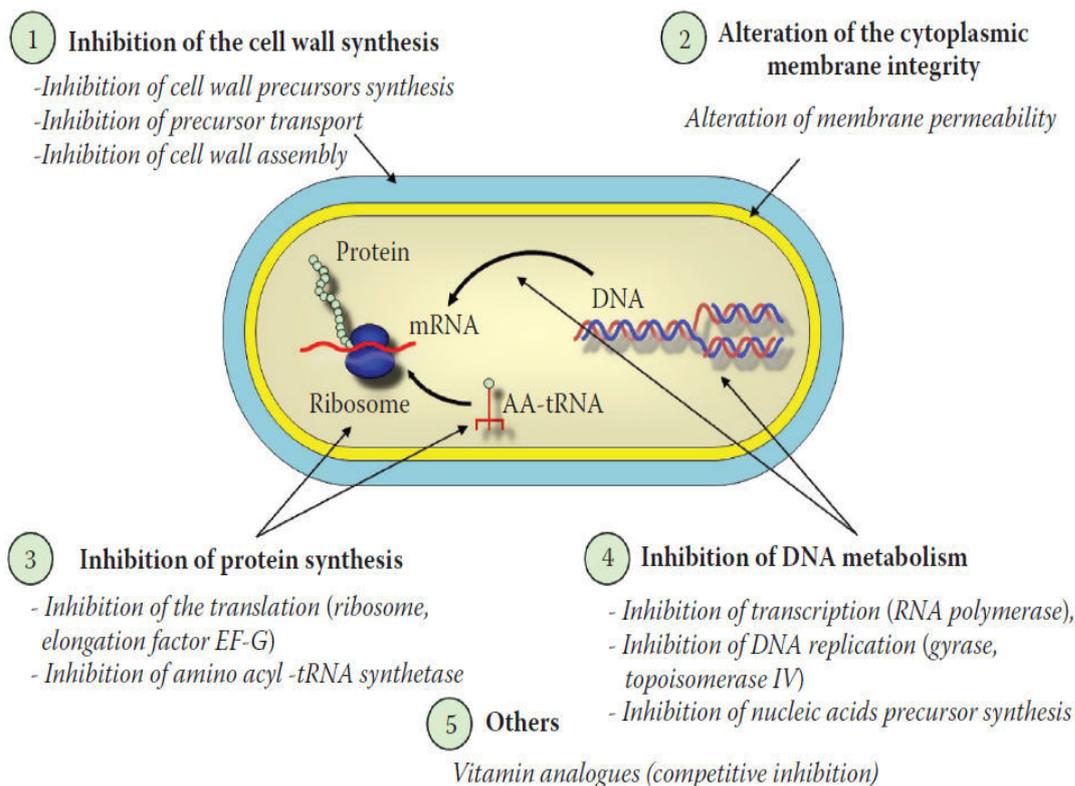


Figure I.2 : Modes d'action et cibles des antibiotiques (Potier et al., 2014)

Le premier groupe inhibe la synthèse des peptidoglycanes qui sont les éléments constitutifs de la paroi cellulaire des bactéries. Selon l'antibiotique utilisé, l'inhibition survient au niveau de la synthèse des précurseurs, du transport des précurseurs à travers la membrane cellulaire ou de l'assemblage des précurseurs pour former le polymère de la paroi cellulaire. Le deuxième groupe d'antibiotiques est constitué de molécules qui s'insèrent dans les couches phospholipidiques de la membrane cytoplasmique des bactéries, et en modifient la perméabilité. Le troisième groupe qui inhibe la synthèse protéique agit à plusieurs niveaux, selon que la cible soit le ribosome, le facteur de translation-élongation EF-G ou une aminoacyl-ARNt synthétase. Le quatrième groupe inhibe le métabolisme de l'ADN en interférant avec la synthèse des acides nucléiques précurseurs, la transcription et la réplication de l'ADN. Le cinquième et dernier groupe est celui des molécules antimétaboliques, comme les vitamines et analogues, responsables d'inhibition compétitive.

Les antibiotiques sont l'une des classes de médicaments à pouvoir être utilisées à des fins thérapeutiques pour le traitement des maladies ou comme des promoteurs de croissance lorsqu'ils sont utilisés au-delà des doses prescrites et sur une longue période (Chopra et al., 2001). Malgré les restrictions légales européennes en 1998, ils sont toujours utilisés en grande quantité pour stimuler la croissance du bétail, surtout dans les élevages intensifs où l'utilisation se fait indépendamment de la santé du bétail (De Liguoro et al., 2003). De surcroît, dans le but d'essayer d'assurer un effet thérapeutique, les quantités administrées sont supérieures aux recommandations pour annuler l'antibio-résistance des germes pathogènes ; ce qui augmente la

dispersion des résidus actifs dans les écosystèmes et par là même renforce l'antibio-résistance (Witte, 2000). L'administration intraveineuse des antibiotiques et leur faible biodisponibilité dans l'organisme résultent en l'excrétion via les urines et les fèces de 30 à 90% du composé parent et/ou de métabolites (Halling-Sorensen et al., 2001 ; Winckler et Grafe, 2001 ; Thiele-Bruhn, 2003 ; Sarmah et al., 2006 ; Arikian et al., 2006 et 2009). Certains métabolites ont une activité supérieure à celle de leur composé parent. Ceux sous forme conjuguée peuvent revenir à la forme du parent pendant la phase de stockage (Boxall et al., 2002).

La quantification des teneurs en antibiotiques dans les matrices aussi complexes que le lisier n'est pas standardisée et les rendements des méthodes d'extraction sont faibles et variés (31 % – 83 %) (Massé et al., 2014). La comparaison des résultats entre différentes études peut s'avérer difficile, surtout quand les techniques de conditionnement de l'échantillon sont différentes. Néanmoins, il ressort que la présence d'antibiotiques dans les écosystèmes agricoles est reliée à l'utilisation de lisier comme amendement organique (Hospido et al., 2010). Ils présentent généralement de longs temps de demi-vie. La répétition de la fertilisation conduit à l'accumulation des antibiotiques et de leurs métabolites, toutes aussi toxiques envers les divers microorganismes (Ge et al., 2010). Ceci représente une menace pour l'écosystème car cela conduit à la perturbation de la structure microbienne des sols par les effets délétères induits. Des tests de germination et de culture de plantes ont mis en évidence le caractère phytotoxique des sols (Liu et al., 2009 ; Wei et al., 2009). Cette contamination s'étend par la suite aux ressources en eaux suite aux phénomènes de lessivage des sols consécutifs aux événements pluvieux.

La digestion anaérobie peut permettre de diminuer les teneurs en antibiotiques du lisier (Du et Liu, 2012) et s'est avérée être un moyen efficace d'élimination de la pollution due à certains antibiotiques. L'étude de la réduction ou l'élimination par la digestion anaérobie des teneurs en antibiotiques a montré que les effets sur le procédé diffèrent selon les concentrations, les familles des composés, les modes d'actions et les conditions opératoires. En effet, les bactéries peuvent, dans ces cas d'élimination, s'adapter sous certaines conditions spécifiques pour utiliser comme source le carbone provenant de composés aromatiques constitutifs des antibiotiques (Tropel et Van der Meer, 2004).

L'effet inhibiteur des antibiotiques sur la digestion anaérobie a peu été étudié, en particulier pour le lisier/fumier bovin (Sara et al., 2013). L'activité biologique des composés actifs et leur effet inhibiteur sur les microorganismes méthanogènes ralentissent la digestion anaérobie de lisiers/fumiers voire la bloquent totalement (Ince et al., 2013). Le tableau I.1 suivant rapporte les effets inhibiteurs de quelques antibiotiques testés en digestion anaérobie et que nous retrouvons pour certains dans notre ferme partenaire « La Bouzule ».

Tableau I.1 : Données de la littérature sur l'effet de quelques antibiotiques sur la production de biogaz pendant la digestion anaérobie. Source : Sara et al., 2013

Principe actif	Dose	Effet	Références
Oxytétracycline	22 mg par kg de masse corporelle de veau par jour, pendant 5 jours	Inhibition de 27% en production de biogaz	Arikan et al., 2006
Oxytétracycline	0,45 à 10 mg par kg de lisier bovin	Inhibition de 21% à 58% en production de biogaz	Ince et al., 2013
Oxytétracycline hydrochloré	125 et 250 mg par litre de lisier porcin	Pas d'inhibition	Lallai et al., 2002
Tétracycline	25 et 50 mg par litre de lisier porcin	Inhibition jusqu'à 25% en production de biogaz	Shi et al., 2011
Thiamphénicol	80 et 160 mg par litre de lisier porcin	Inhibition	Lallai et al., 2002
Amoxicilline	60 et 120 mg par litre de lisier porcin	Inhibition	Lallai et al., 2002
Sulfaméthoxydiazine	25 et 50 mg par litre de lisier porcin	Inhibition jusqu'à 28% en production de biogaz	Shi et al., 2011

Les études récentes se focalisent de plus en plus sur les interactions entre les microorganismes et les antibiotiques, le comportement des microorganismes et les cinétiques de dégradation des molécules (Zhu et al., 2014). Néanmoins, les voies biochimiques de dégradation n'ont pas été élucidées en détails, notamment à cause de la difficulté à identifier, isoler et purifier les différents métabolites présents à l'état de trace.

Notre revue bibliographique s'intéressera à trois antibiotiques qui sont utilisés sur la ferme expérimentale de la Bouzule, où sont prélevés nos échantillons. Ces trois antibiotiques sont la tétracycline, la tylosine et la spiramycine.

I.2.2.1. La tétracycline

La tétracycline (Figure I.3) est un antibiotique de la famille des tétracyclines, tout comme l'oxytétracycline, la chlortétracycline et la doxycycline. Les tétracyclines possèdent un large spectre d'activité antibactérienne, et agissent aussi contre des organismes particuliers tels les *chlamydiae*, *mycoplasmas*, certains protozoaires et bon nombre de bactéries gram-positives et gram-négatives. Ainsi, leur effet inhibiteur peut être grand (Chopra et al., 2001 ; Sarmah et al., 2006). Leur mode d'action consiste à inhiber la synthèse protéique des organismes ciblés en empêchant l'association de l'aminocyl-ARNt et du ribosome. La réversibilité de cette association justifie le fait que les tétracyclines ont un effet inhibiteur du genre bactériostatique (Chopra et al., 1992). Elle est généralement présente dans l'environnement (pH 4 – 8) sous sa forme zwitterion qui atteint une concentration maximale à pH 5,5 (Sarmah et al., 2006). Elle est relativement stable en milieu acide et conduit à la formation de sels indépendamment du pH du milieu (Halling-Sorensen et al., 2002). La molécule est peu soluble dans l'eau. La tétracycline est très chélatrice, et voit donc ses propriétés antimicrobiennes et pharmacocinétiques influencées par les ions métalliques (Chopra et al., 2001). Elle est très répandue car outre son rôle sanitaire, elle favorise la croissance des animaux.

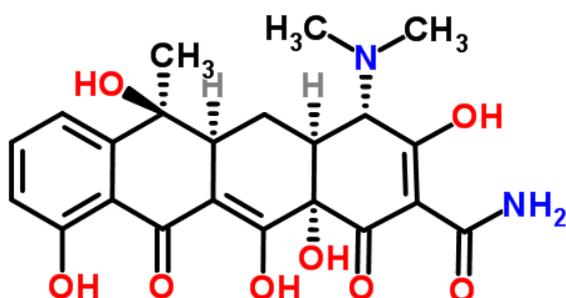


Figure I.3 : La tétracycline (Source : www.chemspider.com)

Les tétracyclines représentent l'une des classes d'antibiotiques les moins coûteuses sur le marché, et sont donc très utilisées. En 1990, la consommation était estimée à 2 294 tonnes en Europe et 3488 tonnes aux Etats-Unis (Chopra et al., 2001). Les tétracyclines sont administrées à des concentrations subthérapeutiques pour agir comme stimulateur de croissance. Cela engendre le développement de l'antibiorésistance qui limite son efficacité, et résulte alors en l'utilisation de plus grandes quantités. Feinman et al. (1978) rapportent que 25 % de la tétracycline est excrétée par les fèces animales. Des concentrations de 98 mg/L et 30 mg/kg de matière sèche ont été mesurées pour le lisier porcin (Chen et al., 2012 ; Jacobsen et al., 2006).

Les tétracyclines montrent des vitesses de dégradation assez variées avec des temps de demi-vie allant de 6h à 14 semaines (Loftin et al., 2008 ; Boxall et al., 2004). Les valeurs élevées, lorsque la matrice est le lisier (Boxall et al., 2004), ont été confirmées par les recherches récentes de Massé et al. (2014). Elles montrent que ces dernières affichent une forte persistance dans l'environnement. Leur utilisation considérable a contribué à une exposition des bactéries à cette famille d'antibiotique, et a résulté en la sélection d'organismes résistants.

Gartiser et al. (2007) ont montré qu'une concentration en tétracycline de 75 mg/L environ inhibait de 50% l'activité bactérienne de boues digérées provenant de station d'épuration. Loftin et al. (2005) ont observé une inhibition de 27% après 14 jours pour une concentration de 10 mg/L dans des lagunes anaérobies de traitement de purin.

I.2.2.2. La tylosine

La tylosine (figure I.4) est un antibiotique à large spectre du groupe des macrolides, produit par la fermentation de souches de *streptomyces*. Elle est composée du mélange des macrolides tylosine A, tylosine B, tylosine C et tylosine D, avec la tylosine A qui compte pour 80 – 90 % du composé parent (Loke et al., 2000 ; Sarmah et al., 2006). A l'instar de la plupart des macrolides, elle présente une solubilité élevée, proportionnelle à la polarité du solvant. Très instable en milieu alcalin ou acide, elle présente une relative stabilité à pH neutre. Son activité

antibactérienne est efficace contre la plupart des microorganismes pathogènes (Sarmah et al., 2006).

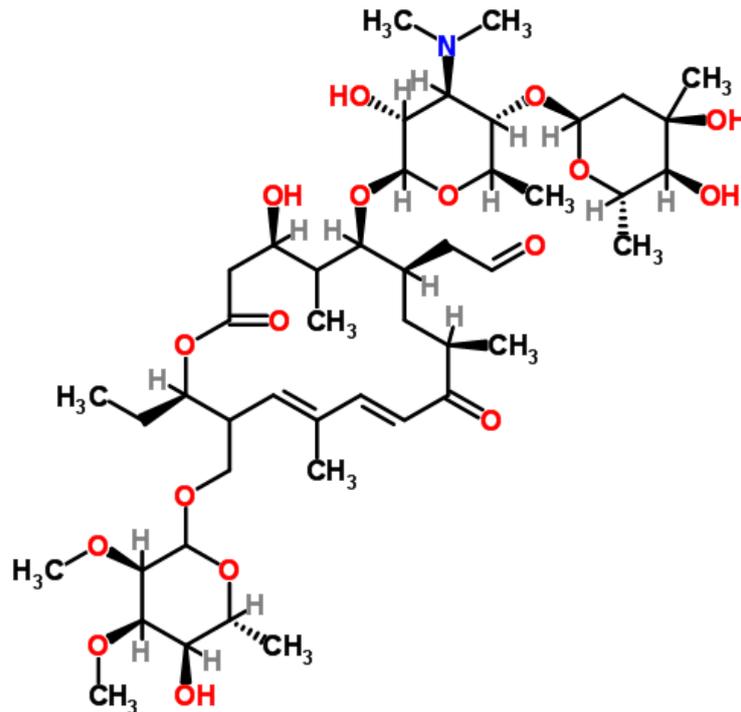


Figure I.4 : La tylosine (Source : www.chemspider.com)

Il a été montré que 40 – 60 % de la tylosine était rejetée via les urines et lisiers de porcs (Feinman et al., 1978 ; Kolz et al., 2005). Des teneurs de 0,11 et 8,1 mg/kg ont été mesurées dans du lisier bovin (De Liguoro et al., 2003 ; Dolliver et al., 2008). Une étude réalisée sur la toxicité d'un macrolide sur un procédé d'épuration biologique à boue activée a montré que même à faible concentration, un long temps d'exposition était préjudiciable aux bactéries (Louvet et al., 2010).

La dégradation de la tylosine contenu dans une matrice sol a été étudiée en présence de lisier dans un environnement anaérobie. Les temps de demi-vie observés sont de 2 et 2,4 jours (Loke et al., 2000 ; Nonaka et al., 2012).

Chelliapan et al. (2006) ont étudié la dégradation de la tylosine dans un procédé « Upflow Anaerobic Sludge Reactor » qui traite des effluents pharmaceutiques. Ils ont trouvé que les concentrations inférieures à 400 mg/L n'affectaient pas significativement les performances du réacteur. A 800 mg/L, les méthanogènes étaient encore actives et n'affectaient pas le rendement de méthane. Shimada et al. (2008) renseignent de plus faibles concentrations inhibitrices (167 mg/L), et ont trouvé que la tylosine a une action inhibitrice sur les bactéries fermentatives et les bactéries syntrophiques oxydatives des propionates et des butyrates. Sanz et al. (1996) ont observé aussi une baisse de performance de réacteur pour des concentrations allant de 25 à 250 mg/L, consécutive au ralentissement de la consommation des propionates et des butyrates. La variabilité des concentrations inhibitrices peut être corrélée à l'historique du réacteur ou même

au type de réacteur. En effet, un plus long temps d'exposition à la molécule favorise l'acclimatation des microorganismes par le développement d'une antibiorésistance ou un changement de la communauté microbienne par le développement des bactéries moins sensibles qui viennent se substituer aux plus sensibles comme les gram négatives (Gartiser et al., 2007 ; Shimada et al., 2008). Kolz et al. (2005) ont montré que la tylosine A se dégradait à 90% en conditions anaérobies. Chelliapan et al. (2011) ont obtenu 70 – 88% d'élimination à une charge organique de $1,86 \text{ kg DCO.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$, et ont observé une amélioration à 93 – 99% en augmentant la charge organique à $3,73 \text{ kg DCO.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ concomitante à une baisse d'élimination de DCO. Angenent et al. (2008) ont ajouté que la tylosine était éliminé par dégradation biologique. La biodégradabilité de la tylosine est favorisée par la biodisponibilité de la molécule dont 85% est extractible à l'eau (Dolliver et al., 2008).

I.2.2.3. La spiramycine

La spiramycine (figure I.5) est un antibiotique à large spectre du groupe des macrolides à 16 cycles, utilisée pour traiter les infections du système oro-pharyngien, du système respiratoire et du système génito-urinaire. Elle résulte d'un mélange de trois composés affichant une activité contre les bactéries gram+ et gram-, mais pas contre les *Enterobacteriaceae* (Rubinstein et Keller, 1998). Les trois composés diffèrent selon le substituant à la position 3 et sont : la spiramycine I (3-OH), la spiramycine II (3-O-acétyle) et la spiramycine III (3-O-propionyle).

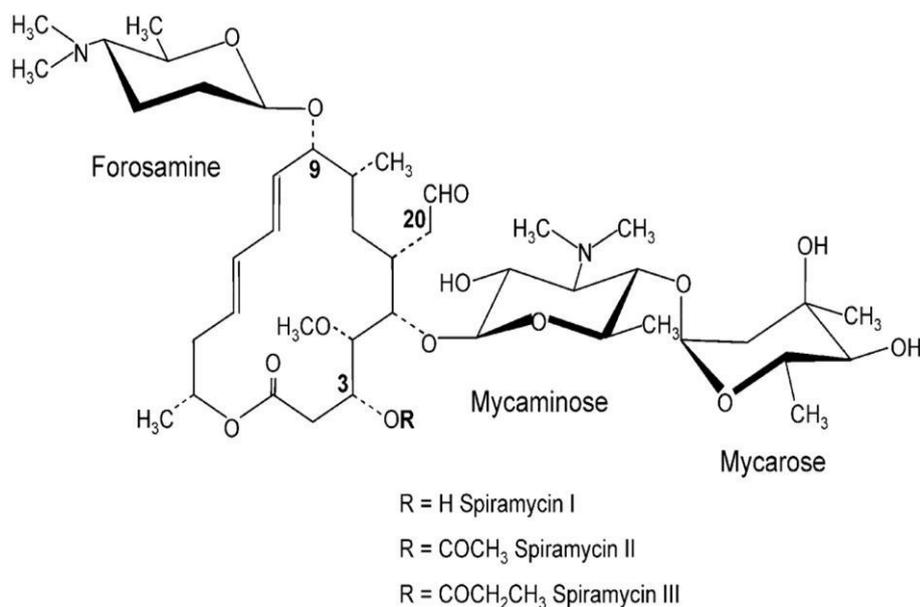


Figure I.5 : La spiramycine (Karray et al., 2007)

Les pourcentages des trois composantes varient selon les pays. En France, la spiramycine I est majoritaire et est présente à plus de 85 %, et les spiramycines II et III comptent pour moins de 5% et 10% respectivement (Mourier et Brun, 1997). En Chine cependant, la spiramycine I ne

compte que pour 10% au maximum, tandis que les spiramycines II et III comptent pour 35% au minimum (Liu et al., 1997). La spiramycine I présente un niveau d'activité bien supérieur à ses deux autres homologues. Des tests de diffusion vers l'intérieur des cellules ont démontré que les spiramycines II et III étaient respectivement à 57 et 72% d'activité par rapport à la spiramycine I (Liu et al., 1999).

Comme tous les macrolides, son mode d'action consiste à interférer avec la synthèse protéique en se liant à la sous-unité ribosomique 50S. Les macrolides ont un effet bactériostatique du fait de la réversibilité de la liaison ribosomique, mais à forte concentration s'avèrent bactéricides (Zhu et al., 2014).

Suite à son usage vétérinaire, la spiramycine est présente dans les lisiers, mais sa dégradation anaérobie dans ce type de matrice a été peu étudiée. Les travaux les plus pertinents à ce sujet concernent les voies métaboliques de la dégradation de la spiramycine I en digestion anaérobie. Zhu et al. (2014) ont pu observer que 95% de la spiramycine (I, II et III) était dégradée au bout de 32 jours dans une solution contenant 200 mg/L. Un test parallèle avec une eau usée contaminée à 37 mg/L de SPM I a montré que la SPM I s'est dissipée en 4 jours. L'observation des voies métaboliques a permis de conclure que l'hydroxylation et l'hydrolyse sont les voies métaboliques principales pendant la digestion de la spiramycine I. Trois sous-produits ont été identifiés : le 1^{er} étant l'intermédiaire de l'hydroxylation, le 2^{ème} étant l'intermédiaire de l'hydrolyse, et le 3^{ème} étant le produit final des deux réactions. La dégradation anaérobie de la spiramycine est donc une série de deux mécanismes qui conduit à l'apparition d'un métabolite non identifié, et qui s'accumule dans le réacteur.

I.2.3. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques constitués de deux ou plusieurs noyaux aromatiques condensés. Dans l'environnement, ils proviennent essentiellement de la combustion incomplète de la matière organique et des émissions de fumées d'automobiles. Certains HAPs sont utilisés dans la formulation de pesticides, fongicides, détergents, colorants et boules de naphthaline, et se retrouvent donc dans l'environnement suite à l'utilisation de ces produits. Beaucoup de HAPs ont des propriétés toxiques, mutagènes et/ou cancérigènes (Samanta et al., 2002). A cet effet, l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (U.S. EPA) a classifié 16 HAPs comme étant toxiques pour les organismes vivants. Ces HAPs sont listés dans le tableau I.2, avec leurs paramètres physico-chimiques.

Les HAPs peuvent se retrouver dans la phase gazeuse ou la phase particulaire selon leur caractère volatile. Ceux à faible poids moléculaire se retrouvent plus dans la phase gazeuse alors que ceux à haut poids moléculaire sont plus présents dans la phase particulaire.

Beaucoup de HAPs comportent dans leur structure moléculaire une région K et une région Baie (Figure I.6), qui peuvent métaboliquement engendrer des époxydes hautement réactifs

chimiquement et biologiquement (Mrozik et al., 2002), favorisant leur biodégradation. Les HAPs présentent aussi une forte hydrophobicité, mesurée par le coefficient de partage octanol-eau K_{ow} , qui augmente avec le nombre de cycles aromatiques. Au-delà de 10 cycles aromatiques, leur solubilité est trop faible pour qu'ils soient détectés dans un environnement aqueux. Cette hydrophobicité favorise leur adsorption sur la matière organique, et plus spécifiquement leur concentration dans les boues, dans les sédiments ou les tissus lipidiques des organismes vivants. L'adsorption est alors l'un des mécanismes principaux qui régissent le devenir des HAPs dans l'environnement (Barret et al., 2010).

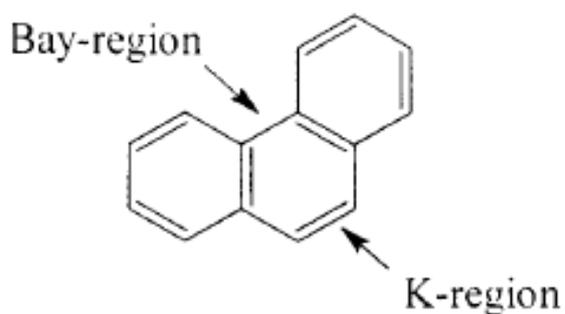
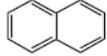
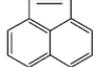
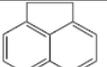
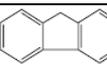
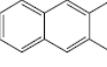
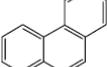
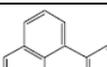
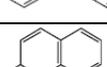
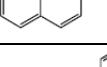
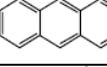
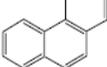
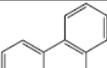
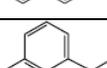
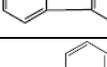
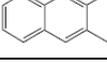
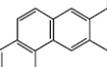


Figure I.6 : Région Baie (Bay-region) et Région K (K-region) de la molécule de phénanthrène

Tableau I.2 : 16 HAPs considérés comme toxiques par l'US-EPA

Composé	Structure	Formule moléculaire	Masse moléculaire (g mol ⁻¹)	Solubilité (mg L ⁻¹)	Log K _{ow} *
Naphtalène		C ₁₀ H ₈	128,16	31,8	3 – 3,7
Acénaphtylène		C ₁₂ H ₈	152,19	3,93	3,94
Acénaphtène		C ₁₂ H ₁₀	154,21	3,9	3,92
Fluorène		C ₁₃ H ₁₀	166,22	1,68	4,18
Anthracène		C ₁₄ H ₁₀	178,23	0,045	4,5
Phénanthrène		C ₁₄ H ₁₀	178,23	1,0	4,46
Fluoranthène		C ₁₆ H ₁₀	202,26	0,206	4,9
Pyrène		C ₁₆ H ₁₀	202,26	0,132	4,88
Benzo[a] Anthracène		C ₁₈ H ₁₂	228,28	0,0094	5,63
Chrysène		C ₁₈ H ₁₂	228,28	0,0018	5,63
Benzo[b]Fluoranthène		C ₂₀ H ₁₂	252,31	0,0015	6,04
Benzo[k]Fluoranthène		C ₂₀ H ₁₂	252,31	0,0080	6,21
Benzo[a]Pyrène		C ₂₀ H ₁₂	252,31	0,0016	6,06
Dibenzo[a,b] Anthracène		C ₂₂ H ₁₄	278,35	0,0050	6,86
Benzo[g,h,i]Pérylène		C ₂₂ H ₁₂	276,33	0,0007	6,78
Indéno[1,2,3-c,d]Pyrène		C ₂₂ H ₁₂	276,33	0,0002	6,58

* Log Kow : coefficient de partage octanol-eau

Le caractère hydrophobe des HAP influence négativement leur biodisponibilité, et inhibe donc leur élimination par des procédés biologiques comme la digestion anaérobie (Barret et al., 2009) ou les traitements aérobies (Christensen et al., 2004). L'étude de la biodisponibilité des HAPs a conduit à définir leurs constantes d'équilibre de sorption, et à conclure que les molécules se retrouvaient dans 3 compartiments à savoir : aqueux, adsorbées sur les particules, et adsorbées sur les matières colloïdales et dissoutes (MCD). Par ailleurs, d'autres résultats (Langford et al., 2005 ; Yamamoto et al., 2003) ont montré que l'hydrophobicité ne suffisait pas à justifier les équilibres de sorption. Raber et al. (1997) ont mis en relief la relation entre les caractéristiques des boues et leur affinité aux MCD. Cette affinité augmente aussi avec le poids moléculaire des MCD (Holbrook et al., 2005 ; Raber et al., 1997), améliorant ainsi la sorption des HAPs (Ilani et al., 2005 ; Maxin et al., 1995). Le poids moléculaire des MCD influence dès lors l'élimination biologique. Ainsi les HAPs à haut poids moléculaire (4 noyaux ou plus), qui se sorbent fortement à la matière organique, sont plus résistants à la biodégradation. La variation de la biodisponibilité des HAPs est très influencée par leurs interactions avec la matière organique. La partie biodisponible, représentée par la fraction aqueuse (compartiments libre et adsorbée aux MCD), peut augmenter au cours de la digestion anaérobie grâce aux processus biochimiques qui décomposent la matière organique. La part de la pollution particulaire qui se retrouvera suite aux réactions sous forme colloïdale ou dissoute, sera assimilable par les microorganismes, et donc aussi les HAP adsorbés aux MCD.

Trably et al. (2003) ont observé la biodégradation anaérobie de 13 HAPs, incluant ceux à haut poids moléculaire, contenues dans les boues d'épuration. Ils ont constaté que l'élimination augmentait de 46% à 53% quand la température était augmentée de 35°C à 55°C. Benabdallah et al. ont observé en 2006 la même tendance dans des digesteurs avec l'élimination qui passait de 37%-43% à 51%-65% pour une augmentation de température de 35°C à 55°C. Cette amélioration de l'élimination s'explique par l'amélioration des processus biochimiques qui est consécutive à la solubilisation de la matière organique, causée par l'augmentation de la température. La hausse de température augmente le transfert de la pollution particulaire vers les formes colloïdale et dissoute, et favorise ainsi l'assimilation microbienne des HAPs. En outre, les rendements d'élimination des HAPs ne sont pas corrélés au temps de rétention hydraulique (TRH), sauf pour les HAPs à faible poids moléculaire où on constate une amélioration de l'élimination avec des TRH plus élevés (Benabdallah et al., 2006). Les études de Barret et al. (2010) sur le devenir de 13 HAPs pendant la digestion anaérobie de boues contaminées ont permis de conclure que la biodisponibilité n'est pas le seul facteur limitant de la biodégradation des HAPs. Il faut considérer aussi un cométabolisme qui consiste en l'apport d'une source de carbone facilement biodégradable. En effet, aucun consortium méthanogène connu n'a pu jusque là être capable de croître avec comme seule source de carbone un HAP comportant plus de 4 noyaux aromatiques. Concernant les conditions opératoires, Chang et al. ont cependant trouvé en 2002 que les conditions optimales pour la dégradation des HAPs sont : une température de 30°C et un pH de 8.

A cette date, il existe très peu d'informations sur la population microbienne impliquée dans la biodégradation anaérobie des HAPs, et sur leurs paramètres cinétiques. Par ailleurs, il a été observé que les cultures mixtes présentent de meilleures éliminations des HAPs parce qu'un sous-produit de dégradation par une espèce peut être une nourriture pour une autre espèce (Bouchet et al., 1995).

De tous les HAPs, c'est la biodégradation du naphthalène qui a été la plus étudiée à cause de sa forte solubilité. Les voies de dégradation proposées reposent essentiellement sur les bactéries du genre *Pseudomonas* (Mrozik et al., 2003). L'élimination du naphthalène dans les sols, les boues et les lisiers en conditions anaérobies augmente avec la température (Christensen et al., 2004). Cette élimination passe de 10-50% à 60-85% quand on passe de conditions mésophiles à thermophiles. D'autre part, Trably et al. (2003) ont pu observer l'élimination relative aux processus abiotiques en stérilisant par addition d'une solution d'azoture de sodium à 100 mmol, des réacteurs maintenus sous agitation permanente. L'élimination abiotique s'est avérée importante pour les HAPs à faible poids moléculaire (phenanthrène, fluorène et anthracène). En effet, pour ces HAPs, des taux supérieurs à 50%, 40% et 25% ont été observés pour des températures de 55°C, 45°C et 35°C (Traby et al., 2003), et 10% pour la phénanthrène en conditions mésophiles (Christensen et al., 2004).

I.2.4. Les métaux lourds

Les micropolluants minéraux les plus souvent utilisés dans les élevages sont les métaux lourds tels le zinc, le cuivre et l'arsenic. Le cuivre et le zinc sont des oligoéléments utilisés comme suppléments alimentaires pour leur capacité à stimuler la croissance des animaux et à prévenir les infections (Jondreville et al., 2003). Cependant, ils présentent une faible biodisponibilité² et sont donc administrés à des doses excédant celles requises. De fortes concentrations de ces micropolluants sont donc mesurées dans les excréments des animaux (Ministère Français de l'Agriculture et de l'Environnement, 2003). Le cuivre présent dans les fermes porcines en particulier, provient de l'utilisation de la solution de sulfate de cuivre comme désinfectant pour prévenir la prolifération de maladies infectieuses.

Les métaux présents dans le lisier sont complexés avec la matière organique (Béline, 2004). La digestion anaérobie du lisier conduit à une réduction du taux de matières organiques, mais les matières minérales ne connaissent aucune variation significative (Marcato et al., 2008). Ceci implique une concentration (exprimée en % de MS) de métaux dans le digestat supérieure à celle dans le lisier. Ceci n'affecte pourtant pas les pratiques d'épandage puisque la réglementation exprime les quantités de métaux à épandre en fonction du taux d'azote.

² En sciences de la nutrition ou en pharmaco-cinétique, la biodisponibilité correspond à la proportion d'un nutriment qui est absorbée par la muqueuse intestinale et qui servira de nutriment pour le métabolisme cellulaire et les fonctions organiques normales (Aggett, 2010).

Marcato et al., (2008) ont observé que durant la digestion anaérobie, les petites particules de taille comprise entre 1 et 60 μm sont les plus dégradées. La modification de la distribution en taille des particules induite est alors un critère déterminant dans la répartition des métaux dans le digestat puisque les processus d'adsorption sont favorisés par la surface spécifique, elle-même proportionnelle à la diminution en taille des particules. Il en résulte une plus grande surface de contact, et donc un taux d'adsorption plus élevé dans le lisier brut que dans le digestat. Un fractionnement en tailles du digestat leur a permis d'observer que moins de 2% des métaux (cuivre et zinc) étaient présents dans les particules de taille supérieure à 250 μm . Ceci indique qu'un tamisage à un seuil de 250 μm ne permet pas d'éliminer ces métaux du digestat. La classe de particules comprises entre 3 et 25 μm s'est avérée être celle qui contient 86% du cuivre et du zinc, et contribue le plus à la surface spécifique, à hauteur de 30% dans le lisier brut et 40% dans le digestat.

Les travaux de Guo et al. (2012) ont permis d'observer une adaptation des bactéries à des concentrations croissantes de cuivre (sous forme CuSO_4), dans un digesteur alimenté en semi-continu. La production de biogaz qui reprenait après 2 jours d'inhibition, serait due à la précipitation de CuS après réduction des sulfates (Guo et al., 2012). Cependant, une inhibition irréversible a été observée au bout de 3 jours pour une concentration en Cu de 19,40 g/kg de MOD (Guo et al., 2012).

L'évaluation des effets de CuO et ZnO sur la digestion anaérobie de fumier bovin, a permis d'observer des effets inhibiteurs, en corrélation avec la toxicité induite aux bactéries anaérobies. Le CuO présente une inhibition de la production de biogaz nettement supérieure à celle de ZnO , les nanoparticules étant plus inhibitrices que les poudres dans le cas CuO . Pour la production de méthane, les nanoparticules de CuO (~30nm) et ZnO (50-70 nm) présentent de plus fortes inhibitions que les poudres, avec des facteurs 10 et 2 pour le CuO et le ZnO respectivement (Luna-delRisco et al., 2011). On note une inhibition complète de la production de méthane pour des concentrations de 330 et 30,2 $\text{mg}_{\text{Cu}}/\text{L}$ pour le CuO en poudre et les nanoparticules respectivement ; et des concentrations de 246 et 181 $\text{mg}_{\text{Cu}}/\text{L}$ pour le ZnO en poudre et les nanoparticules respectivement. La toxicité des nanoparticules peut être expliquée par leur solubilité (Aruoja et al., 2009), mais est aussi corrélée à leurs propriétés surfaciques (Karlsson et al., 2009).

Le zinc et le cuivre sont le plus souvent complexés avec la matière organique dans le lisier brut (Cang et al., 2004), pendant que l'arsenic reste stable sous sa forme organique. La présence de l'arsenic résulte de l'utilisation de la roxarsonne et de l'acide p-arsanilique comme compléments alimentaires. La digestion anaérobie n'affecte pas les minéraux, mais les métaux lourds à plusieurs valences comme l'arsenic peuvent passer d'une forme stable à une forme plus biodisponible et toxique (Zhang et al., 2009) en fonction des conditions opératoires et du stockage du digestat (Jin et al., 2011). Le zinc, le cuivre et l'arsenic sont ainsi conservés lors de la digestion anaérobie.

I.3. Synthèse bibliographique

La digestion anaérobie est un processus relativement complexe qui nécessite un certain équilibre entre les réactions provoquées par la communauté microbienne responsable des transformations de la matière organique en biogaz. Compte tenu de la diversité des substrats utilisés et de la population bactérienne, chaque processus de digestion est unique et il est difficile de généraliser les modes opératoires. Les paramètres les plus influents du procédé sont : la température, le pH, l'azote ammoniacal, les acides gras volatiles, la charge organique, et le temps de rétention hydraulique. La maîtrise en qualité et en quantité des intrants s'avère cruciale pour définir les temps de séjour et statuer sur une éventuelle application de prétraitement, mais également pour évaluer les risques de contamination (HAPs, métaux lourds, médicaments, antibiotiques...)

Le besoin d'assurer la viabilité économique du procédé en maintenant une fourniture d'énergie constante au cours de l'année a conduit à incorporer d'autres substrats organiques dans le digesteur. En effet, lors des périodes de divagation du bétail dans les prés, il n'est pas possible de récupérer les mêmes quantités de lisier que lors des périodes de stabulation permanente. De l'ajout de substrats complémentaires est ainsi née la co-digestion anaérobie. Les études ont montré qu'elle représente une alternative intéressante pour la gestion des résidus agricoles et améliore les performances du procédé tant que certaines conditions opératoires sont respectées. Les co-substrats utilisés devront être idéalement riches en carbone biodégradable, et avoir un ratio C/N élevé pour contrebalancer avec le faible ratio C/N du lisier utilisé en substrat principal. L'un des co-substrats fréquemment utilisé car disponible sur les fermes agricoles est l'herbe. Mais cette dernière, de par sa nature lignocellulosique est difficile à dégrader par la population microbienne et nécessite des pré-traitements pour améliorer l'accessibilité à sa matière organique. Les techniques nécessitant un faible apport d'énergie qui ont prouvé leur efficacité sont : la réduction de la taille des particules et l'ensilage de l'herbe. La réduction de taille se fait par broyage et améliore le mélange du milieu réactionnel. De plus, la réduction de taille augmente la surface spécifique et favorise l'accès au contenu cellulaire de l'herbe en détruisant la structure cristalline de sa paroi. Quant à l'ensilage, il présente l'intérêt d'être un stockage car il permet de conserver le pouvoir nutritif des plantes par fermentation anaérobie. Mais surtout, l'ensilage possède une fonction de pré-digestion pour une meilleure méthanisation car elle favorise aussi la production de sources de méthane telles que les alcools et les acides organiques. Les études mentionnant l'utilisation de l'herbe ensilée recommandent que l'apport de matière organique provenant de l'herbe représente 30% de l'alimentation totale. Il faut noter que les ensilages couramment utilisés ont été réalisés avec des additifs et le temps nécessaire à leur stabilisation est défini entre 30 et 90 jours.

Dans un contexte où l'utilisation des intrants chimiques est limitée, survient alors la question de savoir quel temps sera nécessaire pour un ensilage sans additifs pour obtenir une qualité qui améliore le rendement de la co-digestion ? Outre l'herbe ensilée, le lactosérum est un résidu

fréquemment retrouvé sur les fermes agricoles aussi. Sa forte teneur en protéines et lactose en fait un sujet intéressant pour la co-digestion anaérobie. Il a été montré que son utilisation à 65% du volume total d'alimentation, conduit à une amélioration de la production de méthane. Il convient alors de vérifier si le débit de lactosérum produit conduit à une concentration qui assure le bon fonctionnement du procédé. Le **chapitre 3** traitera de la co-digestion du lisier avec l'herbe ensilée, notamment la durée d'ensilage qui assure le bon fonctionnement du procédé. Il traitera par la suite de la co-digestion avec le lactosérum pour vérifier si le débit de lactosérum produit sur la ferme assure la bonne conduite du procédé.

L'ajout d'ensilage effectué avec de l'herbe, provenant de bordure de route exposée à un trafic de véhicules motorisés, soulève le questionnement de l'impact des éventuels micropolluants que pourrait contenir l'herbe. Les recherches ont montré que les métaux lourds et les HAPs sont faiblement transformés par la digestion anaérobie, et peuvent même à certaines concentrations inhiber le procédé. La **première partie du chapitre 4** sera à cet effet consacré à l'étude des teneurs en micropolluants de l'herbe de bord de route à ensiler. Il s'agira d'évaluer si les teneurs en métaux lourds et en hydrocarbures aromatiques polycycliques sont en deçà des seuils autorisés par la réglementation.

La dernière cause de présence de micropolluants mentionnée dans la revue bibliographique est la médication des vaches. Des quantités d'antibiotiques sont administrées au bétail à des fins thérapeutiques et parfois juste pour stimuler la croissance et augmenter la rentabilité laitière. Il en résulte la présence d'antibiotiques dans le lisier, les médicaments étant majoritairement excrétés via les fèces et les urines à raison de 30 à 90% du composé parent et/ou des métabolites. Ces antibiotiques peuvent, selon leur résistance à la biodégradation et la sensibilité des microorganismes, impacter le procédé de digestion anaérobie. Des inhibitions jusqu'à 60% de la production de biogaz ont pu être observées pour des concentrations correspondant à des doses usuelles de traitement. La **deuxième partie du chapitre 4** se consacrera à l'étude de l'effet de certains antibiotiques utilisés sur les fermes agricoles sur le procédé de digestion. Les antibiotiques étudiés sont : **la tétracycline, la tylosine et la spiramycine.**

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

II.1. Substrats utilisés et dispositifs expérimentaux

II.1.1. Substrats utilisés

Les substrats utilisés sont des résidus agricoles qui proviennent de la ferme expérimentale de la Bouzule, et de l'herbe coupée le long de routes avoisinantes de cette ferme. Il s'agit d'une ferme agricole de type polyculture-élevage, appartenant à l'ENSAIA (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et d'Industries Alimentaires). Elle est située à Champenoux, à 13 km de Nancy dans la direction nord-est. Le domaine de la ferme s'étend sur 155 hectares de terres cultivées et de prairies, et comprend un étang piscicole de 6 hectares. Les espèces cultivées sont le colza, le blé, l'orge, le chanvre, le tournesol, le maïs, le pois fourrager et la luzerne. Elles sont destinées à la vente et à l'alimentation des animaux.

La ferme regroupe un cheptel bovin de 300 têtes comprenant 80 vaches laitières de race *prim'Holstein*, une trentaine de vaches allaitantes charolaises et une trentaine de bœufs. La production laitière annuelle pour une vache est de 10 000 litres, et se situe donc au dessus de la moyenne nationale qui est de 6 000 litres de lait. En stabulation libre, les vaches sont maintenues saisonnièrement en étable, avec un accès libre à leur logette dont le sol est constitué d'un matelas composé de paille et d'un tapis en caoutchouc pour assurer un confort mécanique et thermique. On y retrouve aussi un cheptel caprin d'environ 100 chèvres de race alpine chamoise. Elles produisent 80 000 litres de lait par an, à raison de 3 à 4 litres par jour et par chèvre. Le lait est ensuite transformé sur place en fromage au lait cru par la fromagerie de la ferme.

Toutes ces activités génèrent des résidus agricoles parmi lesquels on trouve le lisier bovin et le lactosérum. Ces substrats organiques ont été choisis pour leur potentiel méthanogène, et ont été utilisés lors des travaux de cette thèse.

II.1.1.1. Le lisier bovin

Les campagnes de prélèvement de lisier se déroulent le matin autour de 9 heures. Le lisier est collecté à l'aide d'un racleur automatique traversant le milieu du hangar pour se déverser dans un collecteur rectangulaire, qui communique avec un bassin dimensionné pour un temps de stockage maximal de 4 mois. Cette réserve de lisier est initialement destinée à être épandue dans les champs constituant ainsi un engrais organique naturel assimilable par les plantes.

Les prélèvements de lisier sont effectués dans le collecteur rectangulaire. Le lisier prélevé est utilisé le jour même pour les expériences en laboratoire, et une partie est aliquotée et stockée à -20°C dans le but de conserver la qualité de lisier pour des expériences ultérieures.

II.1.1.2. Les lactosérums

Les lactosérums utilisés lors de nos travaux sont le lactosérum de chèvre provenant de la ferme de la Bouzule, et le lactosérum de vache provenant d'une ferme extérieure. Les deux lactosérums proviennent d'usines de fromagerie installées sur les fermes respectives, et constituent un résidu de la production de fromage selon les étapes de fabrication traditionnelle. Par conséquent, les lactosérums qui découlent de ce procédé sont riches en acides organiques. Le lactosérum de chèvre a été caractérisé par sa demande chimique en oxygène (DCO) avant son utilisation.

Le lactose étant la principale source de carbone du lactosérum, les concentrations testées dans nos expériences ont été exprimées en g/L de lactose. Sur la ferme expérimentale, comme la concentration en lactose qui sera appliquée au digesteur a été évaluée à 0,8 g/L, les concentrations testées dans nos expériences encadrent cette valeur, et sont de 0,5, 1 et 2 g/L de lactose.

II.1.1.3. L'herbe

Comme la disponibilité en résidus varie au cours de l'année, selon que les vaches soient en stabulation ou non, il a été envisagé d'inclure dans le digesteur des ressources provenant de l'extérieur. Les études ayant montré que l'herbe est un co-substrat intéressant pour la méthanisation, le choix a été porté sur de l'herbe qui provient des coupes le long des routes départementales avoisinantes de la ferme. Ces coupes sont effectuées par la société Noremat®, partenaire de la ferme. Deux campagnes sont effectuées annuellement, dont la première au mois de Mai (5 mois de pousse) et la seconde au mois de Septembre (4 mois de pousse). Les herbes sont ensuite ensilées sous bâche, en plein air à la ferme, et seront uniquement destinées à l'alimentation du méthaniseur.

Pour évaluer la qualité de ces herbes en termes de polluants (métaux lourds), une campagne de prélèvement est effectuée un jour avant le début de coupe par Noremat®. Les herbes sont coupées à différentes distances des bords de route et aux ciseaux, afin que les échantillons soient affranchis de contaminations éventuelles pouvant provenir des outils de coupe mécanique. Afin d'échantillonner toujours aux mêmes endroits, les coordonnées des points de prélèvement sont relevées à l'aide d'un système GPS. Elles sont consignées en annexe.

II.1.2. Dispositifs expérimentaux

III.1.2.1. Les tests de biodégradabilité anaérobie en batch ou Potentiel Biochimique de Méthane (en anglais BMP)

Le test BMP a pour but d'estimer le potentiel de biodégradabilité en condition anaérobie de la matière organique contenue dans un échantillon. Pour ce faire, l'expérience est réalisée dans des

conditions optimales de température et de pH pour une méthanisation mésophile. Elle consiste à suivre dans des réacteurs batch la quantité de méthane (CH₄) produite, par mesures fréquentes du volume de biogaz et de sa composition en méthane. Les tests BMP sont réalisés dans des flacons de 1 L de volume total. Ils sont composés comme le montre le tableau II.1.

Tableau II.1 : Composition des tests BMP

Composition d'un BMP
100 g de lisier bovin
400 mL de solution tampon pH7 (Pour 1 L de tampon, il faut 500 mL de KH ₂ PO ₄ à 0,1M, 291 mL de NaOH à 0,1M et 209 mL d'eau ultrapure)
Masse (en g) de substrats additionnels (Herbe ensilée et/ou lactosérum)

Les bouteilles sont ensuite dégazées au diazote pendant 15 minutes, pour éliminer l'oxygène dissout et balayer le ciel gazeux. Elles sont par la suite serties et incubées à 37 °C dans une armoire thermorégulatrice (figure II.1).



Figure II.1 : Tests BMP en incubation à 37 °C dans l'armoire thermorégulatrice

Le suivi expérimental est effectué tous les jours la première semaine, puis 3 fois par semaine par la suite. Le volume de biogaz produit est déterminé à l'aide d'un dispositif décrit plus loin (figure II.5), et la composition en gaz (H₂S, H₂, CH₄, CO₂) est déterminée par chromatographie gazeuse. L'expérience est arrêtée lorsque la production de biogaz n'est plus significative et que le profil des volumes cumulés de méthane tend vers un palier.

III.1.2.2. Le réacteur continu

En parallèle des tests batch, des expériences ont été menées dans un réacteur fonctionnant en mode continu. Ce réacteur illustré par les figures II.2 et II.3, présente un volume total de 4L et fonctionne par récolte-recharge. Le volume réactionnel (de remplissage) est de 3L pour un temps de renouvellement fixé à 24 jours. L'opération d'alimentation-soutirage se fait manuellement. Elle est définie sur une base moyenne de 125 mL par jour, et se fait 3 fois par semaine. Le réacteur possède une double-paroi soumise à un flux continu d'eau chaude provenant d'un bain-marie de manière à obtenir une température du volume réactionnel de 38°C. La vitesse d'agitation est fixée à 150 rpm grâce à un mobile d'agitation à pales droites. Les dimensions du réacteur sont consignées sur la figure II.3.

Un compteur volumétrique connecté au ciel gazeux du réacteur permet de mesurer le volume de biogaz produit. Le biogaz produit est prélevé dans le conduit connectant le ciel gazeux du réacteur au compteur, puis analysé au chromatographe gaz pour déterminer la teneur en méthane.

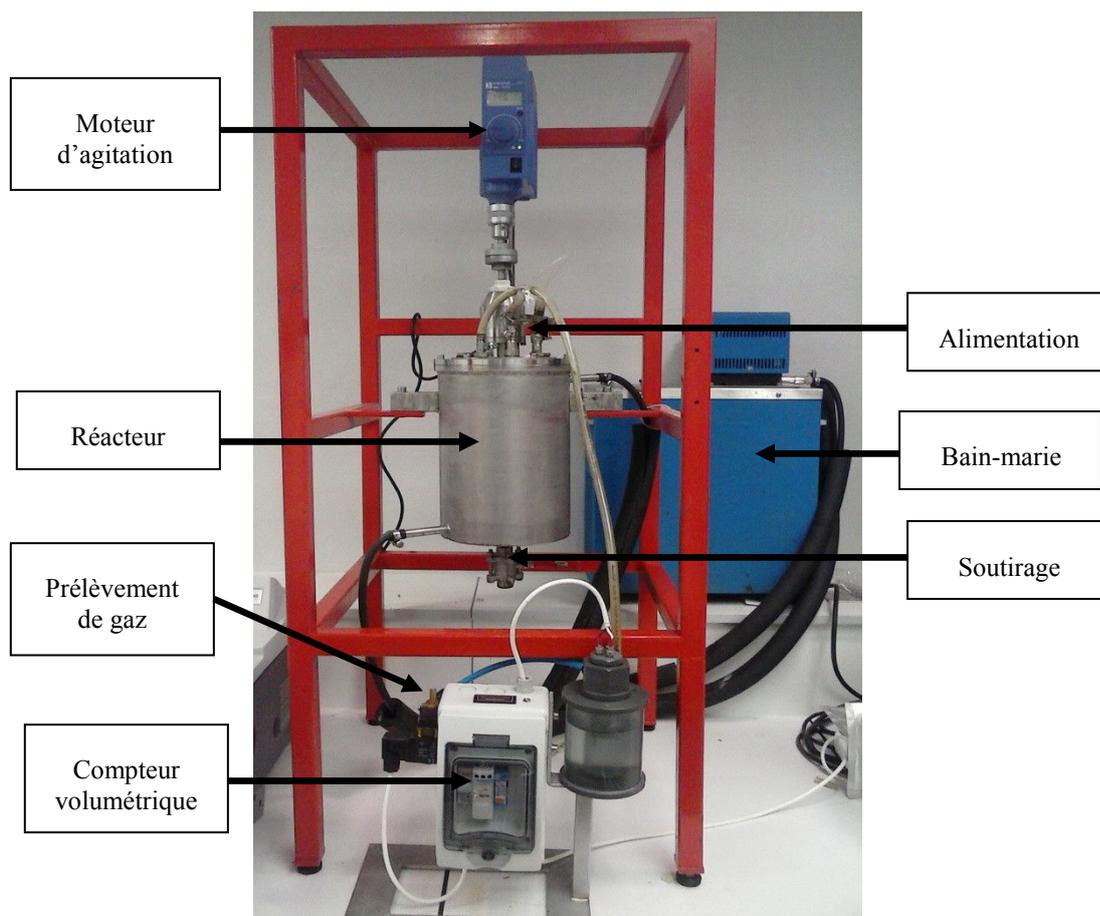


Figure II.2 : Réacteur continu de méthanisation

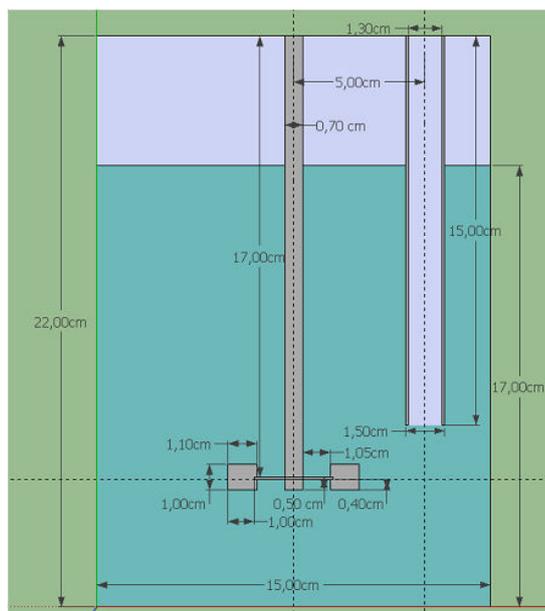


Figure II.3 : Schéma (non à l'échelle) de la coupe longitudinale du réacteur continu

II.2. Méthodes

II.2.1. Matières Sèches (MS)

L'analyse des matières sèches (MS) sert à déterminer la quantité de matière effective introduite dans le réacteur. En effet, selon le taux d'humidité de l'échantillon, la même masse de matière brute peut correspondre à diverses quantités de matière.

Le pourcentage de matière sèche (% MS) est obtenu selon la méthode standard de l'APHA (American Public Health Association) en pesant une certaine masse d'échantillon brut dans une coupelle, puis en la laissant sécher à l'étuve pendant 24 heures à 105 °C. Le pourcentage de MS est ensuite calculé comme suit :

$$\%MS = \frac{(M2 - M0)}{(M1 - M0)} \times 100$$

Avec,

M0 : La masse de la coupelle vide ;

M1 : La masse l'échantillon brut + coupelle

M2 : La masse de l'échantillon séché + coupelle

II.2.2. Matière Organique (MO)

Cette analyse permet de déterminer la quantité de matière organique (MO) introduite dans le réacteur. Cette méthode est basée sur le fait qu'à 525 °C, toute la matière organique contenue dans un échantillon se volatilise au bout d'un certain temps.

Le pourcentage de matière organique (% MO) a été obtenue en pesant une certaine masse d'échantillon sec dans une coupelle (ou du papier aluminium pour les herbes), qu'on fait chauffer pendant 2 heures à une température de 525 °C. Le pourcentage de MO est ensuite calculé comme suit :

$$\%MO = \frac{(M2 - M3)}{(M2 - M0)} \times 100$$

Avec

M0 : La masse de la coupelle vide ;

M2 : La masse de l'échantillon séché + coupelle

M3 : La masse l'échantillon après chauffage à 525 °C + coupelle

II.2.3. Composition en CHNS

L'analyse centésimale des éléments Carbone (C), hydrogène (H), azote (N) et soufre (S) sert à déterminer si les ratios entre les éléments sont favorables ou non au bon déroulement de la digestion.

Elle est réalisée en encapsulant 1 à 2 mg d'échantillon dans une nacelle en étain de 150 µL de volume, compactée ensuite sous forme d'un petit cube à l'aide de pinces. Les échantillons sont pesés à l'aide d'une balance MX5 de Metler Toledo® précise au microgramme près. Ils sont ensuite déposés sur le passeur d'un analyseur « Flash EA 112 Series » de Thermo Scientific®, constitué de deux tubes « Prepacked reactor CHNS/NCS/S Flash » de Thermo Scientific®. L'échantillon est brûlé dans le four et les éléments son détectés par un catharomètre. L'analyseur est géré par un logiciel « EA 112 » qui après analyse permet d'obtenir les différents pourcentages des composés.

Les paramètres de l'analyseur pendant la mesure sont consignés dans le tableau en annexe.

II.2.4. Analyse des fibres

Le but de ces analyses est de caractériser la matière organique contenue dans les herbes, qui diffère par sa nature de celle contenue dans le lisier. Des analyses ont été effectuées sur les herbes pour déterminer leur composition en fibres brutes, cellulose, l'hémicellulose et lignine. Une série de trois analyses différentes établies par ANKOM Technology® est nécessaire pour

déterminer distinctement la composition en fibres. Ces analyses sont différentes par les réactifs utilisés et le protocole suivi, mais sont réalisées par le même appareillage.

II.2.4.1. Appareillage pour l'analyse des fibres

Cet appareillage comprend les éléments suivants, illustrés par la figure II.4 :

- Une balance analytique d'une précision 0,01 g
- Une étuve capable de maintenir une température de 102 ± 2 °C
- Un appareil de digestion (figure II.3) acquis chez Laboratoires Humeau® capable de maintenir une température de $100 \pm 0,5$ °C et une pression allant de 10 à 25 psi. L'appareil possède aussi un système d'agitation à 65 rpm qui lui permet de créer un écoulement similaire autour de tous les échantillons, et assurer ainsi l'uniformité de l'extraction

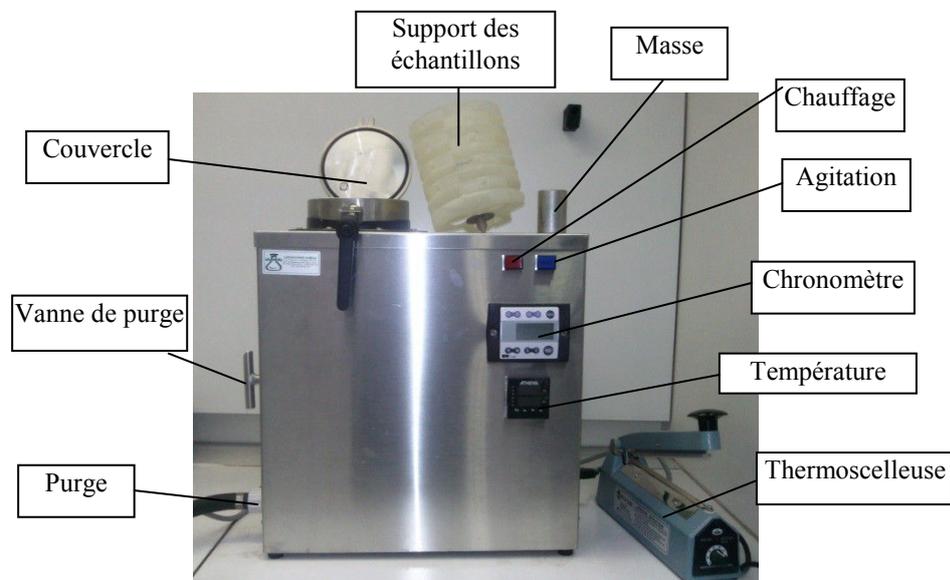


Figure II.4 : Appareillage pour l'analyse des fibres

- Des petits sacs de filtration F57 de ANKOM Technology® fabriqués avec une matière chimiquement inerte et résistante à la chaleur. Les sacs sont scellables avec une thermoscelleuse, et peuvent retenir des particules de 25 μm tout en permettant une pénétration rapide de solution.
- Une thermoscelleuse de ANKOM Technology® pour sceller les sacs
- Un dessiccateur.

II.2.4.2. Fibres résistants aux détergents acides (ADF)

Cette analyse permet de déterminer les fibres résiduelles après digestion avec une solution de détergent acide. Ces fibres résiduelles sont majoritairement la cellulose et la lignine.

Le réactif utilisé pour la digestion est une solution digestive obtenue en dissolvant 20 g de bromure de cétyle-triméthylammonium (CTAB) dans 1 L d'acide sulfurique à 1,00 N. Il est conseillé d'agiter et de chauffer la solution pour faciliter la dissolution du CTAB. Les herbes sont coupées au ciseau en fragments de 2 mm environ.

La procédure détaillée suivie pour l'analyse est reportée en annexe.

II.2.4.3. Fibres résistants aux détergents neutres (NDF)

Cette analyse permet de déterminer les fibres résiduelles après digestion avec un détergent neutre qui sont majoritairement l'hémicellulose, la cellulose et la lignine. Elle donne une approximation de la concentration totale de la paroi cellulaire.

Les réactifs utilisés pour l'analyse sont : une solution de détergent neutre acquise chez ANKOM Technology® (vérifier que le pH est entre 6,9 et 7,1), de l'enzyme alpha-amylase thermostable à activité 17 400 unités liquéfion / mL acquise chez Laboratoires Humeau®, et du sulfite de sodium anhydre acquis chez ANKOM Technology®. Les herbes sont coupées aux ciseaux en fragments de 2 mm environ.

La procédure détaillée suivie pour l'analyse est également reportée en annexe.

II.2.4.4. Fibres brutes (CF)

Cette analyse permet de déterminer les fibres brutes que sont les résidus organiques obtenus restant après digestion avec de l'acide sulfurique à 0,255 N et de l'hydroxyde de sodium à 0,313 N. Les éléments éliminés par le processus sont majoritairement les protéines, les sucres, les amidons, les lipides, et des parties de glucides structurelles et de lignine.

Les réactifs utilisés pour l'analyse sont : l'acide sulfurique à $0,255 \pm 0,005$ N et l'hydroxyde de sodium à $0,313 \pm 0,005$ N, tous deux obtenus à base de solutions standards acquises chez ANKOM Technology®. Les herbes sont coupées au ciseau en fragments de 2 mm environ.

La procédure détaillée suivie pour l'analyse est également reportée en annexe.

II.2.4.5. La lignine

La méthode de mesure de la lignine se fait consécutivement à la détermination des fibres résistant aux détergents acides (ADF). Suite à la procédure ADF, les échantillons sont digérés dans une solution d'acide sulfurique à 72%.

La procédure détaillée est également reportée en annexe.

II.2.5. Ammonium

La mesure de l'ammonium a été effectuée par une méthode spectro-photocolorimétrique en utilisant le spectro-photocolorimètre Hach® DR/2400. La méthode Hach n° 380 basée sur le réactif de Nessler a été adaptée à un volume d'échantillon de 10 mL.

Comme nos échantillons sont semi-solides, une phase d'extraction est effectuée au préalable en introduisant dans un flacon une masse donnée d'échantillon (10 g environ) à laquelle on ajoute 50 mL (ou 100 mL si l'échantillon est très visqueux) d'eau ultrapure, puis on laisse agiter dans un incubateur à 25 °C pendant 2h à une vitesse d'agitation de 200 rpm. Le contenu du flacon est ensuite filtré au filtre à café de porosité 60µm environ, et dilué au 100^{ème} à l'aide d'un diluteur automatique Hamilton®. Le réactif de Nessler ajouté à l'échantillon est décomposé en présence d'ions ammonium avec formation d'iodure de dimercuriammonium résultant en une couleur jaune. L'absorbance à 425 nm est alors mesurée, et la concentration est obtenue en se référant à la courbe d'étalonnage de la méthode. Pour revenir à la concentration de l'échantillon brut, la formule suivante est utilisée :

$$NH_4^+ \left(mg N / g \right) = \frac{Absorbance \text{ à } 425 \text{ nm} \cdot 3,446 \cdot Dilution \cdot Veau}{1000 \cdot masse \text{ d'échantillon}}$$

II.2.6. Volume de biogaz produit

La mesure du volume de biogaz produit est réalisée à l'aide d'un dispositif (figure II.5) constitué d'une aiguille reliée par un tuyau flexible, à une éprouvette renversée contenant une solution acide à pH inférieur à 4. Après agitation des flacons, l'aiguille est introduite dans le ciel gazeux des réacteurs et la surpression fait déplacer dans l'éprouvette le volume équivalent de biogaz produit. Le volume mesuré est précis à 1 mL près.



Figure II.5 : Dispositif de mesure de volume de gaz

II.2.7. Composition du biogaz produit

La composition du biogaz est effectuée par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe gaz Varian® 430-GC en injectant manuellement 1 mL du ciel gazeux des réacteurs à l'aide d'une seringue Hamilton®. Le chromatographe est équipé d'un détecteur à conductivité thermique (ou catharomètre) fixé à 180 °C pendant les analyses. La colonne de séparation est une colonne capillaire Varian® GC CP-Carboplot de 27,5 m x 0,53 mm, et 25 µm de diamètre. La pression dans l'injecteur est de 15 psi, et le gaz vecteur est l'argon.

Chaque analyse dure 7,50 min et le programme de montée en température se déroule comme suit : 60 °C de 0 à 2 min, montée à 110 °C entre 2 et 3 min à une vitesse de 20°C/min, puis un palier de 110 °C de 3 min à 7,5 min.

Une calibration du chromatographe est effectuée avant chaque série d'analyses correspondant à une expérience donnée.

II.2.8. Teneur en métaux lourds

Le but de l'analyse est de déterminer la teneur en métaux lourds des échantillons afin de les comparer aux valeurs limites d'inhibition et aux valeurs autorisées pour l'épandage des digestats.

Les teneurs en métaux ont été dosées par spectrométrie à torche à plasma (ICP-OES) après minéralisation des échantillons. Un générateur haute fréquence est utilisé pour chauffer un courant d'argon et créer un plasma (gaz ionisé) par l'intermédiaire d'une bobine d'induction. La température atteinte est de l'ordre de 7000 à 8000 K. Au contact du plasma, l'échantillon est réduit à l'état d'atomes indépendants et d'ions. Les atomes excités par le plasma réémettent l'énergie qu'ils ont acquise sous forme d'un rayonnement électromagnétique, qui traverse un système dispersif séparant les différentes raies d'émission présentes dans le rayonnement. Chaque élément chimique possède un spectre optique caractéristique et l'intensité des raies émises par l'échantillon est proportionnelle à la concentration en éléments de l'échantillon.

Pour la minéralisation des échantillons, une masse de 0,10 g environ d'échantillon est pesée dans un réacteur en téflon, à laquelle on ajoute 8,5 ml d'acide nitrique à 65% et 1,5 ml de peroxyde d'hydrogène à 50%. Le contenu du réacteur en téflon est ensuite porté dans un four à microondes « Start D » de Milestone® à une température de 180 °C et une pression de 9 bars pendant 40 min. Les réacteurs en téflon sont ensuite laissés refroidir pendant 1h environ, puis on récupère la solution ainsi minéralisée dans une fiole et on complète le volume à 50 ml avec de l'eau ultrapure. La solution obtenue est ensuite filtrée à 0,45 µm pour analyse à l'ICP-OES. Les teneurs en métaux lourds sont calculées en appliquant la formule :

$$Teneurs\ en\ métaux\ (ppm) = \frac{Teneur\ à\ l'ICP(en\ ppb).50}{Masse\ d'échantillon.1000}$$

Chaque cycle de minéralisation est suivi d'un cycle de rinçage pendant lequel on introduit dans les réacteurs en téflon 4 ml d'acide nitrique à 65% et 4 ml d'eau ultrapure. Ensuite, le contenu du réacteur est également porté à une température de 180 °C et à une pression de 9 bars pendant 20 min.

II.2.9. Mesure des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Le but de l'analyse est de déterminer la teneur en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) des échantillons afin de les comparer aux valeurs limites de toxicité définies par la législation.

Pour évaluer les teneurs en HAP, nous avons développé et mis au point une méthode appropriée. Plusieurs méthodes existent pour l'extraction et la quantification des HAP dans des matrices comme le sol, les boues d'épuration et les eaux ; mais ces méthodes ne sont applicables ni au lisier ni à l'herbe à cause de la nature apolaire de la chlorophylle, qui est extraite en grande quantité en même temps que les HAP durant la phase d'extraction par les solvants organiques. La chlorophylle étant connue pour perturber les signaux servant à détecter puis quantifier les HAP, une phase de nettoyage des extraits est nécessaire. La phase de nettoyage est une réaction de saponification qui agit avec les fonctions esters de la chlorophylle pour lui donner un caractère hydrophile. Par la suite, un lavage à l'eau permettra d'éliminer la chlorophylle. En s'inspirant des travaux de Dugay et al. (2012), la méthode a été mise au point et optimisée.

Le choix de modifier la méthode de Dugay a été motivé par le désir d'utiliser pour l'extraction un solvant moins dangereux que le toluène. La méthode proposée ici se veut donc plus respectueuse de l'environnement.

Le protocole de mesure des HAP comprend donc : une phase d'extraction, une phase d'élimination de la chlorophylle contenue dans l'extrait, et l'analyse par HPLC. Les réactifs chimiques utilisés sont de qualité HPLC.

II.2.9.1. Extraction des HAP par ASE (Accelerated Solvent Extraction)

Le principe de l'extraction par ASE (Accelerated Solvent Extractor) de Dionex® (figure II.6) consiste à envoyer un mélange équivolumique de dichlorométhane et d'acétone sous pression et à haute température à travers les cellules de l'ASE contenant l'échantillon. Le solvant organique qui est alors chargé en composés apolaires, est récupéré dans des vials.



Figure II.6 : Vue générale de l'ASE

Pour effectuer l'extraction, il a été placé successivement dans les cellules d'extraction en acier inoxydable :

- 1 filtre en fibre de verre de chez Whattman®
- 1 g de sulfate de sodium anhydre pure à 98%
- 1 g de florisil
- 1 filtre en fibre de verre de chez Whattman
- 2 g environ d'échantillon
- 1 filtre en fibre de verre de chez Whattman
- Billes de verre jusqu'à remplissage de la cellule

Les cellules sont ensuite fermées et posées sur le rack de l'ASE. Les vials de récupération des extraits sont placés sur l'ASE aussi, et la méthode d'extraction est lancée. Les paramètres définis pour la méthode d'extraction sont consignés dans le tableau en annexe.

II.2.9.2. Elimination de la chlorophylle

L'extrait recueilli par ASE dans les vials est ensuite évaporé à température ambiante (21° C) sous flux d'azote à l'aide d'un évaporateur TurboVap LV® (figure II.7).



Figure II.7 : Evaporateur TurboVap LV

Les vials sont ensuite récupérés et les étapes suivantes sont effectuées :

- Ajout de 50 mL d'une solution saponifiante contenant 1M de KOH dans un mélange méthanol-eau à 80/20 (v/v).
- Sonication (45 Hz pendant 30 min) pour remettre en suspension l'extrait séché collé aux parois des vials
- Mise à l'étuve des vials à une température de 60 °C pendant 30 min (Saponification).
- Extraction sur phase solide du contenu des vials sur des cartouches strataX à haute performance polymérique acquises chez Phenomenex® :
 - Conditionnement des cartouches en faisant passer successivement 5 mL de dichloromethane, 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau
 - Passage de l'échantillon sur la cartouche
 - Rinçage de la cartouche avec 10 mL d'eau ultrapure pour éliminer la chlorophylle, et donc prévenir les interférences à la phase de dosage des HAP
 - Séchage des cartouches à l'air en maintenant l'aspiration sous vide
- Elution des HAP avec 8 mL (4 mL deux fois) de dichlorométhane
- Evaporation sous flux d'azote du dichlorométhane à l'aide du TurboVap LV
- Ajout de 2 mL d'acétonitrile pour remettre en solution les HAP, puis sonication pour resuspendre l'extrait
- Filtration à 0,2 µm à l'aide d'une seringue en verre et de filtre seringue en PTFE
- Récupération du filtrat dans un vial, et stockage à -20 °C pour analyse HPLC.

II.2.9.3. Dosage des HAP par HPLC

Les HAP ont été dosés par HPLC en utilisant comme solvant d'élution un mélange d'eau ultrapure et d'acétonitrile de qualité HPLC. La chaîne HPLC utilisée est dotée de :

- un passeur d'échantillon SIL-20AC HT de Shimadzu® permettant d'injecter 50 µL, et qui peut prendre jusqu'à 80 échantillons
- un four colonne CTO-20A de Shimadzu®
- pour la séparation des composés : une colonne EnviroSep-PP de dimensions 125 x 4,6 mm ID, précédée d'une colonne de garde C18 de dimensions 4 x 3,0 mm toutes deux acquises chez Phenomenex®
- un détecteur à barrette de diode (PDA) SPD-M20A de Shimadzu®
- un détecteur fluorescent RF-20A XS de Shimadzu®.
- un module de communication CBM-20A de Shimadzu®

Pour la détection, les échantillons passent par le PDA en premier, puis passent à travers le détecteur fluorescent. Concernant ce dernier, il a fallu spécifier pour chaque HAP une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Un premier test de détection a été effectué avec le couple de longueurs d'onde excitation/émission proposé par les fabricants de la colonne, puis un second avec des valeurs trouvées dans la littérature. Par la suite, les couples de longueur d'ondes choisis pour la détection au fluorimètre résultent de la combinaison de ces deux tests selon la clarté et l'intensité des pics de détection.

Les conditions opératoires qui ont été définies pour détecter et quantifier les HAP sont consignées en annexe.

La calibration a été préalablement effectuée en diluant un standard (PAH-Mix 9) contenant les 16 HAP déclarés dangereux par l'US-EPA. Les concentrations choisies pour les droites d'étalonnage sont respectivement 0,02 – 0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 ppm pour rester dans les valeurs trouvées dans la bibliographie pour les herbes en bordure de route.

Chapitre III : Co-digestion anaérobie de substrats

III.1. Co-digestion du lisier bovin avec de l'herbe ensilée : effet de la durée d'ensilage

Le but est d'étudier l'effet de la durée d'ensilage réalisé sans additifs sur la co-digestion anaérobie avec du lisier bovin. Pour ce faire, et dans un but de valorisation d'un déchet à bon pouvoir méthanogène, de l'herbe a été coupée le long d'une route départementale de la région de Lorraine à l'aide d'un riper, puis ensilée dans des sacs plastiques et stockée au laboratoire. Les durées d'ensilage testées varient entre 3, 5, 8 et 36 semaines. A la fin de chaque durée, un sac d'ensilage est ouvert et l'herbe y est prélevée pour réaliser les tests de co-digestion.

Les tests sont réalisés en batch dans des bouteilles de 1 L dans lesquelles 20 g d'herbe ensilée ont été ajoutés à 100 g de lisier, et 400 mL de solution tampon pH7 pour éviter une variation éventuelle du pH, et maintenir ainsi un milieu favorable à la communauté microbienne. Chaque durée d'ensilage est testée en duplicat, et le milieu n'a pas été inoculé avec du digestat. Il s'en suit que les microorganismes responsables de la conversion de la matière organique sont ceux naturellement présents dans le lisier frais.

III.1.1. Caractérisation du lisier et de l'herbe

Le tableau III.1 présente la caractérisation des substrats en termes de matières sèches (MS), matière organique (MO), ammonium et rapport C/N. Les lisiers utilisés présentent un taux de MS compris entre 10% et 12%, inférieur à celui des herbes ensilées qui est compris entre 18% et 24%. Les taux de MO des herbes ensilées (compris entre 82% et 87%) sont supérieurs à ceux du lisier (entre 80% et 81%), sauf lors du test à 5 semaines. On note aussi que les teneurs en ammonium des lisiers sont supérieures à ceux des herbes. Le ratio C/N de tous les substrats utilisés est compris entre 17 et 20 (tableau III.1). Ces derniers sont donc de bons sujets pour la méthanisation puisque le ratio optimum requis pour assurer une bonne digestion doit être compris entre 15 et 45 (Atandi et al., 2012).

Tableau III.1: Caractérisation des résidus agricoles (Matières Sèches: MS, Matière Organique : MO, Ammonium et ration C/N)

	Matières sèches (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium (mg _{N-NH4} ⁺ /g d'échantillon)	Ratio C/N
Lisier pour test 3 semaines	10,5	80,2	2,33	18
Herbe ensilée 3 semaines	23,6	85,5	0,63	17
Lisier pour test 5 semaines	10,7	85,0	2,28	19
Herbe ensilée 5 semaines	18,5	82,4	0,47	20
Lisier pour test 8 semaines	10,0	80,4	2,38	18
Herbe ensilée 8 semaines	23,7	86,7	0,43	19
Lisier pour test 36 semaines	11,9	80,7	1,22	20
Herbe ensilée 36 semaines	22,2	85,0	0,61	20

Les analyses de fibres pour l'herbe ensilée sont consignées dans le tableau III.2. Les paramètres des herbes ensilées n'affichent pas de tendance par rapport à la durée d'ensilage. Cependant, lorsqu'on considère les herbes ensilées à 3, 8 et 36 semaines, trois paramètres montrent un accroissement avec l'augmentation de la durée d'ensilage à savoir les fibres brutes, les fibres résistantes aux détergents neutres (NDF) et la teneur en cellulose. On note aussi que le pourcentage de NDF, qui est une approximation de la concentration de la paroi cellulaire, est compris entre de 47% à 56% pour les herbes ensilées. La cellulose qui représente la partie la plus biodégradable des carbohydrates de la paroi cellulaire évolue au cours du temps. Elle ne compte que pour 13% pour l'herbe ensilée à 3 semaines et représente 17% à 20% pour les ensilages à 5, 8 et 36 semaines.

Tableau III.2 : Analyse des fibres sur l'herbe ensilée séchée

	Herbe ensilée 3 semaines	Herbe ensilée 5 semaines	Herbe ensilée 8 semaines	Herbe ensilée 36 semaines
Fibres brutes (%)	45	56	46	57
ADF (%)	31	32	19	37
NDF (%)	47	51	49	56
Lignine (%)	17	13	13	18
Hemicellulose (%)	17	19	20	18
Cellulose (%)	13	20	17	20

*ADF : acid detergent fibers ; NDF : neutral detergent fibers

Les teneurs en ammonium affichent 0,63, 0,47, 0,43 et 0,61 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4^+}$ par gramme d'échantillon pour les herbes ensilées de 3, 5, 8 et 36 semaines respectivement. Les teneurs dans les batch de co-digestion (tableau III.3) varient de 245 à 478 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{L}$, et restent donc inférieures à la concentration inhibitrice mentionnée dans la littérature pour les procédés de digestion anaérobie (Atandi et al., 2012).

Tableau III.3 : Composition des batch, ratio d'herbe ensilée, ammonium et pH en fin d'expérience

Batch en duplicat	Composition	Ratio d'herbe ensilée en entrée (% MO)	Ammonium initial ($\text{mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{L}$)	pH final
#1 et #2	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 (Témoin pour test 3 semaines)	0	468	6,9 / 6,9
#3 et #4	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée 3 semaines + 400 mL de tampon pH7	33	472	6,8 / 6,8
#5 et #6	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 (Témoin pour test 5 semaines)	0	458	7,0 / 7,0
#7 et #8	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée 5 semaines + 400 mL de tampon pH7	25	457	6,8 / 6,8
#9 et #10	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 (Témoin pour test 8 semaines)	0	478	6,8 / 6,8
#11 et #12	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée 8 semaines + 400 mL de tampon pH7	34	474	6,7 / 6,7
#13 et #14	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 (Témoin pour test 36 semaines)	0	245	7,0 / 7,0
#15 et #16	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée 36 semaines + 400 mL de tampon pH7	28	258	6,8 / 6,8

Le tableau III.3 montre la composition des batch pour tous les mélanges testés, avec le pourcentage de matière organique apportée par l'herbe ensilée dans l'alimentation et les valeurs de pH à la fin des expériences. Le ratio d'herbe ensilée dans l'alimentation représente des pourcentages allant de 25% à 34% pour tous les tests ; ce qui si on se réfère à Lehtomäki et al., (2007) suppose que la co-digestion devrait être efficace.

Les pH finaux ont été mesurés en fin d'expérience pour vérifier l'acidité du milieu, dans le but d'informer sur un éventuel phénomène d'inhibition pendant les tests. Les valeurs de pH obtenues sont comprises entre les valeurs optimales (6,5 à 8,5) assurant un bon déroulement de procédé selon la littérature (Moletta, 2008), et confirment donc qu'aucune inhibition relative à l'acidité du milieu ne peut survenir.

III.1.2. Production de biogaz

Le tableau III.4 montre les volumes de biogaz pour chaque test de co-digestion et son test témoin associé.

Tableau III.4 : Production de biogaz des tests de co-digestion et gain de production

Durée d'ensilage (duplicats)	Volume moyen de biogaz (mL)	Gain de production par rapport au témoin (lisier seul) (%)
3 semaines	2017±80: témoin (Lisier)	26
	2534±11 : co-digestion (Lisier + Herbe)	
5 semaines	2538±71 : témoin (Lisier)	5
	2673±75 : co-digestion (Lisier + Herbe)	
8 semaines	2491±98 : témoin (Lisier)	31
	3268 : co-digestion (Lisier + Herbe)	
36 semaines	1879±254 : témoin (Lisier)	77
	3324±243 : co-digestion (Lisier + Herbe)	

Les pourcentages de gain de production sont de 26%, 5%, 31% et 77% pour les tests de co-digestion avec l'herbe à 3, 5, 8 et 36 semaines respectivement. Hormis le test à 5 semaines qui ne suit pas particulièrement la tendance, on note que la durée d'ensilage affecte positivement la production de biogaz.

L'observation de la figure III.1 qui présente les volumes moyens cumulés de biogaz produits au cours du temps permet d'étudier l'effet de l'herbe sur la production par comparaison au témoin. Tous les tests témoins présentent chacun une production à vitesse quasi constante de 67, 86, 84 et 61 mL/jour pour les tests à 3, 5, 8 et 36 semaines respectivement. En revanche, les tests de co-digestion présentent des accélérations et des ralentissements de production. Le test à 3 semaines présente une accélération les 4 premiers jours avec une production supérieure à son témoin. S'en suit une phase de ralentissement jusqu'au 16^{ème} jour où le volume du test de co-digestion est légèrement inférieur au test, puis un redémarrage jusqu'à la fin de l'expérience. Le test à 5 semaines présente une production jusqu'au 10^{ème} jour qui est légèrement supérieure à celle du témoin. S'en suit une accélération qui n'a duré que 5 jours, puis un ralentissement jusqu'à la fin de l'expérience. Le test à 8 semaines présente une accélération les 5 premiers jours, puis un ralentissement jusqu'au 12^{ème} jour pour redémarrer par la suite, et connaître un ralentissement à partir du 22^{ème} jour. Sa production n'était inférieure à celle du témoin que pendant 3 jours. Le test à 36 semaines connaît aussi une accélération les 5 premiers jours, puis un ralentissement et un redémarrage jusqu'au 23^{ème} jour. Sa production n'est à aucun moment inférieure à celle de son témoin.

Comme signalé plus haut, hormis le test à 5 semaines, tous les tests de co-digestion présentent une accélération au début, un ralentissement, puis un redémarrage de la production. Les profils de production montrent que la durée du ralentissement diminue avec la durée d'ensilage qui augmente. Plus l'ensilage est long, plus il facilite alors la conversion de la matière organique en biogaz par les microorganismes.

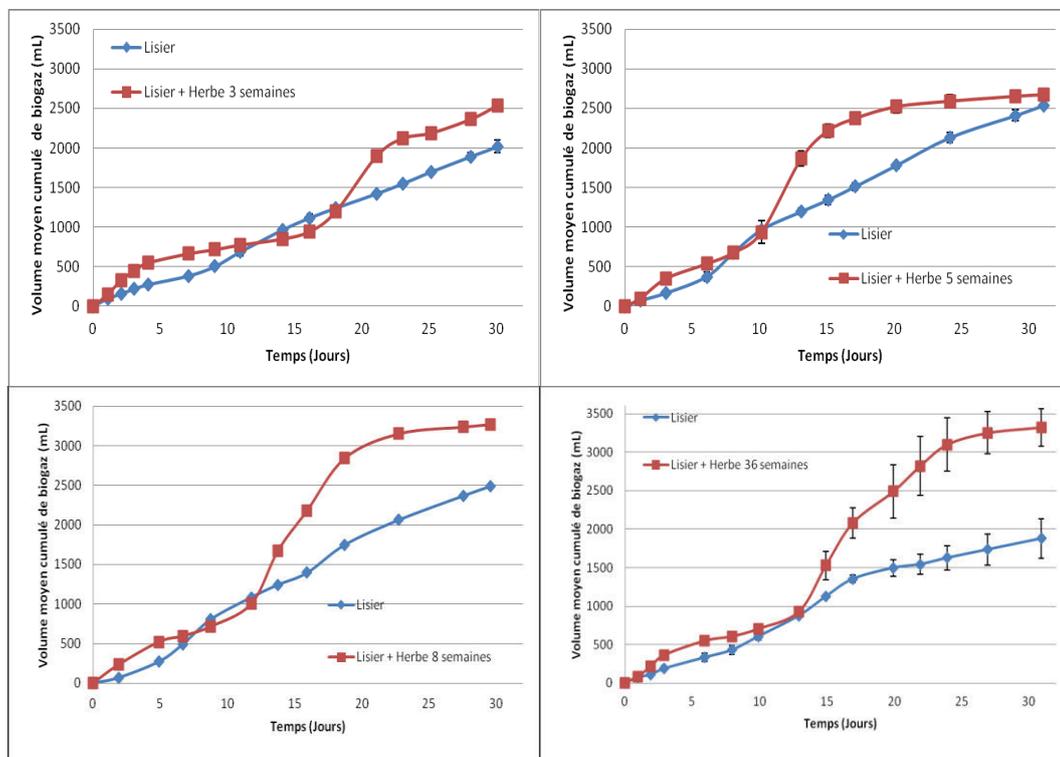


Figure III.1 : Volumes cumulés de biogaz des tests de co-digestion du lisier avec l'herbe ensilée pendant 3, 5, 8 et 36 semaines

III.1.3. Evolution des teneurs en CH₄ et CO₂

La figure III.2 montre l'évolution des teneurs en CH₄ et CO₂ du ciel gazeux des réacteurs batch au cours des tests de co-digestion. Les courbes en bleu représentent le témoin pour chaque test (lisier seul) et les courbes en rouge les tests de co-digestion. Les courbes en trait plein montrent l'évolution du CH₄ et les courbes en pointillés l'évolution du CO₂. Bien que les témoins (lisier seul) réalisés à différents moments soient faits de la même manière pour chaque expérience, ils présentent des évolutions différentes. L'analyse de chaque test de co-digestion se fera donc par rapport à son témoin.

Même si les témoins ne présentent pas le même démarrage, après le 15^{ème} jour leur teneur en méthane se stabilise entre 60% et 70%. Pour le test à 3 semaines, la teneur en méthane du test de co-digestion présente un avantage sur son témoin les 5 premiers jours, mais ralentit fortement jusqu'au 16^{ème} jour. Elle rejoint ensuite des valeurs proches du témoin à partir du 18^{ème} jour, pour se stabiliser aux environs de 65% en fin d'expérience. Pour le test à 5 semaines, la teneur en méthane du test de co-digestion présente aussi un avantage sur son témoin les 5 premiers jours. Il

présente également un ralentissement par rapport à son témoin, moins important que dans le cas du test à 3 semaines. Au 13^{ème} jour, sa teneur avoisine celle de son témoin mais présente un écart de l'ordre de 10% à partir du 20^{ème} jour jusqu'en fin d'expérience. Le test de co-digestion avec l'herbe à 8 semaines affiche aussi un avantage sur son témoin les 5 premiers jours, mais ralentit par la suite et ne rejoint le témoin qu'au 13^{ème} jour. Jusqu'en fin d'expérience ses teneurs en méthane sont voisines de celles de son témoin. Quant au test de co-digestion avec l'herbe à 36 semaines, sa teneur en méthane reste en deçà de celle de son témoin jusqu'au 22^{ème} jour d'expérience, puis présente des valeurs proches jusqu'en fin d'expérience. Le test à 36 semaines et son témoin présentent des profils similaires, à la différence que le test de co-digestion présente un retard de 12% à partir du 3^{ème} jour. Le décalage se réduit à partir du 15^{ème} jour où la phase de stabilisation est amorcée, pour être faible en fin d'expérience. Remarquons que les teneurs de CO₂ affichées par les tests de co-digestion sont supérieures à celles de leurs témoins respectifs pour toutes les herbes testées. Les écarts sont importants en début d'expérience mais se réduisent après le 15^{ème} jour.

La figure III.2 montre que l'ajout d'herbe retarde la montée de la teneur en méthane des tests de co-digestion vers le régime stable de production. Ce retardement résulterait de l'état de l'herbe (état de dégradation lié à l'ensilage) et la mise en place de la population microbienne (acétogènes et méthanogènes) dont le temps de division se situe entre 5 et 15 jours. L'écart entre les teneurs de méthane est important au début des tests, puis se réduit pour devenir très faible en fin d'expérience. Ainsi pour chaque expérience, à partir d'un moment (au bout de 17 jours environ), les teneurs en méthane du témoin et du test de co-digestion sont similaires. Lors de nos expériences, les teneurs en CH₄ des témoins se stabilisent à une valeur proche de 70%. Il ressort de ces constats que l'ajout d'herbe ensilée et la durée d'ensilage n'ont pas un impact positif sur la teneur en CH₄.

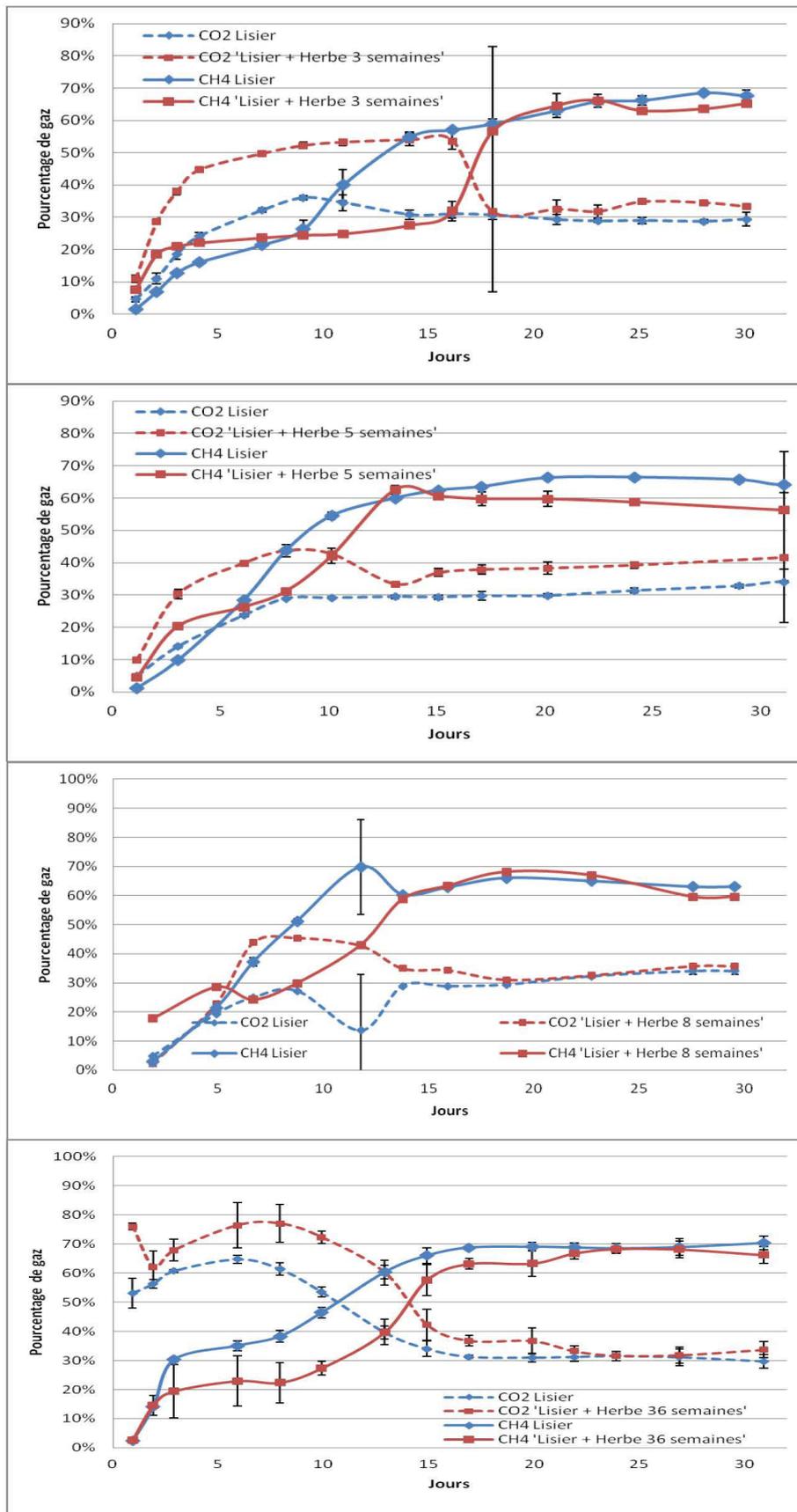


Figure III.2 : Evolution des teneurs en CH₄ et CO₂ des tests de co-digestion avec l'herbe ensilée

III.1.4. Production de méthane

Le volume de méthane produit au terme des expériences est présenté dans le tableau III.5. On note que les tests témoins (lisier seul) ne présentent pas les mêmes volumes moyens finaux, même si le lisier utilisé a été prélevé au même moment. Ces différences pourraient être associées aux temps de congélation subit par les lisiers des tests à 5, 8 et 36 semaines. Pour s'affranchir de cette variabilité dans les discussions, le volume de méthane produit pour chaque test de co-digestion a été rapporté au volume produit par le témoin correspondant, pour évaluer si la co-digestion a conduit à une amélioration.

Tableau III.5 : Production de méthane des tests de co-digestion et pourcentage d'amélioration

Durée d'ensilage (duplicats)	Volume moyen de méthane (mL)	Gain de production par rapport au témoin (lisier seul) (%)
3 semaines	978±69 : témoin (Lisier seul)	25
	1219±63 : co-digestion (Lisier + Herbe)	
5 semaines	1373±48 : témoin (Lisier seul)	-4
	1323±23 : co-digestion (Lisier + Herbe)	
8 semaines	1381±118 : témoin (Lisier seul)	26
	1743 : co-digestion (Lisier + Herbe)	
36 semaines	1050±231 : témoin (Lisier seul)	67
	1751±243 : co-digestion (Lisier + Herbe)	

Le tableau III.5 montre une production de méthane qui augmente avec la durée d'ensilage et qui va de 25% (pour le test avec l'herbe ensilée de 3 semaines) à 67% (pour le test avec l'herbe ensilée de 36 semaines). Ces résultats sont en accord avec ceux de Lehtomäki et al. (2007) qui renseignent une augmentation de 16% à 65% lors de la co-digestion du lisier bovin et de l'herbe ensilée. Cependant, on peut noter encore une fois que le test avec l'herbe à 5 semaines fait exception car il ne montre pas de différence significative par rapport à son témoin, et ne suit donc pas la tendance générale.

La figure III.3 présente la production cumulée de méthane sur la période expérimentale de 30 jours. On y observe que la phase de mise en place de la communauté microbienne a une durée supplémentaire à celle du témoin de 7, 4, 7 et 5 jours pour les tests avec les herbes ensilées de 3, 5, 8 et 36 semaines respectivement. Par ailleurs, le volume cumulé de méthane du test de co-digestion surpasse celui du témoin après 19 jours pour le test à 3 semaines, alors qu'elle surpasse le témoin après 11, 13 et 15 jours pour les tests à 5, 8 et 36 semaines respectivement. La figure III.3 montre que l'addition d'herbe ensilée induit un effet retardateur sur la conversion en

méthane (quand la courbe du test de co-digestion est en dessous de celle du témoin). Cette période inhibitrice a duré 8, 4, 6 et 6 jours pour les tests à 3, 5, 8 et 36 semaines respectivement.

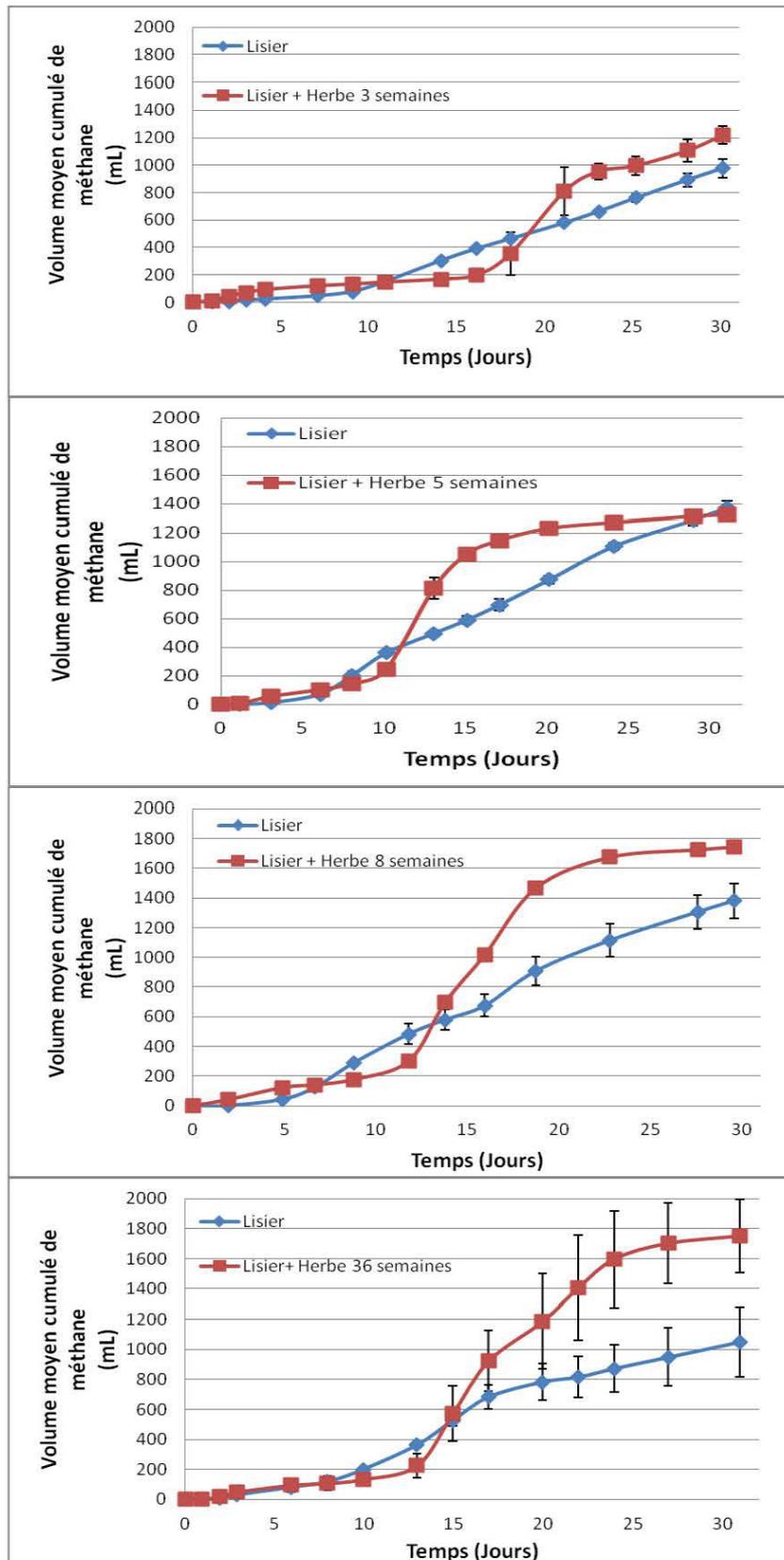


Figure III.3 : Production cumulée de méthane pour les tests de co-digestion anaérobie de lisier avec les herbes ensilées pendant 3, 5, 8 et 36 semaines

L'incorporation des herbes ensilées a globalement conduit à une amélioration de la phase de production du méthane, même si dans le cas de l'herbe à 5 semaines la production est inférieure à celle du témoin en fin d'expérience. Sachant que le processus d'ensilage conduit à la formation de bons précurseurs de méthane (acide lactique, acide acétique, acide formique, alcools, ion hydronium et dioxyde de carbone), le gain de production de méthane peut être relié à la production de ces précurseurs au fil de l'ensilage. On remarque aussi qu'il faut a priori attendre entre 10 et 17 jours pour voir la production de méthane décoller et dépasser le témoin.

III.1.5. Rendement de production de méthane

La section précédente discutait de l'efficacité de la co-digestion par la comparaison des volumes de biogaz et de méthane produits. En ajoutant de l'herbe ensilée comme co-substrat, on rajoute plus de substrat, les masses de lisier étant les mêmes. Ce qui amène à produire plus de volume de méthane s'il n'y a pas de ralentissement ou d'inhibition. Même si la masse brute d'herbe ensilée ne représente que 16% environ de l'alimentation, elle représente cependant 33%, 25%, 34% et 28% de part de matière organique dans l'alimentation pour les essais de co-digestion à 3, 5, 8 et 36 semaines respectivement.

La notion de rendement dans cette section est différente de celle employée dans le domaine du génie des procédés. Son utilisation ici est propre à la digestion anaérobie. Les rendements de méthane ont été analysés en termes de volume produit par masse de matière organique contenue dans l'alimentation. Le but de cette analyse est de déterminer si l'ajout d'herbe ensilée impacte les cinétiques de conversion de la matière organique par la communauté microbienne. En effet, la matière organique contenue dans l'herbe et le lisier n'est pas de la même nature, et ne présente donc pas la même digestibilité.

La figure III.4 montre l'évolution du rendement instantané, calculé sur la base de la matière organique introduite et exprimée en L_{CH_4}/kg_{MO} . Il s'agit d'un volume massique où la MO représente la masse totale de matière organique introduite dans le réacteur batch.

Au terme de l'expérience, le rendement de méthane pour les tests de co-digestion à 3, 5, 8 et 36 semaines sont de 98, 106, 144 et 131 respectivement, pendant que leurs témoins respectifs affichaient 117, 151, 172 et 110. Concernant les témoins, la variabilité observée pour les rendements, alors que le lisier utilisé provient de la même campagne d'échantillonnage, pourrait être reliée au développement des microorganismes au cours des tests. Les réacteurs n'ayant pas été inoculés, les microorganismes responsables de la conversion en méthane sont ceux provenant du lisier d'alimentation. Il en découle que le temps de stockage du lisier à $-20^{\circ}C$ aurait pu impacter les fonctions des microorganismes. En effet, les différents groupes de microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie ne sont pas présents de manière significative au début de l'expérience, et doivent se développer durant les premiers jours (phase de latence). Ceci pourrait aussi expliquer la différence entre le meilleur de nos résultats ($172 L_{CH_4}/kg_{MO}$) et les valeurs

trouvées dans la littérature (268 L_{CH_4}/kg_{MO} (Lehtomäki et al., 2007), 210 L_{CH_4}/kg_{MO} ajoutée (Holm-Nielsen et al., 2009)). Nos expériences sont donc probablement trop courtes.

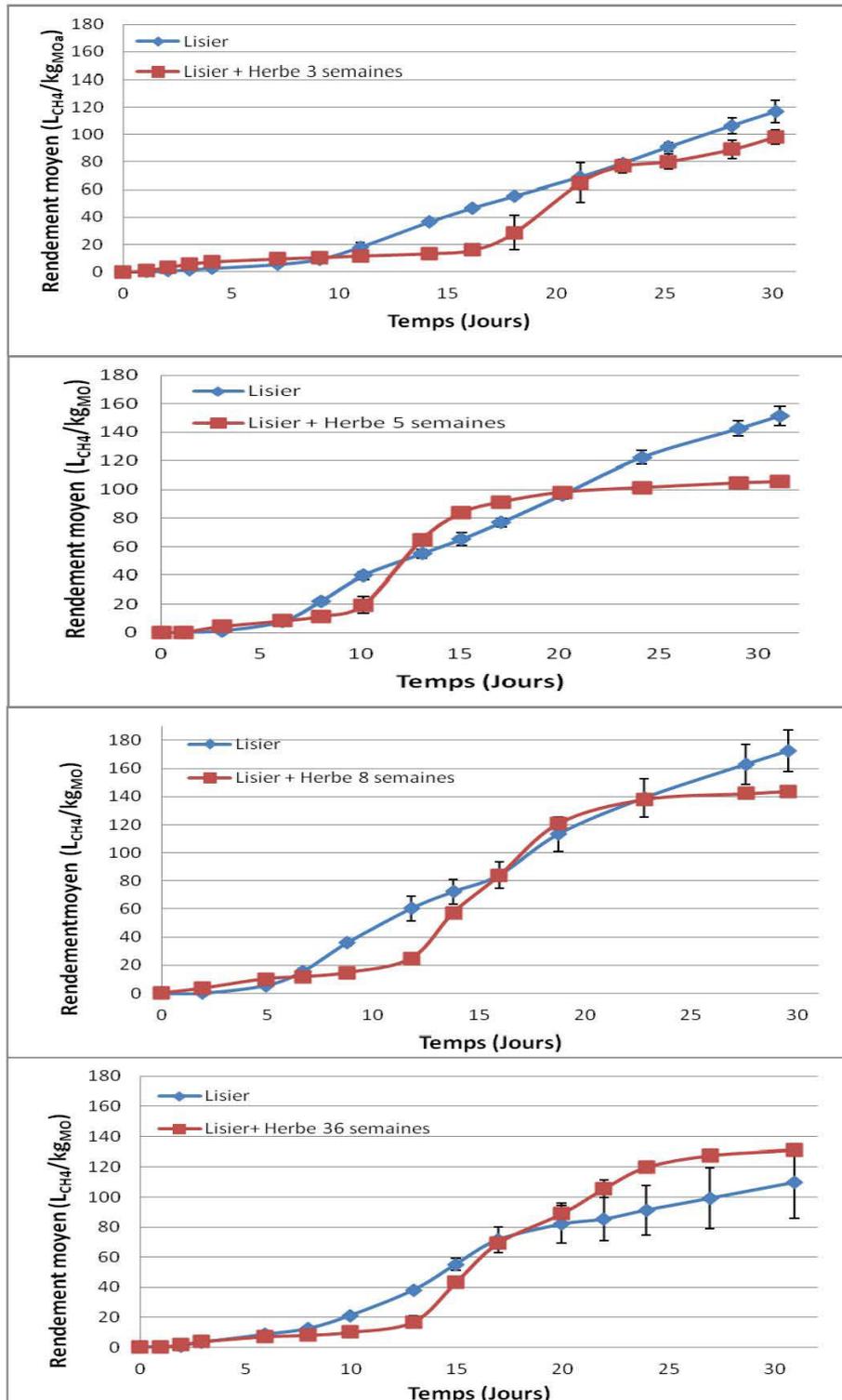


Figure III.4 : Rendement de méthane pour les tests de co-digestion anaérobie de lisier avec les herbes ensilées pendant 3, 5, 8 et 36 semaines

Concernant les tests de co-digestion, on observe des durées de phase de latence plus longues que celles des témoins (lisier seul). Elle était plus longue de 9 jours pour le test à 3 semaines, 4 jours pour le test à 5 semaines, 7 jours pour le test à 8 semaines et 5 jours pour le test à 36 semaines. L'extension de la phase de latence par rapport aux témoins peut être attribuée à l'hydrolyse de l'herbe ensilée. Comme susmentionné, la matière organique contenue dans l'herbe est difficile et lente à dégrader.

Le rendement de méthane du test de co-digestion avec l'herbe de 3 semaines n'a pas surpassé celui de son témoin pendant les phases de production rapide de méthane. Le rendement du test de co-digestion avec l'herbe de 5 semaines a surpassé celui de son témoin du 12^{ème} au 20^{ème} jour, puis est resté inférieur jusqu'à la fin de l'expérience. Pour le test avec l'herbe à 8 semaines, le rendement de la co-digestion a surpassé celui du témoin après 16 jours, mais est retombé en deçà du 23^{ème} jour à la fin. Celui du test à 36 semaines a surpassé celui du témoin après 17 jours et est resté supérieur jusqu'à la fin. Cependant, la tendance de son témoin laisse supposer que le témoin pourrait rejoindre, voire dépasser la co-digestion avec le temps.

Le tableau III.6 présente les rendements des tests de co-digestion et ceux de leur témoin respectif.

Tableau III.6 : Rendements de méthane des tests de co-digestion et pourcentage d'amélioration

Durée d'ensilage (duplicats)	Témoin	Co-digestion	Gain de production par rapport au témoin (lisier seul) (%)
3 semaines	117±8	98±5	-16
5 semaines	151±7	106±2	-30
8 semaines	172±15	144	-17
36 semaines	110±24	131±2	+20

Ces résultats montrent que l'ajout comme co-substrat de l'herbe ensilée pendant 3 semaines n'améliore aucunement ni le rendement de méthane (-16%), ni les vitesses de conversion en méthane sur la durée de l'expérience. Le test à 5 semaines affiche une diminution très importante (-30%) du rendement final par rapport à son témoin, même si on note une amélioration entre le 13^{ème} et le 20^{ème} jour. L'herbe ensilée de 8 semaines n'a pas conduit non plus à l'amélioration du rendement final de la co-digestion (-17%), mais a eu un effet positif du 16^{ème} au 23^{ème} jour. Le test de co-digestion avec l'herbe à 36 semaines est celui qui affiche une amélioration du

rendement final de méthane de 20%. Il a aussi montré un meilleur profil de conversion en méthane à partir du 20^{ème} jour.

Se référant au rendement de méthane, on peut conclure que 36 semaines est la durée d'ensilage qui assure l'efficacité de la co-digestion anaérobie de lisier et d'herbe ensilée. Il est donc possible pour cette durée d'ensilage de valoriser simultanément le lisier et l'herbe ensilée sans affecter le procédé. Cependant, les résultats avec l'herbe à 8 semaines laissent supposer qu'il existe un temps d'ensilage compris entre 8 semaines et 36 semaines qui permettrait d'incorporer les herbes ensilées sans pour autant affecter le procédé. Pour ce temps d'ensilage, la différence de rendement final entre les tests de co-digestion et leurs témoins, ne présentera pas de différence significative.

III.1.6. Teneurs en métaux lourds

Le but de ce travail est de trouver les meilleures conditions de fonctionnement en termes de production de méthane, mais aussi en termes de sécurité des produits obtenus (par rapport aux micropolluants). Les substrats utilisés, notamment l'herbe ensilée, peuvent contenir des micropolluants. A cette fin, les teneurs en métaux lourds (exprimées en µg/g de matière sèche) ont été mesurées pour les échantillons en début et fin de réaction. En fin de réaction, du fait des contraintes opératoires, les teneurs n'ont été mesurées que sur la partie solide après une séparation de phase avec un tamis. Le tableau III.7b présente les teneurs en métaux lourds des échantillons mesurés pour les substrats incorporés dans le batch (Entrée) et la teneur sur la part solide à la fin de l'expérience (Fin).

Tableau III.7a : Teneurs limites en éléments traces métalliques pour les normes NF U 44-041 et NF U 44-051

	Valeur limite NF U 44-041 (µg/g de MS)	NF U 44-051		
		Valeur limite (µg/g de MS)	Flux maximal par an (g/ha)	Flux maximal sur 10 ans (g/ha)
Arsenic	-	18	270	900
Cadmium	10	3	45	150
Chrome	1000	120	1800	6 000
Cuivre	1000	300	3000	10 000
Nickel	200	60	900	3 000
Plomb	800	180	2700	9 000
Zinc	3000	600	6000	30 000

Les normes NF U 44-041 et 44-051 réglementent respectivement les concentrations des éléments traces dans les boues d'épuration et dans les amendements organiques (Tableau III.7a). Leur comparaison montre que la norme NF U 44-051 est plus sévère et prend en compte les valeurs limites imposées par la norme NF U 44-041. Elle sera donc considérée pour discuter de la qualité sanitaire de nos digestats.

Le tableau III.7b montre que les teneurs sont très inférieures aux limites imposées par la norme NF U 44-051. Les métaux concernés par cette norme sont : l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le nickel (Ni) le plomb (Pb) et le zinc (Zn). L'aluminium (Al) et le manganèse (Mn) qui ont aussi été mesurés n'y sont pas mentionnés mais il était intéressant de les doser également. Les digestats résultant des expériences sont donc appropriés pour un épandage agricole. Même si les analyses en fin de réaction ne concernent que la partie solide, les analyses en entrée sur le total montrent que les seuils réglementaires sont respectés. La digestion anaérobie est un processus de minéralisation qui n'affecte que la matière organique. Les changements éventuels qu'on peut observer dans les teneurs en métaux ne peuvent être dus qu'à des processus physiques, puisque ces métaux ne sont pas dégradables pas les réactions biologiques. Une classification décroissante de la présence des métaux dans le milieu réactionnel donne $Al \gg Mn \sim Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > As > Cd$. On remarque aussi que pour chaque expérience, la quantité de métaux lourds est moins importante pour les tests de co-digestion que pour leur témoin respectif. L'herbe étant beaucoup moins chargée que le lisier, son incorporation apporte certes des quantités de métaux lourds, mais ne contribue pas à une augmentation de leur teneur globale dans l'échantillon de co-substrats.

Tableau III.7b : Teneurs en métaux en entrée et sortie de batch

	Aluminium	Arsenic	Cadmium	Chrome	Cuivre	Manganèse	Nickel	Plomb	Zinc
	µg/g de MS								
Teneur limite NF U 44-051		18	3	120	300		60	180	600
Entrée Lisier 3 semaines	3520	< l.d	0,69	57	44	246	27	7	211
Fin Lisier 3 semaines	1423	0,48	0,10	7	23	138	4	3	109
Entrée Lisier +Herbe 3 semaines	3135	< l.d	0,65	53	39	229	24	6	184
Fin Lisier +Herbe 3 semaines	986	0,51	0,08	9	16	118	5	1	70
Entrée Lisier 5 semaines	3236	< l.d	0,72	46	45	253	21	9	225
Fin Lisier 5 semaines	1059	0,53	0,07	6	18	117	4	3	86
Entrée Lisier +Herbe 5 semaines	2752	< l.d	0,63	40	39	224	18	8	193
Fin Lisier +Herbe 5 semaines	936	0,41	0,07	10	16	110	6	2	73
Entrée Lisier 8 semaines	3348	< l.d	0,71	33	47	266	17	5	233
Fin Lisier 8 semaines	1009	0,74	0,11	7	19	115	5	3	90
Entrée Lisier +Herbe 8 semaines	2902	< l.d	0,64	31	41	239	15	5	201
Fin Lisier +Herbe 8 semaines	1006	0,36	0,07	12	17	92	6	2	79
Entrée Lisier 36 semaines	1345	0,65	0,11	15	30	132	8	3	117
Fin Lisier 36 semaines	598	0,23	0,08	7	15	97	4	2	63
Entrée Lisier +Herbe 36 semaines	1261	0,56	0,08	15	27	121	8	3	102
Fin Lisier +Herbe 36 semaines	634	0,14	0,09	10	26	94	6	3	63

III.2. Co-digestion du lisier bovin avec de l'herbe ensilée et du lactosérum de chèvre

Le lactosérum constituant un résidu disponible dans les fermes et notamment à la ferme expérimentale de la Bouzule, le but de cette expérience est d'étudier l'effet de son ajout à la digestion. Cette section vise à évaluer la possibilité de digérer simultanément tous les résidus produits sur la ferme. Les tests ont donc consisté à co-digérer le lisier bovin, l'herbe ensilée et le lactosérum de chèvre. Lors du fonctionnement de la fromagerie, le flux de lactosérum rapporté au débit de lisier reviendra à une concentration de 1 g/L de lactose en entrée du digesteur. En effet le lactose est le composé majoritaire du lactosérum et représente la source du carbone qui sera transformée lors de la digestion anaérobie. On rajoute dans nos expériences une quantité de lactosérum correspondant aux concentrations de lactose à tester : 0,5 g/L de lactose, 1 g/L de lactose et 2 g/L de lactose. L'herbe utilisée est de l'herbe de bord de route et a été ensilée pendant 9 mois. Il s'agit de la même herbe que celle utilisée dans le précédent test de co-digestion.

Les tests ont été réalisés en batch dans des bouteilles de 1 L. Après ajout des substrats, 400 mL de solution tampon à pH7 ont été ajoutés pour éviter une variation éventuelle du pH, et maintenir ainsi un milieu favorable à la communauté microbienne. Chaque configuration a été testée en duplicat, et le milieu n'a pas été inoculé avec du digestat du fait de la non disponibilité de digesteur en fonctionnement au laboratoire ou sur la ferme. Il s'en suit que les microorganismes responsables de la conversion de la matière organique sont ceux naturellement présentes dans le lisier frais. Le volume de gaz produit et les teneurs en CH₄ et CO₂ ont été suivis tout au long de la durée de l'expérience qui est de 38 jours.

III.2.1. Caractérisation du lisier, de l'herbe et du lactosérum

Le lisier et l'herbe ensilée présentent une teneur en MS de 12% et 22% respectivement, et une teneur en MO de 81% et 85% respectivement (tableau III.8). La teneur en ammonium (exprimée en mg_{N-NH₄⁺}/g d'échantillon) du lisier (1,22) est deux fois supérieure à celle de l'herbe ensilée (0,61). Le lactosérum caractérisé par sa DCO présente une valeur de 78,77 g_{O₂}/L.

Les deux substrats affichent un ratio C/N égal à 20. Cette valeur est comprise dans la gamme optimale pour une bonne digestion (Atandi et al., 2012).

Tableau III.8 : Caractérisation du lisier, de l'herbe et du lactosérum (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)

	Matières sèche (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium initial (mg _{N-NH4} ⁺ /g d'échantillon)	Ratio C/N	DCO (g _{O2} /L)
Lisier	12	81	1,22	20	-
Herbe ensilée 36 semaines	22	85	0,61	20	-
Lactosérum de chèvre	-	-	-	-	78,77

Les analyses de teneur en fibres (tableau III.9) montrent que les NDF (Neutral Detergent Fibers), qui comptent pour une approximation de la paroi cellulaire, représentent 56% de la masse sèche des herbes. Même si l'herbe présente une teneur en matières sèche et organique élevée, seulement 20% de la matière sèche de cet ensemble est biodégradable. En effet la partie constitutive de la paroi cellulaire est difficilement assimilable par les microorganismes en charge de la digestion anaérobie.

Tableau III.9 : Analyse des fibres sur l'herbe ensilée séchée

	Herbe ensilée 36 semaines
Fibres brutes (%)	57
ADF (%)	37
NDF (%)	56
Lignine (%)	18
Hemicellulose (%)	18
Cellulose (%)	20

*ADF: acid detergent fibers; NDF: neutral detergent fibers

Le tableau III.10 affiche la composition des réacteurs, le ratio d'herbe ensilée dans l'alimentation totale (exprimée en %MO), les teneurs en ammonium et le pH à la fin des expériences. La part d'herbe ensilée compte pour 30% de l'alimentation totale, ce qui est proche des 30% conseillés, et devrait assurer une bonne réaction (Lehtomäki et al., 2007). Les teneurs en ammonium dans les batch de co-digestion sont comprises entre 254 et 258 mg_{N-NH4}⁺/L. Elles sont donc largement en deçà de la valeur inhibitrice de 1500 mg_{N-NH4}⁺/L renseignée dans la littérature (Atandi et al., 2012). Les pH finaux mesurés pour vérifier une éventuelle acidité du milieu qui aurait pu bloquer les réactions, montrent qu'un seul réacteur est susceptible de dysfonctionner. Hormis le réacteur 16 avec un pH<6,5, tous les réacteurs affichent un pH compris dans la gamme de bon fonctionnement.

Tableau III.10 : Composition des batch, ratio d'herbe ensilée, ammonium et pH en fin d'expérience

Batch en duplicats	Composition	Ratio d'herbe ensilée en entrée (% MO)	Ammonium initial (mg _{N-NH4} ⁺ /L)	pH final
#1 et #2	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7	0	245	7,0 / 7,0
#3 et #4	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée 36 semaines + 400 mL de tampon pH7	28	258	6,8 / 6,8
#5 et #6	100 g de lisier + 0,5 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	0	245	6,9 / 7
#7 et #8	100 g de lisier + 1 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	0	245	6,8 / 6,5
#9 et #10	100 g de lisier + 2 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	0	245	6,7 / 6,8
#11 et #12	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée + 0,5 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	28	258	6,6 / 6,8
#13 et #14	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée + 1 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	28	258	6,8 / 6,8
#15 et #16	100 g de lisier + 20 g d'herbe ensilée + 2 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	28	258	6,9 / 6,3

III.2.2. Production de biogaz

Le tableau III.11 présente la production de biogaz pour chaque test de co-digestion. Les pourcentages de gain de production ont été calculés par rapport au lisier seul, et le mélange "Lisier + Herbe + Lactose" a été comparé aux mélanges "Lisier + Herbe" et "Lisier + Lactose" pour chaque concentration de lactose testée.

Les volumes totaux de biogaz produits pour chaque configuration testée, présentent une grande variabilité. Cette variabilité est plus importante pour les tests impliquant le lactosérum de chèvre. Pour chaque test, la production maximale a été considérée pour la suite des analyses.

Tableau III.11 : Production de biogaz des tests de co-digestion du lisier avec l'herbe ensilée et le lactosérum et pourcentage d'amélioration

Contenu du réacteur	Volume de biogaz (mL)	Volume maximum (mL)	Pourcentage d'augmentation par rapport au lisier (%)	Pourcentage d'augmentation par rapport à "Lisier + Herbe" (%)	Pourcentage d'augmentation par rapport à "Lisier + x Lactose" (%)
Lisier	2059 2486	2486	-	-	-
Lisier + Herbe	3586 3290	3586	44%	-	-
Lisier + 0,5 g/L Lactose	2746 2008	2746	10%	-	-
Lisier + 1 g/L Lactose	2518 1646	2518	1%	-	-
Lisier + 2 g/L Lactose	2544 2970	2970	19%	-	-
Lisier + Herbe + 0,5 g/L Lactose	3108 2562	3108	25%	-13%	13%
Lisier + Herbe + 1 g/L Lactose	1762 2882	2882	16%	-20%	14%
Lisier + Herbe + 2 g/L Lactose	2534 1508	2534	2%	-29%	15%

L'ajout d'herbe améliore de 44% la production de biogaz par rapport au lisier seul. L'ajout de lactose à hauteur de 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L conduit à une amélioration de la production de 10%, 1% et 19% respectivement par rapport au lisier seul. La co-digestion des trois substrats donne une amélioration de 25%, 16% et 2% lorsqu'au lisier et à l'herbe est ajouté du lactosérum à hauteur de 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L de lactose respectivement. Cependant, comparativement au test du lisier et de l'herbe, la co-digestion des trois substrats conduit à une diminution de la production de 13%, 20% et 29% pour 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L de lactose respectivement. Le lactosérum de chèvre agit à ce niveau donc comme un ralentisseur.

La figure III.5 montre le volume cumulé de biogaz au fil du temps pour les réacteurs ayant produit le maximum pour chaque duplicat. Le test "lisier + herbe" présente une phase de démarrage plus importante que celle du lisier sur 5 jours, puis un ralentissement jusqu'au 9^{ème}

jour. S'en suit une production rapide dont l'intensité est supérieure à celle du lisier, qui atteint un pseudo-palier au 23^{ème} jour. Les test de "lisier+lactosérum" démarrent identiquement à une vitesse proche de celle du lisier, présentent une courte phase de production rapide à partir du 9^{ème} jour, et une évolution lente et constante à partir du 19^{ème} jour. Ces tests présentent une courbe de production supérieure à celle du lisier, notamment au niveau de la phase de production rapide. Le test à 2 g/L de lactose est le plus important, suivi des tests à 0,5 g/L et 1 g/L de lactose. On note aussi que les courbes des tests à 0,5 g/L et 1 g/L sont très proches pendant la dernière phase d'évolution lente.

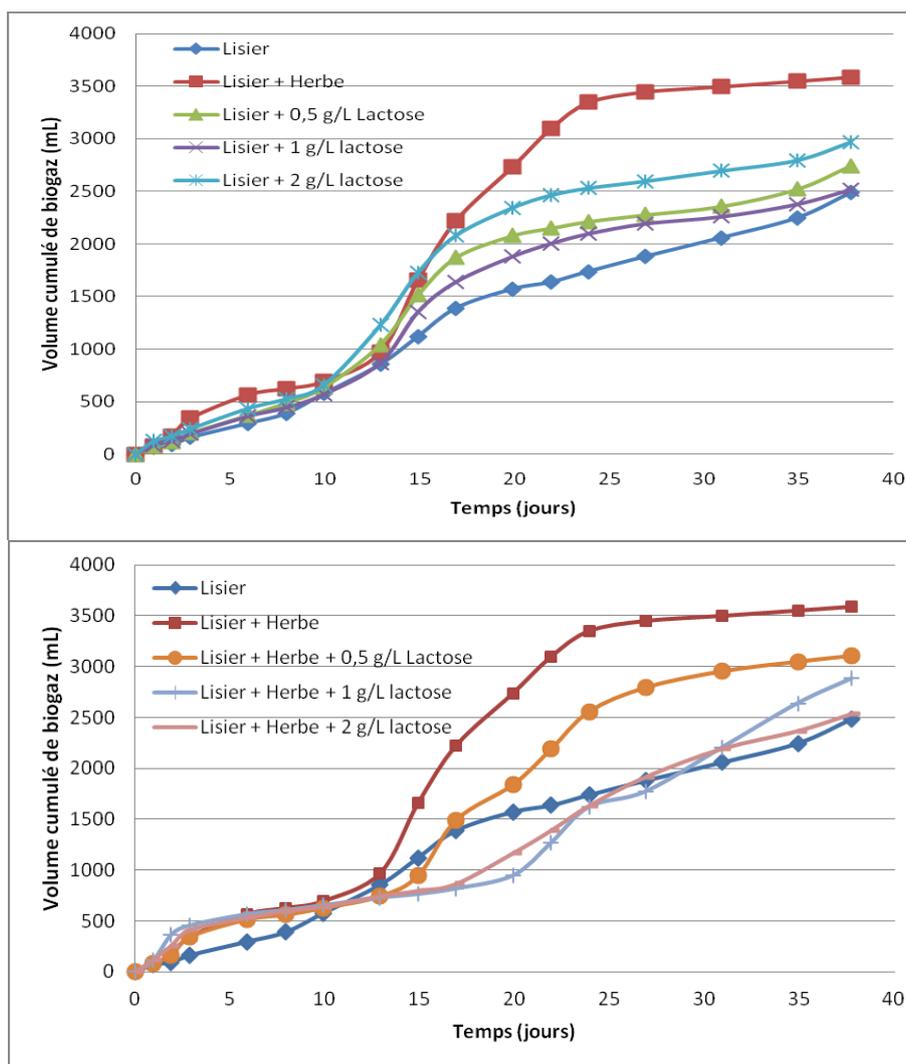


Figure III.5 : Volume cumulé de biogaz des test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe ensilée et le lactosérum de chèvre

Les tests de co-digestion simultanée des 3 substrats présentent un démarrage identique à celui du test "lisier + herbe", et donc supérieur à celui du lisier. S'en est suivi une phase de production lente qui a duré 10 jours, 18 jours et 14 jours respectivement pour les tests contenant 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L de lactose. Le test contenant 0,5 g/L de lactose présente le meilleur profil de production. En plus de présenter la plus courte période de stagnation, sa production rapide est la plus importante et se rapproche de celle du test 'lisier + herbe'. On note aussi que leurs profils

sont similaires. Plus on ajoute du lactose, plus on s'éloigne du profil du test 'lisier+herbe'. Contrairement aux tests impliquant l'ajout d'un co-substrat (herbe ou lactose) qui favorisent un démarrage plus rapide de la production rapide de biogaz (par rapport au témoin), les tests de co-digestion simultanée des trois substrats affichent un retardement. De plus, le gain de volume de biogaz obtenu avec les tests de co-digestion simultanée des 3 substrats est inférieur à la somme des gains de volume obtenus lors de la co-digestion avec chacun de co-substrats séparément. L'ajout de lactose comme troisième substrat influence donc négativement la production. En effet l'ajout d'un substrat de nature différente complexifie le milieu, et rallongerait la phase d'acclimatation et de mise en place de la communauté microbienne.

III.2.3. Evolution des teneurs en CH₄

La figure III.6 montre l'évolution des teneurs en CH₄ du ciel gazeux dans les duplicats de chaque mélange testé. Hormis le test "lisier+herbe" et le test "lisier+herbe+lactose 2 g/L", les tests ne présentent pas de différences significatives en teneur de CH₄ sur les duplicats. Le test "lisier+herbe" montre un écart de 10% sur les 8 premiers jours, ce qui n'aurait pas pu influencer la production car les volumes de biogaz produits à cette période sont faibles. Le test "lisier+herbe+lactose 2 g/L" affiche un grand écart à partir du 18^{ème} jour. Pour ce test, l'écart constaté est confirmé par le pH final du réacteur défaillant, qui est en dessous de la valeur assurant un bon déroulement du procédé de méthanisation. On voit significativement que les réactions se font en deux étapes principales : la première amenant à environ 30% de CH₄ les 10 premiers jours et la deuxième amenant à 75% environ après 15 à 20 jours. Pour le test "lisier+herbe", on note que c'est la première étape qui a été retardée dans l'un des réacteurs. Le test "lisier+herbe+lactose 2 g/L" montre quant à lui un retard au niveau de la deuxième étape. Ce dernier test présente le plus grand écart de production puisque la production de gaz se fait essentiellement au cours de cette deuxième étape.

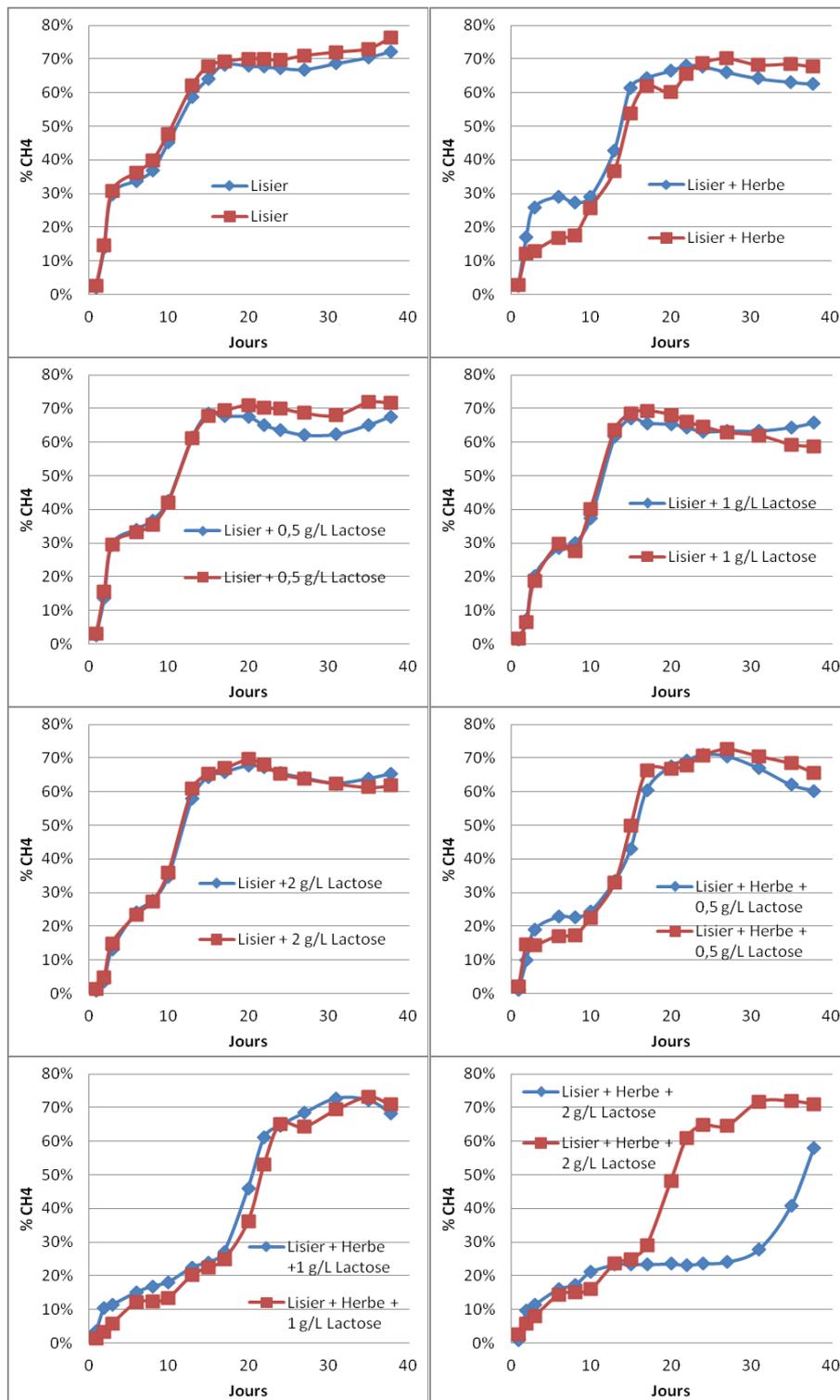


Figure III.6 : Evolution des teneurs en CH₄ dans les duplicats de chaque mélange testé

La figure III.7 montre l'évolution des teneurs en CH₄ dans le ciel gazeux pour les réacteurs ayant produit le maximum pour chaque duplicat. Toutes les courbes passent par un premier palier avant de se stabiliser sur un second palier entre 60% et 80% de CH₄. La courbe témoin (lisier seul) reste la plus élevée, montrant que l'ajout des autres substrats a un effet retardateur. Le test "lisier+herbe" montre un premier palier plus bas (25 – 30% environ de CH₄) que celui du témoin (30 – 40% de CH₄) et un peu plus long, avant d'atteindre au 15^{ème} jour une teneur en méthane proche de celle du témoin. Les tests "lisier+lactose" montrent que l'ajout de lactose affecte le premier palier. 1 g/L de lactose produit le même palier que l'herbe (30% de CH₄). 0,5 g/L de lactose a un effet retardateur moindre (37% de CH₄) et 2 g/L un effet retardateur plus important (27% de CH₄). Le premier palier avec le lactose est cependant plus court qu'en présence d'herbe. Le ralentissement occasionné par l'ajout de lactose n'est observé que les 15 premiers jours, au bout desquels les tests "lisier+lactose" affichent les mêmes teneurs en méthane.

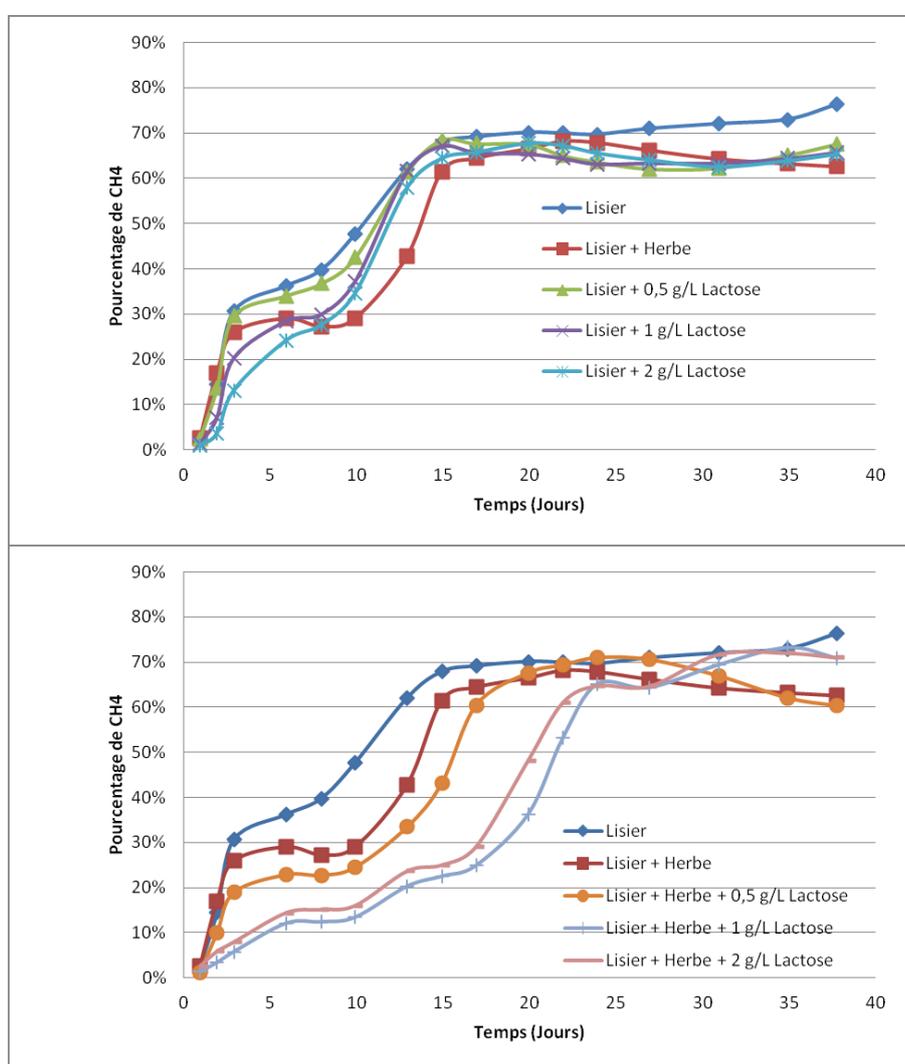


Figure III.7 : Evolution des teneurs de CH₄ pour les tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre

Pour les tests de co-digestion des trois substrats, l'effet de ralentissement est plus accentué encore en intensité et en durée qu'avec l'herbe seule ou le lactose seul. Pour atteindre le palier final, il faut jusqu'au 20^{ème} jour pour le test avec 0,5 g/L de lactose et 30 jours pour les tests à 1

g/L et 2 g/L de lactose. Le premier palier est d'autant plus bas et plus long que la concentration en lactose est grande. Le lactose agit comme un retardateur de la production de méthane. L'effet est accentué avec les concentrations croissantes de lactose. Il faut noter que les tests avec 1 g/L et 2 g/L de lactose présentent des profils similaires. De plus, ces derniers affichent une teneur finale en méthane supérieure à celle du test "lisier+herbe" après 30 jours et égale à celle du témoin. A ces concentrations, un ralentissement important est noté au début de la réaction de conversion, mais après 27 jours la co-digestion devient bénéfique en ce sens qu'elle n'affecte pas la teneur en méthane.

III.2.4. Production de méthane

Le tableau III.12 présente la production de méthane pour chaque test de co-digestion et les pourcentages de gain de production par rapport au témoin (lisier seul).

Tableau III.12 : Production de méthane pour le test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe et le lactosérum de chèvre

Contenu du réacteur	Volume de méthane (mL)	Volume maximum (mL)	Gain de production par rapport au lisier (%)	Gain de production par rapport à "Lisier + Herbe" (%)	Gain de production par rapport à "Lisier + x Lactose" (%)	%CH ₄ dans le biogaz
Lisier	1144 1534	1534	-	-	-	62%
Lisier + Herbe	1980 1673	1980	29%	-	-	55%
Lisier + 0,5 g/L Lactose	1585 1202	1585	3%	-	-	58%
Lisier + 1 g/L Lactose	1401 844	1401	-9%	-	-	56%
Lisier + 2 g/L Lactose	1345 1597	1597	4%	-	-	54%
Lisier + Herbe + 0,5 g/L Lactose	1673 1372	1673	9%	-16%	6%	54%
Lisier + Herbe + 1 g/L Lactose	715 1412	1412	-8%	-29%	1%	49%
Lisier + Herbe + 2 g/L Lactose	1180 492	1180	-23%	-40%	-26%	47%

A l'instar des volumes de biogaz, les volumes totaux de méthane produits pour les tests avec le lactose présentent un défaut de répétabilité. Cette variabilité est plus importante pour les tests impliquant les plus fortes concentrations en lactose de chèvre. Pour chaque test, la production maximale a été considérée pour la suite des analyses. L'ajout d'herbe améliore la production de méthane de 29%. L'ajout de lactose au lisier à hauteur 0,5 g/L et 2 g/L améliore la production de 3% et 4% respectivement tandis qu'à 1 g/L de lactose la production diminue de 9%. La co-digestion des trois substrats avec du lactose à 0,5 g/L améliore la production de 9% par rapport au lisier. Par rapport au test "lisier+herbe", on note une baisse de 16%. A 1 g/L de lactose, on note une baisse de 8% par rapport au lisier, et une diminution de 29% par rapport au test "lisier+herbe". A 2 g/L de lactose, la baisse est plus importante encore et se chiffre à 23% par rapport au lisier et 40% par rapport au test "lisier+herbe". Il en ressort qu'au-delà de 0,5 g/L de lactose, la co-digestion simultanée des trois substrats n'est plus avantageuse.

La figure III.8 montre le volume cumulé de méthane pour les tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre. Pour la plupart des profils, il y a une phase de démarrage où la production est quasi nulle, une phase de production rapide, puis un pseudo-palier suivi d'une nouvelle montée atteignant ou pas un autre palier. La phase de démarrage du test "lisier+herbe" a duré 13 jours, soit 3 jours de plus que celle du lisier. Cependant sa phase de production rapide est bien supérieure à celle du lisier. Le test "lisier+herbe" a une vitesse de production de 0,14 L/jour du 13^{ème} au 24^{ème} jour alors que le lisier affiche une phase de production plus courte et moins marquée avec une vitesse de 0,05 L/jour sur les 30 derniers jours de l'expérience. Les tests "lisier+lactosérum" à 0,5 g/L et 2g/L de lactose présentent la même phase de démarrage et des vitesses de production rapide plus faibles et sur une plus courte période (10^{ème} au 17^{ème} jour) de 0,12 L/jour et 0,13 L/jour respectivement. Le test à 1 g/L de lactose présente une vitesse inférieure aux autres (0,10 L/jour), mais supérieure à celle du témoin. L'ajout de substrat, même s'il rallonge la phase de démarrage (dans le cas de l'herbe), conduit à une amélioration de la phase de production rapide de méthane. Cependant le test avec le lactose à 1 g/L présente une production finale inférieure à celle du témoin.

Pour les tests de co-digestion des trois substrats, la phase de démarrage est rallongée. Avec le seul substrat qu'est l'herbe, la durée est rallongée de 3 jours par rapport au lisier. L'ajout supplémentaire de 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L de lactose rallonge la phase de démarrage de 5, 10 et 7 jours respectivement, alors que les tests "lisier+lactose" ne la rallongeaient pas. Après cette phase, les vitesses de production rapide sont de 0,12 L/jour (15^{ème} au 24^{ème} jour), 0,07 L/jour (20^{ème} au 38^{ème} jour) et 0,05 L/jour (17^{ème} au 38^{ème} jour) pour 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/l de lactose respectivement.

Au vu de la durée des phases de démarrage, il ressort que plus on a de substrats différents, plus la phase de production rapide est retardée. Ceci serait lié au fait que les microorganismes doivent s'adapter cinétiquement (par la production des enzymes nécessaires) à la diversité des sources de carbone et à leur quantité. L'effet du lactose ne se fait pas sentir sur la production finale de

méthane lorsqu'il est co-digéré seul avec le lisier. En présence de l'herbe qui retarde déjà la production de production rapide, son effet est plus notable.

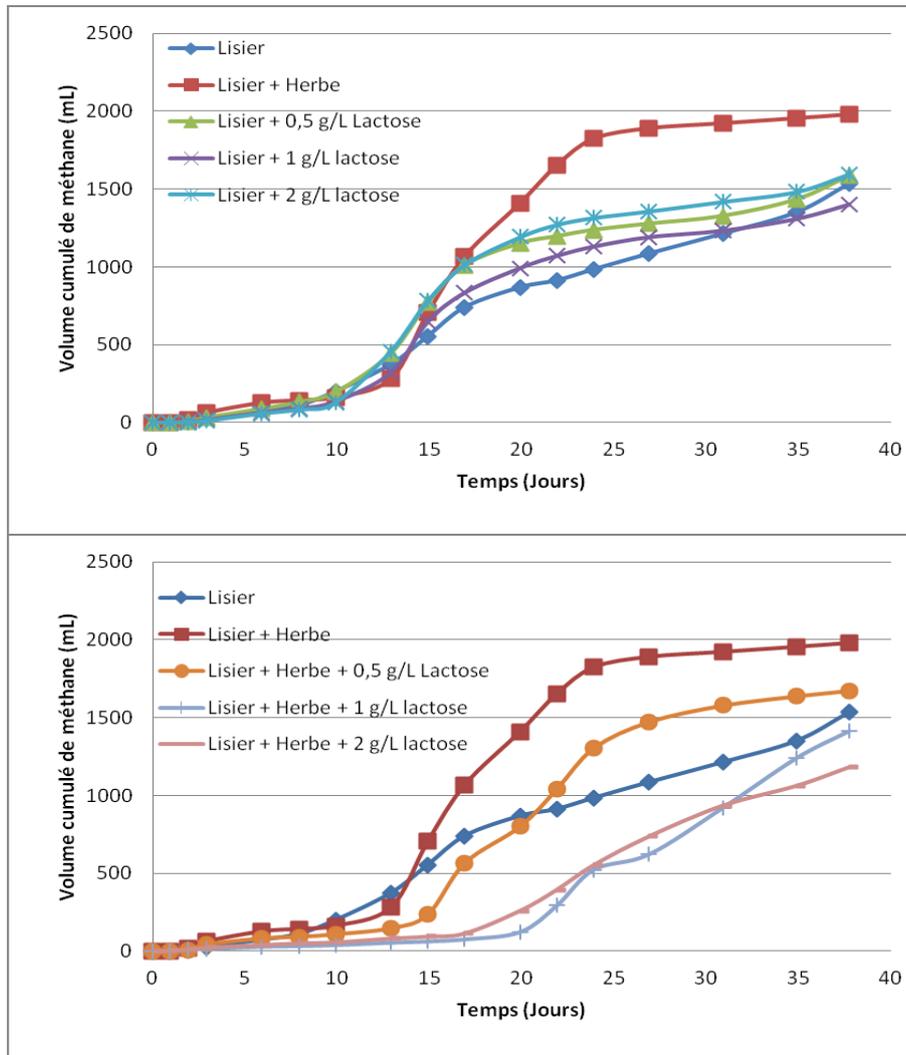


Figure III.8 : Volumes cumulés de méthane pour les tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre

III.2.5. Rendement de méthane

En ajoutant le lactosérum de chèvre comme co-substrat, on rajoute plus de matière organique, les masses de lisier étant les mêmes. Plus de volume de méthane devrait donc être produit s'il n'y a pas de perturbation du système. Les rendements de méthane ont été calculés en termes de volume produit par masse de matière organique contenue dans l'alimentation. Le but de cette analyse est de déterminer si l'ajout de lactosérum de chèvre impacte les cinétiques de conversion de la matière organique par la communauté microbienne.

La figure III.9 montre l'évolution du rendement instantané, calculé sur la base de la matière organique introduite et exprimée en $\text{mL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{MO}}$. Il s'agit, comme défini précédemment, d'un

volume massique où MO représente la masse totale de matière organique introduite dans le réacteur batch.

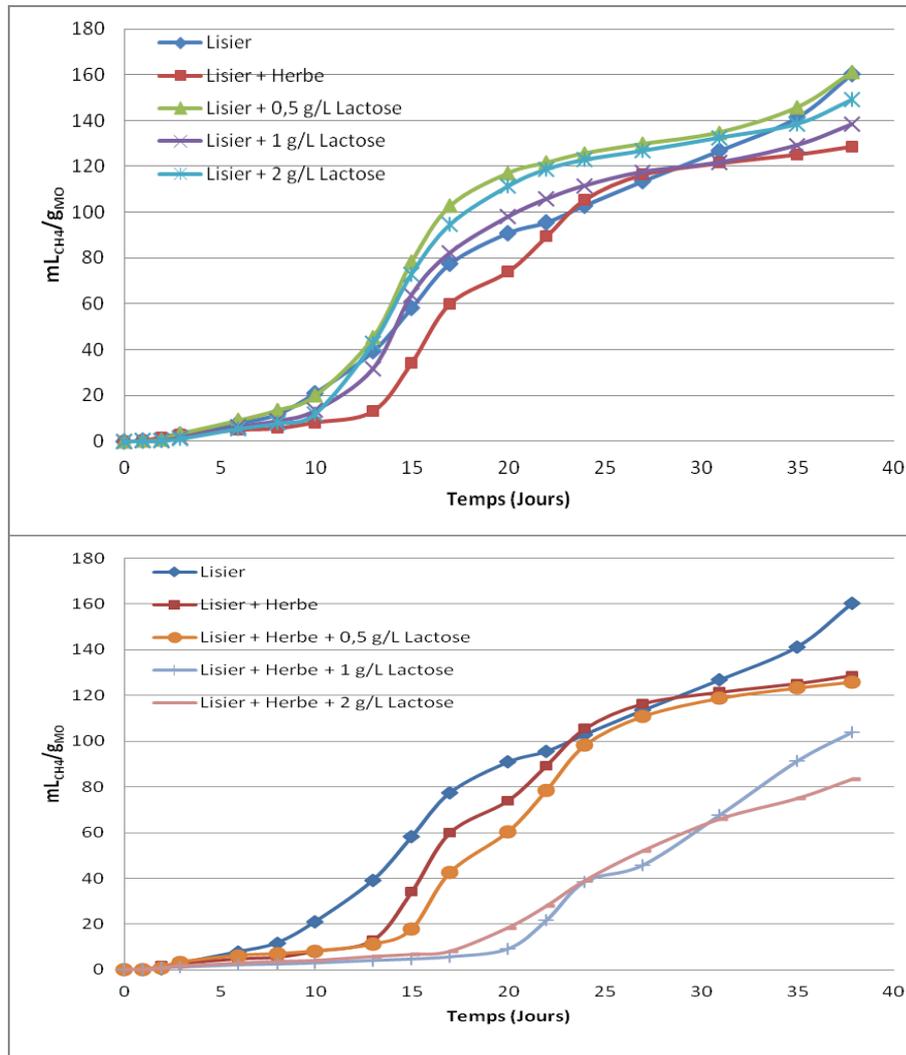


Figure III.9 : Rendements de méthane pour les tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre

L'ajout de lactose au lisier conduit à un léger prolongement de la phase de démarrage à 1 g/L et 2 g/L de lactose, alors que l'ajout d'herbe rallonge nettement cette phase de 5 jours. Les concentrations de 0,5 g/L et 2 g/L de lactose améliorent également la phase de production rapide, même si en fin d'expérience on note une baisse de rendement final de 14% et 7% à 1 g/L et 2 g/l respectivement par rapport au lisier. A 1g/L de lactose, on observe une légère baisse par rapport au lisier en début de production rapide, puis un léger avantage qui est perdu du 27^{ème} jour à la fin de l'expérience. Le test avec l'herbe ne présente quant à lui un avantage par rapport au lisier que du 24^{ème} au 27^{ème} jour. L'ajout de substrat a un premier effet retardateur sur la phase de démarrage, puis améliore la production rapide (sauf à 1g/L de lactose).

La co-digestion simultanée des trois substrats conduit à un retardement de la phase de démarrage par rapport aux tests de lisier et de "lisier+herbe". Le test "lisier+herbe+0,5 g/L de lactose" présente la même allure que le test "lisier+herbe" et rejoint son rendement en fin d'expérience même si un léger décalage est observé en début de production rapide. Pour les concentrations de 1 g/L et 2 g/L de lactose rajoutées au "lisier+herbe", le décalage entre les débuts de production rapide est encore plus important, et leur rendement final est plus faible que celui du test "lisier+herbe".

Le tableau III.13 qui présente les rendements finaux des tests de co-digestion montre que l'ajout de substrat au lisier n'améliore pas la conversion de la matière organique en méthane. Que ce soit pour l'ajout de l'herbe seule, du lactose seul ou des deux simultanément, on note une baisse du rendement, sauf pour l'ajout du lactose à 0,5 g/L où on ne note pas de variation significative. La co-digestion simultanée des trois substrats présente les plus forts impacts négatifs sur le procédé. En effet, l'ajout supplémentaire du lactose au "lisier+herbe" diminue d'autant plus le rendement par rapport à celui du test "lisier+herbe", que la concentration en lactose augmente.

Tableau III.13 : Rendements finaux des tests de co-digestion du lisier avec l'herbe et le lactosérum de chèvre

Contenu du réacteur	Rendement de méthane mL _{CH4} /g _{MO}	Gain de production par rapport au lisier	Gain de production par rapport à "Lisier + Herbe"	Gain de production par rapport à "Lisier + x Lactose"
Lisier	160	-	-	-
Lisier + Herbe	129	-20%	-	-
Lisier + 0,5 g/L Lactose	161	0%	-	-
Lisier + 1 g/L Lactose	138	-14%	-	-
Lisier + 2 g/L Lactose	149	-7%	-	-
Lisier + Herbe + 0,5 g/L Lactose	126	-21%	-2%	-22%
Lisier + Herbe + 1 g/L Lactose	104	-35%	-19%	-25%
Lisier + Herbe + 2 g/L Lactose	83	-48%	-35%	-44%

Au vu des baisses de rendement observées au bout des 38 jours d'expérience, le meilleur compromis pour la co-digestion simultanée consiste à utiliser du lisier, de l'herbe et du lactose à

0,5 g/L et de se limiter à un temps de réaction de 30 jours. Cette combinaison affecte moins le rendement de méthane comparativement au témoin, et impacte faiblement le rendement du test "lisier+herbe".

III.2.6. Teneurs en métaux lourds

Pour évaluer la qualité sanitaire en termes de métaux lourds des digestats issus des tests de co-digestion, leurs teneurs (exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche) ont été mesurées pour les échantillons en début et fin d'expérience de méthanisation. En fin de réactions, du fait des contraintes opératoires, les teneurs n'ont été mesurées que sur la partie solide après une séparation de phase avec un tamis. Le tableau III.14 présente les teneurs en métaux lourds des échantillons mesurés pour les substrats incorporés dans le batch (Entrée) et la teneur sur la part solide à la fin de l'expérience (Fin).

Tout comme dans le cas des tests avec les différentes herbes ensilées, les teneurs sont comparées à la norme NF U 44-051. La comparaison avec les valeurs de la norme montrent que les teneurs des échantillons sont inférieures et en adéquation avec la réglementation. Les analyses en fin de réaction ne concernant que la partie solide, les analyses en entrée sur le total confirment que les seuils réglementaires sont respectés. En effet, les métaux lourds ne varient quasiment pas en cours de réaction puisque la digestion anaérobie est un processus de minéralisation qui n'affecte que la matière organique. La qualité du digestat devrait donc être en deçà de la réglementation puisque nous sommes bien éloignés des valeurs limites. Une classification décroissante de la présence des métaux dans le milieu réactionnel donne $\text{Al} \gg \text{Mn} \sim \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Cd}$.

Tableau III.14 : Teneurs en métaux en entrée et sortie de batch

	Aluminium	Arsenic	Cadmium	Chrome	Cuivre	Manganèse	Nickel	Plomb	Zinc
	µg/g de MS								
Teneur limite NF U 44-051		18	3	120	300		60	180	600
Entrée Lisier	1345	0,65	0,11	14	30	132	8	3,4	117
Fin Lisier	598	0,23	0,08	7	15	97	4	1,6	63
Entrée Lisier + Herbe	1261	0,56	0,08	15	27	121	8	3,3	102
Fin Lisier + Herbe	634	0,14	0,09	10	26	94	6	2,7	63
Entrée Lisier + 0,5 g/L de lactose	608	0,13	0,06	13	15	88	6	1,6	62
Fin Lisier + 0,5 g/L de lactose	611	< l.d	0,11	5	15	115	3	1,8	65
Entrée Lisier + 1 g/L de lactose	580	0,28	0,07	7	14	78	4	2,6	62
Fin Lisier + 1 g/L de lactose	629	0,21	0,06	7	15	73	5	0,5	62
Entrée Lisier + 2 g/L de lactose	642	0,79	0,08	10	16	87	5	2,2	61
Fin Lisier + 2 g/L de lactose	608	0,40	0,10	9	16	93	5	1,8	63
Entrée Lisier + Herbe + 0,5 g/L de lactose	672	0,08	0,04	21	15	97	10	2,9	59
Fin Lisier + Herbe + 0,5 g/L de lactose	611	< l.d	0,08	22	13	101	10	1,7	56
Entrée Lisier + Herbe +1 g/L de lactose	550	0,07	0,05	22	13	103	10	0,8	55
Fin Lisier + Herbe + 1 g/L de lactose	582	0,16	0,11	20	14	105	10	1,6	53
Entrée Lisier + Herbe + 2 g/L de lactose	544	0,48	0,07	18	13	97	9	1,8	50
Fin Lisier + Herbe + 2 g/L de lactose	561	0,07	0,01	15	33	49	8	3,1	55

III.3. Co-digestion du lisier bovin avec du lactosérum de vache

Tout comme le lactosérum de chèvre, le lactosérum de vache constitue l'un des résidus produits sur les fermes agricoles, mais pas sur notre ferme expérimentale de la Bouzule. Face à la récurrence de ce résidu, notre intérêt s'est porté sur l'étude de l'effet de son ajout à la digestion. Les tests ont donc consistés à co-digérer le lisier bovin et le lactosérum de vache. Le flux de lactosérum de vache rapporté au débit d'alimentation du digesteur revient également à 1g/L de lactose dans le digesteur. Les concentrations testées sont comme dans le cas du lactosérum de chèvre : 0,5 g/L de lactose, 1 g/L de lactose et 2 g/L de lactose.

Les tests ont été réalisés en batch selon le même protocole expérimental que précédemment : les substrats sont ajoutés dans des bouteilles de 1L et additionnés de 400mL de tampon phosphate à pH7. Chaque configuration a été testée en duplicat, et le milieu n'a pas été inoculé avec du digestat. Il s'en suit que les microorganismes responsables de la conversion de la matière organique sont ceux naturellement présents dans le lisier frais. Le volume de gaz produit et les teneurs en CH₄ et CO₂ dans le ciel gazeux ont été suivis tout au long de la durée de l'expérience qui est de 80 jours.

III.3.1. Caractérisation des substrats

Le lisier utilisé présente un taux de MS de 10% avec une teneur en MO de 78% (tableau III.15). Ces paramètres confirment que le lisier est un substrat organique intéressant pour la méthanisation. En outre, elle présente un ratio C/N de 15, qui selon la littérature favorise une bonne digestion (Atandi et al., 2012). La teneur en ammonium du lisier de 0,63 mg_{N-NH₄⁺}/g d'échantillon conduit à une teneur en ammonium dans les batch d'une valeur de 126 mg_{N-NH₄⁺}/L (tableau III.16). Cette valeur est bien en deçà des teneurs inhibitrices de 1500 mg_{N-NH₄⁺}/L renseignées dans la littérature (Atandi et al., 2012).

La composition des réacteurs est consignée dans le tableau III.16.

Tableau III.15 : Caractérisation des substrats (Matière Sèche: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)

	Matières sèches (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium initial (mg _{N-NH₄⁺} /g d'échantillon)	Ratio C/N
Lisier	10,1	78,4	0,63	15

Tableau III.16 : Composition des batch

Batch en duplicat	Composition	Ammonium initial (mg _{N-NH4} ⁺ /L)
#1 et #2	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7	126
#3 et #4	100 g de lisier + 0,5 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	-
#5 et #6	100 g de lisier + 1 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	-
#7 et #8	100 g de lisier + 2 g/L de lactose + 400 mL de tampon pH7	-

III.3.2. Production de biogaz

Le tableau III.17 résume la production de biogaz lors de l'expérience pour chaque configuration testée. Les tests présentent une bonne reproductibilité et l'écart entre les duplicats d'un même test est faible, mais le volume maximum produit pour chaque test a été considéré pour les calculs comme dans le cas du lactosérum de chèvre dans la section précédente. Ceci permettra de comparer *in fine* les effets des deux types de lactosérum. Les pourcentages de gain de production calculés par rapport au témoin (lisier seul) donnent 3% pour le test à 0,5 g/L de lactose. Les différences entre les volumes de biogaz produit pour le témoin avec les tests à 1 g/L et 2 g/L sont inférieures à 1%. Les différences de pourcentages observées lors de l'ajout de lactose étant faibles, l'impact de ces concentrations de lactose sur le volume final de biogaz n'est pas notable.

Tableau III.17 : Production cumulée de biogaz pour le test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe et le lactosérum de vache

Contenu du réacteur	Volume de biogaz (mL)	Volume maximum (mL)	Pourcentage de gain par rapport au lisier (%)
Lisier	4172	4172	-
	4111		
Lisier + 0,5 g/L Lactose	4312	4312	3%
	3885		
Lisier + 1 g/L Lactose	4154	4154	-0,4%
	3981		
Lisier + 2 g/L Lactose	4188	4188	0,4%
	3735		

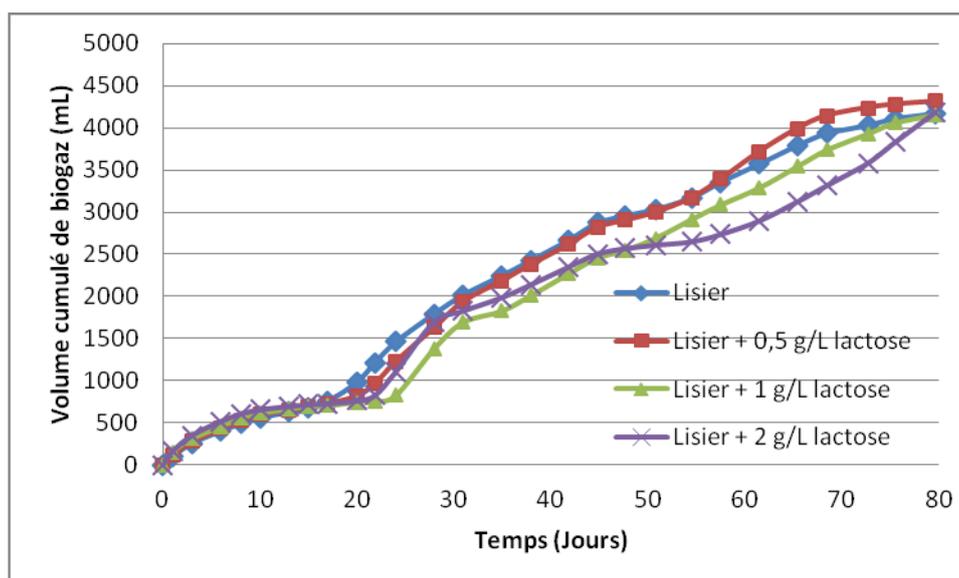


Figure III.10 : Volumes cumulés de biogaz pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache

Cependant, la figure III.10 présentant le cumul de la production de biogaz au cours de l'expérience, montre que le lactosérum affecte le procédé. La courbe du témoin présente 3 grandes phases : une phase de démarrage, une phase de production rapide avec un ralentissement temporaire (du 45^{ème} au 55^{ème} jour), puis un pseudo-palier à partir du 73^{ème} jour. L'ajout de lactosérum rallonge la phase de démarrage de 3, 7 et 5 jours pour les tests à 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L de lactose respectivement. A cette étape, la teneur de méthane n'est pas encore stabilisée autour de 70% et est seulement de 40%. L'ajout de lactosérum de vache impacte donc légèrement la mise en route de la production. Lors de la phase de production, le test à 0,5 g/L présente le même ralentissement que le témoin, contrairement aux autres où le test à 2 g/L

présente un ralentissement plus prononcé et un redémarrage plus difficile. On note aussi que les tests à 1 g/L et 2 g/L présentent en début de production rapide un ralentissement supplémentaire survenu au 28^{ème} jour pour le premier et au 31^{ème} jour pour le second. Ce premier ralentissement survient alors d'autant plus vite que la concentration de lactose est élevée.

Si les volumes finaux de biogaz produits lors de l'ajout de lactosérum de vache ne sont pas très différents, on note un rallongement de la phase de démarrage et un léger ralentissement en phase de production qui s'accroît avec la concentration de lactose.

III.3.3. Evolution des teneurs en CH₄

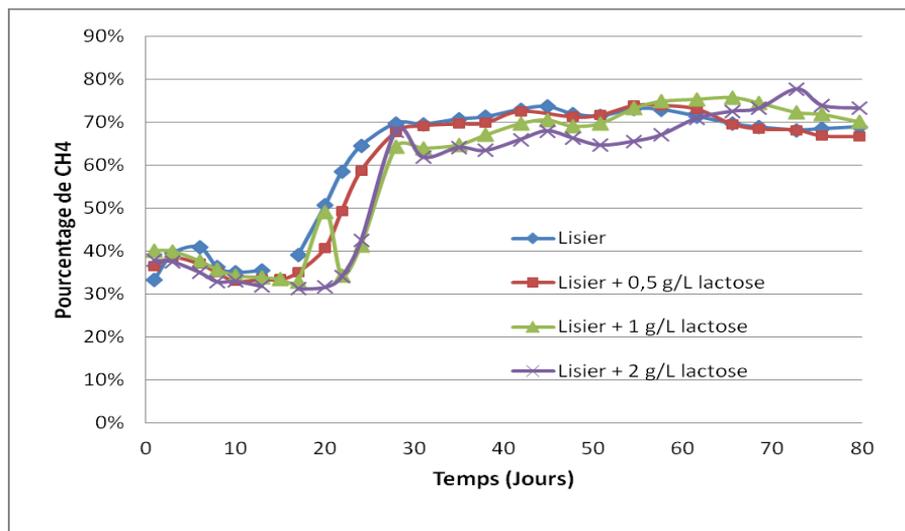


Figure III.11 : Evolution des teneurs en CH₄ pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache

La figure III.11 montre les évolutions des teneurs en CH₄ dans le ciel gazeux des réacteurs au cours de l'expérience. Chaque configuration testée est présentée conjointement au témoin. La teneur en CH₄ dans le réacteur témoin se situe entre 30% et 40% au début du test pendant 17 jours pour ensuite se stabiliser autour de 70% à partir du 28^{ème} jour. Le test à 0,5 g/L de lactose présente une teneur légèrement inférieure à celle du témoin, mais rejoint cette dernière à partir du 28^{ème} jour. La teneur en CH₄ est restée entre 30% et 40% en début d'expérience, puis a démarré au 17^{ème} jour pour se stabiliser autour de 70%. Le test à 1 g/L de lactose démarre plus tard que celui à 0,5 g/L et le témoin, au 22^{ème} jour. Sa teneur en CH₄ reste inférieure à celle du témoin en début de réaction où elle descend à 31%. Elle reste aussi inférieure en début de phase de production du 21^{ème} au 51^{ème} jour, pour ensuite se stabiliser en fin d'expérience à une teneur proche de celle du témoin autour de 70%. Le test à 2 g/L connaît aussi un démarrage plus lent que le témoin, où sa teneur en CH₄ descend à 31% avant de remonter après le 20^{ème} jour. Sa teneur varie fortement ensuite entre 60% et 80% pour ensuite se stabiliser en fin de test autour de 75%. Pour ce test, ce n'est qu'après le 61^{ème} jour que sa teneur est supérieure à celle du témoin.

Les tests de co-digestion avec le lactosérum de vache présentent des temps de démarrage plus longs au cours desquels la teneur en méthane diminue par rapport aux témoins. L'intensité de la diminution augmente avec les concentrations croissantes de lactose en phase de démarrage. En phase de production, plus la concentration de lactose est forte, plus longue est la période pendant laquelle le test de co-digestion affiche une teneur inférieure à celle des témoins. L'effet de l'ajout de lactosérum de vache au lisier est plus important pendant la phase de production que pendant celle de démarrage.

III.3.4. Production de méthane

Le tableau III.18 affiche la production de méthane à la fin de l'expérience. Le volume du test à 0,5 g/L affiche un pourcentage de gain de 5%, alors que les volumes produits pour 1 g/L et 2 g/L diffèrent du volume du témoin de 1%. La part de méthane dans le biogaz produit ne varie pas significativement entre le témoin et les tests de lactosérum. Elle est de 64% pour le témoin et de 63%, 64% et 62% pour les tests à 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L de lactose respectivement. Ce paramètre laisse supposer que l'ajout de lactosérum de vache n'affecte pas grandement le rendement de la méthanogenèse. En effet, une diminution de la part de méthane indiquerait qu'en plus d'un ralentissement global du processus, la phase de méthanogenèse aurait été affectée. On note néanmoins qu'une concentration de 2 g/L diminue faiblement le taux de génération global du méthane

Tableau III.18 : Production cumulée de méthane pour le test de co-digestion du lisier bovin avec l'herbe et le lactosérum de vache

Contenu du réacteur	Volume de méthane (mL)	Volume maximum (mL)	Pourcentage de gain par rapport au lisier (%)	Part de méthane
Lisier	2598 2615	2615	-	64%
Lisier + 0,5 g/L Lactose	2733 2394	2733	5%	63%
Lisier + 1 g/L Lactose	2638 2513	2638	1%	64%
Lisier + 2 g/L Lactose	2587 2309	2587	-1%	62%

La figure III.12 présente la production cumulée de méthane au cours de l'expérience.

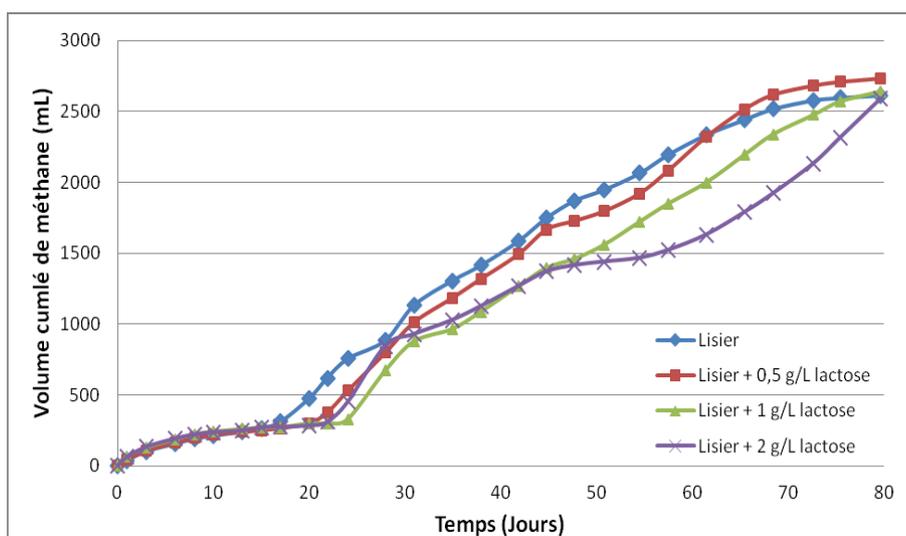


Figure III.12 : Volume cumulé de CH₄ pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache

Les courbes présentent une phase de démarrage, une phase de production et un pseudo-palier en fin d'expérience, à l'exception du test à 2 g/L qui ne présente pas le pseudo-palier sur la durée de l'expérience. Les tests "lisier+lactose" ont une phase de démarrage plus longue que celle du témoin ; et le rallongement ne croit pas proportionnellement avec la concentration en lactose. Lors de la phase de production, les tests de co-digestion restent en deçà du témoin, à l'exception du test à 0,5 g/L qui surpasse le témoin à partir du 61^{ème} jour. Les tests à 1 et 2 g/L ralentissent légèrement en début de phase de production. A partir du 45^{ème} jour, tous les tests de co-digestion

présentent un ralentissement plus notable. Il a duré 6 jours pour 0,5 g/L de lactose, mais 10 jours pour le test à 2 g/L de lactose, avec un redémarrage plus lent que pour les autres tests.

L'ajout de lactosérum devant conduire à une production supplémentaire de volume (s' il n'y a pas de perturbation) et le test à 0,5 g/L étant celui qui apporte le plus de volume final supplémentaire, cette dernière concentration est celle qui impacte le moins le procédé de façon négative. On note aussi que même si le test à 2 g/L présente un très faible avantage pour la production de biogaz, c'est une baisse (très faible aussi) qui est observée pour le méthane. Même si on note de faibles différences entre les volumes finaux, le lactosérum de vache impacte le processus de conversion en gaz. En cours d'expérience, notamment au niveau de la phase rapide, on voit que le lactosérum de vache ralentit la production de méthane, et que pour 2 g/L le décalage avec le témoin n'est rattrapé qu'au bout du 80^{ème} jour (à la fin de l'expérience).

III.4. Conclusion partielle

III.4.1. Utilisation de l'herbe et/ou du lactosérum comme substrat

Même si la biomasse lignocellulosique représente un bon sujet pour la méthanisation, la structure de ses différentes composantes (que sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine) constitue une barrière pour son assimilation microbienne. De toutes les techniques de prétraitement développées pour améliorer la digestibilité de l'herbe, l'ensilage sans additif étudié dans ce chapitre est avantageux d'un point de vue économique (pas de coût relié aux enzymes) et environnemental (pas de résidu chimique incorporé). L'ensilage étant un procédé se déroulant en environnement anaérobie, il peut être assimilé à la phase d'hydrolyse (identifiée comme la phase limitante) de la digestion anaérobie. Les résultats ont montré que malgré le fort potentiel énergétique de l'herbe ($286 - 324 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{kg}_{\text{MO}}^{-1}$) (Weiland, 2010), le degré d'ensilage atteint au bout de 3, 5 et 8 semaines ne conduit pas à une amélioration du procédé sur un temps de séjour de 30 jours dans le digesteur. Seule l'herbe ensilée pendant 36 semaines assurait une amélioration de 20% du procédé de conversion en méthane. Cependant, les rendements de méthane obtenus dans nos expériences sont inférieurs aux valeurs mentionnées dans la littérature. On note néanmoins qu'au bout des 30 jours d'expériences, les courbes des témoins n'ont pas atteint leur palier de production et qu'une prolongation des expériences conduirait à de plus fortes productions. La faiblesse de nos rendements est donc liée à la durée de nos expériences probablement trop courte. En effet, comme aucun digestat n'a été ajouté en guise d'inoculum, la communauté microbienne doit se mettre en place (4 à 15 jours pour les méthanogènes) en un temps qui varie selon la nature et la quantité des microorganismes présents en début de réaction. La première phase de nos réactions correspond donc à l'acclimatation et ne montre pas de production significative de méthane. L'ajout supplémentaire de substrat (herbe ensilée) différent en nature et plus complexe à dégrader affecte cette phase d'acclimatation et a

donc résulté en un retardement de la phase rapide de production de méthane. Dans les cas où le lactosérum a été ajouté, on assiste à une faible reproductibilité entre les duplicats. En ne considérant que les réacteurs présentant les meilleures productions, on ne note pas de perturbation significative des réactions puisque ce substrat est plus rapidement assimilable que le lisier seul. Dans nos expériences, la faible quantité de lactose ajoutée n'a pas conduit à une amélioration significative du rendement de production. Cependant, dans un système déjà fragilisé par l'ajout d'herbe ensilée où les microorganismes doivent s'adapter à la biomasse lignocellulosique, l'ajout de lactose dans les mêmes proportions affectent significativement la phase d'acclimatation.

En définitive et d'après nos expériences, l'utilisation d'une herbe ensilée sans additif pendant 36 semaines (temps pratiqué sur la ferme de la Bouzule) conduit à une amélioration du procédé. Cependant, l'inoculation des réacteurs avec du digestat permettrait d'accélérer les réactions, d'améliorer l'assimilation de la biomasse lignocellulosique, et offrirait plus de stabilité aux tests avec l'herbe et le lactosérum, améliorant ainsi les rendements de production de méthane.

III.4.2. Effets comparés du lactosérum de chèvre et du lactosérum de vache

Les lactosérums de chèvre et de vache provenant de deux fermes expérimentales ayant été testés dans les mêmes concentrations, cette section a pour but de comparer leurs effets sur le procédé de co-digestion utilisant le lisier bovin de la ferme comme substrat principal. Leurs effets seront comparés sur une durée identique d'expérience de 38 jours, correspondant à la durée de l'expérience avec le lactosérum de chèvre. Les tableaux III.19 et III.20 présentent respectivement les volumes cumulés de biogaz et de méthane pour les tests de co-digestion avec le lactosérum de chèvre et le lactosérum de vache sur une durée de 38 jours.

Les tests de co-digestion à 0,5 g/L, 1 g/L et 2 g/L affichent des pourcentages de gain pour le biogaz de 10%, 1% et 19% dans le cas du lactosérum de chèvre, alors que des baisses de 2%, 17% et 12% sont observées dans le cas du lactosérum de vache. Ces pourcentages montrent que le lactosérum de chèvre conduit à une augmentation de volume contrairement à celui de vache. L'observation du cumul de production de biogaz montre que le lactosérum de chèvre conduit à un démarrage plus rapide de la production de gaz, alors que le lactosérum de vache ralentit la phase de mise en place de la population microbienne, et aussi la phase de production rapide (à deux reprises pour 0,5 et 2 g/L de lactose). Pour les deux types de lactosérum, le test de co-digestion à 1 g/L de lactose est celui qui favorise le moins la co-digestion.

Pour le méthane, à l'exception du test à 1 g/L qui présente des baisses de volumes similaires pour les deux types de lactose, la tendance est similaire au cas précédent du biogaz. Le lactosérum de chèvre conduit à une augmentation de volume contrairement à celui de vache. A 0,5 g/L et 2 g/L on observe des augmentations par rapport au témoin de 6% dans le cas de la

chèvre ; et respectivement des baisses de 7% et 20% dans le cas de la vache. L'évolution de la production cumulée de méthane permet d'observer le rallongement occasionné par l'ajout de lactosérum de vache, alors que celui de chèvre raccourcit le délai de démarrage de la production de méthane. De surcroît, dans le cas de la vache, le témoin reste supérieur aux tests de co-digestion le long de l'expérience ; alors que pour la chèvre, seul le test à 1 g/L passe en deçà du témoin à partir du 30^{ème} jour. Le test à 1 g/L, quel que soit le type de lactosérum, reste aussi dans le cas du méthane celui qui favorise le moins la co-digestion. Par ailleurs, la différence entre les pourcentages d'augmentation de biogaz et de méthane est relativement plus faible pour le lactosérum de vache que pour celui de chèvre. Ceci indiquerait que le lactosérum de chèvre, impacte plus fortement la production de méthane que de biogaz.

Tableau III.19 : Volumes cumulés de biogaz et de méthane sur 38 jours pour les tests de co-digestion du lisier avec le lactosérum de chèvre

Contenu du réacteur	Volume cumulé de biogaz à 38 jours (mL)	Pourcentage d'augmentation par rapport au lisier (%)	Volume cumulé de méthane à 38 jours (mL)	Pourcentage d'augmentation par rapport au lisier (%)
Lisier	2486	-	1534	-
Lisier + 0,5 g/L Lactose	2746	10%	1585	3%
Lisier + 1 g/L Lactose	2518	1%	1401	-9%
Lisier + 2 g/L Lactose	2970	19%	1597	4%

Tableau III.20 : Volumes cumulés de biogaz et de méthane sur 38 jours pour le test de co-digestion du lisier bovin avec le lactosérum de vache

Contenu du réacteur	Volume cumulé de biogaz à 38 jours (mL)	Pourcentage d'augmentation par rapport au lisier (%)	Volume cumulé de méthane à 38 jours (mL)	Pourcentage d'augmentation par rapport au lisier (%)
Lisier	2426	-	1414	-
Lisier + 0,5 g/L Lactose	2376	-2%	1317	-7%
Lisier + 1 g/L Lactose	2008	-17%	1086	-23%
Lisier + 2 g/L Lactose	2140	-12%	1126	-20%

Chapitre IV : Etude des micropolluants

IV.1. Suivi qualitatif de l'herbe de bord de route

Dans le chapitre précédent, des tests de co-digestion ont été effectués pour évaluer l'impact de l'utilisation d'herbe comme substrat sur la production de méthane. Cette section se consacrera à l'étude de la qualité sanitaire de cette herbe, du point de vue des métaux lourds et des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cette étude se rapporte aussi à l'un des objectifs du projet Bouzule, qui consiste en l'utilisation d'herbe coupée en bordure de routes avoisinantes, notamment la route départementale D674, comme co-substrat dans le digesteur. Cependant le trafic routier est connu pour être responsable d'émissions polluantes d'origine organique et métallique, qui peuvent affecter la santé des organismes vivants (Colville et al., 2001), notamment des microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie. Cette section étudiera donc la présence de certains polluants dans l'herbe récoltée en bordure de route.

Le suivi a été effectué sur les années consécutives 2012 et 2013, où deux campagnes ont été réalisées par année, dont l'une au mois de mai et l'autre au mois de septembre. Les prélèvements sont effectués manuellement au ciseau, avant que le fauchage ne soit effectué par la machine. Il est important de noter que le fauchage se fait sur une largeur de 2 m en mai puis sur toute la largeur au mois de septembre. Au cours des deux années de suivi, les stations de prélèvement sont globalement restées inchangées, mais la distance par rapport à la bordure de route a subi un décalage. Les résultats du suivi seront donc présentés par année.

IV.1.1. Caractérisation des échantillons

Le tableau IV.1 présente la caractérisation des échantillons prélevés en termes de matières sèches (MS), matière organique (MO) et ratio C/N, pour l'année 2012. Il convient de noter que de mai à septembre, certains points de prélèvements ont été rajoutés et ne peuvent donc faire l'objet d'une analyse comparative.

Tableau IV.1 : Pourcentages de matières sèches (MS), matière organique (MO) et ratio C/N des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) de l'année 2012

Station – Distance de la route	% MS		% MO		Ratio C/N	
	Mai 2012	Sept 2012	Mai 2012	Sept 2012	Mai 2012	Sept 2012
Station 1 - 2m	21%	37%	89%	85%	17	35
Station 1 - 4,5m	23%	33%	90%	88%	21	24
Station 2 - 2m	20%	28%	89%	89%	19	29
Station 2 - 4m	24%	55%	90%	90%	17	46
Station 3 - 2m	20%	27%	90%	87%	18	26
Station 3 - 4,5m	20%	47%	88%	91%	19	30
Station 4 - 2m	23%	37%	90%	90%	19	29
Station 4 - 4m	24%	24%	90%	88%	19	18
Station 5 - 2m	29%	51%	90%	91%	25	30
Station 5 - 4m	25%	45%	88%	90%	16	34
Station 6 - 2m	23%	40%	89%	90%	19	30
Station 6 - 4m	24%	47%	89%	92%	18	25
Station 7 - 2m	22%	35%	88%	89%	20	27
Station 7 - 4m	23%	34%	88%	87%	18	33
Station 7 - 6m	23%	30%	91%	86%	16	31
Station 8 - 2m	24%	34%	90%	89%	19	29
Station 8 - 4m	29%	45%	88%	91%	19	31
Station 9 - 2m	-	29%	-	88%	-	22
Station 9 - 4m	-	24%	-	86%	-	16
Station 10 - 2m	-	33%	-	90%	-	17
Station 10 - 4m	-	27%	-	90%	-	25
Station 11 - 2m	-	58%	-	90%	-	35
Station 11 - 4,5m	-	67%	-	89%	-	35
Moyenne	23%	39%	89%	89%	19	19
Ecart-type	3%	12%	1%	2%	2	7

L'analyse des matières sèches montre qu'au mois de mai, les pourcentages sont compris entre 20% et 29% alors qu'en septembre ils varient entre 24% et 67%. Ce qui s'explique par le fait que les herbes coupées en septembre ont une plus longue période de pousse et donc un degré de maturité plus avancé que celles de mai. On remarque aussi que pour la plupart des stations de prélèvement, plus on s'éloigne de la bordure de route, plus le pourcentage de MS affiche une augmentation. L'écart au sein d'une même station des valeurs de MS est faible au mois de mai, comparativement au mois de septembre où les écarts de MS sont plus notables. En effet, le fauchage au mois de septembre s'effectue sur toute la largeur, alors que le fauchage du mois de mai ne s'effectue que sur les 2 premiers mètres de largeur contre la route. Les herbes récoltées en mai ont globalement le même degré de maturité, alors que les herbes coupées en septembre sont le mélange des herbes ayant poussé sur 2 m après la coupe de mai, et de celles situées au-delà de 2 m, et qui ont poussé depuis le mois de septembre de l'année précédente. Lors de la campagne de septembre, les herbes éloignées de la bordure (au-delà de 2 m) sont alors plus anciennes. Cette hypothèse est renforcée par les valeurs affichées par le ratio carbone – azote (ratio C/N). Les ratios C/N de mai sont inférieurs à ceux de septembre ; les herbes de septembre sont plus

carbonées, car étant à un stade de maturation plus avancé. Outre ce constat général, sur une même station de prélèvement, on remarque que le ratio C/N évolue quand on s'éloigne de la bordure de route. Ce qui confirme la présence d'herbes plus vieilles au-delà de 2m, reliée à la différence entre les largeurs de fauchage en mai et septembre. Quant au pourcentage de matière organique, il varie entre 88% et 91% en mai, et 85% et 92% en septembre.

La caractérisation des échantillons prélevés aux mois de mai et septembre de l'année 2013 sont résumés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Pourcentages de matières sèches (MS), matière organique (MO) et ratio C/N des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) de l'année 2013

Station – Distance de la route	% MS		% MO		Ratio C/N	
	Mai 2013	Sept 2013	Mai 2013	Sept 2013	Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 1m	20%	20%	89%	86%	18	27
Station 1 - 3m	20%	16%	88%	86%	19	18
Station 2 - 1m	20%	21%	87%	89%	18	31
Station 2 - 3m	20%	26%	89%	90%	18	20
Station 3 - 1m	21%	22%	89%	85%	17	33
Station 3 - 3m	16%	18%	88%	88%	14	17
Station 4 - 1 m	23%	20%	89%	86%	23	33
Station 4 - 3m	23%	22%	89%	88%	23	26
Station 5 - 1m	-	20%	-	87%	-	26
Station 5 - 3m	-	20%	-	86%	-	23
Station 6 - 1m	22%	22%	89%	88%	19	30
Station 6 - 3m	17%	16%	87%	90%	19	16
Station 6 - 5m	-	20%	-	85%	-	22
Station 7 - 1m	24%	21%	87%	88%	14	38
Station 7 - 3m	22%	22%	89%	85%	14	42
Station 7 - 5m	20%	25%	89%	88%	23	44
Station 8 - 1m	21%	17%	90%	85%	19	18
Station 8 - 3m	20%	22%	89%	86%	22	11
Station 9 - 1m	23%	24%	88%	89%	20	13
Station 9 - 3m	23%	26%	89%	85%	22	41
Station 12 - 1m	22%	28%	90%	89%	22	35
Station 12 - 3m	20%	24%	90%	88%	22	35
Moyenne	21%	21%	89%	87%	19	27
Ecart-type	2%	3%	1%	2%	3	10

Les teneurs en matières sèches au mois de mai 2013 sont globalement inférieures à celles du mois de mai de 2012. Ce constat pourrait être lié à la météo du printemps 2013 plus froide et moins ensoleillée qu'au printemps 2012 d'après les données de Météo-France. Ce constat prévaut aussi pour le mois de septembre puisque le fauchage de septembre prend en compte les herbes de mai se situant au-delà de 2m. Toutefois, comme pour les échantillons de la campagne de 2012, on note au mois de mai 2013 une plus forte homogénéité au sein d'une même station, comparativement à septembre 2013. Aussi, les échantillons de septembre présentent majoritairement un pourcentage de matières sèches supérieur à ceux de mai. Mais contrairement

à l'année 2012, au sein d'une même station, le pourcentage de matières sèches tend à diminuer quand on s'éloigne de la bordure de la route. Les ratios C/N des échantillons de septembre sont supérieurs à ceux du mois de mai, témoignant d'une herbe de septembre avec un niveau de maturité plus avancé. Au mois de mai, les ratios C/N ne sont pas très différents au sein d'une même station, sauf pour les stations 7, 8 et 9 où on note une augmentation quand on s'éloigne de la bordure de route. On note aussi que sur les 7 premières stations de prélèvement, le point à 1 mètre de la bordure de route est celui qui présente le plus grand écart entre les mois de mai et septembre. Le pourcentage de matière organique varie entre 87% et 90% au mois de mai, et entre 85% et 90% au mois de septembre.

IV.1.2. Suivi des métaux lourds

Les métaux lourds ont été suivis sur des points de prélèvement répartis le long de la route départementale. Les métaux suivis sont : l'aluminium, l'arsenic, le cadmium, le chrome, le cuivre, le manganèse, le nickel, le plomb et le zinc. Leur analyse a été faite sur l'échantillon sec et est exprimée en $\mu\text{g/g}$ de matières sèches. Les résultats seront comparés entre eux, et par rapport à la norme NF U 44-051 relative aux amendements organiques dont les valeurs limites sont rappelées dans le tableau IV.3. Certes cette législation ne concerne pas directement les herbes mais ces herbes sont destinées à servir de co-substrat pour l'alimentation du digesteur. Il convient de vérifier si leur ajout conduira à une augmentation de la concentration en métaux lourds du digestat. Des herbes présentant des concentrations en métaux lourds inférieures aux teneurs limites de la réglementation ne peuvent donc pas affecter négativement la qualité sanitaire du digestat en termes de métaux lourds.

Tableau IV.3 : Teneurs limites en métaux lourds (Norme NF U 44-051)

	NF U 44-051		
	Valeur limite ($\mu\text{g/g}$ de MS)	Flux maximal par an (g/ha)	Flux maximal sur 10 ans (g/ha)
Arsenic	18	270	900
Cadmium	3	45	150
Chrome	120	1800	6 000
Cuivre	300	3000	10 000
Nickel	60	900	3 000
Plomb	180	2700	9 000
Zinc	600	6000	30 000

IV.1.2.1. Aluminium

L'aluminium n'ayant été ajouté à la liste des métaux que nous suivons qu'en 2013, sa teneur n'a pas été mesurée pour la campagne d'échantillonnage de 2012. Le tableau IV.4 présente les teneurs en aluminium pour la campagne de 2013.

Tableau IV.4 : Teneur en aluminium des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) 2013

Station – Distance de la route	Aluminium ($\mu\text{g/g}$ de MS)	
	Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 1m	76	825
Station 1 - 3m	54	618
Station 2 - 1m	152	367
Station 2 - 3m	68	219
Station 3 - 1m	271	659
Station 3 - 3m	285	473
Station 4 - 1 m	145	610
Station 4 - 3m	84	295
Station 5 - 1m	-	215
Station 5 - 3m	-	244
Station 6 - 1m	131	349
Station 6 - 3m	63	169
Station 6 - 5m	-	168
Station 7 - 1m	129	341
Station 7 - 3m	67	376
Station 7 - 5m	56	398
Station 8 - 1m	120	909
Station 8 - 3m	106	455
Station 9 - 1m	261	766
Station 9 - 3m	81	289
Station 12 - 1m	112	408
Station 12 - 3m	66	349
Moyenne	123	432
Ecart-type	73	213

Les teneurs en aluminium sont comprises entre $54 \mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et $285 \mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ pour les échantillons de mai, et entre $168 \mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et $909 \mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ pour ceux de septembre. Les échantillons de septembre sont plus chargés en aluminium que ceux de mai, et jusqu'à un rapport avoisinant 10 pour certaines stations. Cette brusque augmentation pourrait être due à la forte activité orageuse qui a eu lieu au mois de juillet 2013 d'après les données de Météo-France, soit 2 à 3 mois avant la campagne de coupe. L'intensité des précipitations aurait donc pu favoriser le détachement de particules d'aluminium qui se seraient retrouvées par la suite sur les herbes, ou dans le sol puis absorbées par ces dernières. Au sein de chaque station, les teneurs diminuent en général au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la bordure de route. Les herbes qui poussent proche de la route sont donc plus sujettes à une contamination.

IV.1.2.2. Arsenic

Le tableau IV.6 présente les teneurs en arsenic pour les échantillons lors des campagnes de 2012 et 2013.

Tableau IV.5 : Teneur en arsenic des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Arsenic (µg/g de MS)		Station – Distance de la route	Arsenic (µg/g de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	-	-	Station 1 - 1m	0,25	-
Station 1 - 4,5m	0,13	-	Station 1 - 3m	0,11	-
Station 2 - 2m	0,07	0,06	Station 2 - 1m	0,62	-
Station 2 - 4m	-	0,08	Station 2 - 3m	0,20	-
Station 3 - 2m	-	-	Station 3 - 1m	0,16	-
Station 3 - 4,5m	-	0,10	Station 3 - 3m	0,17	-
Station 4 - 2m	-	-	Station 4 - 1 m	0,39	-
Station 4 - 4m	0,14	-	Station 4 - 3m	0,12	-
Station 5 - 2m	-	0,08	Station 5 - 1m		-
Station 5 - 4m	-	0,08	Station 5 - 3m		-
Station 6 - 2m	-	0,29	Station 6 - 1m	0,09	-
Station 6 - 4m	-	0,18	Station 6 - 3m	0,40	-
Station 7 - 2m	-	0,17	Station 6 - 5m		-
Station 7 - 4m	-	-	Station 7 - 1m	0,06	-
Station 7 - 6m	-	-	Station 7 - 3m	0,31	-
Station 8 - 2m	0,10	-	Station 7 - 5m	0,21	-
Station 8 - 4m	-	-	Station 8 - 1m	0,29	-
Station 9 - 2m		-	Station 8 - 3m	0,31	-
Station 9 - 4m		0,18	Station 9 - 1m	0,41	-
Station 10 - 2m		-	Station 9 - 3m	0,49	-
Station 10 - 4m		-	Station 12 - 1m	0,08	-
Station 11 - 2m		-	Station 12 - 3m	0,05	-
Station 11 - 4,5m		-	Moyenne	0,25	-
Moyenne	-	-	Ecart-type	0,16	-
Ecart-type	-	-			

L'arsenic est présent en très faible quantité dans les échantillons. En 2012, il n'est détecté que sur 4 échantillons au mois de mai et 9 échantillons au mois de septembre. En 2012, sa teneur est comprise entre 0,07 µg/g_{MS} et 0,14 µg/g_{MS} en mai, alors qu'en septembre elle varie entre 0,06 µg/g_{MS} et 0,29 µg/g_{MS}. En 2013, il n'a été détecté que pour les échantillons du mois de mai à des valeurs comprises entre 0,05 µg/g_{MS} et 0,62 µg/g_{MS}. Les teneurs observées sont inférieures à la valeur limite de 18 µg/g_{MS} autorisée par la législation.

IV.1.2.3. Cadmium

Le tableau IV.6 présente les teneurs de cadmium pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.6 : Teneur en cadmium des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Cadmium (µg/g de MS)		Station – Distance de la route	Cadmium (µg/g de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	0,09	-	Station 1 - 1m	0,09	0,27
Station 1 - 4,5m	0,01	-	Station 1 - 3m	0,05	0,18
Station 2 - 2m	-	-	Station 2 - 1m	0,08	0,18
Station 2 - 4m	0,01	-	Station 2 - 3m	0,07	-
Station 3 - 2m	-	-	Station 3 - 1m	0,06	0,30
Station 3 - 4,5m	-	-	Station 3 - 3m	0,05	0,18
Station 4 - 2m	-	-	Station 4 - 1 m	0,08	0,29
Station 4 - 4m	0,03	-	Station 4 - 3m	0,05	0,20
Station 5 - 2m	-	-	Station 5 - 1m	-	0,22
Station 5 - 4m	0,12	-	Station 5 - 3m	-	0,29
Station 6 - 2m	0,03	-	Station 6 - 1m	0,07	0,25
Station 6 - 4m	-	-	Station 6 - 3m	0,06	-
Station 7 - 2m	0,02	-	Station 6 - 5m	-	-
Station 7 - 4m	0,02	-	Station 7 - 1m	0,07	0,23
Station 7 - 6m	0,53	-	Station 7 - 3m	0,06	0,27
Station 8 - 2m	0,01	-	Station 7 - 5m	0,05	-
Station 8 - 4m	-	-	Station 8 - 1m	0,07	0,28
Station 9 - 2m	-	-	Station 8 - 3m	0,08	0,18
Station 9 - 4m	-	-	Station 9 - 1m	0,07	0,17
Station 10 - 2m	-	-	Station 9 - 3m	0,10	-
Station 10 - 4m	-	-	Station 12 - 1m	0,09	0,17
Station 11 - 2m	-	-	Station 12 - 3m	-	-
Station 11 - 4,5m	-	-	Moyenne	-	-
Moyenne	-	-	Ecart-type	-	-
Ecart-type	-	-			

Sur l'année 2012, le cadmium n'a été détecté dans aucun échantillon de la campagne de septembre. En mai, les teneurs varient entre 0,01 µg/g_{MS} et 0,53 µg/g_{MS}. En 2013, le cadmium est détecté lors des deux campagnes, et affichent des teneurs au mois de septembre qui sont jusqu'à 4 fois supérieures à celles de mai. Les teneurs varient de 0,05 µg/g_{MS} à 0,10 µg/g_{MS} pour le mois de mai, et de 0,17 µg/g_{MS} à 0,30 µg/g_{MS} pour le mois de septembre. Les teneurs observées sont inférieures à la valeur limite de 3 µg/g_{MS} autorisée par la législation.

IV.1.2.4. Chrome

Le tableau IV.7 présente les teneurs de chrome pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.7 : Teneur en cadmium des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Chrome (µg/g de MS)		Station – Distance de la route	Chrome (µg/g de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	8	10	Station 1 – 1m	13	34
Station 1 - 4,5m	4	8	Station 1 – 3m	13	17
Station 2 - 2m	4	13	Station 2 – 1m	19	26
Station 2 - 4m	5	8	Station 2 – 3m	14	15
Station 3 - 2m	5	18	Station 3 – 1m	24	29
Station 3 - 4,5m	4	13	Station 3 – 3m	24	24
Station 4 - 2m	17	10	Station 4 – 1 m	18	35
Station 4 - 4m	5	12	Station 4 – 3m	12	27
Station 5 - 2m	6	14	Station 5 – 1m	-	23
Station 5 - 4m	7	10	Station 5 – 3m	-	20
Station 6 - 2m	5	8	Station 6 – 1m	16	25
Station 6 - 4m	2	9	Station 6 – 3m	9	12
Station 7 - 2m	6	13	Station 6 – 5m	-	15
Station 7 - 4m	8	13	Station 7 – 1m	11	41
Station 7 - 6m	16	20	Station 7 – 3m	10	35
Station 8 - 2m	5	7	Station 7 – 5m	12	25
Station 8 - 4m	4	5	Station 8 – 1m	22	33
Station 9 - 2m	-	10	Station 8 – 3m	24	22
Station 9 - 4m	-	6	Station 9 – 1m	18	24
Station 10 - 2m	-	4	Station 9 – 3m	12	16
Station 10 - 4m	-	4	Station 12 – 1m	18	18
Station 11 - 2m	-	14	Station 12 – 3m	11	12
Station 11 - 4,5m	-	8	Moyenne	16	24
Moyenne	7	10	Ecart-type	5	8
Ecart-type	4	4			

Pour l'année 2012, les teneurs en chrome sont comprises entre 4 µg/g_{MS} et 17 µg/g_{MS} au mois de mai, et entre 4 µg/g_{MS} et 20 µg/g_{MS} au mois de septembre. Sur la plupart des points, on constate que les teneurs en septembre sont supérieures à celles de mai. Les teneurs mesurées pour les échantillons de l'année 2013 sont supérieures à celles de 2012. Elles varient entre 9 µg/g_{MS} et 24 µg/g_{MS} au mois de mai, et entre 12 µg/g_{MS} et 41 µg/g_{MS} au mois de septembre. Tout comme pour l'année 2012, les teneurs en septembre sont supérieures à celles de mai, mais le rapport est ici de l'ordre du quadruple. Aussi, en général, les teneurs diminuent pour une même station à mesure qu'on s'éloigne de la bordure de route. Les valeurs mesurées restent cependant très inférieures à la valeur limite de la législation qui est de 120 µg/g_{MS}.

IV.1.2.5. Cuivre

Le tableau IV.8 présente les teneurs de cuivre pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.8 : Teneur en cuivre des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Cuivre ($\mu\text{g/g}$ de MS)		Station – Distance de la route	Cuivre ($\mu\text{g/g}$ de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 – 2m	29	7	Station 1 – 1m	10	12
Station 1 – 4,5m	8	7	Station 1 – 3m	9	11
Station 2 – 2m	8	8	Station 2 – 1m	9	12
Station 2 – 4m	16	6	Station 2 – 3m	10	8
Station 3 – 2m	8	7	Station 3 – 1m	11	9
Station 3 – 4,5m	9	8	Station 3 – 3m	11	11
Station 4 – 2m	10	5	Station 4 – 1 m	9	8
Station 4 – 4m	7	8	Station 4 – 3m	8	7
Station 5 – 2m	10	7	Station 5 – 1m	-	10
Station 5 – 4m	42	8	Station 5 – 3m	-	8
Station 6 – 2m	11	7	Station 6 – 1m	11	10
Station 6 – 4m	7	6	Station 6 – 3m	8	8
Station 7 – 2m	12	6	Station 6 – 5m	-	8
Station 7 – 4m	16	5	Station 7 – 1m	8	7
Station 7 – 6m	128	7	Station 7 – 3m	8	8
Station 8 – 2m	7	7	Station 7 – 5m	8	5
Station 8 – 4m	6	7	Station 8 – 1m	10	9
Station 9 – 2m	-	6	Station 8 – 3m	9	7
Station 9 – 4m	-	7	Station 9 – 1m	10	9
Station 10 – 2m	-	7	Station 9 – 3m	9	7
Station 10 – 4m	-	5	Station 12 – 1m	12	11
Station 11 – 2m	-	5	Station 12 – 3m	8	8
Station 11 – 4,5m	-	7	Moyenne	9	9
Moyenne	20	7	Ecart-type	1	2
Ecart-type	29	1			

Les teneurs en cuivre pour l'année 2012 sont comprises entre 6 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 128 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 5 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 8 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Contrairement aux métaux précédents, sur la plupart des points, on constate que les teneurs en septembre sont inférieures à celles de mai. Les teneurs mesurées pour les échantillons de l'année 2013 sont globalement supérieures à celles de 2012, hormis pour 4 échantillons de 2012. Elles varient entre 8 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 12 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 5 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 12 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Les teneurs mesurées pour les deux mois sont du même ordre de grandeur, et ne diminuent pas significativement pour une même station à mesure qu'on s'éloigne de la bordure de route. Elles peuvent même parfois beaucoup augmenter (station 2, 6, 7 en mai 2012). Les valeurs mesurées restent cependant très inférieures à la valeur limite de la législation qui est de 300 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$.

IV.1.2.6. Manganèse

Le tableau IV.9 présente les teneurs de manganèse pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.9 : Teneur en manganèse des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Manganèse ($\mu\text{g/g}$ de MS)		Station – Distance de la route	Manganèse ($\mu\text{g/g}$ de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	38	44	Station 1 - 1m	49	67
Station 1 - 4,5m	ND	85	Station 1 - 3m	60	71
Station 2 - 2m	38	51	Station 2 - 1m	51	73
Station 2 - 4m	33	59	Station 2 - 3m	51	75
Station 3 - 2m	33	41	Station 3 - 1m	38	118
Station 3 - 4,5m	46	60	Station 3 - 3m	38	68
Station 4 - 2m	33	35	Station 4 - 1 m	37	161
Station 4 - 4m	ND	48	Station 4 - 3m	45	128
Station 5 - 2m	43	47	Station 5 - 1m	-	84
Station 5 - 4m	65	57	Station 5 - 3m	-	83
Station 6 - 2m	28	61	Station 6 - 1m	43	112
Station 6 - 4m	38	54	Station 6 - 3m	37	55
Station 7 - 2m	18	55	Station 6 - 5m	-	80
Station 7 - 4m	30	60	Station 7 - 1m	39	136
Station 7 - 6m	29	66	Station 7 - 3m	34	194
Station 8 - 2m	50	41	Station 7 - 5m	47	131
Station 8 - 4m	-	36	Station 8 - 1m	48	114
Station 9 - 2m	-	40	Station 8 - 3m	51	86
Station 9 - 4m	-	27	Station 9 - 1m	47	62
Station 10 - 2m	-	46	Station 9 - 3m	36	41
Station 10 - 4m	-	31	Station 12 - 1m	32	51
Station 11 - 2m	-	49	Station 12 - 3m	30	42
Station 11 - 4,5m	-	153	Moyenne	43	92
Moyenne	37	54	Ecart-type	8	40
Ecart-type	11	25			

Pour l'année 2012, les teneurs en manganèse sont comprises entre 18 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 65 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 27 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 153 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Sur la plupart des points, on constate que les teneurs en septembre sont jusqu'à 2 fois supérieures à celles de mai. Au sein d'une même station, la teneur augmente à mesure qu'on s'éloigne de la bordure pour la plupart des stations. Les teneurs mesurées pour les échantillons de l'année 2013 sont globalement supérieures à celles de 2012. Elles varient entre 30 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 60 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 41 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 194 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Les teneurs en septembre sont jusqu'à 6 fois supérieures à celles de mai. Les teneurs diminuent pour une même station à mesure qu'on s'éloigne de la bordure de route sauf pour les stations 1 et 4 de mai, et 7 de septembre.

IV.1.2.7. Nickel

Le tableau IV.10 présente les teneurs de nickel pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.10 : Teneur en nickel des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept.) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Nickel ($\mu\text{g/g}$ de MS)		Station – Distance de la route	Nickel ($\mu\text{g/g}$ de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	23	5	Station 1 - 1m	5	14
Station 1 - 4,5m	115	4	Station 1 - 3m	7	8
Station 2 - 2m	8	6	Station 2 - 1m	8	11
Station 2 - 4m	7	4	Station 2 - 3m	8	6
Station 3 - 2m	7	9	Station 3 - 1m	10	8
Station 3 - 4,5m	13	6	Station 3 - 3m	10	8
Station 4 - 2m	25	4	Station 4 - 1 m	7	9
Station 4 - 4m	26	6	Station 4 - 3m	5	6
Station 5 - 2m	14	6	Station 5 - 1m	-	7
Station 5 - 4m	17	5	Station 5 - 3m	-	5
Station 6 - 2m	10	4	Station 6 - 1m	7	7
Station 6 - 4m	9	4	Station 6 - 3m	5	4
Station 7 - 2m	9	6	Station 6 - 5m	-	5
Station 7 - 4m	22	6	Station 7 - 1m	5	13
Station 7 - 6m	20	9	Station 7 - 3m	5	8
Station 8 - 2m	37	4	Station 7 - 5m	6	8
Station 8 - 4m	9	2	Station 8 - 1m	10	15
Station 9 - 2m	-	5	Station 8 - 3m	6	8
Station 9 - 4m	-	4	Station 9 - 1m	8	10
Station 10 - 2m	-	3	Station 9 - 3m	5	7
Station 10 - 4m	-	3	Station 12 - 1m	8	7
Station 11 - 2m	-	6	Station 12 - 3m	5	4
Station 11 - 4,5m	-	4	Moyenne	7	8
Moyenne	22	5	Ecart-type	2	3
Ecart-type	25	2			

En 2012, les teneurs en nickel sont comprises entre 7 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 115 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 2 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 9 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Les teneurs en septembre sont très inférieures à celles mai. Au sein d'une même station, la teneur augmente à mesure qu'on s'éloigne de la bordure pour la plupart. Les teneurs mesurées pour les échantillons de l'année 2013 sont inférieures à celles de 2012 pour les mois de mai, et supérieures pour les mois de septembre. Elles varient entre 5 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 10 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 4 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 15 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Les teneurs en septembre sont globalement supérieures à celles de mai. Les teneurs diminuent pour une même station à mesure qu'on s'éloigne de la bordure de route ou restent inchangées. A l'exception du point de la station 1, les valeurs mesurées restent cependant inférieures à la valeur limite de la législation qui est de 60 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$.

IV.1.2.8. Plomb

Le tableau IV.11 présente les teneurs de plomb pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.11 : Teneur en plomb des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Plomb (µg/g de MS)		Station – Distance de la route	Plomb (µg/g de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	0,50	0,98	Station 1 - 1m	0,40	1,64
Station 1 - 4,5m	0,41	0,73	Station 1 - 3m	0,12	1,42
Station 2 - 2m	0,56	1,02	Station 2 - 1m	0,40	1,49
Station 2 - 4m	0,70	0,85	Station 2 - 3m	0,05	0,91
Station 3 - 2m	0,46	0,79	Station 3 - 1m	1,17	1,97
Station 3 - 4,5m	0,50	1,08	Station 3 - 3m	1,28	2,01
Station 4 - 2m	0,65	0,78	Station 4 - 1 m	0,54	1,54
Station 4 - 4m	0,50	1,10	Station 4 - 3m	0,34	1,21
Station 5 - 2m	0,33	1,13	Station 5 - 1m	-	1,27
Station 5 - 4m	0,48	1,06	Station 5 - 3m	-	1,49
Station 6 - 2m	0,46	1,56	Station 6 - 1m	0,53	1,16
Station 6 - 4m	0,36	0,90	Station 6 - 3m	0,36	1,13
Station 7 - 2m	0,24	0,97	Station 6 - 5m	-	0,97
Station 7 - 4m	0,49	0,66	Station 7 - 1m	0,36	1,49
Station 7 - 6m	0,69	0,76	Station 7 - 3m	0,07	1,28
Station 8 - 2m	0,56	0,80	Station 7 - 5m	0,24	1,09
Station 8 - 4m	0,60	0,85	Station 8 - 1m	0,50	3,43
Station 9 - 2m	-	0,46	Station 8 - 3m	0,31	1,27
Station 9 - 4m	-	0,55	Station 9 - 1m	0,76	1,24
Station 10 - 2m	-	0,48	Station 9 - 3m	0,06	0,73
Station 10 - 4m	-	0,46	Station 12 - 1m	0,40	2,01
Station 11 - 2m	-	0,81	Station 12 - 3m	0,42	1,19
Station 11 - 4,5m	-	2,13	Moyenne	0,44	1,45
Moyenne	0,50	0,91	Ecart-type	0,33	0,56
Ecart-type	0,12	0,37			

Les teneurs en plomb mesurées pour les échantillons sont faibles. En 2012, elles sont comprises entre 0,24 µg/g_{MS} et 0,70 µg/g_{MS} au mois de mai, et entre 0,46 µg/g_{MS} et 2,13 µg/g_{MS} au mois de septembre. Les teneurs en septembre affichent des valeurs plus élevées que celles de mai. On note qu'au sein d'une même station, la teneur ne présente pas de grande variation à mesure qu'on s'éloigne du bord de route. Les teneurs mesurées pour les échantillons de septembre 2013 sont supérieures à celles de septembre 2012, mais pour les mois de septembre. Elles varient entre 0,05 µg/g_{MS} et 1,28 µg/g_{MS} au mois de mai, et entre 0,73 µg/g_{MS} et 3,43 µg/g_{MS} au mois de septembre. Les teneurs en septembre sont globalement supérieures à celles de mai. On voit nettement que les teneurs diminuent au fur et à mesure qu'on s'éloigne de la bordure pour les stations

présentant une variation en leur sein. Les valeurs mesurées restent cependant très inférieures, voire négligeables, à la valeur limite de la législation qui est de 180 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$.

IV.1.2.9. Zinc

Le tableau IV.12 présente les teneurs de zinc pour les échantillons d'herbe lors des campagnes de mai et septembre des années 2012 et 2013.

Tableau IV.12 : Teneur en zinc des prélèvements d'herbe de mai et septembre (Sept) des années 2012 et 2013

Station – Distance de la route	Zinc ($\mu\text{g/g}$ de MS)		Station – Distance de la route	Zinc ($\mu\text{g/g}$ de MS)	
	Mai 2012	Sept 2012		Mai 2013	Sept 2013
Station 1 - 2m	37	28	Station 1 - 1m	45	59
Station 1 - 4,5m	28	23	Station 1 - 3m	41	52
Station 2 - 2m	21	25	Station 2 - 1m	43	39
Station 2 - 4m	35	22	Station 2 - 3m	51	29
Station 3 - 2m	23	22	Station 3 - 1m	58	36
Station 3 - 4,5m	26	26	Station 3 - 3m	62	43
Station 4 - 2m	30	19	Station 4 - 1 m	44	29
Station 4 - 4m	32	28	Station 4 - 3m	42	27
Station 5 - 2m	23	25	Station 5 - 1m	-	41
Station 5 - 4m	29	24	Station 5 - 3m	-	44
Station 6 - 2m	33	34	Station 6 - 1m	55	36
Station 6 - 4m	24	35	Station 6 - 3m	58	31
Station 7 - 2m	18	39	Station 6 - 5m	-	29
Station 7 - 4m	25	29	Station 7 - 1m	48	39
Station 7 - 6m	23	31	Station 7 - 3m	44	34
Station 8 - 2m	28	29	Station 7 - 5m	45	25
Station 8 - 4m	24	29	Station 8 - 1m	53	54
Station 9 - 2m	-	18	Station 8 - 3m	49	44
Station 9 - 4m	-	26	Station 9 - 1m	52	32
Station 10 - 2m	-	21	Station 9 - 3m	50	31
Station 10 - 4m	-	17	Station 12 - 1m	64	62
Station 11 - 2m	-	23	Station 12 - 3m	40	36
Station 11 - 4,5m	-	21	Moyenne	50	39
Moyenne	27	26	Ecart-type	7	10
Ecart-type	5	6			

Les teneurs en zinc mesurées en 2012 sont comprises entre 18 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 37 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 17 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 39 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Aucune des deux campagnes ne se dégage nettement comme celle affichant les plus fortes teneurs de zinc. Les teneurs mesurées pour les échantillons de l'année 2013 sont supérieures à celles de 2012. Elles varient entre 40 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 62 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de mai, et entre 25 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ et 59 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ au mois de septembre. Les teneurs en septembre sont globalement inférieures à celles de mai. Les valeurs mesurées restent

cependant très inférieures, voire négligeables, à la valeur limite de la législation qui est de 600 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$.

IV.1.3. Suivi des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été suivis sur les points de prélèvement répartis le long de la route départementale. Les HAPs ciblés sont ceux répertoriés par l'U.S.EPA comme étant prioritaires. Leur analyse a été faite sur les échantillons secs et est exprimée en $\mu\text{g}/\text{g}$ de matières sèches. Les résultats présentés sont ceux des campagnes d'échantillonnage de mai et septembre de l'année 2013. Ils seront comparés entre eux, puis par rapport à la réglementation des valeurs limites autorisées. La norme NF U 44-051 relative aux amendements organiques fixe les valeurs limites à 4 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$ pour le fluoranthène, 2,5 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$ pour le benzo(b)fluoranthène et 1,5 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$ pour le benzo(a)pyrène. Les flux limites annuels exprimés en $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ sont fixés par la norme à 6, 4 et 2 respectivement pour le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène et le benzo(a)pyrène.

Les tableaux IV.13 et IV.14 présentent les teneurs en HAP pour les échantillons d'herbe récoltés en mai et septembre 2013. Pour la campagne de mai 2013 (tableau IV.13), tous les HAPs ont été détectés, à l'exception du benzo(a)pyrène considéré comme l'un des HAPs les plus dangereux. Leurs teneurs sont inférieures à 0,50 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$. La plus forte teneur de fluoranthène mesurée est de 0,18 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$ et celle du benzo(b)fluoranthène est de 0,03 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$. Les teneurs en mai 2013 sont donc inférieures aux valeurs limites de la réglementation. La campagne de septembre 2013 (tableau IV.14) n'affiche pas non plus de présence de benzo(a)pyrène. Le naphtalène affiche des teneurs allant jusqu'à 1,32 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$. Tout comme pour la campagne de mai, les échantillons de septembre présentent des valeurs en deçà de la réglementation. En effet, le fluoranthène affiche une teneur maximale de 0,09 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$ et le benzo(b)fluoranthène affiche une teneur maximale de 0,07 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MS}}$.

Tableau IV.13 : Teneurs en HAPs (exprimées en µg/g de matière sèche) des échantillons d'herbe de la campagne de mai 2013

	Naphtalène	Acénaphthylène	Acénaphthène	Fluorène	Phénanthrène	Anthracène	Fluoranthène	Pyrène	Benzo(a) Anthracène	Chrysène	Benzo (b) fluoranthène	Benzo (k) fluoranthène	Benzo (a) Pyrène	Dibenzo (a,h) Anthracène	Benzo (g,h,i) pérylène	Indéno (1,2,3- c,d) Pyrène
Station 1 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11	0,01	0,03	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,10	0,12	0,08
Station 1 - 3m	0,03	0,21	0,00	0,05	0,05	0,01	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01	-	0,11	0,14	0,12
Station 2 - 1m	0,07	0,07	0,00	0,02	0,13	0,01	0,11	0,09	0,01	0,01	0,00	0,04	-	0,00	0,34	0,17
Station 2 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,02	0,12	0,01	0,10	0,08	0,01	0,01	0,02	0,03	-	0,00	0,41	0,17
Station 3 - 1m	0,00	0,11	0,00	0,03	0,10	0,00	0,03	0,05	0,00	0,01	0,01	0,00	-	0,07	0,18	0,08
Station 3 - 3m	0,05	0,00	0,00	0,03	0,13	0,01	0,10	0,12	0,02	0,01	0,03	0,05	-	0,00	0,43	0,17
Station 4 - 1 m	0,06	0,00	0,00	0,03	0,11	0,00	0,03	0,11	0,01	0,01	0,02	0,05	-	0,00	0,47	0,20
Station 4 - 3m	0,00	0,14	0,00	0,03	0,15	0,03	0,04	0,22	0,00	0,00	0,00	0,01	-	0,32	0,00	0,06
Station 6 - 1m	0,04	0,00	0,00	0,03	0,11	0,01	0,09	0,08	0,00	0,00	0,03	0,01	-	0,12	0,17	0,15
Station 6 - 3m	0,05	0,23	0,00	0,05	0,14	0,01	0,02	0,09	0,00	0,00	0,01	0,03	-	0,16	0,26	0,19
Station 7 - 1m	0,00	0,21	0,00	0,04	0,12	0,01	0,11	0,08	0,01	0,01	0,03	0,05	-	0,00	0,40	0,17
Station 7 - 3m	0,00	0,21	0,00	0,03	0,12	0,01	0,08	0,08	0,01	0,01	0,01	0,04	-	0,00	0,30	0,15
Station 7 - 5m	0,00	0,00	0,00	0,06	0,21	0,02	0,12	0,10	0,00	0,02	0,00	0,01	-	0,18	0,20	0,18
Station 8 - 1m	0,00	0,00	0,18	0,02	0,17	0,02	0,10	0,08	0,00	0,00	0,01	0,03	-	0,15	0,29	0,17
Station 8 - 3m	0,00	0,23	0,00	0,05	0,15	0,01	0,05	0,08	0,00	0,01	0,00	0,01	-	0,17	0,18	0,17
Station 9 - 1m	0,00	0,23	0,00	0,10	0,25	0,03	0,18	0,14	0,00	0,05	0,01	0,02	-	0,29	0,18	0,20
Station 9 - 3m	0,00	0,25	0,00	0,06	0,11	0,01	0,13	0,15	0,01	0,01	0,01	0,04	-	0,00	0,48	0,17
Station 12 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,06	0,05	0,01	0,00	0,05	0,00	0,01	0,01	0,02	-	0,11	0,39	0,10
Station 12 - 3m	0,04	0,00	0,00	0,05	0,06	0,01	0,04	0,06	0,00	0,01	0,00	0,02	-	0,00	0,22	0,08

Tableau IV.14 : Teneurs en HAPs (exprimées en µg/g de matière sèche) des échantillons d'herbe de la campagne de septembre 2013

	Naphtalène	Acénaphthylène	Acénaphtène	Fluorène	Phénanthrène	Anthracène	Fluoranthène	Pyrène	Benzo(a) Anthracène	Chrysène	Benzo (b) fluoranthène	Benzo (k) fluoranthène	Benzo (a) Pyrène	Dibenzo (a,h) Anthracène	Benzo (g,h,i) pérylène	Indéno (1,2,3-c,d) Pyrène
Station 1 - 1m	0,43	0,00	0,00	0,06	0,33	0,03	0,08	0,11	0,00	0,04	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 1 - 3m	0,17	0,00	0,00	0,05	0,24	0,02	0,07	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 2 - 1m	0,62	0,17	0,97	0,09	0,62	0,03	0,08	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 2 - 3m	0,37	0,00	0,00	0,07	0,36	0,03	0,09	0,12	0,00	0,03	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 3 - 1m	0,00	0,00	0,76	0,05	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,13
Station 3 - 3m	1,32	0,19	0,00	0,11	0,64	0,04	0,07	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 4 - 1 m	0,68	0,15	0,00	0,08	0,51	0,03	0,06	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 4 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,06	0,05	0,01	0,04	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 5 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,04	0,09	0,02	0,03	0,08	0,02	0,03	0,07	0,09	-	0,10	0,64	0,12
Station 5 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,05	0,04	0,01	0,06	0,04	0,02	0,02	0,03	0,02	-	1,28	0,06	0,04
Station 6 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,21	0,02	0,00
Station 6 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04	0,01	0,00	0,04	0,00	0,00	0,02	0,00	-	0,00	0,14	0,03
Station 6 - 5m	0,00	0,00	0,00	0,05	0,04	0,01	0,00	0,04	0,00	0,01	0,00	0,02	-	0,00	0,05	0,03
Station 7 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,02	0,09	0,07	0,00	0,02	0,03	0,02	-	0,05	0,00	0,07
Station 7 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,04	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,13	0,00	0,00
Station 7 - 5m	0,13	0,00	0,00	0,04	0,07	0,03	0,00	0,04	0,00	0,01	0,02	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 8 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,02	0,00	0,04	0,00	0,01	0,02	0,00	-	0,00	0,17	0,01
Station 8 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,05	0,09	0,02	0,03	0,07	0,00	0,01	0,02	0,00	-	0,00	0,00	0,07
Station 9 - 1m	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,01	0,06	0,06	0,02	0,02	0,03	0,00	-	0,35	0,00	0,05
Station 9 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,04	0,09	0,03	0,00	0,04	0,00	0,02	0,02	0,00	-	0,07	0,00	0,00
Station 12 - 1m	0,24	0,00	0,00	0,05	0,05	0,02	0,00	0,03	0,00	0,02	0,02	0,00	-	0,00	0,00	0,00
Station 12 - 3m	0,00	0,00	0,00	0,04	0,05	0,02	0,05	0,04	0,00	0,01	0,02	0,00	-	0,00	0,00	0,00

IV.1.4. Conclusion partielle

Le suivi des teneurs en matières sèches et du ratio C/N des herbes récoltées en bordure de route a montré que ces paramètres sont influencés par le temps de maturation. On a pu constater que les herbes de septembre ($39\pm 12\%$ de MS) ont une teneur en carbone plus élevée que celles de mai ($23\pm 3\%$ de MS). Les ratios C/N de septembre présentent également une supériorité par rapport au mois de mai. Les prélèvements effectués à diverses distances de la bordure de route au sein d'une même station montrent l'impact des largeurs de fauchage : 2 m en mai et sur toute la largeur en septembre. En effet, les teneurs en MS présentent des écarts plus importants sur une même station au mois de septembre qu'au mois de mai.

La digestion anaérobie affectant très peu les teneurs en métaux lourds, les quantités introduites en entrée représentent une très bonne estimation des quantités retrouvées en fin de réaction dans le digestat. Les teneurs détectées lors des campagnes d'échantillonnage montrent des valeurs très faibles comparées à celles autorisées par législation, et ce même en cumulant les quantités détectées lors des deux campagnes pour chaque année. L'utilisation des herbes provenant des deux campagnes annuelles au cours de la même année n'affectera donc pas la qualité sanitaire du digestat au regard des métaux lourds. La norme NF U 44-051 impose également des flux sur des périodes de 1 an et 10 ans à ne dépasser. Même si les teneurs mesurées pour les herbes ne représentent pas de risques, un suivi de la teneur en métaux lourds dans les sols s'avère indispensable pour évaluer les impacts de leur accumulation. Un tel suivi pourra permettre de réguler les fréquences d'épandage du digestat en tenant compte de la phytoextractibilité des métaux lourds par les plantes.

Le suivi des hydrocarbures aromatiques polycycliques aboutit aux mêmes conclusions que dans le cas des métaux lourds. Les teneurs mesurées sont bien en deçà des limites imposées par la législation, mais il s'avère indispensable de surveiller sur le long terme l'accumulation de ces composés dans le sol.

IV.2. Effet des antibiotiques sur le procédé

Les antibiotiques sont présents dans les lisiers et fumiers, car ils sont consommés par les animaux de l'élevage et excrétés via leurs fèces et leurs urines. De par leur action antibactérienne, les antibiotiques peuvent potentiellement perturber le procédé de méthanisation et donc la production de biogaz.

Nous étudierons d'abord la tétracycline (réacteur batch et continu), puis la spiramycine (batch et continu), et finalement la tylosine (batch).

IV.2.1. Effet de la tétracycline sur le procédé

La tétracycline ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) étant l'un des antibiotiques les plus utilisés, ses effets ont été étudiés en réacteur fermé (batch) et continu sur le processus de digestion anaérobie du lisier bovin. Les concentrations testées prennent en compte les quantités utilisées sur la ferme de la Bouzule, et des concentrations testées dans la littérature. La concentration de tétracycline sur la ferme a été estimée à 0,16 mg/L pour l'année 2010, tandis que les concentrations testées dans la littérature vont de 10 mg/L à 98 mg/L. Les concentrations testées dans nos expériences qui sont au-delà de cette gamme relèvent d'une étude théorique, pour évaluer les scénarios de très fortes concentrations.

IV.2.1.1. Test batch

Dans le but d'observer l'effet de la tétracycline en réacteur fermé, les conditions opératoires ont été fixées pour assurer une réaction optimale. Les effets observés pourront alors être attribuables à la présence de la tétracycline dans le milieu réactionnel. Les concentrations testées sont : 8, 16, 80 et 160 mg/L.

III.2.1.1.1. Caractérisation des substrats

Le tableau IV.15 présente la caractérisation du lisier utilisé pour l'expérience.

Tableau IV.15 : Caractérisation du lisier pour le test en batch de la tétracycline (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ratio C/N)

	Matières sèches (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium initial ($mg_{N-NH_4^+}/g$ d'échantillon)	Ratio C/N
Lisier	10	83	1,32	20

Le lisier utilisé présente un taux de matières sèches de 10%, une teneur en matière organique de 83% (tableau IV.15). Il est donc un substrat organique intéressant pour la méthanisation, et présente de surcroît un ratio C/N de 20 qui favorise le bon déroulement du procédé car étant compris entre 15 et 45 (Atandi et al., 2012). La teneur en ammonium du lisier de 1,32 mg_{N-NH4}⁺/g d'échantillon conduit à une teneur en ammonium dans les batch d'une valeur initiale de 263 mg_{N-NH4}⁺/L (tableau IV.16). Même si la teneur en ammonium augmente au cours du temps puisque la digestion anaérobie en tant que processus de minéralisation de la matière organique transforme l'azote organique, cette valeur reste bien en deçà des teneurs inhibitrices de 1500 mg_{N-NH4}⁺/L renseignées dans la littérature (Atandi et al., 2012).

La composition des réacteurs consignée dans le tableau IV.16 montre des valeurs de pH final comprises dans la gamme optimale (6,5 – 8,5). L'acidification du milieu de réaction ne peut donc pas être un des facteurs inhibiteurs de ce test (Moletta, 2008).

Tableau IV.16 : Composition des batch, ammonium et pH en fin d'expérience

Batch en duplicat	Composition	Ammonium (mg _{N-NH4} ⁺ /L)	pH final
#1 et #2	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7	263	6,9
#3 et #4	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 8 mg/L de Tétracycline	263	6,9
#5 et #6	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 16 mg/L de Tétracycline	263	6,9
#7 et #8	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 80 mg/L de Tétracycline	263	7,0
#9 et #10	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 160 mg/L de Tétracycline	263	6,9

Les résultats obtenus lors de la caractérisation du substrat confirment que les conditions sont favorables pour une bonne digestion anaérobie. Un écart de production par rapport au témoin (lisier seul) proviendra donc de l'ajout de la tétracycline.

IV.2.1.1.2. Production de biogaz

Le tableau IV.17 présente le volume moyen de biogaz produit pour chaque concentration testée et les pourcentages de perte de volume par rapport au témoin. L'écart relatif des témoins par rapport à leur moyenne est de 11%. Nous considérons que les pertes des tests de tétracycline ne

seront significatives que pour des valeurs supérieures à cet écart de 11%. Les tests contenant 8, 16, 80 et 160 mg/L de tétracycline présentent des pertes volumiques de 22%, 26%, 34% et 35 % respectivement. La baisse de production croît avec les concentrations croissantes de tétracyclines, mais pas proportionnellement. Le doublement de la concentration de 8 à 16 mg/L induit une baisse de 4%, et seulement de 1% de 80 à 160 mg/L.

Tableau IV.17 : Volume total de biogaz produit pour le test batch avec la tétracycline (Tet)

	Volume moyen de biogaz (mL)	Ecart relatif (%)	Baisse par rapport au lisier seul (%)
Lisier	3363±354	11	-
Lisier + 8mg/L de Tet	2626±188	7	22
Lisier + 16 mg/L de Tet	2479±45	2	26
Lisier + 80 mg/L de Tet	2205±281	13	34
Lisier + 160 mg/L de Tet	2196±40	2	35

La figure IV.1 montre l'évolution du pourcentage final de baisse de production de biogaz en fonction des concentrations de tétracycline. Pour les faibles concentrations testées (8 mg/L et 16 mg/L) le pourcentage de baisse croît rapidement, puis évolue plus lentement lorsqu'on approche des fortes concentrations. On note que l'augmentation de la concentration d'un facteur 10 ne rajoute que 9 – 12% de baisse supplémentaire. Par ailleurs, entre 80 mg/L et 160 mg/L, le pourcentage de baisse présente un palier.

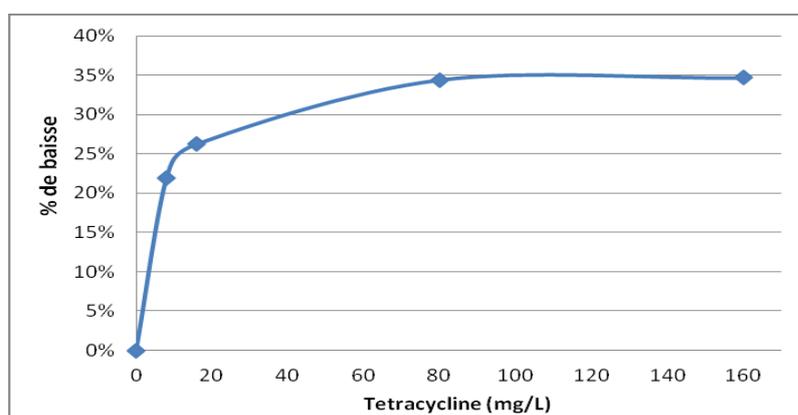


Figure IV.1 : Pourcentage final de baisse de production de biogaz en présence de tétracycline

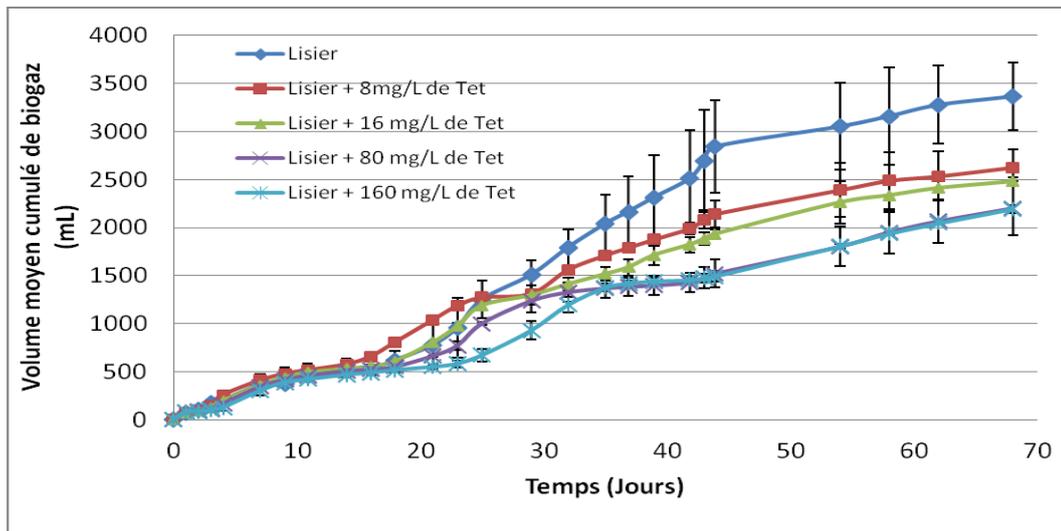


Figure IV.2 : Volume moyen cumulé de biogaz pour le test batch avec de la tétracycline (Tet)

La figure IV.2 montre que tous les tests contenant la tétracycline présentent la même phase de démarrage que le témoin durant les 14 premiers jours. Le test à 8 mg/L est le premier à présenter une phase rapide de production, mais connaît un ralentissement du 25^{ème} au 29^{ème} jour qui le fait passer en dessous du témoin. La phase de production rapide du test à 16 mg/L démarre en même temps que celle du lisier au 21^{ème} jour, mais elle ralentit à partir du 25^{ème} jour. La phase de production rapide des tests à 80 mg/L démarre au 21^{ème} avec une plus faible intensité, puis stagne du 29^{ème} au 43^{ème} jour avant de se stabiliser à une pente identique à celle du témoin jusqu'à la fin de réaction. Le test à 160 mg/L a une phase de production rapide qui va du 25^{ème} au 35^{ème} jour, stagne jusqu'au 43^{ème} jour aussi pour finir avec une pente identique à celle du témoin.

Pour la plus faible concentration de tétracycline (8 mg/L), on peut noter que la phase de production rapide de ce test précède celle du témoin. Ceci peut s'expliquer par un stress bactérien qui a accéléré la mise en place des microorganismes,. Mais cet avantage est vite perdu à partir du 25^{ème} jour. Le profil du volume cumulé moyen de gaz met en évidence l'effet bactériostatique (observable par un ralentissement temporaire) de la tétracycline. En effet, du 44^{ème} jour à la fin de l'expérience, les tests avec la tétracycline présentent des pentes de production proches de celle du témoin. En plus de retarder le démarrage de la production rapide pour les tests à 80 et 160 mg/L, on note que la production est presque arrêtée pendant 4 jours pour les tests à 8 et 16 mg/L. Le test à 80 mg/L est quasiment arrêté pendant 11 jours. Quant au test à 160 mg/L, il présente un quasi-arrêt de 8 jours en plus d'avoir démarré la phase de production rapide 4 jours après le lisier.

Même si les tests à 8 et 16 mg/L présentent des baisses de production volumique similaires, elles n'affectent pas pareillement la production de gaz. Les différences de processus surviennent les 29 premiers jours. Du 32^{ème} jour à la fin de réaction, ces deux tests présentent des comportements similaires. De manière analogue, les tests à 80 et 160 mg/L présentent des pourcentages finaux de baisses similaires, et le même profil du 35^{ème} jour à la fin de

l'expérience. Cependant, le test à 160 mg/L produit tardivement du biogaz et à une intensité plus faible que le test à 80 mg/L, mais 2 jours plus longtemps.

La figure IV.3 montre que les concentrations de tétracyclines ont des effets différents même si certains présentent des pourcentages de baisse proches. Au 20^{ème} jour, on observe que le test à 8 mg/L conduit à une amélioration alors que celui à 16 mg/L n'a pas d'effet notable sur la production. Ce n'est qu'à partir du 25^{ème} jour que les pourcentages de baisse se rapprochent et gardent un écart quasi-constant jusqu'à la fin de l'expérience. Quant aux tests à 80 mg/L et 160 mg/L, c'est plutôt au 25^{ème} jour qu'on note le plus grand écart, où celui à 80 mg/L affiche une baisse de volume de 20% alors que la baisse est de 46% pour 160 mg/L. A partir du 35^{ème} jour, les pourcentages de baisse sont similaires jusqu'à la fin de l'expérience.

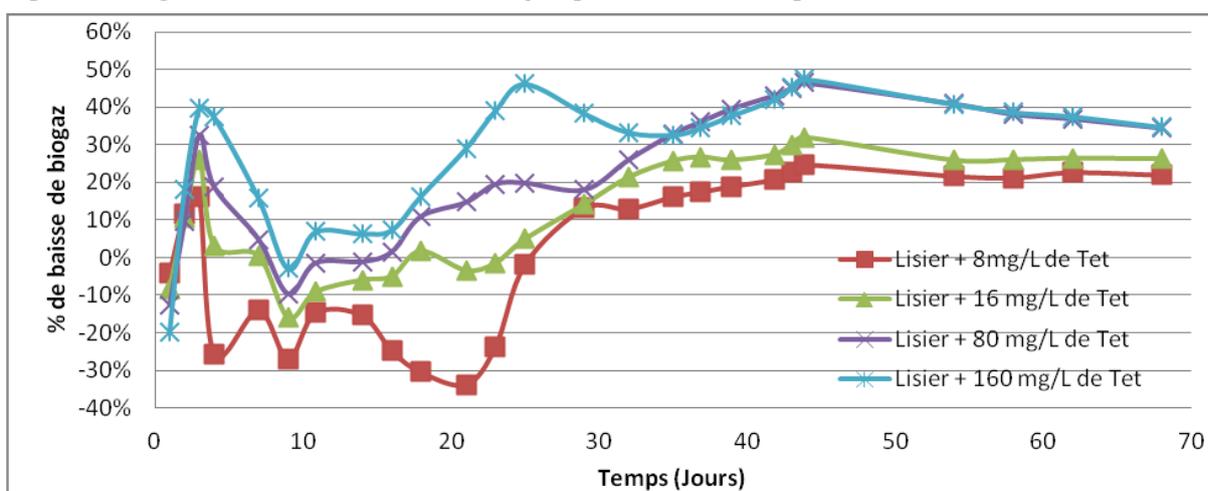


Figure IV.3 : Evolution du pourcentage de baisse de biogaz au cours du temps

Le tracé des temps nécessaires pour atteindre un volume donné (figure IV.4) met aussi en évidence les retards occasionnés par l'ajout de la tétracycline sur la production de biogaz.

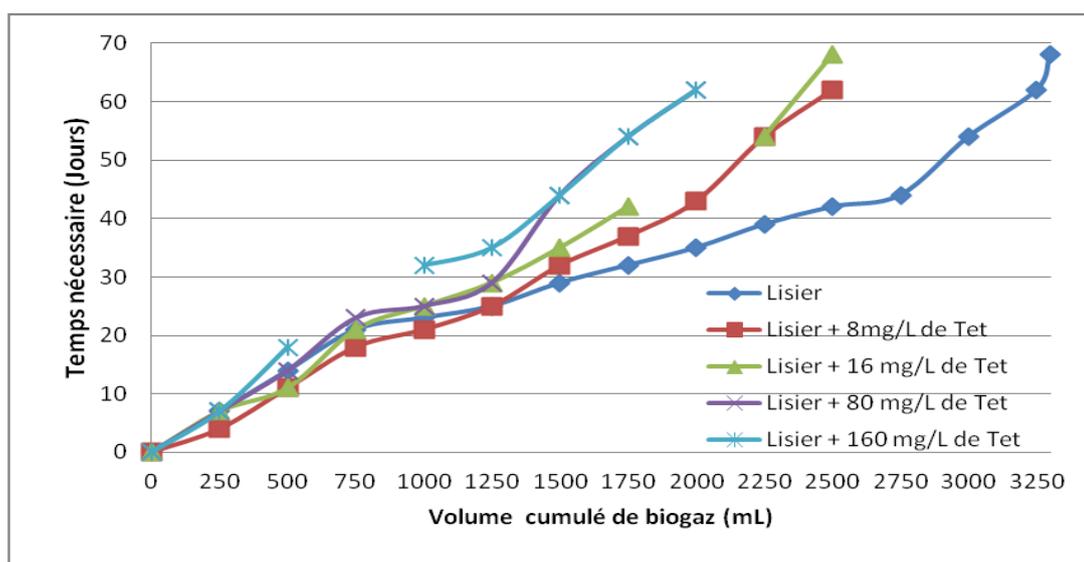


Figure IV.4 : Temps nécessaire pour atteindre une production cumulée de biogaz

Les tests à 8 mg/L et 16 mg/L présentent un avantage sur le témoin pour des productions cumulées de biogaz de 1000 mL et 750 mL respectivement. Au-delà, ces tests nécessitent plus de temps pour atteindre le volume produit par le témoin. L'écart augmente jusqu'à atteindre 20 jours supplémentaires nécessaires pour les tests à 8 et 16 mg/L pour produire 2500 mL. Les tests à 80 mg/L et 160 mg/L présentent un retard par rapport au témoin à partir de 750 mL et 500 mL respectivement. Le retard s'accroît jusqu'à atteindre 30 jours supplémentaires nécessaires à ces deux tests pour atteindre 2000 mL. Plus les concentrations sont élevées, plus les volumes produits sont faibles, et plus les temps de production sont ralentis.

IV.2.1.1.3. Evolution des teneurs en CH₄

La figure IV.5 présente l'évolution des teneurs en CH₄ dans le ciel gazeux des différents batch avec chaque concentration de tétracycline testée.

Tous les profils de teneur en méthane présentent une montée brusque dès les premiers jours, une descente brusque sur un jour, puis une remontée pour se stabiliser jusqu'en fin autour de 70%. On observe un saut de méthane au bout de 3 jours pour le témoin et le test à 8mg/L, et 4 jours pour les tests à 16, 80 et 160 mg/L. Les sauts brusques de méthane observés ponctuellement, par un passage de 40% à plus de 80%, ne s'inscrivent pas dans le profil d'évolution de la teneur en méthane dans le ciel gazeux. Ceci pourrait être dû à la présence d'un intermédiaire réactionnel ponctuel non pris en compte par le chromatogramme. Cependant les analyses sur les rendements de productions ne sont pas affectées car il faut remarquer qu'à ces moments là, la production de biogaz est encore très faible.

Le test à 8 mg/L présente un saut de méthane inférieur à celui du témoin d'environ 10%, mais reste supérieur à ce dernier tout le long de l'expérience. Les tests à 16 et 80 mg/L présentent des sauts de méthane plus importants que celui du témoin puis se stabilisent autour de valeurs proches de celles de ce dernier. Le test à 160 mg/L présente aussi un saut de méthane plus important que celui du lisier, mais se stabilise 6 jours après le témoin ; il présente en fin d'expérience plus de fluctuations autour des valeurs du témoin.

Les tests à 8 et 16 mg/L provoquent un stress qui affecte positivement le profil de méthane car ce dernier est globalement supérieur ou égal au profil du témoin. Le test à 80 mg/L présente un saut de méthane au début mais est majoritairement en dessous du profil du témoin. Le test à 160 mg/L est celui qui affiche l'effet défavorable le plus notable car on observe un retard de 6 jours dans la stabilisation de sa teneur en CH₄.

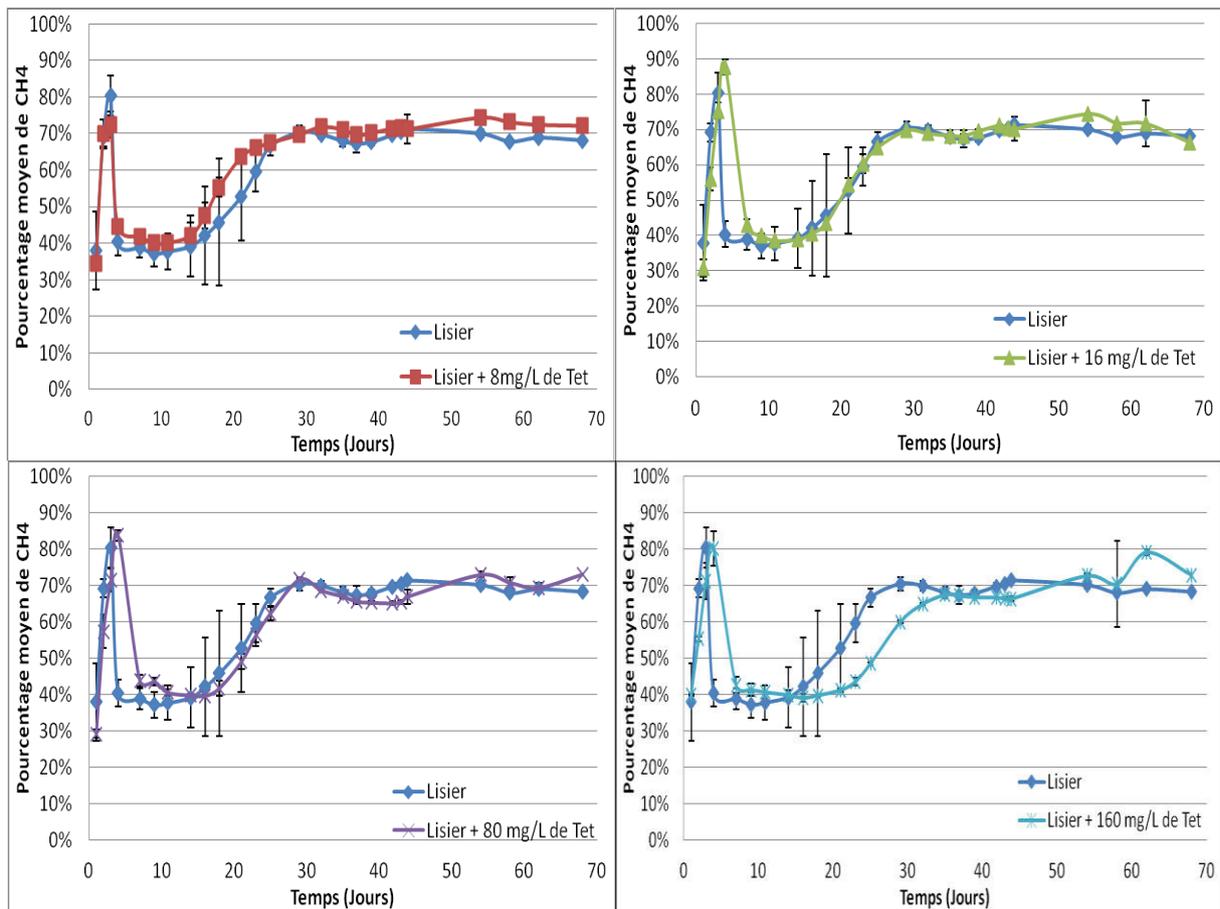


Figure IV.5 : Evolution des teneurs en CH₄ des tests batch avec la tétracycline (Tet)

Globalement, on voit que la courbe à 8 mg/L de tétracycline est en avance sur celle du témoin (lisier seul). En revanche, la courbe à 16 mg/L est similaire à celle du témoin. Celle à 80 mg/L prend un peu de retard, et celle à 160 mg/L prend beaucoup plus de retard (6 jours environs).

IV.2.1.1.4. Production de méthane

Le tableau IV.18 présente le volume moyen de méthane produit pour chaque concentration de tétracycline et les pourcentages de baisse en volume par rapport au témoin.

Tableau IV.18 : Volumes de méthane produits pour le test batch avec la tétracycline (Tet)

	Volume moyen de méthane (mL)	Ecart relatif sur les duplicats (%)	Baisse par rapport au lisier seul (%)	Part du méthane (%)
Lisier	2153±274	13	-	64
Lisier + 8mg/L de Tet	1660±123	7	23	63
Lisier + 16 mg/L de Tet	1555±78	5	28	63
Lisier + 80 mg/L de Tet	1364±187	14	37	62
Lisier + 160 mg/L de Tet	1340±3	0	38	61

L'écart relatif des duplicats du test témoin par rapport à la moyenne est de 13%. Les diminutions de volume qui sont de 23%, 28%, 37% et 38% pour les tests à 8, 16, 80, et 160 mg/L de

tétracycline respectivement, sont donc significatives. La perte volumique augmente avec les concentrations croissantes de tétracycline, mais pas proportionnellement. L'impact sur la production de méthane est quasi équivalent à celui sur la production de biogaz. Le doublement de la concentration de 8 à 16 mg/L induit une baisse supplémentaire de 5%, et seulement 1% de 80 à 160 mg/L. L'écart relatif sur les tests à 8 mg/L étant de 7%, la baisse supplémentaire de 5% pour le test à 16mg/L n'est pas significative. De manière analogue, l'écart relatif pour les duplicats du test à 80 mg/L étant de 14%, les tests à 80 et 160 mg/L ne présente pas de différence significative.

Le tracé de l'évolution du pourcentage de baisse de méthane en fonction des concentrations de tétracycline (figure IV.6) permet de retrouver la courbe de baisse de production mise en évidence dans le cas du biogaz, avec des baisses de méthane légèrement plus élevées que celles de biogaz. Pour toutes les concentrations, l'écart observé entre les pertes de méthane et de biogaz ne dépasse pas 3%.

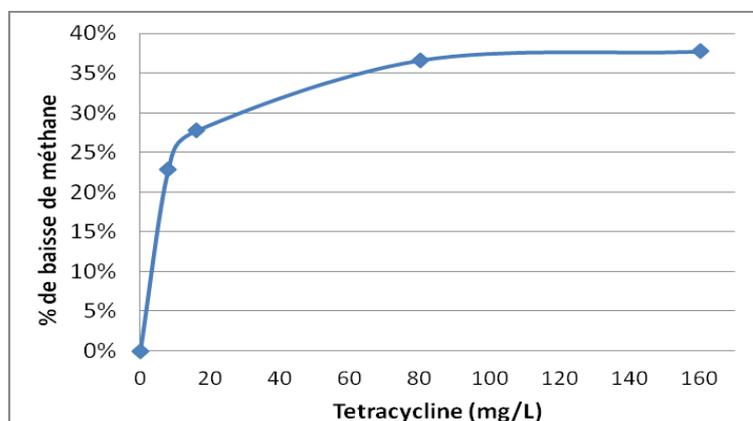


Figure IV.6 : Pourcentage de baisse de méthane en fonction de la concentration de tétracycline

Aux concentrations de 8 et 16 mg/L, on observe 23 – 28% de baisse, et aux concentrations de 80 et 160 mg/L, on observe 37 – 38% de baisse. Aux faibles concentrations (8 mg/L et 16 mg/L), la baisse croît très vite, puis évolue faiblement aux fortes concentrations (80 mg/L et 160 mg/L). En effet, l'augmentation de la concentration d'un facteur 10 ne rajoute que 10 – 14% de baisse supplémentaire, et diminue à mesure que les concentrations augmentent. Pour 10 mg/L, Loftin et al. (2005) observait 27% de baisse après 24 jours, ce qui est proche de nos observations pour 8 et 16 mg/L. Aux hautes concentrations (80 et 160 mg/L), les baisses constatées n'atteignent pas 50% comme ce fut le cas dans les expériences de Gartiser et al. (2007) pour 75 mg/L avec les boues digérées de station d'épuration. Cette différence pourrait être reliée à la nature de la population microbienne, plus adaptée à la tétracycline dans le cas de nos expériences, car la tétracycline est plus présente dans les lisiers que dans les effluents domestiques.

Le volume de méthane rapporté à la quantité de matière organique introduite permet d'évaluer le rendement de production de méthane qui s'élève à 259 L_{CH_4}/kg_{MO} pour le test témoin. Ce rendement se situe dans la gamme de rendement (210 – 260 L_{CH_4}/kg_{MO}) renseignée par la littérature (Lehtomäki et al., 2007 ; Holm-Nielsen et al., 2009) en digestion anaérobie de lisier bovin. Cependant, contrairement à ces expériences de la littérature où le rendement était atteint

au bout de 30 jours, ce n'est qu'au bout de 44 jours que nos tests témoins atteignent un rendement similaire. Ce retard serait occasionné par un démarrage plus long de la phase de production effective de gaz, au cours de laquelle la population microbienne s'acclime et se développe. Les rendements de production pour les tests contenant la tétracycline à 8, 16, 80 et 160 mg/L s'élèvent à 200, 187, 164 et 161 L_{CH₄}/kg_{MO} respectivement.

Par ailleurs, la proportion de méthane dans le biogaz produit subit une très faible influence de la part des concentrations de tétracycline testées. On observe par rapport au témoin une faible diminution de 1% pour les tests à 8 et 16 mg/L, et 2% et 3% pour les tests à 80, et 160 mg/L respectivement. La tétracycline, pour les concentrations testées, n'agit pas sur la qualité du procédé en termes de génération de méthane. L'effet est donc un ralentissement des réactions, ce qui confirme la fonction bactériostatique de la tétracycline.

Cette fonction bactériostatique est observable sur la figure IV.7 suivante qui montre le volume cumulé de méthane pour chaque concentration testée. Les profils montrent un fort ralentissement des réactions à divers niveaux.

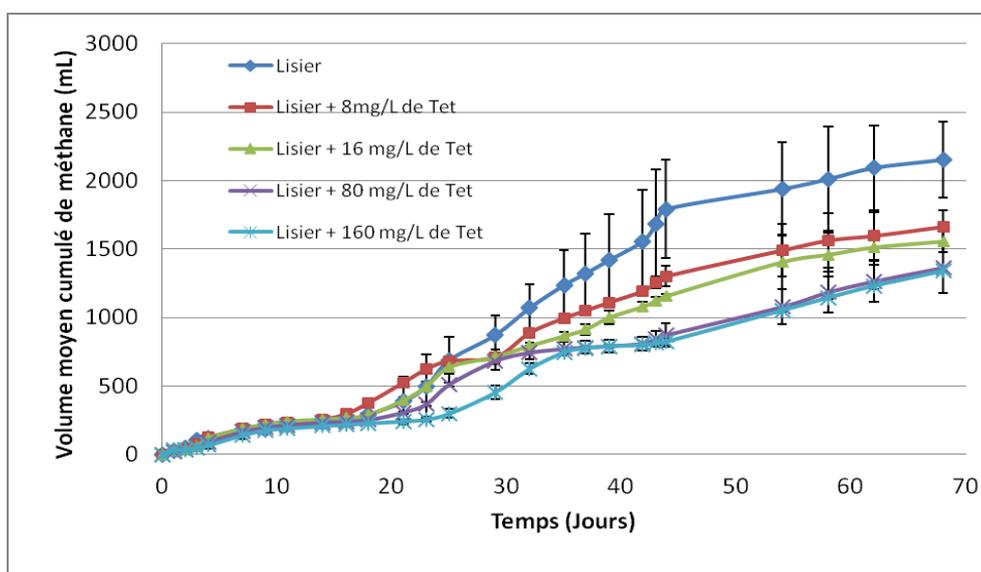


Figure IV.7 : Volume cumulé de méthane pour les tests batch avec la tétracycline (Tet)

La phase de production rapide de méthane du test à 8 mg/L de tétracycline démarre 3 jours avant celle du témoin mais présente par la suite un ralentissement du 25^{ème} au 29^{ème} jour qui affecte négativement sa production par rapport au témoin. Le test à 16 mg/L présente un ralentissement similaire à celui du test à 8 mg/L, mais sa phase de production rapide ne démarre pas avant celle du témoin. Même si ces deux tests présentent en fin d'expérience des pourcentages de baisse similaires, le test à 8 mg/L est le seul à induire un stress positif temporairement sur les réactions. A 80 mg/L, la tétracycline n'impacte toujours pas la phase de mise en place de la communauté microbienne représentée par le plateau qui va à 18 jours. Mais on note un démarrage moins important de la production rapide à partir du 21^{ème} jour qui est vite ralenti du 29^{ème} au 42^{ème} jour (13 jours de pseudo-palier). A 160 mg/L, la tétracycline affecte négativement la mise en place de la communauté microbienne en rallongeant le début de la production rapide de 7 jours. Par ailleurs, un fort ralentissement de la production est observé pendant 9 jours à partir du 35^{ème} jour.

Pour les concentrations de 80 et 160 mg/L aussi, les dynamiques sont différentes même si les pourcentages finaux de baisse de production sont identiques.

L'évolution du pourcentage de baisse au cours du temps (figure IV.8) montre que les tests présentant des pourcentages finaux identiques n'ont pas toujours eu le même comportement au cours du temps. Au 20^{ème} jour, un écart est observé entre les tests à 8 mg/L et 16 mg/L. Ce n'est qu'à partir du 25^{ème} jour que les pourcentages de baisse se rapprochent et gardent un écart quasi-constant jusqu'à la fin de l'expérience. Pour les tests à 80 mg/L et 160 mg/L, leur écart est observé au 25^{ème} jour, où celui à 80 mg/L affiche une baisse de volume de 25% alors que la baisse est de 56% pour 160 mg/L. A partir du 35^{ème} jour, leurs pourcentages de baisse sont similaires jusqu'à la fin de l'expérience.

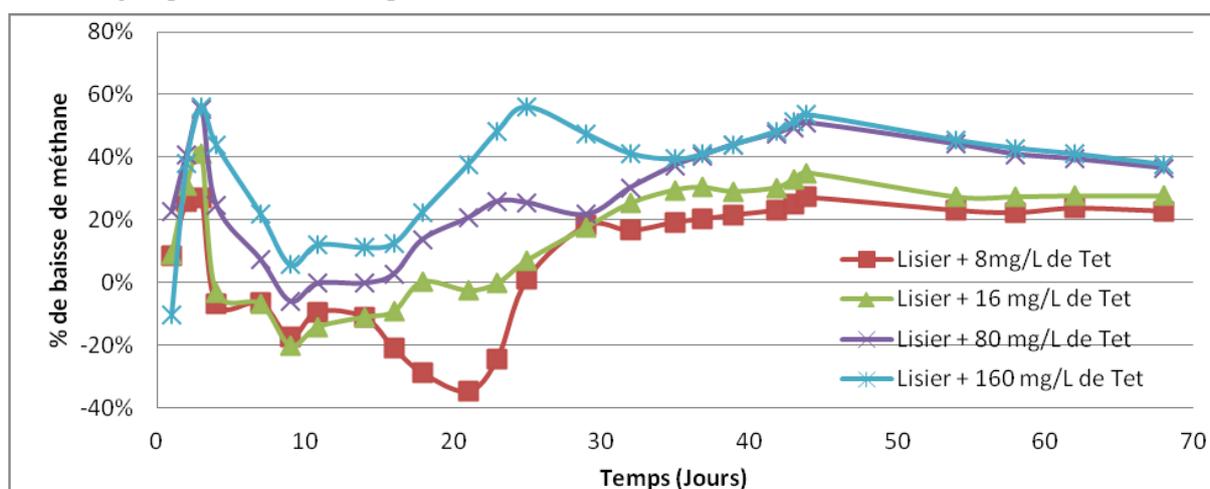


Figure IV.8 : Evolution du pourcentage de baisse de méthane au cours du temps avec la tétracycline

Le tracé des temps nécessaires pour atteindre un volume donné (figure IV.9) montre l'impact de la tétracycline sur les temps de production de méthane.

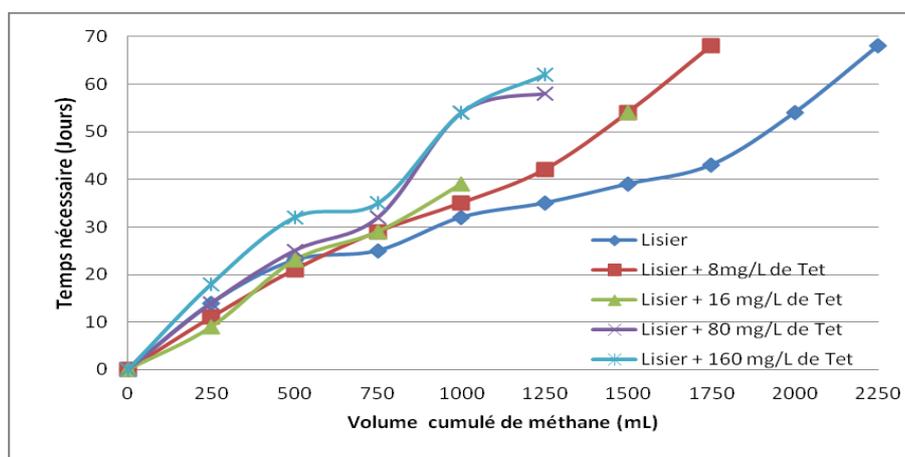


Figure IV.9 : temps nécessaire pour atteindre une production cumulée de méthane

Les test à 8 mg/L et 16 mg/L présentent un avantage sur le témoin jusqu'à une production cumulée de 500 mL. Au-delà, ces test nécessitent plus de temps pour atteindre le volume produit par le témoin. Il faut 25 jours supplémentaires au test à 8mg/L pour atteindre 1750 mL, et 15 jours supplémentaires aux tests à 8 mg/L et 16 mg/L pour atteindre 1500 mL. Le test à 80 mg/L présente un retard par rapport au témoin à partir de 500 mL, alors que celui à 160 mg/L présentait un retard depuis le début de l'expérience. Le retard croît jusqu'à atteindre 23 jours et 27 jours (pour 80 mg/L et 160 mg/L respectivement) de décalage pour atteindre 1250 mL. Plus les concentrations sont élevées, plus les retards de production sont élevés pour des volumes de plus en plus faibles.

IV.2.1.1.5. Vitesses de réaction et profils de baisse de production

La figure IV.10 présente les vitesses de production de méthane exprimées en $\text{m}^3_{\text{CH}_4}$ par jour et par m^3 de réacteur.

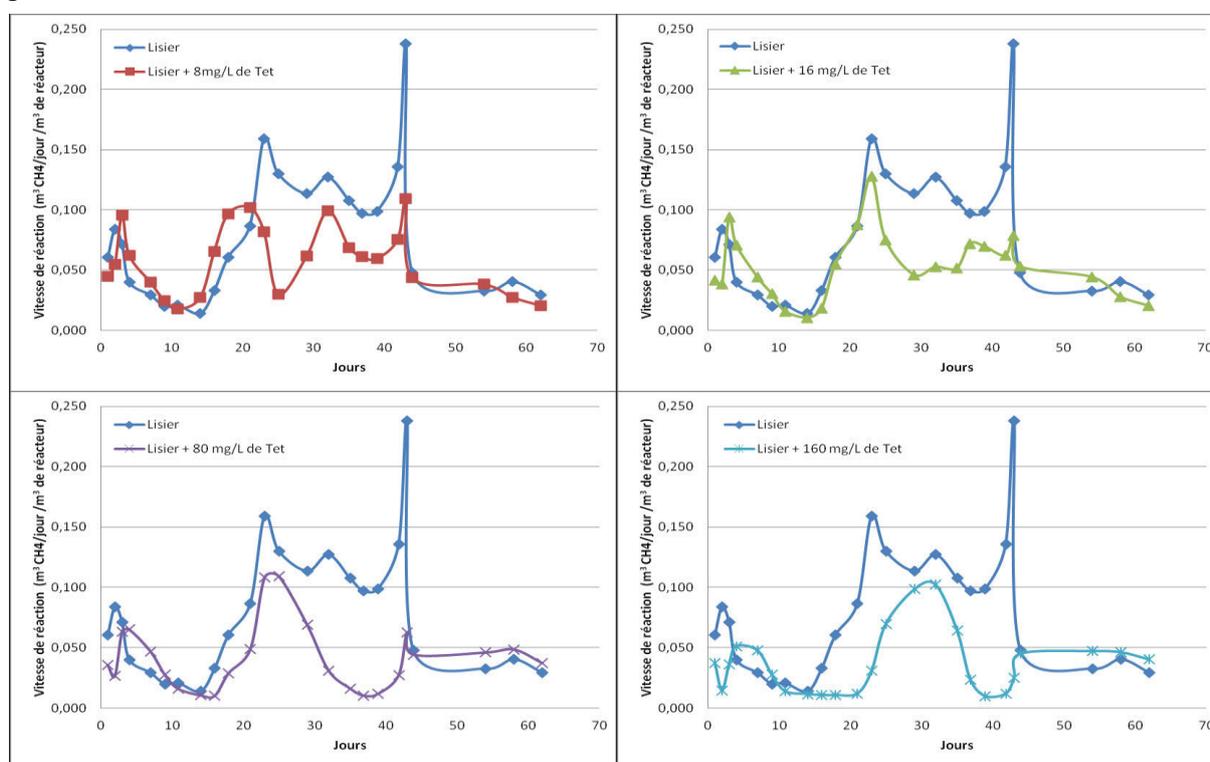


Figure IV.10 : Vitesses de production de méthane (en $\text{m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ de réacteur) des tests batch de tétracycline (Tet)

Cette figure permet d'observer que la production des tests contenant la tétracycline surpasse celle du témoin en début et en fin d'expérience. Dans la zone d'intérêt que constitue la phase de production rapide, les autres tests de tétracycline sont en deçà du témoin, hormis le test à 8 mg/L qui surpasse le témoin pendant les 10 premiers jours de cette phase. Le test témoin montre trois pics dans la phase de production, ce qui suppose qu'il y a eu trois réactions de génération de méthane. Le test à 8 mg/L présente aussi les trois pics, mais à de faibles intensités, avec le premier pic qui survient avant celui du témoin. A 16 mg/L, les pics sont toujours inférieurs au

témoin, mais le second pic de production est décalé vers la droite, et montre donc un retard dans la 2^{ème} réaction de production. A 80 mg/L et 160 mg/L, on n'observe plus que le premier et le troisième pic de production. On note aussi qu'à 160 mg/L, le premier pic de production est plus décalé sur la droite que dans le cas de 80 mg/L.

La figure IV.11 suivante affiche les pourcentages de baisse par rapport au témoin des différents tests de tétracycline à des dates comprises dans la période de production optimale allant de 18 à 44 jours. Les pourcentages à 18 et 21 jours suivent une tendance croissante avec l'augmentation des concentrations, avec la particularité qu'à ces dates pour le test à 8 mg/L, la vitesse de production de méthane est améliorée de 60% et 20% respectivement. A 37 jours, les pourcentages de baisse sont autour de 40% et 30% pour 8 et 16 mg/L, et 90% et 75% pour les tests à 80 mg/L et 160 mg/L. A 37 jours, les pourcentages de baisse sont autour de 40% et 30% pour 8 et 16 mg/L, et 90% et 75% pour les tests à 80 mg/L et 160 mg/L. A 43 jours, tous les pourcentages de baisse sont supérieurs à 50% et affichent une tendance croissante avec la concentration. On note aussi que pour chaque concentration, la baisse n'est pas évolutive au fil du temps.

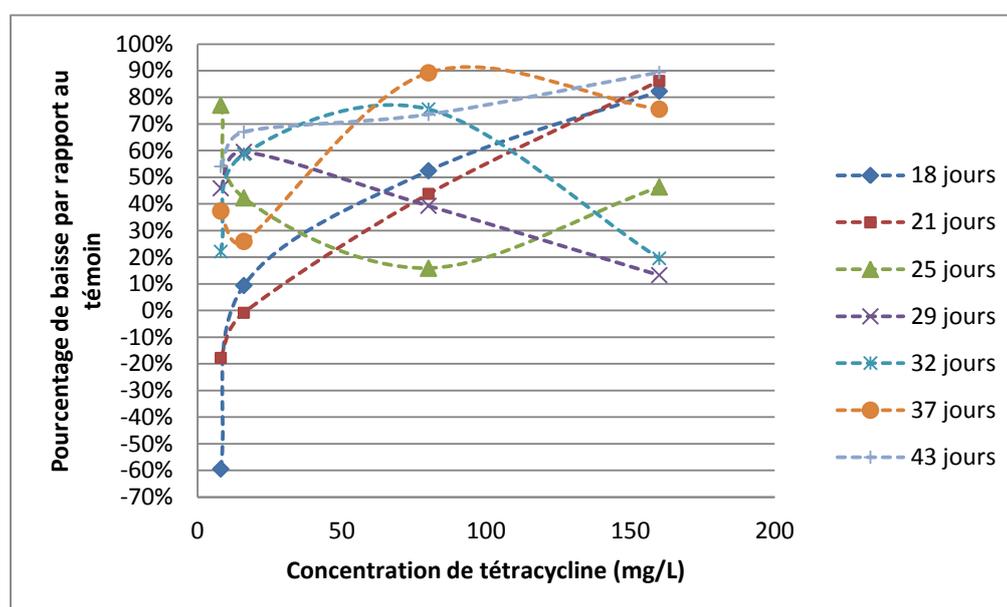


Figure IV.11 : Pourcentages de baisse au cours de l'expérience en fonction de la teneur en tétracycline

IV.2.1.2. Test en réacteur continu

Cette section présente l'étude de la tétracycline en réacteur continu (alimentation – soutirage) avec un temps de passage fixé à 24 jours. Différentes concentrations de tétracycline ont été testées successivement. Les concentrations testées vont de 0,2 mg/L à 2000 mg/L avec un facteur 10 à chaque fois dans le réacteur, et les effets de chaque concentration sont observés pendant la semaine. Le réacteur a été rempli de digestat jusqu'à 3 L, puis le volume a été renouvelé par soutirage de digestat et alimentation de lisier à raison de trois opérations par semaine. Lors de la première alimentation, la tétracycline est ajoutée au lisier d'alimentation dans une quantité

permettant d'atteindre dans le réacteur la concentration à tester. Pour les deux autres alimentations de la semaine, la tétracycline est rajoutée au lisier d'alimentation de sorte que ce dernier reste à la concentration testée. Au bout de 24 jours (temps de passage fixé), la tétracycline est ajoutée aux concentrations susmentionnées à une semaine d'intervalle. Les effets pour chaque concentration testée sont observés après incorporation de la tétracycline.

Le tableau IV.19 présente la caractérisation du lisier et du digestat utilisés.

Tableau IV.19 : Caractérisation du digestat et du lisier pour le test en continu de la tétracycline

	Matière sèche (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium ($\text{mg}_{\text{N-NH}_4^+/\text{g}}$ d'échantillon)	Ratio C/N
Digestat	6	73	1,22	15
Lisier	9	82	0,56	15

IV.2.1.2.1. Production de biogaz

Les figures IV.12 et IV.13 présentent respectivement la production de biogaz (exprimée en m^3 par jour et par m^3 de réacteur) et les pourcentages de baisse suite à l'ajout de la tétracycline, au cours de l'expérience. Les pourcentages de baisse sont calculés par rapport à la dernière vitesse de production (au jour 7) enregistrée avant l'ajout de la tétracycline.

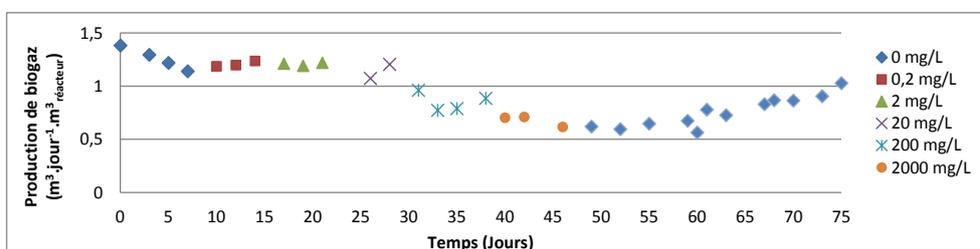


Figure IV. 12 : Production de biogaz pour le test en continu avec la tétracycline

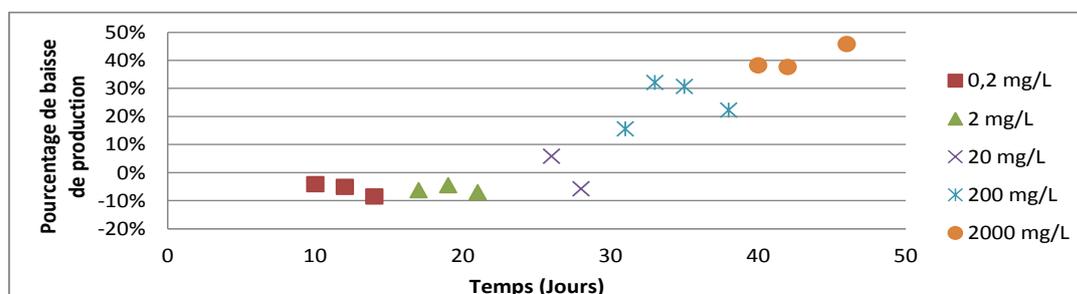


Figure IV. 13 : Baisse de la production de biogaz au cours du temps pour le test en continu avec la tétracycline

Avant l'ajout de la tétracycline à hauteur de 0,2 mg/L, la vitesse de production du biogaz était à $1,14 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$. A 3, 5 et 7 jours après l'ajout de la tétracycline, la vitesse passe à 1,19, 1,20 et 1,24 respectivement. On note donc une hausse de 4%, 5% et 9% à 3, 5 et 7 jours respectivement pour l'ajout de 0,2 mg/L de tétracycline. A 2 mg/L de tétracycline, on observe des vitesses de 1,21, 1,19 et 1,22 $\text{m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ de réacteur 3, 5 et 7 jours après l'ajout. Ce qui résulte en des augmentations de 6%, 5% et 7% respectivement. Par conséquent, les concentrations de 0,2 et 2 mg/L de tétracycline ont conduit à une agmentation de la production de biogaz allant de 4 – 9% sur une période d'une semaine pour chaque concentration. A 20 mg/L de tétracycline, la production baisse à 1,07 en 5 jours et augmente à 1,21 au 7^{ème} jour. La concentration de 20 mg/L a eu un impact négatif de 6% sur la production de biogaz au bout de 5 jours. Mais au 7^{ème} jour après l'ajout de la tétracycline, on note une amélioration de la production de 6%.

A 200 mg/L la production est de $0,96 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$, et baisse donc de 16% au 3^{ème} jour consécutif à l'ajout de tétracycline. Aux 5^{ème} et 7^{ème} jours après l'ajout, la baisse de production est de 32% et 31% respectivement ($0,77$ et $0,79 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$). Contrairement aux concentrations précédentes, la production est toujours impactée négativement au bout de 7 jours et même au-delà. En effet, l'impact est amoindri au 10^{ème} jour où la production passe à $0,89 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$, mais on note toujours une baisse production (22%). A 2000 mg/L de tétracycline, on note une baisse de production de 38% au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout. La baisse est toujours de 38% au 4^{ème} jour après l'ajout, et monte à 46% au 8^{ème} jour après l'ajout. Pour cette concentration aussi, l'impact négatif est observable au-delà de 7 jours.

A partir du 8^{ème} jour (jour 46) après l'ajout de tétracycline à 2000 mg/L, le digesteur est réalimenté avec du lisier provenant de la ferme sans ajout supplémentaire de tétracycline. La baisse de production est restée à 46% au jour 49, et augmente à 48% au jour 52. Ce n'est qu'à partir du jour 55, soit 17 jours après l'ajout de la tétracycline, qu'on note une diminution de la baisse de production. La production remonte ponctuellement à 50% au jour 60, redescend à 36% au jour 63, puis diminue progressivement jusqu'à atteindre 10% au jour 75. Sur la période de 37 jours consécutive à l'ajout de la tétracycline, alors que le digesteur est alimenté avec du lisier sans antibiotique les 29 derniers jours, le système n'a toujours pas récupéré.

Les pourcentages de baisse en fonction des concentrations de tétracycline (figure IV.14) montrent un effet non-linéaire qui va de 10% d'amélioration (pour 0,2 mg/L) à 46% de diminution (pour 2000 mg/L), pour notre période d'observation. De 20 mg/L à 2000 mg/L, l'effet négatif observé sur la production augmente avec les concentrations. Pour chacune de ces concentrations, l'écart entre les suivis (sur une même semaine) est d'environ 10%, montrant que le système récupère environ de 10% sur une période de 7 jours.

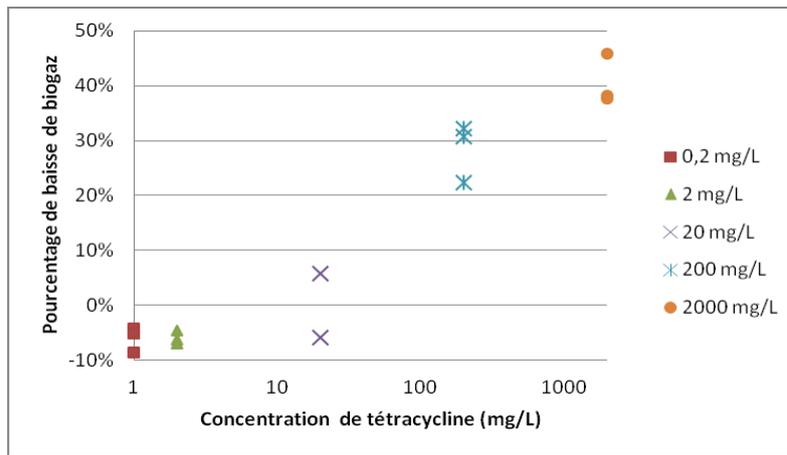


Figure IV.14 : Pourcentage de baisse en fonction des concentrations de tétracycline en réacteur continu

IV.2.1.2.2. Production de méthane

Les figures IV.15 et IV.16 présentent respectivement la production de méthane (exprimée en m^3 par jour et par m^3 de réacteur) et les pourcentages de baisse suite à l'ajout de la tétracycline, au cours de l'expérience. Les pourcentages de baisse sont calculés par rapport à la dernière vitesse de production (au jour 7) enregistrée avant l'ajout de la tétracycline.

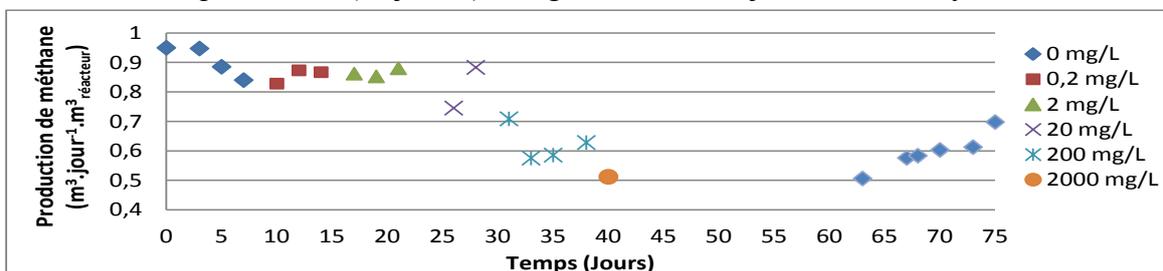


Figure IV.15 : Production de méthane pour le test continu avec la tétracycline

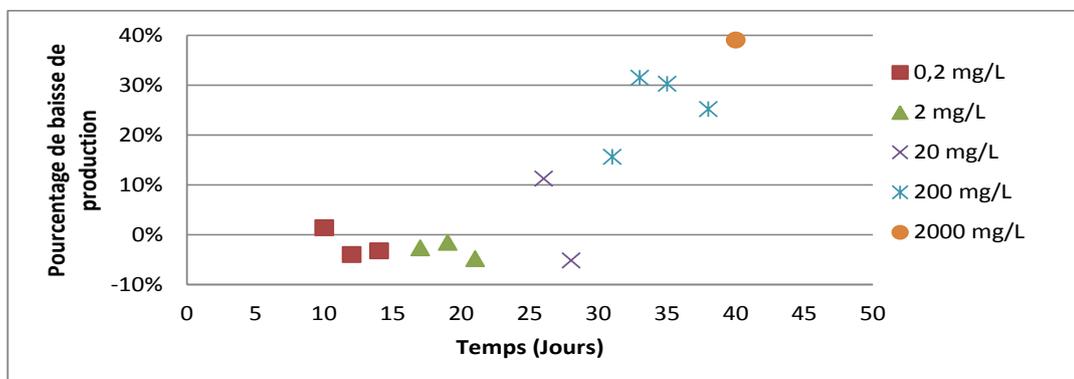


Figure IV. 16 : Baisse de la production de méthane au cours du temps pour le test en continu avec la tétracycline

Après le renouvellement du volume du réacteur sur le temps de passage de 24 jours, la vitesse de production du méthane était à $0,84 \text{ m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$. A 3, 5 et 7 jours après l'ajout de la tétracycline à hauteur de 2 mg/L, la vitesse passe à 0,83, 0,87 et 0,87 respectivement. On note ainsi une très faible baisse de 1% au bout de 3 jours, mais aux 5^{ème} et 7^{ème} jours la production de méthane est améliorée de 4%. A 2 mg/L de tétracycline, les vitesses de production sont de 0,86, 0,85 et 0,88 $\text{m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ de réacteur 3, 5 et 7 jours après l'ajout. La tétracycline favorise toujours la production de méthane avec un pourcentage d'amélioration qui va de 2% à 5%. A 20 mg/L de tétracycline, la production de méthane baisse à 0,75 en 5 jours et augmente à 0,88 au 7^{ème} jour. L'impact négatif de 11% sur la production de méthane au bout de 5 jours, ne dure pas jusqu'au 7^{ème} jour où on note une amélioration de la production de 5%.

A 200 mg/L de tétracycline, la production est de $0,71 \text{ m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ au 3^{ème} jour consécutif à l'ajout de tétracycline, ce qui correspond à une baisse de 16%. Aux 5^{ème} et 7^{ème} jours après l'ajout, la baisse de production est de 31% et 30% respectivement ($0,58$ et $0,59 \text{ m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$). Contrairement aux concentrations précédentes, la production est toujours impactée négativement au bout de 7 jours et au-delà. En effet, au 10^{ème} jour consécutif à l'ajout, on observe toujours une perte de production qui est réduite à 25%, où la production passe à $0,63 \text{ m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$. A 2000 mg/L de tétracycline, on note une baisse de production de 39% pour une vitesse de $0,51 \text{ m}^3_{\text{CH}_4}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout.

A partir du 8^{ème} jour (jour 46) après l'ajout de tétracycline à 2000 mg/L, le digesteur est réalimenté avec du lisier provenant de la ferme sans ajout supplémentaire de tétracycline. La baisse de production était de 40% au jour 63, 31% au jour 68, 27% au jour 73 puis atteint 17% au jour 75. Sur la période de 37 jours consécutive à l'ajout de la tétracycline à 2000 mg/L, alors que le digesteur est alimenté avec du lisier sans antibiotique les 29 derniers jours, le système n'a toujours pas récupéré.

En résumé, à 0,2 mg/L et 2 mg/L de tétracycline, la production de méthane n'est pas affectée négativement, mais est au contraire améliorée de 3% à 5% au bout de 7 jours. A 20 mg/L, la production est diminuée temporairement (au bout de 5 jours), mais le système récupère et affiche une amélioration de 5% au 7^{ème} jour consécutif à l'ajout de la tétracycline. La tétracycline a donc provoqué donc une diminution, mais qui est réversible. A 200 mg/L, on note une diminution de production qui s'accroît jusqu'au 5^{ème} jour consécutif à l'ajout et qui persiste jusqu'au 7^{ème} jour. Au 10^{ème} jour, le système n'a pas récupéré puisqu'une diminution et toujours notable. La concentration de 2000 mg/L provoque une forte baisse de 39% dès les premiers jours, dont l'irréversibilité est notable par la persistance de la diminution. Malgré l'arrêt d'ajout de tétracycline, une baisse de 27% est toujours observée 27 jours après. Au 29^{ème} la baisse observée n'est plus que de 17%.

A 0,2 mg/L et 2 mg/L, la tétracycline impacte plus la production de biogaz que celle de méthane. Pour ces concentrations où la production est améliorée sur 7 jours, les pourcentages d'amélioration du biogaz sont en tous points supérieurs à ceux du méthane. A 20 mg/L, la baisse temporaire est plus accentuée pour le méthane que pour le biogaz, même si les deux affichent au

7^{ème} jour des pourcentages d'amélioration similaires. A 200 mg/L, les pourcentages de baisse sont similaires pour le biogaz et le méthane, et même au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout de 2000 mg/L. Ce n'est que pendant la phase d'alimentation avec du lisier seul que le pourcentage de baisse du méthane redevient plus important que celui du biogaz.

L'effet de la tétracycline sur la baisse de production de méthane n'est pas linéaire (figure IV.17). De 2 mg/L à 2000 mg/L, l'effet négatif observé sur la production augmente avec les concentrations. Pour ces mêmes concentrations, l'écart entre le plus faible impact et le plus fort est de 10% environ, montrant que le système récupère de 10% environ sur une période de 7 jours.

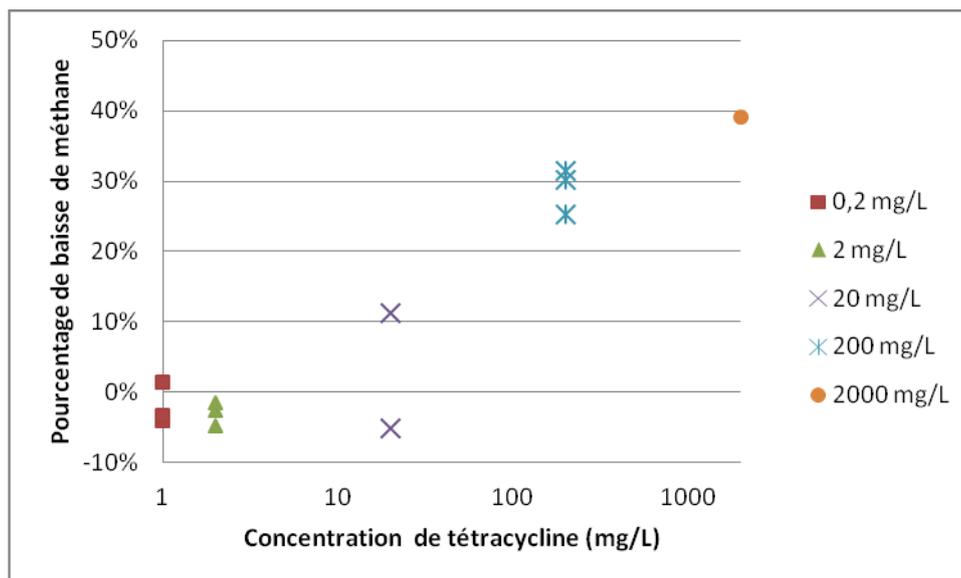


Figure IV.17 : Pourcentage de baisse en fonction des concentrations de tétracycline en réacteur continu

IV.2.2.3. Teneur en CH₄

La figure IV.18 présente l'évolution des teneurs en CH₄ au cours de l'expérience.

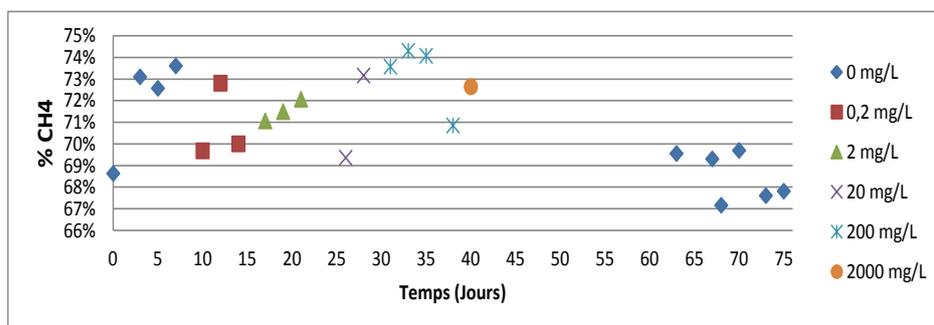


Figure IV.18 : Teneur en CH₄ au cours du temps pour le test en continu avec tétracycline

Avant l'ajout de la tétracycline la teneur en CH₄ oscillait entre 68% et 74%. A 0,2 mg/L de tétracycline, la teneur est de 70% après 7 jours. A 2 mg/L de tétracycline, la teneur en CH₄ est de

71% au 3^{ème} jour consécutif à l'ajout, et évolue pour atteindre 72% au 7^{ème} jour après l'ajout. La teneur en méthane rechute vers 69% au 5^{ème} jour après l'ajout de 20 mg/L de tétracycline, mais remonte à 73% au 7^{ème} jour. Les 7 premiers jours consécutifs à l'ajout de 200 mg/L de tétracycline, la teneur en méthane est comprise entre 73% et 75%. Ce n'est qu'au 10^{ème} jour que la teneur descend à 71%. Deux jours après l'ajout de 2000 mg/L de tétracycline, on note une légère augmentation qui passe la teneur à 73%. Alors que le réacteur est réalimenté avec du lisier sans ajout supplémentaire de tétracycline à partir du jour 46, on note que la teneur en méthane est comprise entre 67% et 70%.

Comparativement à la teneur en CH₄ en début d'expérience, l'ajout de 0,2 mg/L de tétracycline conduit à une faible diminution de l'ordre de 4% à 5%. Pendant la période d'augmentation récurrente de la concentration d'un facteur 10 entre 0,2 mg/L et 200 mg/L, le système tend à évoluer vers la teneur du début d'expérience. Mais pour la concentration à 200 mg/L, on note au 10^{ème} jour une baisse de la teneur en CH₄. Et en fin d'expérience, on remarque que la teneur en méthane ne rejoint plus sa valeur de début d'expérience.

IV.2.1.2.4. Evolution des paramètres du milieu

Lors de l'alimentation du réacteur, le digestat soutiré est analysé puis caractérisé suivant les paramètres physico-chimiques que sont : les matières sèches, la matière organique, le ratio C/N, l'azote ammoniacal, la conductivité et le pH.

La figure IV.19 présente successivement le taux de matières sèches, le taux de matière organique et le ratio C/N des digestats associés aux concentrations de tétracycline testées.

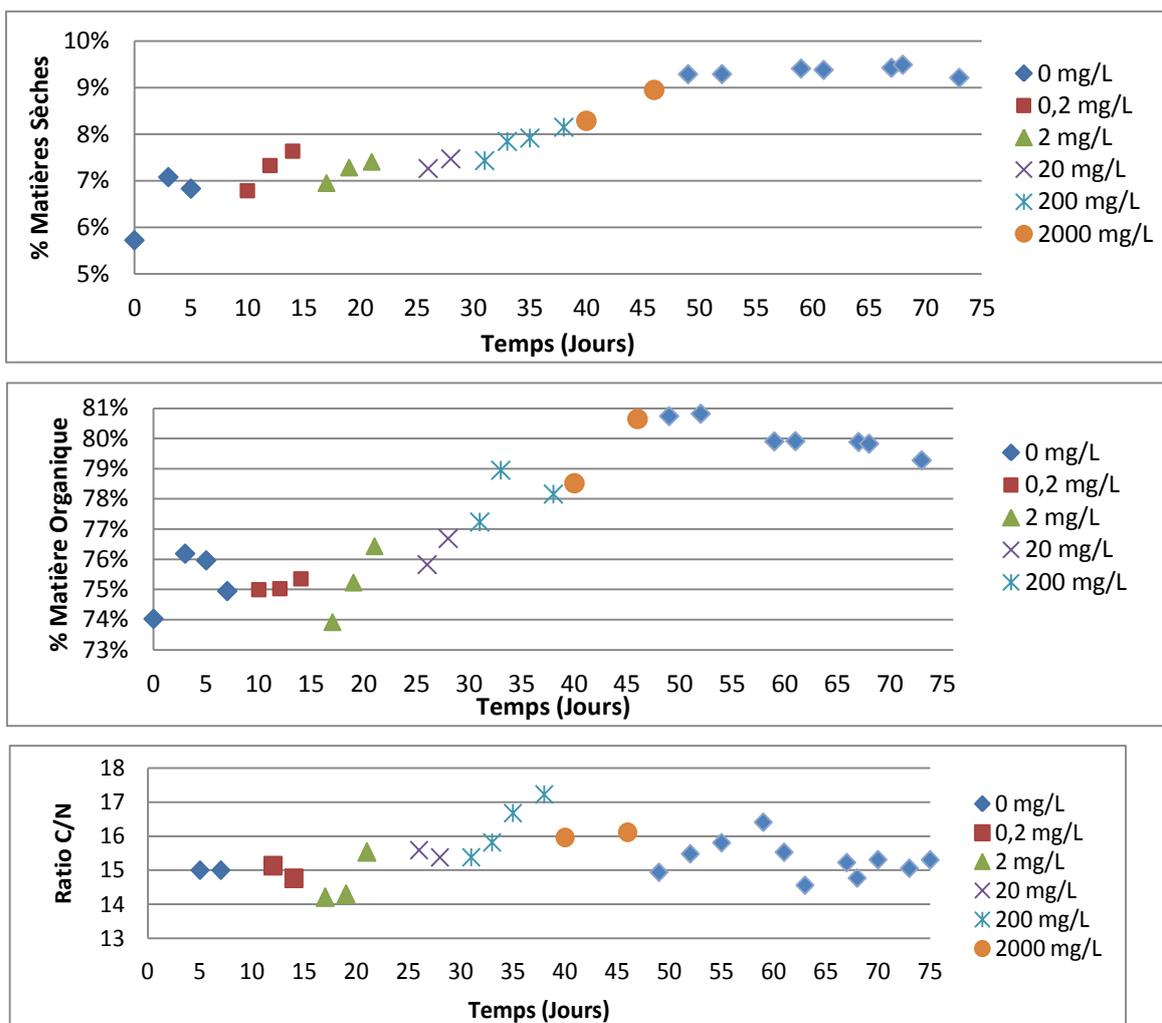


Figure IV.19 : Taux de matières sèches et matière organique, et ratio C/N pour le test en continu avec la tétracycline

Le pourcentage de matières sèches (MS) se situe autour de 7% en début d'expérience. A l'ajout de 0,2 mg/L le pourcentage de MS tend vers 8% au bout de 7 jours. 3 jours après l'ajout de 2 mg/L, le pourcentage de MS est proche de 7% et tend vers 8%. Il reste entre 7% et 8% pour 20 mg/L et les 7 premiers jours de l'ajout à 200 mg/L. A partir du 10^{ème} jour consécutif à l'ajout de 200 mg/L, le pourcentage de MS est supérieur à 8% et atteint 9% au 8^{ème} jour après l'ajout de 2000 mg/L. Malgré l'arrêt d'ajout de tétracycline à partir du jour 46, il reste entre 9% et 10% jusqu'au jour 75.

Le pourcentage de matière organique (MO) a une allure similaire à celle du pourcentage de MS. Il présente des variations faibles par rapport au début d'expérience pour les concentrations allant de 0,2 mg/L à 20 mg/L. On note une augmentation à partir de 200 mg/L, qui continue lors de l'ajout de 2000 mg/L. Même après ajout de lisier non additionné de tétracycline, le pourcentage de MO est resté entre 79% et 80% en fin d'expérience.

La littérature renseigne que le ratio C/N qui définit le rapport carbone-azote d'un substrat doit être compris entre 15 et 45 pour assurer une bonne digestion anaérobie (Atandi et al., 2012). Il

est de 15 en début de réaction, puis descend temporairement à 14 pendant les 5 premiers jours consécutifs à l'ajout de 2 mg/L. Il est compris entre 15 et 16 lors de l'ajout de 20 mg/L et les 5 premiers jours de l'ajout de 200 mg/L, puis est proche de 17 au 10^{ème} jour après l'ajout. A 2000 mg/L, le ratio est de 16, et se stabilise autour de 15 en fin d'expérience alors que la tétracycline n'est plus ajoutée.

La figure IV.20 montre qu'au cours de l'expérience, le pH est resté à des valeurs comprises entre 6,5 et 8,5, permettant ainsi le déroulement de la digestion anaérobie (Moletta, 2008). Après ajout de 0,2 mg/L, il a baissé de 8,0 à 7,7. Il augmente ensuite avec l'ajout des différentes concentrations de tétracycline, jusqu'à atteindre 8,2 lors de l'ajout de 200 mg/L. Il présente la même valeur 2 jours après l'ajout de 2000 mg/L mais descend ensuite à 7,6. Alors que la tétracycline n'est plus ajoutée au réacteur, le pH se stabilise entre 7,3 et 7,6 en fin d'expérience.

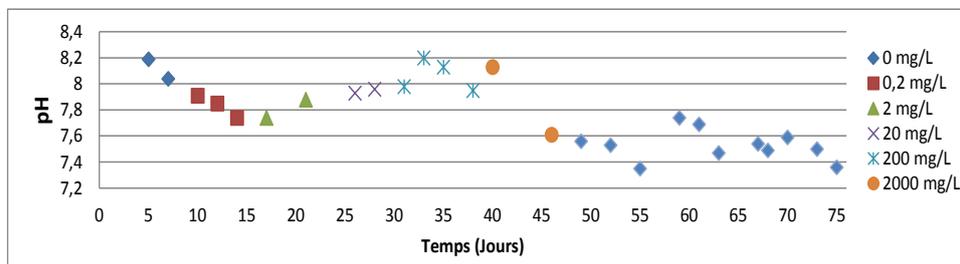


Figure IV.20 : Evolution du pH pour le test en continu avec la tétracycline

La figure IV.21 affiche l'évolution de l'azote ammoniacal et de la conductivité au cours de l'expérience.

La tétracycline à hauteur de 0,2 mg/L n'a pas d'effet sur le procédé dont la teneur en azote ammoniacal se situe entre 1300 mg/L et 1400 mg/L en début d'expérience. A 2 mg/L et 20 mg/L, cette teneur est entre 1400 mg/L et 1500 mg/L. Au 3^{ème} jour consécutif à l'ajout de 200 mg/L de tétracycline, la teneur en azote ammoniacal est de 1600 mg/L et surpasse ainsi la valeur inhibitrice de 1500 mg/L, mais redescend autour de 1400 mg/L aux 5^{ème} et 10^{ème} jours consécutifs à l'ajout. Elle reste autour de 1400 mg/L à l'ajout de 2000 mg/L, et varie entre 1100 mg/L et 1300 mg/L jusqu'au jour 69 alors que la tétracycline n'est plus ajoutée. Elle tend ensuite vers 1400 mg/L puis chute à 1000 mg/L en fin d'expérience.

La conductivité exprimée en $\mu\text{S}/\text{cm}$ se situe autour de 15 avant ajout de tétracycline. A 0,2 mg/L, elle augmente et tend vers 17. A 2 mg/L, elle atteint 21, puis chute à 10. De 20 mg/L à 200 mg/L, sa valeur se stabilise entre 14 et 16. Elle remonte à 18 au 8^{ème} jour consécutif à l'ajout de 2000 mg/L, et se situe entre 16 et 18 jusqu'en fin d'expérience.

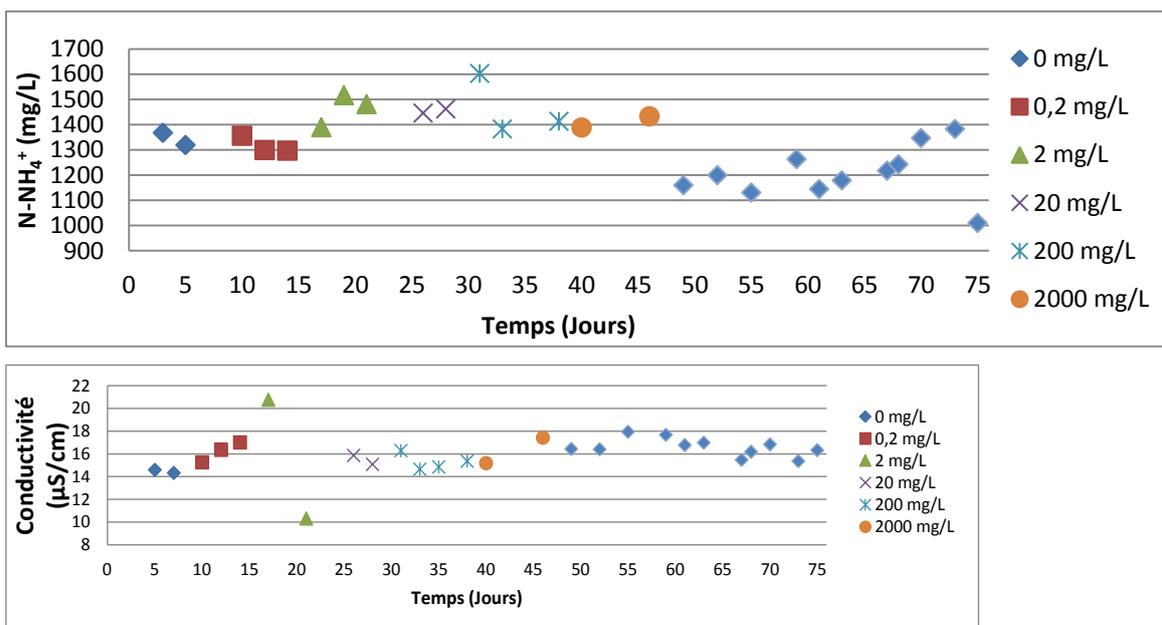


Figure IV.21 : Evolution de l'azote ammoniacal et de la conductivité au cours du test en continu avec la tétracycline

IV.2.1.2.5. Evolution des métaux lourds

Certains métaux sont indispensables en digestion anaérobie, mais à de faibles quantités pour des fonctions enzymatiques des microorganismes. A des teneurs élevées, ils peuvent inhiber, voire arrêter, la production de biogaz. Dans le but d'évaluer la qualité du digestat en sortie du réacteur, les métaux lourds ont été analysés puis comparés aux valeurs de la réglementation de l'épandage des boues (tableau IV.20). Les teneurs en métaux lourds sont consignées dans les figures IV.22 et IV.23.

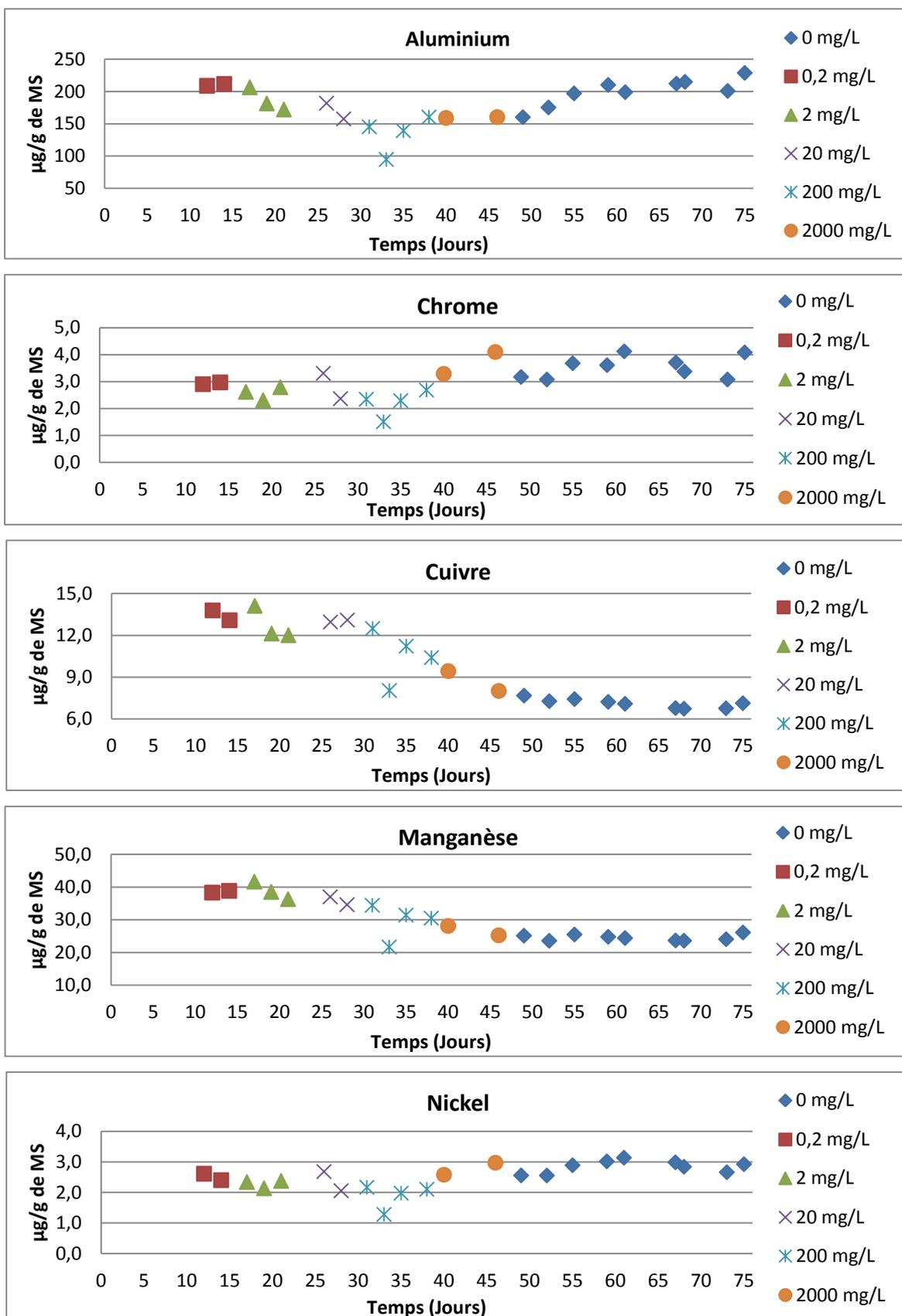


Figure IV.22 : Evolution des teneurs en aluminium, chrome, cuivre manganèse et nickel au cours du test en continu avec la tétracycline

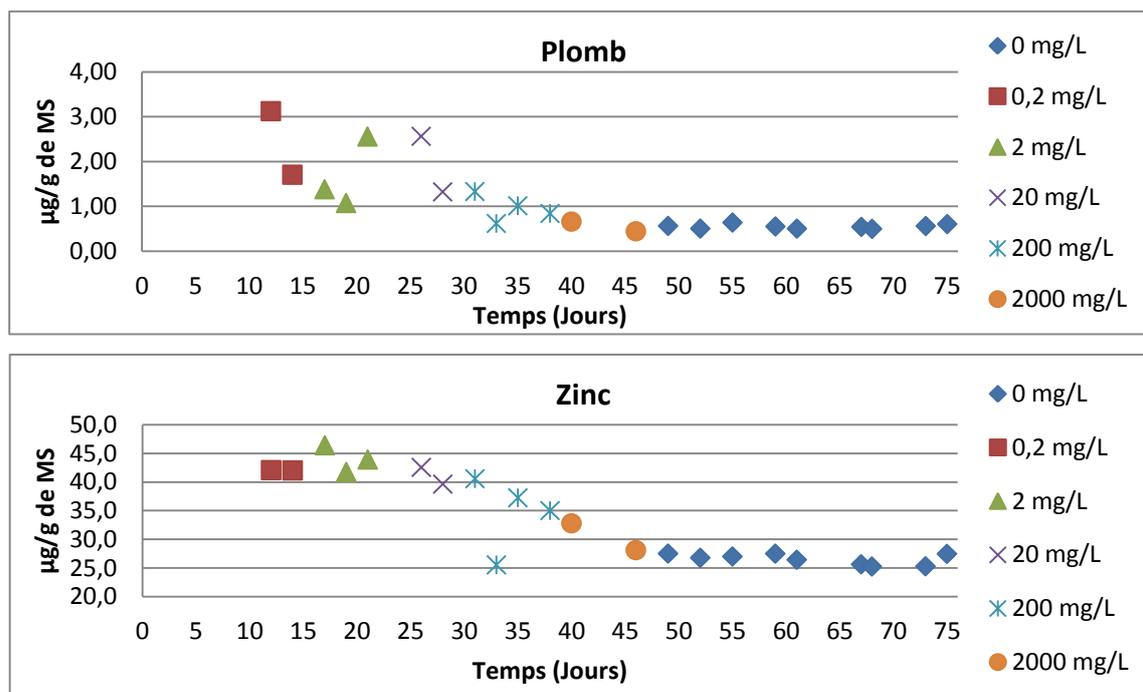


Figure IV.23 : Evolution des teneurs en plomb et zinc au cours du test en continu avec la tétracycline

Pour rappel, le tableau IV.20 présente les valeurs limites en métaux autorisées par la réglementation.

Tableau IV.20 : Valeurs limites des concentrations en métaux dans les amendements organiques (Norme NF U 44-051)

	Valeur limite NF U 44-041 (µg/g de MS)	NF U 44-051		
		Valeur limite (µg/g de MS)	Flux maximal par an (g/ha)	Flux maximal sur 10 ans (g/ha)
Arsenic	-	18	270	900
Cadmium	10	3	45	150
Chrome	1000	120	1800	6 000
Cuivre	1000	300	3000	10 000
Nickel	200	60	900	3 000
Plomb	800	180	2700	9 000
Zinc	3000	600	6000	30 000

Des métaux lourds analysés, l'arsenic et la cadmium n'ont pas été détectés et sont ainsi inférieures au ppb (ng/g de MS). On remarque cependant que l'aluminium, initialement à 200 µg/g de MS, baisse à partir de 2 mg/L de tétracycline, est stable à 2000 mg/L, puis remonte

lorsque la tétracycline n'est plus ajoutée pour stabiliser à nouveau autour de 200 mg/L. Quant au cuivre, au zinc et au manganèse, ils baissent progressivement à partir de 200 mg/L de tétracycline et ne remontent pas à la valeur initiale. Le plomb baisse aussi mais à partir de 20 mg/L. Par contre, le nickel ne présente pas de variation notable tout le long du procédé.

Deux types d'évolution sont observées pour les métaux lourds. L'aluminium, le chrome, le nickel baissent à partir de 20 mg/l de tétracycline, mais remontent en fin vers la valeur de début d'expérience. Le deuxième type d'évolution concerne le cuivre, le manganèse, le plomb et le zinc. Pour ces derniers, on note une baisse de concentration en métaux au fur et à mesure que les concentrations de tétracycline augmentent, et ils ne remontent pas à la valeur de début en fin d'expérience. La digestion anaérobie étant un processus de minéralisation, la variation des métaux lourds observée est inattendue. En effet, la méthode d'analyse quantifie les métaux totaux, et le lisier utilisé pour alimenter le réacteur est toujours le même. Le changement progressif de la concentration dans le digestat qui est de plus en plus faible, pourrait être relié à une masse solide dans le réacteur qui ne sort lors du soutirage, et qui est en équilibre avec le milieu.

Toutefois, les métaux lourds mesurés présentent des teneurs très inférieures aux valeurs de la réglementation. Le digestat résultant de l'expérience a donc une qualité sanitaire acceptable pour l'épandage agricole.

IV.2.1.3. Conclusion partielle

Les tests effectués en batch avec la tétracycline montrent qu'à concentrations égales, la production de méthane est plus affectée que celle de biogaz, mais l'impact sur les deux gaz ne présente pas de différence significative (<5%). Aux basses concentrations (8 et 16 mg/L), on note un impact similaire à celui observé dans la littérature qui s'élève à 22 – 26% de diminution de production de biogaz. En revanche, aux hautes concentrations (80 et 160 mg/L), la diminution de production de biogaz (34 – 35%) est moindre que celle observée dans la littérature (50%) pour des tests utilisant les boues de station d'épuration. Ceci pourrait être lié au fait que nous avons favorisé la mise en place d'un consortium microbien autochtone en n'ajoutant pas d'inoculum, et donc favorisé le développement de microorganismes probablement acclimatés à de faibles quantités de tétracycline. Il est à noter que même si chacune des gammes de concentration testées présente la même baisse finale, on note une différence dans l'évolution de la baisse au cours de l'expérience. Les profils cumulés montrent un retardement de la production effective de gaz qui augmente avec la concentration en tétracycline. Par ailleurs, les vitesses de production de méthane montrent que la baisse de production résulte de la diminution en intensité et du retardement dans le temps des phases réactionnelles. Le premier impact observé est la diminution de l'intensité des phases réactionnelles voire leurs disparitions avec l'augmentation des concentrations. Le second impact est observé à 160 mg/L de tétracycline où on note un retardement de la phase réactionnelle principale de production.

Les tests effectués en continu dans le but d'évaluer l'effet de l'ajout de la tétracycline ont montré qu'au bout de 7 jours, les concentrations de 0,2, 2 et 20 mg/L n'affectaient pas négativement la production de méthane. En revanche à 200 mg/L on note une baisse résiduelle de production de 30% au bout de 7 jours. La tétracycline à hauteur de 2000 mg/L impacte négativement la production aussi, et le système ne récupère pas, même après 29 jours d'incorporation de lisier sans antibiotique. Pour toutes les concentrations ayant affecté la production, le système récupère de 10% en moyenne sur la période d'observation de 7 jours. Les analyses en métaux lourds pour évaluer la qualité sanitaire du digestat affichent des teneurs en deçà des limites autorisées par la législation et n'auraient a priori aucun impact négatif sur la production de biogaz.

IV.2.2. Effet de la spiramycine sur le procédé

La spiramycine ($C_{43}H_{74}N_2O_{14}$) est un antibiotique un peu moins connu que la tétracycline, mais utilisée sur la ferme de la Bouzule. Ses effets sur la digestion anaérobie ont fait l'objet de peu d'étude. Dans cette section nous étudierons ses effets sur la digestion anaérobie du lisier bovin. Les concentrations testées représentent un compromis entre les quantités utilisées sur la ferme de la Bouzule (0,2 mg/L en 2010) et les concentrés testées dans la littérature (37 mg/L à 200 mg/L).

IV.2.2.1. Test en réacteur batch

Pour étudier l'effet de la spiramycine en réacteur fermé, les conditions opératoires ont été fixées pour assurer une digestion anaérobie optimale. Les effets sur le procédé pourront alors être associés à la présence de la spiramycine dans le milieu réactionnel. Les concentrations testées sont : 1,4, 14, et 140 mg/L.

IV.2.2.1.1. Caractérisation du substrat

Le lisier utilisé présente un taux de MS de 10%, une teneur en MO de 78% (tableau IV.21). De plus, son ratio C/N de 15 est à la limite des valeurs conseillées dans la littérature (entre 15 et 45) pour assurer un bon déroulement du procédé (Atandi et al., 2012). La teneur en ammonium du lisier de $0,63 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{g}$ d'échantillon conduit à une teneur en ammonium initiale dans les batches d'une valeur de $126 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{L}$ (tableau IV.22). Même si la teneur en ammonium augmentera au cours du temps puisque la digestion anaérobie en tant que processus de minéralisation de la matière organique transformera l'azote organique, cette valeur est largement inférieure aux teneurs inhibitrices de $1500 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{L}$ renseignées dans la littérature (Atandi et al., 2012). Au vu de ces paramètres, ce lisier est un substrat organique favorable pour la méthanisation.

Tableau IV.21 : Caractérisation des substrats (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)

	Matières sèches (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium initial (mg N-NH ₄ ⁺ /g d'échantillon)	Ratio C/N
Lisier	10	78	0,63	15

La composition des réacteurs consignée dans le tableau IV.22 montre les valeurs de pH en fin d'expérience. Les pH en fin d'expérience du test à 14 mg/L sont de 6,4 et 6,3, et ne sont pas compris dans la gamme optimale (6,5 – 8,5) et ceux du test à 140 mg/L sont proches de la valeur limite (Moletta, 2008). L'écart entre les valeurs de pH du témoin et les tests à 14 et 140 mg/L montrent que l'ajout de spiramycine a contribué à l'acidification du milieu, contrairement au test à 1,4 mg/L dont les pH n'ont pas diminué par rapport au témoin. Il faut noter que la spiramycine est légèrement basique (pKa=8). Elle n'acidifie donc pas le milieu, cependant son action sur les microorganismes entrainerait probablement une baisse du pH que nous n'observons pas avec les témoins.

Tableau IV.22 : Composition des batch, ammonium et pH en fin d'expérience

Batch en duplicat	Composition	Ammonium initial (mg N-NH ₄ ⁺ /L)	pH final
#1 et #2	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7	126	6,9 / 6,9
#3 et #4	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 1,4 mg/L de spiramycine	126	7,0 / 7,2
#5 et #6	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 14 mg/L de spiramycine	126	6,4 / 6,3
#7 et #8	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 140 mg/L de spiramycine	126	6,5 / 6,6

IV.2.2.1.2. Production de biogaz

Le tableau IV.23 présente le volume moyen de biogaz produit pour chaque concentration testée et les pourcentages de baisse de volume produit par rapport au témoin. L'écart relatif des témoins par rapport à leur moyenne est de 1%. Les baisses de volume pour les tests de spiramycine seront alors significatives pour des pourcentages supérieurs à cet écart de 1%.

Tableau IV.23 : Volume de biogaz produit pour le test batch avec la spiramycine (Spi)

	Volume moyen de biogaz (mL)	Ecart relatif sur les duplicats (%)	Baisse par rapport au lisier seul (%)
Lisier	4146±34	1	-
Lisier + 1,4 mg/L de Spi	3972±34	1	4
Lisier + 14 mg/L de Spi	2568±93	4	38
Lisier + 140 mg/L de Spi	2671±115	4	36

Les tests contenant 1,4, 14 et 140 mg/L de spiramycine affichent des pertes volumiques de 4%, 38% et 36 % respectivement. L'augmentation de la concentration d'un facteur 10 (de 1,4 à 14 mg/L) induit une baisse supplémentaire de 34%, alors que ce même facteur (de 14 à 140 mg/L) induit une hausse supplémentaire de 2%. L'écart relatif sur les tests à 14 mg/L étant de 4%, la différence de 2% entre les tests à 14 mg/L et 140 mg/L n'est pas significative. Il en résulte que ces deux dernières concentrations mettent en évidence un palier où la baisse est de 36 – 38%. Ce pseudo-palier est observable sur la figure IV.24 qui montre que la baisse n'évolue pas linéairement pour toutes les concentrations de spiramycine testées. Cependant sur la portion allant de 0 à 14 mg/L, la baisse de production obéit à une loi linéaire.

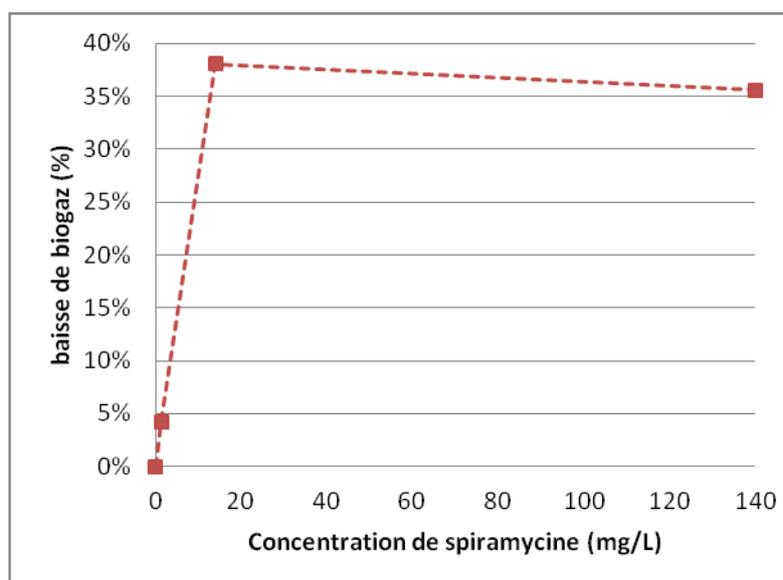


Figure IV.24 : Evolution du pourcentage de baisse du biogaz en fonction de la concentration de spiramycine

Le profil de production du biogaz (figure IV.25) montre trois phases à savoir : la mise en place de la population microbienne, la production rapide, et une phase stationnaire qui marque l'arrêt de la production.

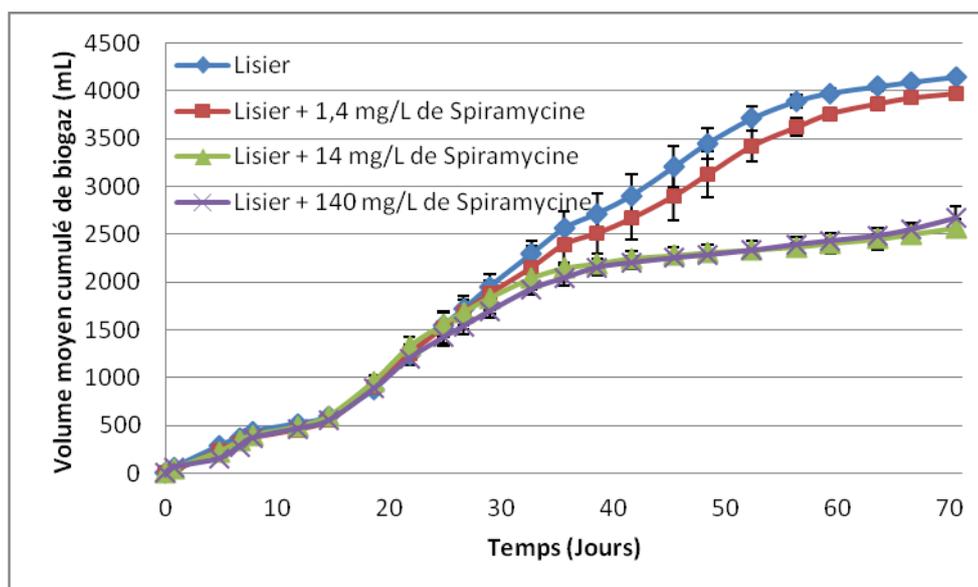


Figure IV.25 : Volume moyen cumulé de biogaz pour les tests batch avec la spiramycine

Tous les profils se ressemblent globalement jusqu'au 20^{ème} jour. Lors de la phase de mise en place de la population microbienne qui couvre les 15 premiers jours, les tests à 1,4 et 14 mg/L présentent le même profil que le témoin tout en étant légèrement inférieur à ce dernier. Le test à 140 mg/L présente un ralentissement entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour et ne rattrape le profil des autres teneurs de spiramycine qu'au 8^{ème} jour. Le test à 14 mg/L connaît un ralentissement à partir du 27^{ème} jour où il est inférieur au témoin et au test à 1,4 mg/L, et passe en dessous du test à 140 mg/L à partir du 52^{ème} jour. La production rapide des tests à 1,4 et 140 mg/L démarre en même temps que celle du témoin après le 19^{ème} jour, mais elle ralentit à partir du 27^{ème} jour pour 1,4 mg/L et du 22^{ème} jour pour 140 mg/L.

A 14 mg/L, la spiramycine a résulté en un démarrage de la production rapide un peu plus rapide que celle du témoin, qui pourrait être attribué à un stress bactérien. Ce stress n'aurait pas constitué un avantage pour la production puisqu'un ralentissement est observé par la suite. Les tests à 14 et 140 mg/L affichent un fort ralentissement visible jusqu'à la fin de l'expérience. Ces résultats sont en adéquation avec le caractère bactériostatique à faible concentration et bactéricide à forte concentration des macrolides, et donc de la spiramycine (Zhu et al., 2014). On note qu'en fin d'expérience, la production semble redémarrer pour les tests à 14 et 140 mg/L. C'est un scénario envisageable puisqu'il a été observé que 200 mg/L de spiramycine avaient pu être dégradés en 32 jours. (Zhu et al., 2014).

L'évolution du pourcentage de baisse au cours de l'expérience (figure IV.26) montre que tous les tests tendent vers une amélioration de la production de 10% environ vers le 20^{ème} jour. C'est après cette date que les tests affichent un ralentissement qui augmente jusqu'à se stabiliser autour de 10% à partir du 38^{ème} jour pour le test à 1,4 mg/L. Quant aux tests à 14 et 140 mg/L, ils évoluent pareillement et se stabilisent à partir du 52^{ème} jour autour de 38%.

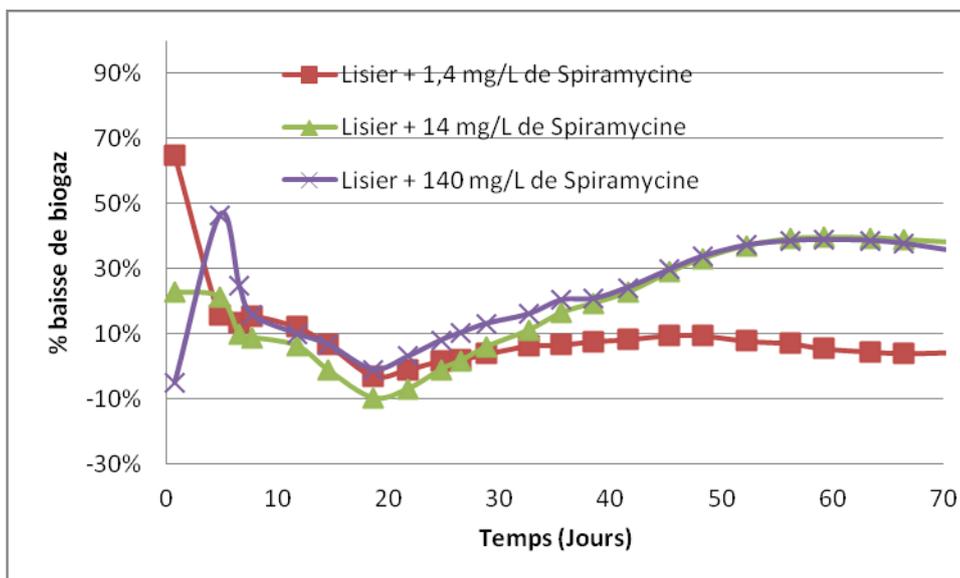


Figure IV.26 : Evolution du pourcentage de baisse de biogaz au cours du temps pour le test avec la spiramycine

La figure IV.27 montre les décalages observés dans la production de biogaz en présence de spiramycine.

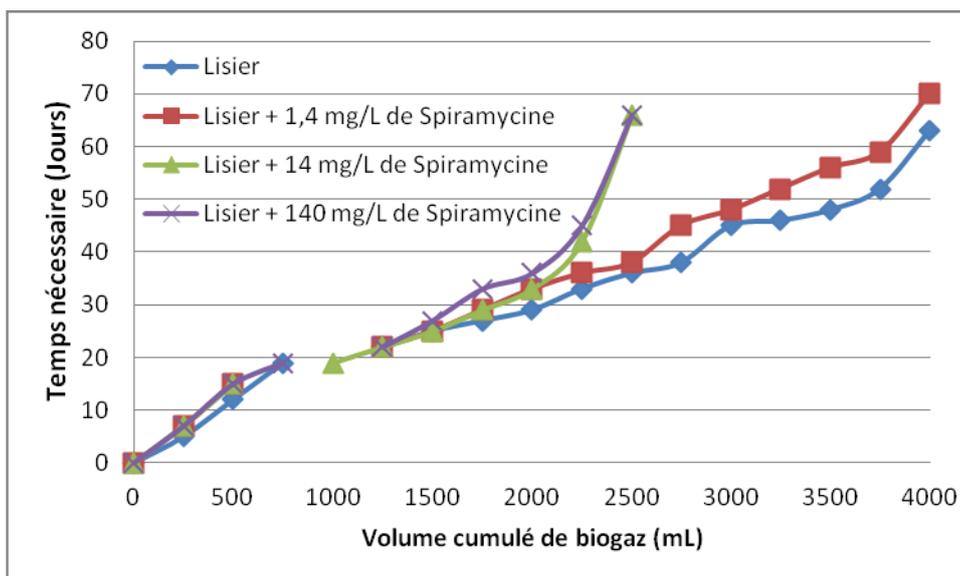


Figure IV.27 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de biogaz pour le test avec la spiramycine

L'ajout de 1,4 mg/L entraîne un léger effet retardateur sur la production de biogaz par rapport au témoin, avec un écart de 7 jours environ tout au long de l'expérience. Mais pour les tests à 14 mg/L et 140 mg/L, le retard maximal est de 7 jours aussi jusqu'à la production de 2000 mL. L'écart s'amplifie à partir de 2250 mL de biogaz produit, et pour 2500 mL de biogaz on note un écart par rapport au témoin de 28 jours. La différence entre les effets des concentrations de spiramycine se font sentir à partir de 2250 mL de biogaz produit, soit à partir du 33^{ème} jour.

IV.2.2.1.3. Evolution des teneurs en CH₄

La figure IV.28 présente l'évolution des teneurs en CH₄ du ciel gazeux du témoin avec chaque concentration de spiramycine testée. Tous les profils de teneur en méthane présentent une montée brusque dès les 5 premiers jours, une faible diminution, puis une remontée dès le 15^{ème} jour pour se stabiliser à partir du 22^{ème} jour entre 65% et 74%.

La spiramycine à 1,4 mg/L impacte négativement, mais faiblement, la réaction pendant la phase d'acclimatation des microorganismes. A partir de la phase de production, sa teneur en méthane est similaire à celle du témoin. Quant au test à 14 mg/L de spiramycine, un impact positif est observable pendant les 15 jours de la phase d'acclimatation, et au-delà jusqu'au 22^{ème} jour. La teneur en méthane pour le reste de l'expérience reste proche de celle du témoin. Le test à 140 mg/L impacte plus fortement encore la phase d'acclimatation où il surpasse le témoin de 10% jusqu'au 15^{ème} jour, pour ensuite être rattrapé au 22^{ème} jour. Même si sa teneur reste globalement proche de celle du témoin, elle diminue de 7% entre le 36^{ème} et le 42^{ème} jour, pour remonter en fin d'expérience.

Il en résulte que l'effet de la spiramycine sur la teneur en méthane est plus notable lors de la phase d'acclimatation. La baisse de volume observée serait donc d'ordre quantitatif. En effet les microorganismes continuant de produire le méthane dans les mêmes proportions, toutes les réactions sont ralenties plus ou moins dans les mêmes proportions.

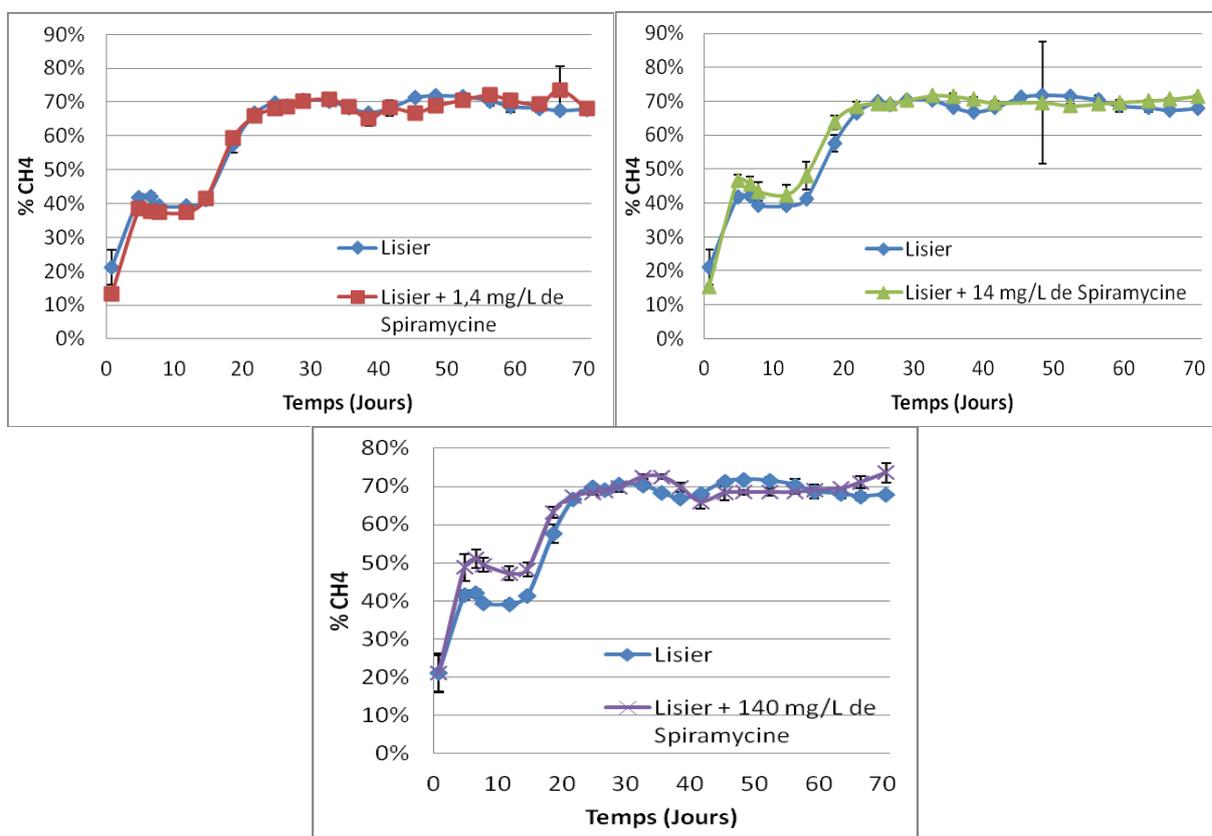


Figure IV.28 :Teneur en méthane des tests batch avec la spiramycine

IV.2.2.1.4. Production de méthane

Le tableau IV.24 présente le volume moyen de méthane produit pour chaque concentration de spiramycine et les pourcentages de baisse en volume par rapport au témoin.

Tableau IV.24 : Volume moyen de méthane pour les tests batch avec la spiramycine (Spi)

	Volume moyen de méthane (mL)	Ecart relatif sur les duplicats (%)	Baisse (%)	Part du méthane (%)
Lisier	2668±13	0		64
Lisier + 1,4 mg/L de Spi	2532±32	1	5	64
Lisier + 14 mg/L de Spi	1610±74	5	40	63
Lisier + 140 mg/L de Spi	1710±76	4	36	64

L'écart relatif sur les duplicats du test témoin par rapport à leur moyenne est quasi nul. Les baisses de volume de méthane de 5%, 40% et 36% pour les tests à 1,4, 14, et 140 mg/L de spiramycine respectivement, sont donc significatives. Cependant, l'écart relatif observé pour le test à 14 mg/L étant de 5%, la différence de 4% entre les baisses des tests à 14 et 140 mg/L n'est pas significative. L'impact sur la production de méthane est similaire à celui sur la production de biogaz, les pourcentages de baisses étant similaires. Aussi, la part de méthane dans le biogaz est quasi identique pour les réacteurs considérés.

L'évolution du pourcentage de baisse de méthane en fin d'expérience en fonction de la présence de spiramycine n'est pas linéaire sur l'ensemble des concentrations testées. Cependant, tout comme dans le cas du biogaz, la baisse de production est linéaire sur la plage allant de 0 à 14 mg/L. Dans cette plage, elle croît rapidement puis on observe un ralentissement qui donne lieu à un pseudo-palier entre 14 mg/L et 140 mg/L.

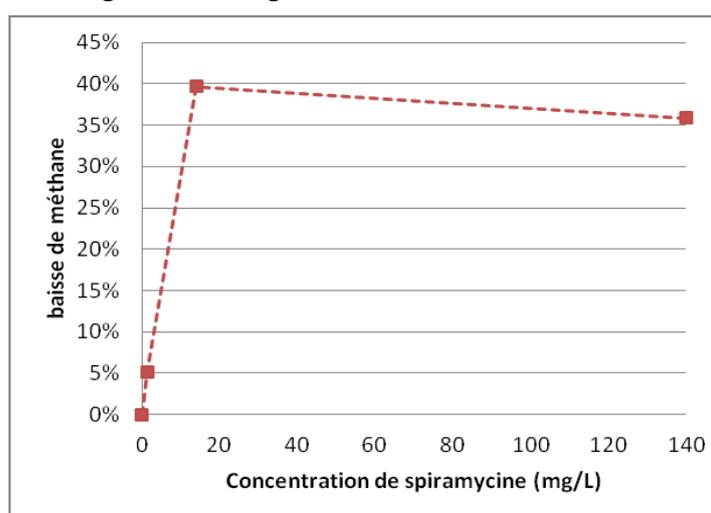


Figure IV.29 : Evolution du pourcentage de baisse de méthane en fonction de la concentration de spiramycine

L'effet de la spiramycine au cours du temps est observable sur la figure IV.30 qui montre le volume cumulé de méthane pour chaque concentration testée. Tout comme dans le cas du biogaz, le test à 140 mg/L est le seul à afficher un petit ralentissement au bout de 5 jours de réaction. Le test à 14 mg/L est le premier à montrer une phase de production rapide, mais ralentit dès le 29^{ème} jour et passe bien en deçà du témoin. La production rapide du test à 1,4 mg/L est identique à celle du témoin jusqu'au 27^{ème} jour où un ralentissement est observable. A partir du 45^{ème} jour, son profil est à nouveau identique à celui du témoin. Le ralentissement momentané occasionné par la spiramycine est attribuable à sa fonction bactériostatique pour les faibles concentrations.

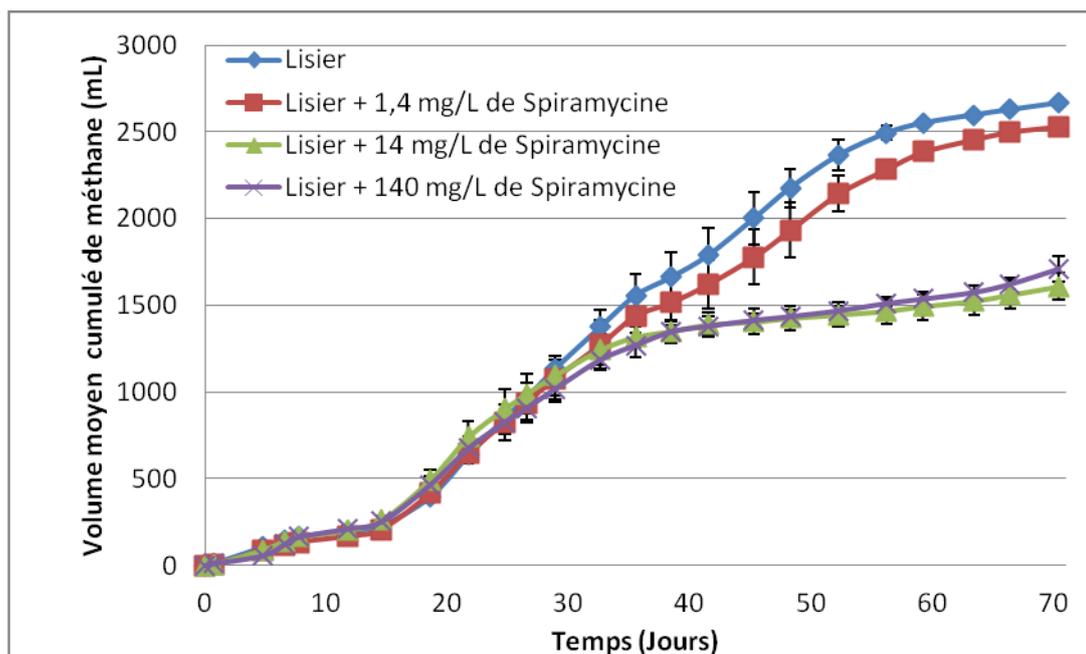


Figure IV.30 : Volume moyen cumulé de méthane pour les tests batch avec la spiramycine

Quant aux tests à 14 et 140 mg/L, leur ralentissement est observable à partir du 29^{ème} jour, et leur profil devient presque stationnaire à partir du 33^{ème} jour. Cependant, les profils de ces deux tests remontent en fin d'expérience et tendent vers le profil de la phase stationnaire du témoin. Les concentrations testées pour la spiramycine permettent de mettre en évidence son effet bactériostatique (ralentissement temporaire de réaction) et son effet bactéricide (fort ralentissement de réaction et redémarrage lent en fonction de la vitesse de repopulation). A 1,4 mg/L où la baisse de production est de 5%, on observe un ralentissement temporaire des réactions typique de l'effet bactériostatique. Pour les concentrations de 14 et 140 mg/L qui ont montré une baisse de 36 – 40%, on observe un ralentissement brusque et un fort ralentissement de la production, typique de l'effet bactéricide. Le léger redémarrage observé en fin de réaction pourrait être associé à un recolonisation du milieu réactionnel.

L'évolution des pourcentages de baisse de méthane au cours du temps (figure IV.31) montre que l'ajout de la spiramycine améliore la production de méthane les 20 premiers jours de 5%, 24% et 17% respectivement pour les tests à 1,4, 14 et 140 mg/L. la tendance s'inverse par la suite avec une augmentation de la baisse de production. Le test à 1,4 mg/L atteint un palier de 10% à partir

du 33^{ème} jour, alors que les autres tests atteignent le même palier de 38% environ à partir du 52^{ème} jour. Les concentrations de 14 et 140 mg/L ont donc intensifié et prolongé la baisse de production de méthane.

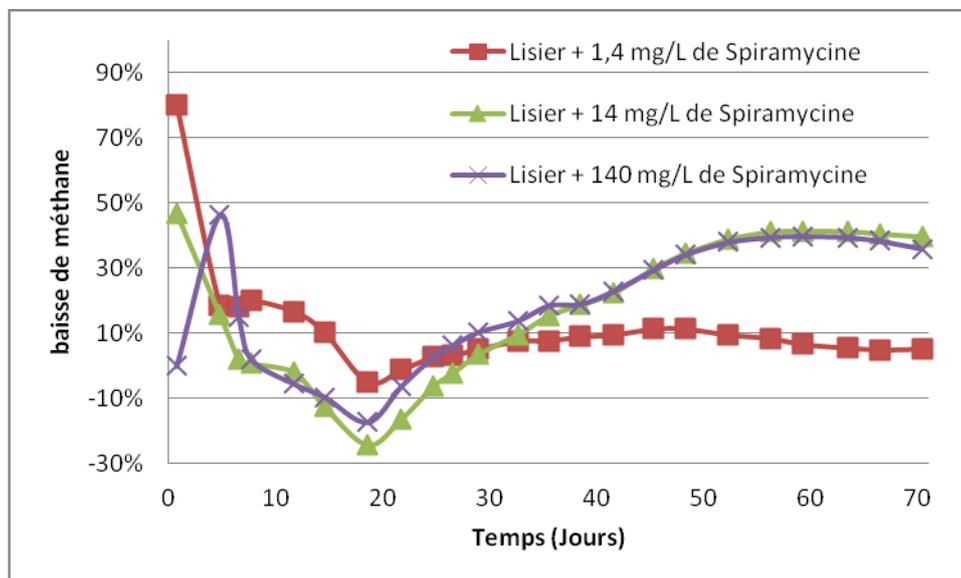


Figure IV.31 : Evolution du pourcentage de baisse de méthane au cours du temps pour le test avec la spiramycine

La figure IV.32 met en évidence les décalages observés dans les temps nécessaires pour atteindre un volume de production de méthane donné. Le test à 1,4 mg/L présente un décalage par rapport au témoin qui est faible mais globalement constant jusqu'à une production de 2500 mL. Quant aux tests à 14 et 140 mg/L, ils restent proches du témoin jusqu'à 1250 mL de production. A partir de 1500 mL de méthane produit, ils présentent le même décalage de 15 jours. Les différences majeures se sont fait sentir à partir du 33^{ème} jour pour ces deux dernières concentrations de spiramycine.

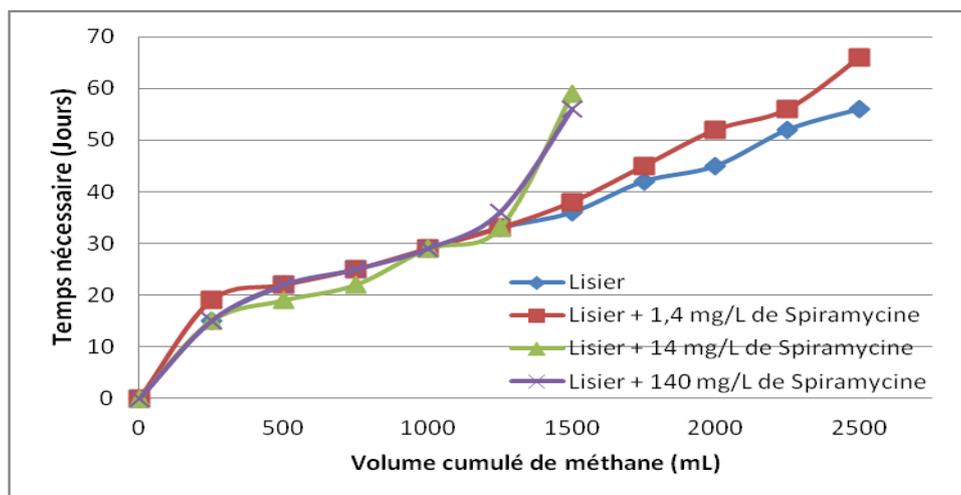


Figure IV.32 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de méthane pour le test avec la spiramycine

IV.2.2.1.5. Vitesses de production de méthane et profils de baisse de production

La figure IV.33 présente les vitesses de production de méthane exprimées en $\text{m}^3_{\text{CH}_4}$ par jour et par m^3 de réacteur et les pourcentages de baisse par rapport au témoin.

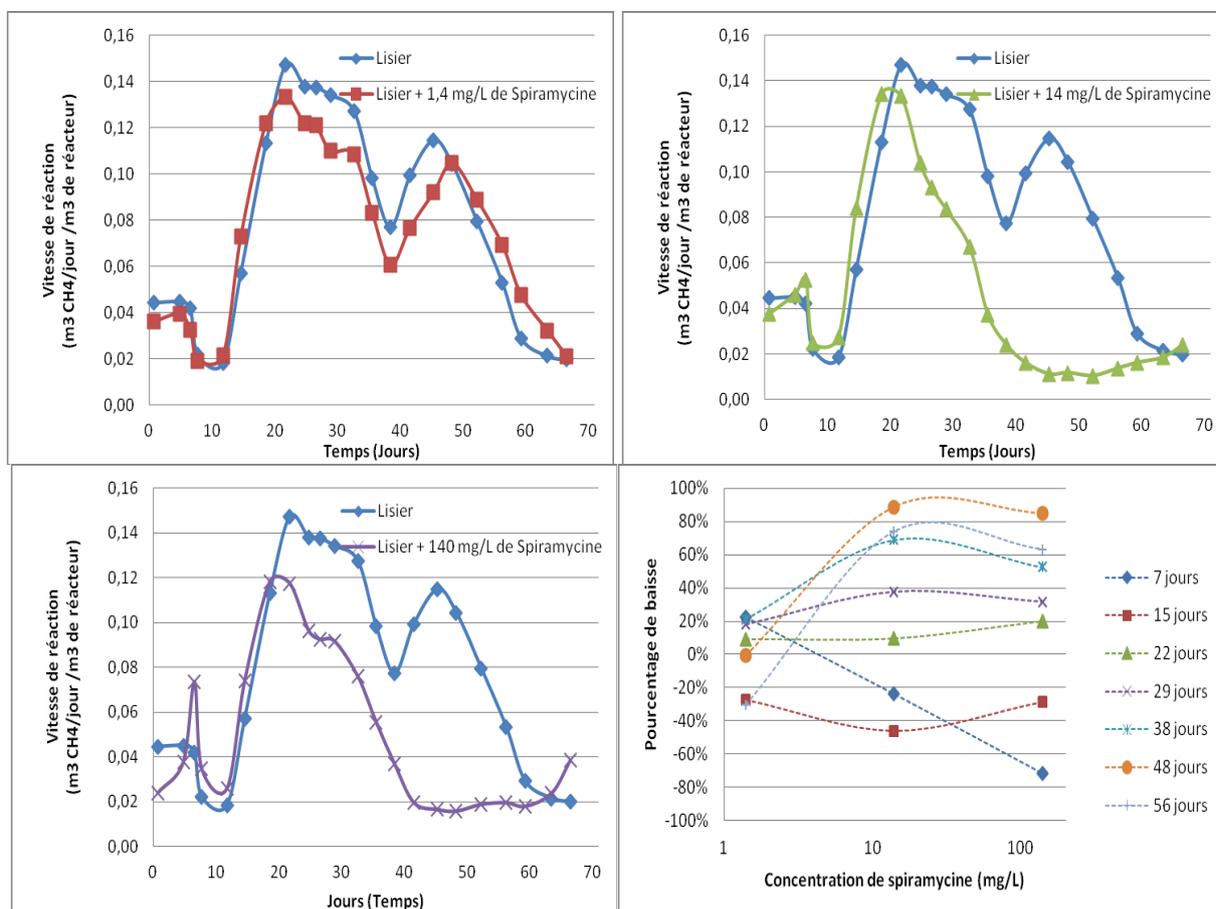


Figure IV.33 : Vitesses de production de méthane en $\text{m}^3_{\text{CH}_4}$ par jour par m^3 de réacteur et pourcentages de baisse par rapport au témoin des tests batch de spiramycine

L'analyse est effectuée sur la période allant du 15^{ème} au 56^{ème} jour, où les vitesses de production sont supérieures à celle de la phase d'acclimatation. Pour toutes les concentrations, la présence de spiramycine conduit à une légère amélioration de la vitesse de réaction qui dure jusqu'au 19^{ème} jour. Au 22^{ème} jour on a cependant des baisses de 10% pour 1,4 et 14 mg/L et 20% pour 140 mg/L. Après le 22^{ème} jour, le test à 1,4 mg/L présente une production inférieure au témoin, jusqu'au 48^{ème} jour où il surpasse le témoin. L'action de la spiramycine sur le procédé est donc temporaire. En revanche, les tests à 14 et 140 mg/L présentent après le 22^{ème} jour une forte diminution atteignant 85%. Les profils de vitesses des tests à 14 et 140 mg/L sont similaires et restent inférieurs au profil du témoin jusqu'au 63^{ème} jour pour 14 mg/L et 140 mg/L. Le début de redémarrage observé en fin d'expérience pour le test à 140 mg/L explique sa baisse de production de méthane qui est de 4% moins importante que celle du test à 14 mg/L.

Globalement, on voit 4 pics sur la courbe du témoin, représentant quatre phases réactionnelles différentes de production de méthane dont le 1^{er} survient avant la phase de production proprement dite. On peut noter que les 2^{ème} et 3^{ème} pics se chevauchent. La présence de

spiramycine à 1,4 mg/L ne change pas l'existence de ces phases, mais ne fait que diminuer leur intensité. En revanche, à partir de 14 mg/L, la 4^{ème} phase disparaît et l'intensité du 3^{ème} pic diminue. D'après la gamme de concentrations testées, la spiramycine aurait donc pour effet de diminuer l'intensité des phases réactionnelles de production, contrairement à la tétracycline qui en plus de diminuer l'intensité des pics les décalait. On note aussi que l'effet est moindre sur les premières phases réactionnelles et est plus important sur celles qui surviennent après la phase de production rapide de gaz.

IV.2.2.2. Test en réacteur continu

Cette section présente l'étude de la spiramycine en réacteur continu (soutirage – alimentation) avec un temps de passage fixé à 24 jours. Trois concentrations de spiramycine ont été testées : 0,14 mg/L, 1,4 mg/L et 14 mg/L. Les effets de chaque concentration sont observés pendant la semaine. Le réacteur initialement rempli de digestat jusqu'à 3 L, est alimenté avec du lisier à raison de trois opérations par semaine. Lors de la première alimentation, la spiramycine est ajoutée au lisier d'alimentation dans une quantité permettant d'atteindre dans le réacteur la concentration à tester. Pour les deux autres alimentations de la semaine, la spiramycine est rajoutée au lisier d'alimentation de sorte que ce dernier soit à la concentration testée. Lorsque la production de gaz s'est stabilisée, la spiramycine a été ajoutée aux concentrations susmentionnées à une semaine d'intervalle. Les effets pour chaque concentration testée sont observés après incorporation de la spiramycine.

Le tableau IV.19 présente la caractérisation du lisier et du digestat utilisés.

Tableau IV.19 : Caractérisation du digestat et du lisier pour le test en continu de la spiramycine

	Matière sèche (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium (mg _{N-NH4} ⁺ /g d'échantillon)
Digestat	6	73	1,43
Lisier	10	83	1,02

IV.2.2.2.1. Production de biogaz

Les figures IV.34 et IV.35 présentent respectivement la production de biogaz (exprimée en m³ par jour et par m³ de réacteur) et les pourcentages de baisse suite à l'ajout de la spiramycine, au cours de l'expérience. La production de biogaz se stabilisant à partir du 17^{ème} jour. La moyenne de production du 17^{ème} au 34^{ème} jour, qui est de 1,63 m³_{biogaz}.jour⁻¹.m⁻³_{réacteur}, sera prise comme référence pour évaluer les effets de la spiramycine sur le procédé.

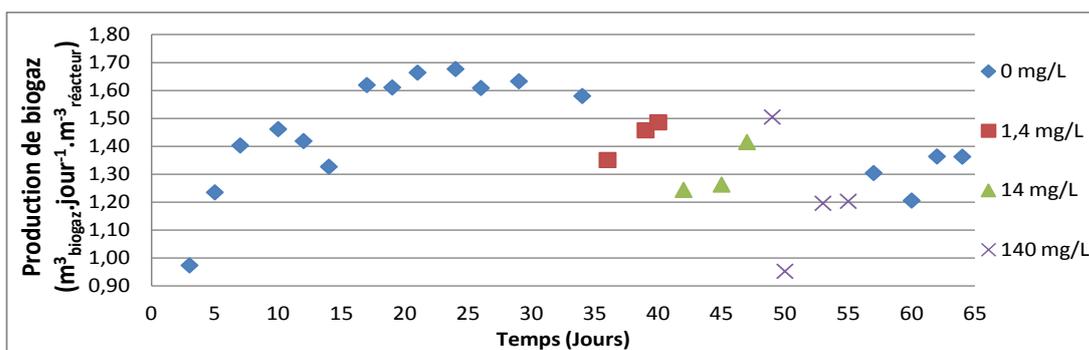


Figure IV.34 : Production de biogaz pour le test en continu avec la spiramycine

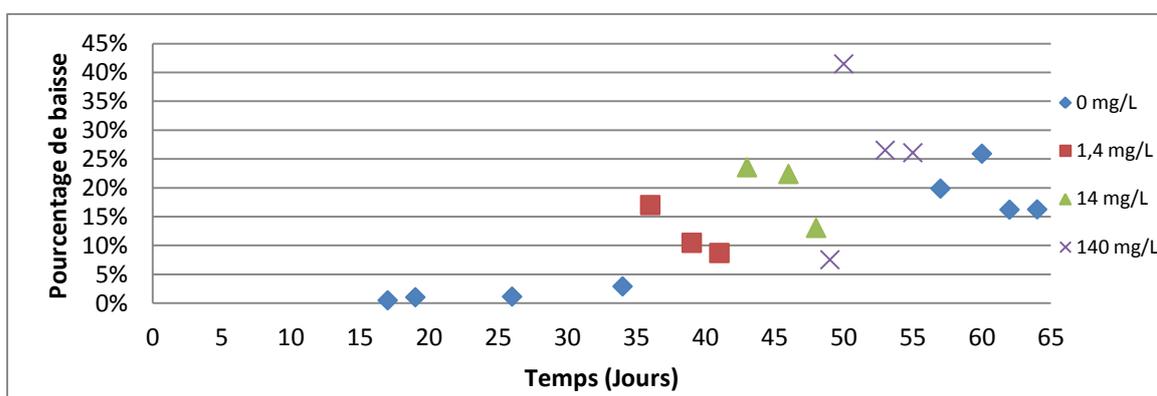


Figure IV.35 : Evolution du pourcentage de baisse de biogaz pour le test en continu avec la spiramycine

Au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout de la spiramycine à hauteur de 1,4 mg/L, la production de biogaz chute à $1,35 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ et affiche ainsi une baisse de 17% par rapport au débit avant ajout. Elle remonte par la suite à 1,46 puis $1,49 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$, et la baisse de production n'est plus que de 9% au 7^{ème} après l'ajout. Au 2^{ème} jour après l'ajout de 14 mg/L de spiramycine, la production descend à $1,24 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ et affiche ainsi une baisse de 24% par rapport au débit avant à ajout. Elle remonte aussi à 1,26 puis $1,42 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réact}}$, pour une baisse qui n'est plus que de 13% au 7^{ème} jour consécutif à l'ajout. A 140 mg/L de spiramycine, la production baisse à $0,95 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout, ce qui correspond à une diminution de 41%. Elle se stabilise ensuite à $1,20 \text{ m}^3_{\text{biogaz}} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réact}}$ aux 5^{ème} et 7^{ème} jours consécutifs à l'ajout, où la baisse n'est plus que de 26%. Le réacteur alimenté par la suite avec du lisier sans spiramycine affiche du 7^{ème} au 9^{ème} jour après une baisse de production de 16%.

L'ajout de spiramycine provoque une baisse de production dont le maximum est noté après 2 jours. Le point au jour 49 (qui correspond à 1 jour après l'ajout de la spiramycine à 140 mg/L) ne baisse pas, montrant que l'effet de la spiramycine est visible après 2 jours. La production évolue par la suite pour tendre vers sa valeur avant l'ajout de spiramycine. Pour 1,4 mg/L, au 5^{ème} jour

après l'ajout, on note une remontée. Ce qui n'est pas le cas pour 14 mg/L où il faut attendre le 7^{ème} jour consécutif à l'ajout pour noter une remontée de la production, qui continue jusqu'à 1 jour après l'ajout de 140 mg/L. Au 5^{ème} jour consécutif à l'ajout de 140 mg/L, on note une remontée, mais qui est vite arrêtée puisqu'au 7^{ème} jour, la production était la même. Il faut attendre le 14^{ème} jour consécutif à l'ajout, sachant que le réacteur est alimenté en lisier seul pendant 7 jours, pour constater une baisse résiduelle de 16% qui persiste jusqu'au 16^{ème} jour après. En plus de provoquer une chute brusque de la production, la spiramycine maintient la production à la baisse du 5^{ème} au 7^{ème} jour après l'ajout de 1,4 mg/L, du 2^{ème} au 5^{ème} jour après l'ajout de 14 mg/L puis du 5^{ème} au 7^{ème} jour après l'ajout de 140 mg/L avec une remontée plus lente malgré que le réacteur soit alimenté avec du lisier seul. Elle a donc un comportement bactériostatique qui survient d'autant plus vite que sa concentration est élevée pour 1,4 mg/L et 14 mg/L. A 140 mg/L, l'effet statique survient au 5^{ème} jour comme pour 1,4 mg/L, mais la production est vite bloquée à un pseudo-palier par la suite, contrairement à la remontée constatée au jour 49 où l'effet n'agit pas encore pour 140 mg/L.

La figure IV.36 présente l'évolution de la baisse de la production de biogaz en fonction des concentrations de spiramycine testées. Pour chaque concentration les baisses consécutives à l'ajout de spiramycine après 2, 5 et 7 jours sont représentées. L'évolution de la baisse affiche une tendance non linéaire, avec une montée rapide de la baisse de production aux faibles concentrations.

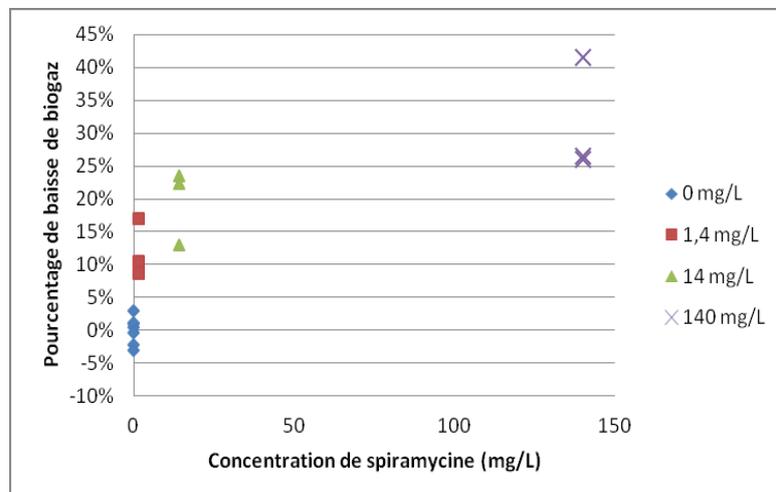


Figure IV.36 : Evolution de la baisse de biogaz en fonction des concentrations de spiramycine

IV.2.2.2.2. Production de méthane

Les figures IV.37 et IV.38 présentent respectivement la production de méthane et l'évolution du pourcentage de baisse au cours de l'expérience. Tout comme dans le cas du biogaz, la production de méthane se stabilise à partir du 17^{ème} jour. La moyenne de production du 17^{ème} au 34^{ème} jour, qui s'élève à $1,14 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$, sera prise comme référence pour évaluer les effets de la spiramycine sur la production de méthane.

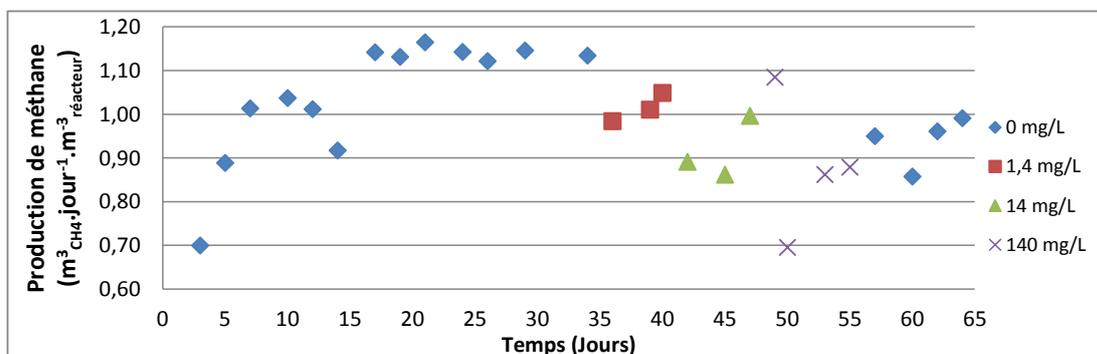


Figure IV.37 : Production de méthane pour le test en continu avec la spiramycine

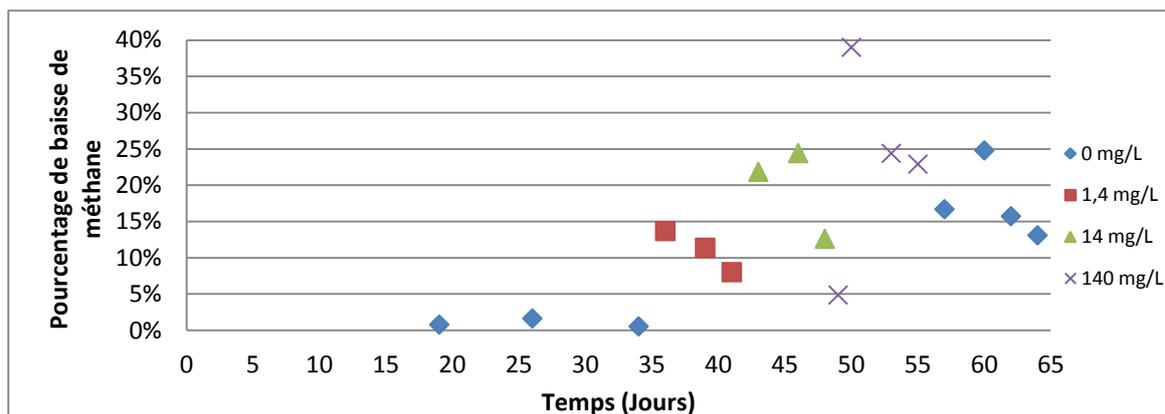


Figure IV.38 : Pourcentage de baisse de méthane pour le test en continu avec la spiramycine

Au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout de 1,4 mg/L de spiramycine, la production de méthane chute à $0,98 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ et affiche ainsi une baisse de 14% par rapport au débit avant ajout. Elle remonte par la suite à 1,01 puis $1,05 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$, et la baisse de production n'est plus que de 8% au 7^{ème} après l'ajout. Aux 2^{ème} et 5^{ème} jours après l'ajout de 14 mg/L de spiramycine, la production descend à 0,89 puis $0,86 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ et affiche ainsi une baisse de 22% puis 24% par rapport au débit avant à ajout. Elle remonte ensuite à $1,00 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$, pour une baisse qui n'est plus que de 13% au 7^{ème} jour consécutif à l'ajout. A 140 mg/L de spiramycine, la production baisse à $0,70 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ au 2^{ème} jour consécutif à l'ajout, ce qui correspond à une diminution de 39%. Elle se stabilise ensuite à 0,86 et $0,88 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{réacteur}}$ aux 5^{ème} et 7^{ème} jours consécutifs à l'ajout, où la baisse n'est plus que de 23%. Le réacteur alimenté par la suite avec du lisier sans spiramycine affiche aux 7^{ème} et 9^{ème} jours après une baisse de production de 16% et 13% respectivement.

L'ajout de spiramycine provoque un effet négatif sur la production de méthane qui ne serait observable qu'après 2 jours. En effet, le point au jour 49 (qui correspond à 1 jour après l'ajout de la plus forte concentration de spiramycine à 140 mg/L) ne baisse pas, et ce n'est qu'au jour 50 qu'on note la baisse. La production évolue par la suite pour tendre vers sa valeur avant l'ajout de spiramycine. Pour 1,4 mg/L, à partir 5^{ème} jour après l'ajout, on note une faible remontée qui continue jusqu'au 7^{ème} jour. Pour 14 mg/L, la production baisse jusqu'au 5^{ème} jour après l'ajout à une valeur très proche celle observée au 2^{ème} jour après l'ajout. On note au 7^{ème} jour consécutif à l'ajout une remontée de la production, qui continue jusqu'à 1 jour après l'ajout de 140 mg/L. Au 5^{ème} jour consécutif à l'ajout de 140 mg/L, on note une remontée, mais qui est vite arrêtée puisqu'au 7^{ème} jour, la production reste presque la même. Au 14^{ème} jour consécutif à l'ajout de spiramycine, sachant que le réacteur est alimenté en lisier seul pendant 7 jours, on constate une baisse résiduelle de 16% qui diminue faiblement pour atteindre 13% au 16^{ème} jour après. En plus de conduire à une diminution de la production de méthane au bout de 2 jours, la spiramycine bloque temporairement la remontée vers la valeur initiale de la production. Elle a donc un comportement bactériostatique qui est d'autant plus important que sa concentration est élevée. A 1,4 mg/L, la baisse initiale de production est moins importante (14%) et conduit à une remontée lente. A 14 mg/L où la production de méthane est plus affectée (22%-24%), la remontée est plus rapide. A 140 mg/L, l'effet statique survient au 5^{ème} jour après l'ajout, et la remontée est très lente jusqu'en fin d'expérience malgré l'alimentation avec du lisier sans spiramycine. A 140 mg/L, on est donc en présence soit d'un effet bactériostatique à durée supérieure à 16 jours ou d'un effet bactéricide.

La figure IV.39 présente les pourcentages de baisses de méthane observées en fonction des concentrations de spiramycine. Pour chaque concentration, les baisses observées après les 2^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} jours consécutifs à l'ajout sont affichées. L'évolution, comme dans le cas du biogaz, n'est pas linéaire. Le pourcentage de baisse semble tendre vers un palier à mesure que la concentration augmente.

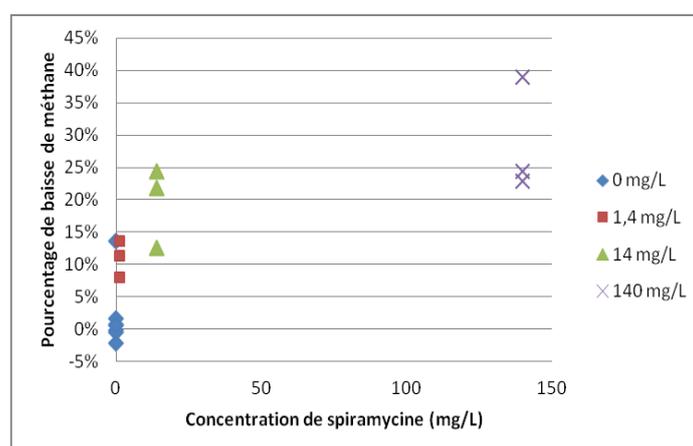


Figure IV.39 : Pourcentage de baisse de méthane en fonction de la concentration de spiramycine

IV.2.2.2.3. Teneur en CH₄

La figure IV.40 présente la teneur en méthane au cours de l'expérience.

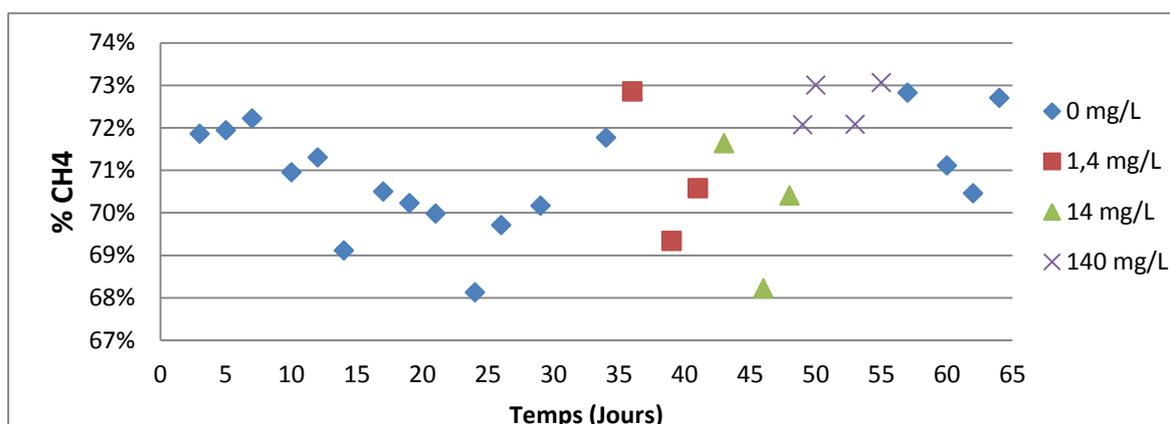


Figure IV.40 : Evolution de la teneur en CH₄ pour le test en continu avec la spiramycine

Avant l'ajout de spiramycine, la teneur en méthane sur la période de production stable de biogaz et de méthane, est comprise entre 68% et 72%. Au 2^{ème} jour après l'ajout de 1,4 mg/L, la teneur monte à 73% puis redescend vers 69% pour remonter. Pour 14 mg/L, la teneur en méthane descend au 5^{ème} jour après l'ajout à 68%, puis entame une remontée. A 140 mg/L, la teneur en méthane présente des valeurs hautes et varie entre 72% et 73%. A l'arrêt de l'ajout de spiramycine, la teneur varie entre 70% et 73%, ce qui est supérieur à la plage observée en début d'expérience. L'ajout de spiramycine a donc globalement élevé la plage de variation de la teneur en méthane.

IV.2.2.2.4. Evolution des paramètres du milieu

Après l'opération de soutirage-alimentation du réacteur, le digestat soutiré est analysé puis caractérisé suivant les paramètres physico-chimiques que sont : les matières sèches, la matière organique, l'azote ammoniacal, la conductivité et le pH.

La figure IV.41 présente successivement le taux de matières sèches et le taux de matière organique des digestats associés aux concentrations de tétracycline testées.

Avant ajout de spiramycine, le pourcentage de matières sèches (MS) varie globalement entre 6% et 7% sur la période allant du 17^{ème} au 34^{ème} jour où la production de biogaz et de méthane est stabilisée. A 1,4 mg/L de spiramycine, on note une évolution progressive du pourcentage de MS qui atteint 8% au 7^{ème} jour consécutif à l'ajout. A 14 mg/L, le pourcentage de MS varie très faiblement et affiche une valeur comprise entre 6% et 7%. A 140 mg/L on note une légère montée qui amène le pourcentage de MS à 7% à partir du 5^{ème} jour consécutif à l'ajout. Par la suite, alors que le réacteur est alimenté avec du lisier seul, le pourcentage de MS se situe légèrement au-dessus de 7%. L'ajout de lactosérum a globalement conduit à une hausse du pourcentage de MS. Si à 1,4 mg/L de spiramycine, il redescend après 7 jours, après 140 mg/L il

reste supérieur à la valeur de début d'expérience jusqu'à la fin. L'effet négatif sur la conversion en méthane de la matière organique justifie l'augmentation des matières sèches.

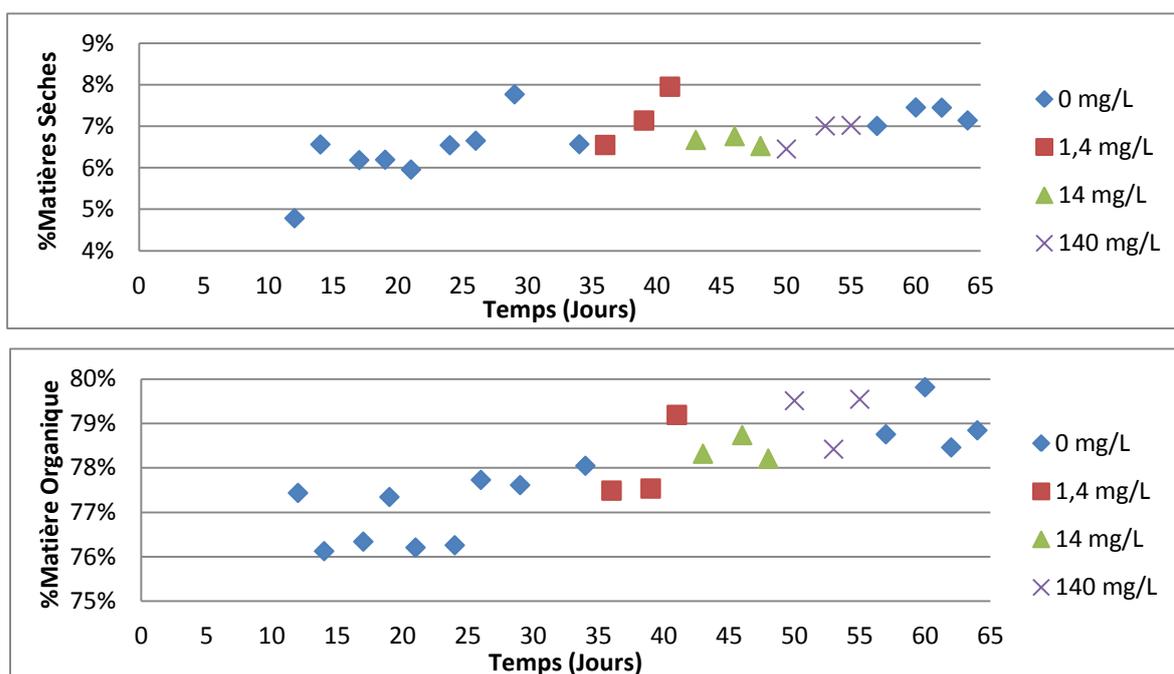


Figure IV.41 : Evolution des pourcentages de matières sèche et de matière organique pour le test en continu avec la spiramycine

Le pourcentage de matière organique se situe autour de 78% avant ajout de spiramycine au réacteur. A 1,4 mg/L on note une légère baisse, puis une hausse vers 79% au 7^{ème} jour consécutif à l'ajout. A 14 mg/L de spiramycine, le pourcentage varie entre 78% et 79%. A 140 mg/L le pourcentage est entre 79% et 80%. Après alimentation avec du lisier seul, le pourcentage de MO varie entre 78% et 80%. Tout comme dans le cas des matières sèches, le pourcentage de MO augmente d'autant plus que la concentration de spiramycine est élevée. Ceci traduit une baisse de la conversion de la matière organique, et donc de la production de biogaz et de méthane.

La figure IV.42 affiche les valeurs de pH au cours de l'expérience. Tout au long du procédé, les valeurs de pH sont comprises dans la plage assurant une bonne digestion anaérobie (6,5 – 8,5).

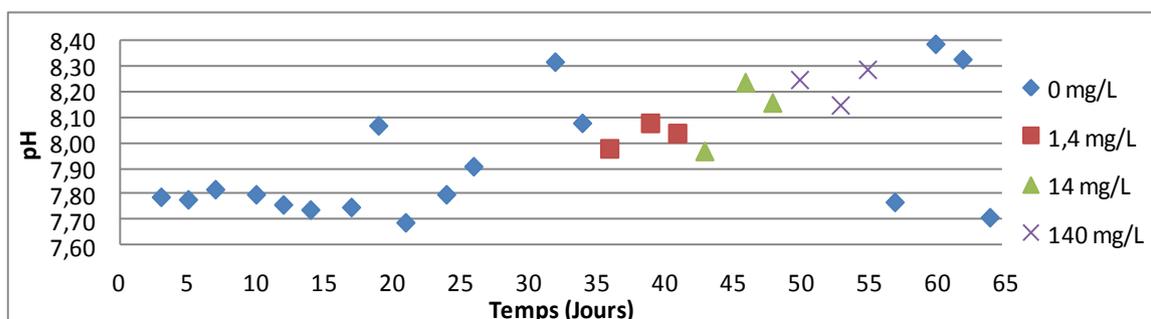


Figure IV.42 : Valeurs de pH pour le test en continu avec la spiramycine

A 1,4 mg/L, le pH se situe entre 7,9 et 8,1. A 14 mg/L, il se situe entre 7,9 et 8,3. A 140 mg/L, il se situe entre 8,1 et 8,3. Ce n'est qu'en fin de réaction, soit 9 jours après ajout de lisier seul, que le pH affiche une valeur de 7,7. Plus la concentration en spiramycine augmente, plus la plage de variation du pH augmente. Cette montée de pH pourrait être reliée au ralentissement causé par la présence de spiramycine, qui aurait causé le ralentissement de la production d'acides.

La figure IV.44 présente successivement l'évolution de l'azote ammoniacal et de la conductivité au cours de l'expérience

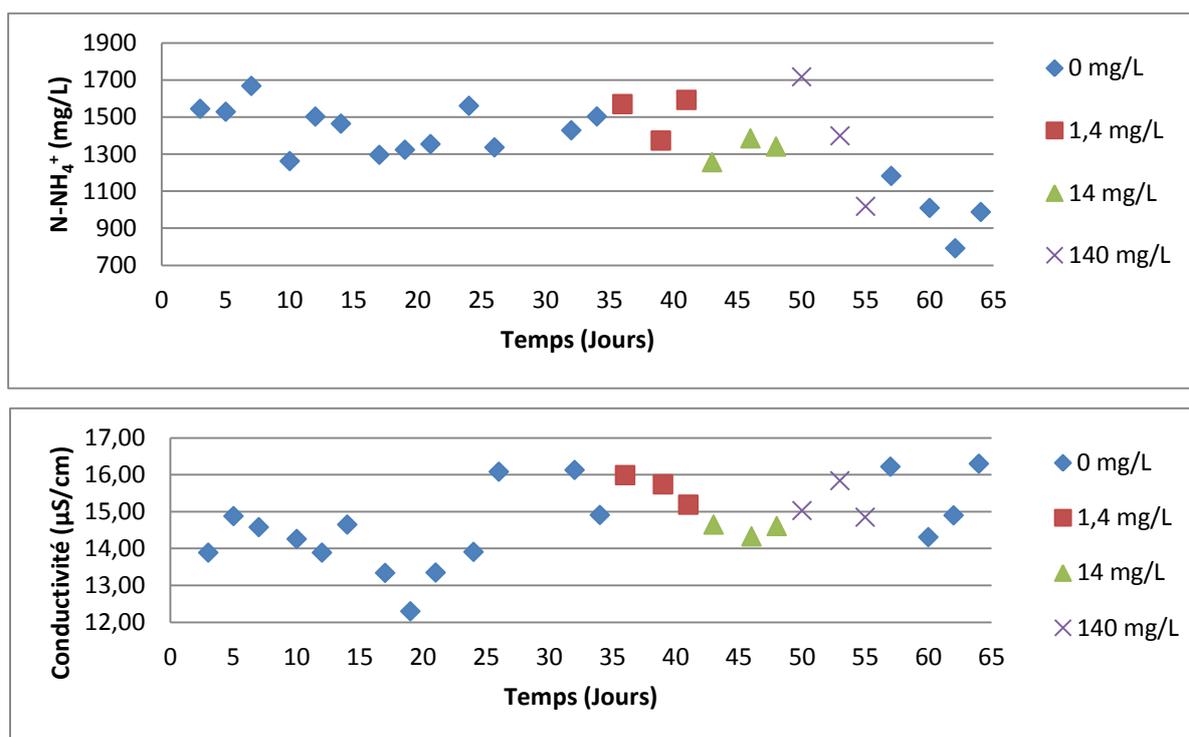


Figure IV.44 : Evolution de l'azote ammoniacal et de la conductivité pour le test en continu avec la spiramycine

Les variations de la conductivité avant l'ajout de spiramycine sont trop importantes pour qu'on puisse déceler un effet après l'ajout de ce dernier. Quant à l'azote ammoniacal, avant ajout de la spiramycine, sa concentration varie entre 1300 mg/L et 1600 mg/L sur la période allant du 17^{ème} au 34^{ème} jour, dépassant ainsi la valeur de 1500 mg/L considérée comme modérément inhibitrice (Moletta, 2008). A 1,4 mg/L de spiramycine, la variation de la concentration en ammonium ne diffère pas celle observée pour le témoin. On note néanmoins une baisse de la teneur en ammonium au 5^{ème} jour à 1400 mg/L après l'ajout de la spiramycine, puis une remontée au 7^{ème} jour pour atteindre 1600 mg/L. A 14 mg/L, la variation de la teneur en ammonium se situe entre 1200 mg/L et 1400 mg/L. Elle baisse au 2^{ème} jour après ajout de la spiramycine, puis remonte faiblement pour présenter des concentrations proches aux 5^{ème} et 7^{ème} jours consécutifs à l'ajout. On note une montée à 1700 mg/L au 2^{ème} jour après l'ajout de 140 mg/L de spiramycine, puis une descente à partir du 5^{ème} jour pour atteindre 1400 mg/L qui continue jusqu'au 7^{ème} jour où la concentration est de 1000 mg/L. En fin d'expérience, alors que

le réacteur est alimenté avec du lisier seul, la concentration oscille entre 800 mg/L et 1000 mg/L les 4 derniers jours.

La digestion anaérobie étant un processus de minéralisation de la matière organique, une baisse en azote ammoniacal traduit un ralentissement du procédé. On note qu'avec l'augmentation des concentrations, l'azote ammoniacal diminue. Si après 1,4 mg/L et 14 mg/L de spiramycine, on observe des remontées vers les valeurs de début d'expérience, après 140 mg/L on assiste à une baisse dont le système ne récupère pas après 9 jours d'alimentation avec du lisier seul.

IV.2.2.2.5. Evolution des teneurs en métaux lourds

Tout comme dans l'étude de la tétracycline, les teneurs en métaux lourds ont été analysés pour évaluer la qualité sanitaire du digestat résultant de l'expérience. Elles ont été mesurées sur les digestats secs et sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matières sèches ($\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$).

La figure IV.45 présente les teneurs pour l'aluminium, le chrome et le cuivre, et la figure IV.46 celles du manganèse, du nickel, du plomb et du zinc.

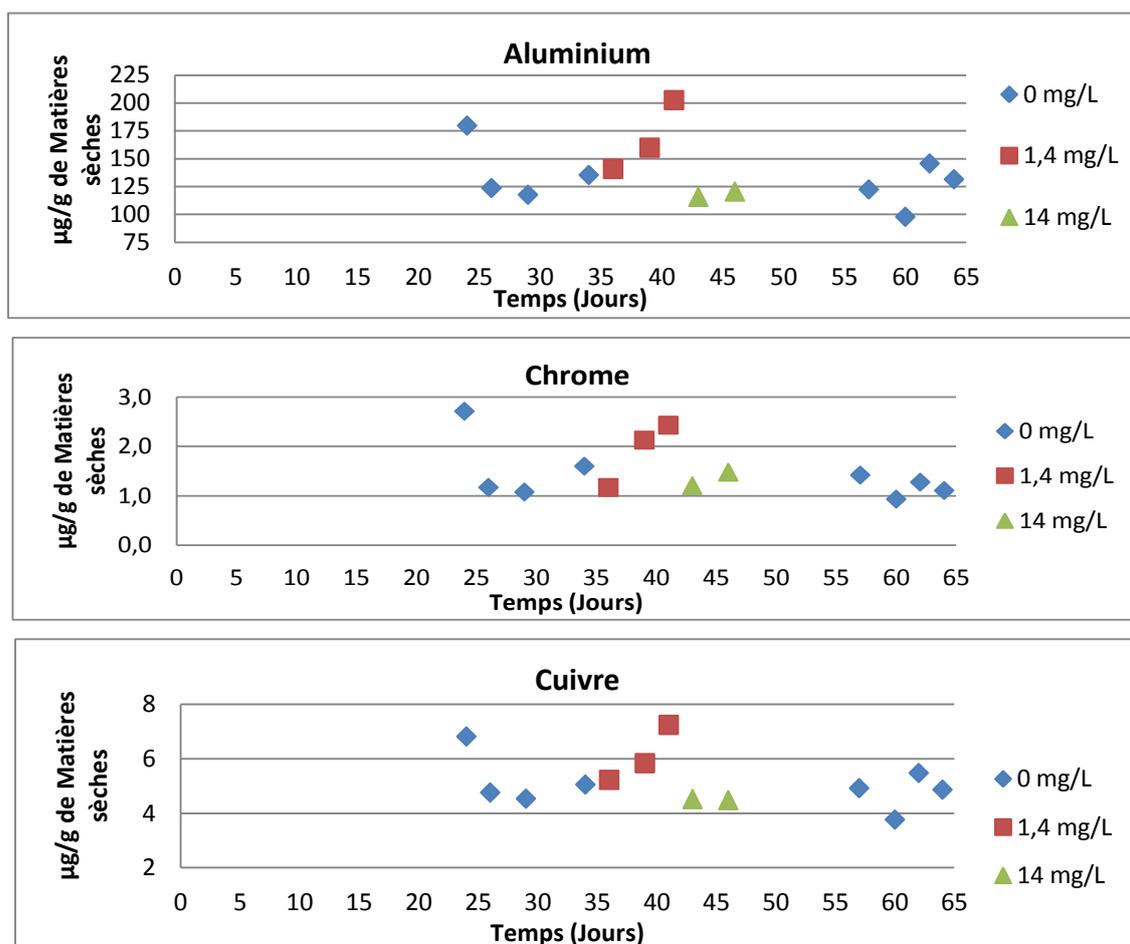


Figure IV.45 : Evolution des teneurs en aluminium, cuivre et chrome pour le test en continu avec la spiramycine

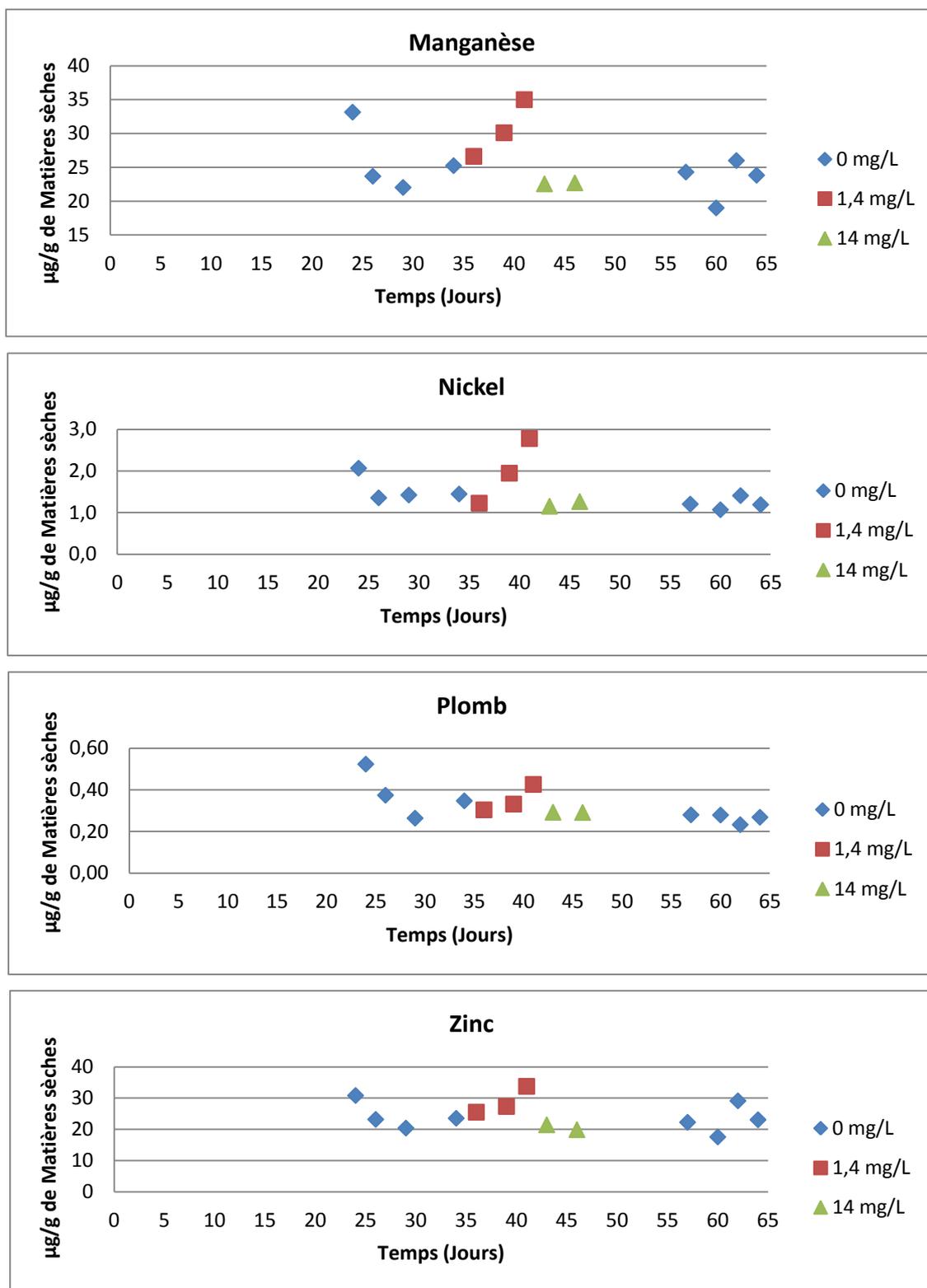


Figure IV.46 : Evolution du manganès, du nickel, du plomb et du zinc pour le test en continu avec la spiramycine

Le réacteur étant stable du 17^{ème} au 34^{ème} jour, les quatre derniers points avant ajout de la spiramycine ont été considérés, notamment du 24^{ème} au 34^{ème} jour. Des métaux lourds analysés, l'arsenic et la cadmium n'ont pas été détectés et sont ainsi inférieures au ppb (ng/g de MS). Pour les autres métaux, on remarque que l'ajout de spiramycine à 1,4 mg/L conduit à une hausse progressive de leur teneur. A 14 mg/L, la teneur redescend vers des teneurs proches de celle du

début d'expérience. Suite à une contrainte expérimentale, les teneurs pour les digestats à 140 mg/L ne sont pas exploitables pour cause d'incertitude de mesure. On note cependant qu'après alimentation avec du lisier seul, les teneurs en métaux sont proches de celles observées en début d'expérience et à 14 mg/L. Contrairement à la tétracycline où on avait deux types de comportement de métaux, tous les métaux suivent la même tendance avec la spiramycine. Cependant, les variations observées sont dans la plage de variation du réacteur avant l'ajout de la spiramycine. On peut donc conclure que les teneurs en métaux sont globalement restées similaires pendant l'expérience.

Les métaux lourds mesurés présentent toutefois des teneurs très inférieures aux valeurs de la réglementation. Le digestat résultant de l'expérience peut donc être utilisé pour l'épandage, du point de vue des métaux lourds.

IV.2.2.3. Conclusion partielle

Les tests effectués en batch avec la spiramycine montrent qu'à 1,4 mg/L on ne note pas d'effet significatif (<5%) sur la production de gaz. Les teneurs de 14 mg/L et 140 mg/L conduisent respectivement à une diminution de 38% et 36% pour le biogaz et 40% et 36% pour le méthane. A ces concentrations, on note une acidification du milieu où les pH sont en deçà des valeurs assurant un fonctionnement du procédé. A concentrations égales, les impacts sur le méthane et le biogaz ne présentent pas de différence significative. Le profil des volumes cumulés montre que la spiramycine agit sur la phase de production rapide, et n'agit que faiblement sur la phase de mise en place de la communauté microbienne. Contrairement au test effectué par Zhu et al. (2014) où 37 mg/L de spiramycine était dissipée en 4 jours, à 14 mg/L déjà, la réaction reste affectée sur près de 40 jours. Ce n'est qu'en fin de réaction qu'on note un faible redémarrage qui pourrait relancer la production. Ceci pourrait correspondre aux observations de Zhu et al. (2014) qui ont montré qu'à 200 mg/L, la spiramycine était dégradée au bout de 32 jours. La spiramycine aurait donc perturbé la mise en place de la population microbienne d'un point de vue quantitatif. En effet, on ne note pas en début de réaction, où la disponibilité en monomères est faible, une différence significative en termes de volumes produits ; l'écart ne survient qu'en phase de production rapide. Une hypothèse serait que face à la faible quantité de méthanogènes pour consommer les produits résultant de l'hydrolyse et de l'acidogenèse (acides gras volatils), le milieu se serait acidifié (comme le montrent les pH) et aurait donc limité la méthanogenèse. Les vitesses de production de méthane montrent que la baisse de production résulte de la diminution en intensité et du retardement dans le temps des phases réactionnelles. Contrairement au profil de 1,4 mg/L, ceux de 14 mg/L et 140 mg/L ne présentent pas la deuxième phase réactionnelle de production qui survient après 40 jours, d'où la chute brutale de la production de méthane en passant de 14 à 140 mg/L. On note aussi que la première phase réactionnelle est plus stable que la seconde qui est décalée à 1,4 mg/L, et disparaît à 14 et 140 mg/L.

Les tests effectués en continu en présence spiramycine ont permis d'évaluer l'effet de son ajout sur une durée de 7 jours. Pour toutes les concentrations testées, le système ne récupère pas au bout de 7 jours. On note ainsi des baisses résiduelles de biogaz de 9%, 13% et 26% et de méthane de 8%, 13% et 23% pour 1,4 mg/L, 14 mg/L et 140 mg/L de spiramycine respectivement. Comparativement aux tests en batch, les tests en continu sont moins affectés à concentrations égales. En effet, la spiramycine est ajoutée alors que le procédé a atteint la phase stationnaire ; la communauté microbienne était donc déjà en place et n'a pas subi une perturbation en termes de qualité ou de quantité lors de sa mise en place comme ce fut le cas dans les tests en batch. Les analyses en métaux lourds pour évaluer la qualité sanitaire du digestat affichent encore une fois des teneurs en deçà des limites autorisées par la législation.

IV.2.3. Effet de la tylosine sur le procédé en réacteur batch

La tylosine est certes plus souvent utilisée dans l'industrie porcine, mais elle est présente aussi dans le lisier bovin à des teneurs comprises entre 0,11 et 8,1 mg/kg de lisier bovin (De Liguoro et al., 2003 ; Dolliver et al., 2008). Les études relatives à son effet sur la digestion anaérobie concernent majoritairement les effluents pharmaceutiques. Face à la disparité des valeurs inhibitrices de la tylosine, il a été conclu que le type de réacteur ou même l'historique du réacteur avait une grande influence (Gartiser et al., 2007 ; Shimada et al., 2008). La présente étude de l'effet de la tylosine a été effectuée avec du lisier frais en batch. Il n'y a donc pas d'effet d'historique, où les microorganismes auraient pu s'acclimater à la tylosine puisque cette dernière n'est pas utilisée sur la ferme de la Bouzule. Les conditions opératoires ont été fixées pour assurer une digestion anaérobie optimale. Les effets sur le procédé pourront alors être associés à la présence de la tylosine dans le milieu réactionnel. Les concentrations testées ont été choisies pour balayer les concentrations qui se sont avérées inhibitrices dans la littérature. Elles sont de 20, 200, et 1000 mg/L.

IV.2.3.1. Caractérisation du substrat

Le lisier utilisé présente un taux de matières sèches de 10%, une teneur en matière organique de 78% (tableau IV.20). De plus, son ratio C/N de 15 est dans la gamme des valeurs conseillées par De Vries et al. (2012) pour assurer un bon déroulement du procédé. La teneur en ammonium du lisier de 0,63 mg_{N-NH4}⁺/g d'échantillon conduit à une teneur en ammonium dans les batch d'une valeur de 126 mg_{N-NH4}⁺/L (tableau IV.21). Cette valeur est largement inférieure aux teneurs inhibitrices de 1500 mg_{N-NH4}⁺/L renseignées dans la littérature (Atandi et al., 2012). Ce lisier est donc un substrat organique favorable pour la méthanisation.

Tableau IV.20 : Caractérisation des substrats (Matières Sèches: MS, Matière Organique: MO, Ammonium et ration C/N)

	Matière sèche (MS) (%)	Matière Organique (MO) (%)	Ammonium initial ($\text{mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{g}$ d'échantillon)	Ratio C/N
Lisier	10,1	78,4	0,63	15

La composition des réacteurs consignée dans le tableau IV.21 montre les valeurs de pH en fin d'expérience. Les pH sont compris dans la gamme optimale (6,5 – 8,5), le dernier batch du test à 1000 mg/L étant proche de la valeur limite (Moletta, 2008). Les concentrations de tylosine testées n'ont donc pas pu inhiber la digestion par acidification du milieu réactionnel.

Tableau IV.21 : Composition des batch, ammonium et pH en fin d'expérience

Batch en duplicat	Composition	Ammonium initial ($\text{mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{L}$)	pH final
#1 et #2	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7	126	6,9 / 6,9
#3 et #4	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 20 mg/L de tylosine	126	6,9 / 6,8
#5 et #6	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 200 mg/L de tylosine	126	6,7 / 6,7
#7 et #8	100 g de lisier + 400 mL de tampon pH7 + 1000 mg/L de tylosine	126	6,7 / 6,5

IV.2.3.2. Production de biogaz

Le tableau IV.22 présente le volume moyen de biogaz produit pour chaque concentration testée et les pourcentages de perte de volume par rapport au témoin. L'écart relatif des témoins par rapport à leur moyenne est de 1%.

Tableau IV.22 : Volume de biogaz produit pour le test batch avec la tylosine (Tyl)

	Volume moyen de biogaz (mL)	Ecart relatif sur les duplicats (%)	Baisse par rapport au lisier seul (%)
Lisier	4146±34	1	
Lisier + 20 mg/L de Tyl	2868±170	6	31
Lisier + 200 mg/L de Tyl	2663±177	7	36
Lisier + 1000 mg/L de Tyl	2265±52	2	45

Au terme de l'expérience, les tests contenant 20, 200 et 1000 mg/L de tylosine affichent des baisses volumiques de 31%, 36% et 45% respectivement. La perte volumique de biogaz croît avec la teneur en tylosine, mais pas de manière proportionnelle. L'augmentation de la concentration d'un facteur 10 (de 20 à 200 mg/L) induit une baisse supplémentaire de 5%. L'augmentation de la concentration en tylosine d'un facteur 5 (200 à 1000 mg/L) induit une baisse supplémentaire de 9% significative, puisque l'écart sur le test à 200 mg/L (7%) y est inférieur. Les teneurs de 20 et 200 mg/L mettent en évidence un palier de baisse de production compris entre 31 et 36%. Même si la différence d'effet sur la digestion n'est pas significative en termes de volume de biogaz produit, on note une différence au niveau du déroulement du procédé.

La figure IV.47 présente l'évolution de la baisse de biogaz en fonction des concentrations de tylosine. On observe que l'évolution n'est pas linéaire pour les concentrations testées. De plus, contrairement aux autres antibiotiques testés en batch, la tylosine ne tend pas vers un palier à mesure que la concentration augmente. On a pu constater en effet que la baisse supplémentaire induite par le passage de 20 mg/L à 200 mg/L est inférieure à celle induite par le passage de 200 mg/L à 1000 mg/L.

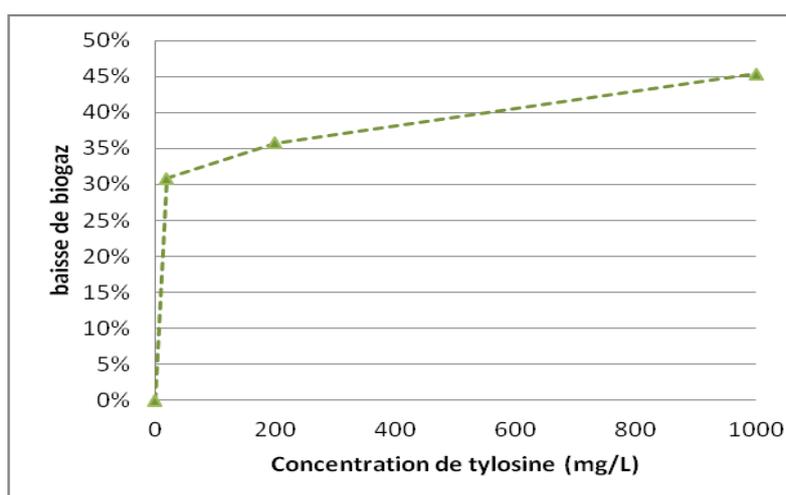


Figure IV.47 : Baisse de biogaz en fonction de la concentration de tylosine

Le profil de production du biogaz (figure IV.48) présente trois phases à savoir : la mise en place de la population microbienne, la production rapide, et une phase de ralentissement.

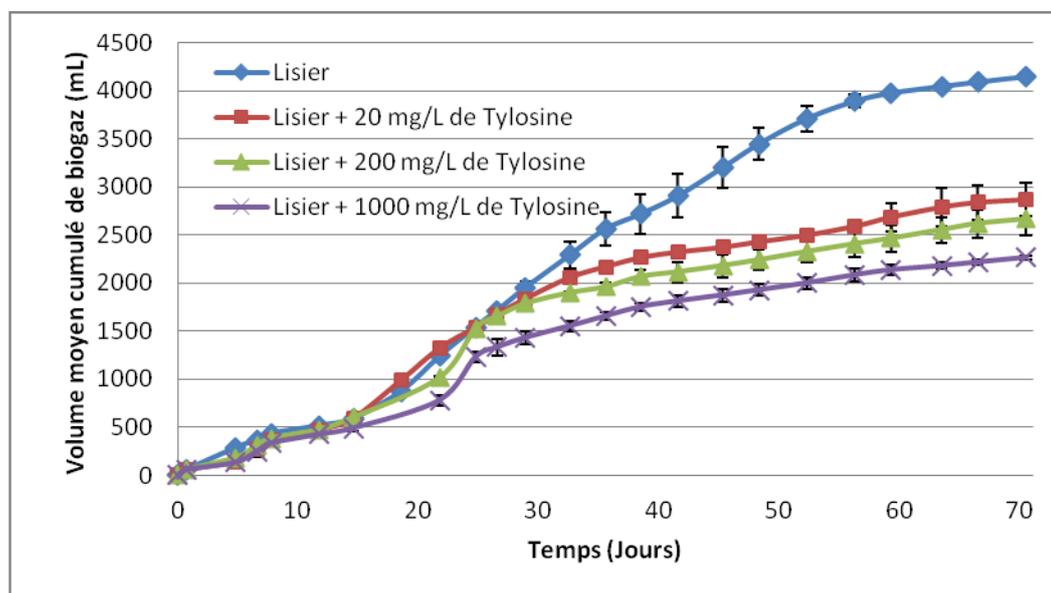


Figure IV.48 : Volume moyen cumulé de biogaz pour les tests batch avec la tylosine

Lors de la phase de mise en place de la population microbienne qui couvre les 15 premiers jours, tous les tests de tylosine sont légèrement inférieurs au témoin. Ils présentent le même profil jusqu'au 8^{ème} jour, avec une production statique entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour. Du 8^{ème} au 15^{ème} jour, le test à 1000 mg/L ralentit plus que les tests à 20 et 200 mg/L. La référence que constitue le profil du témoin entre en phase de production après le 15^{ème} jour, pour ralentir à partir du 56^{ème} jour jusqu'à la fin de l'expérience. Le test à 20 mg/L est le premier à entrer en phase de production rapide, avant le témoin, mais ralentit au 27^{ème} jour où il passe en deçà du témoin, pour entrer en phase ralentie à partir du 33^{ème} jour. Le test à 200 mg/L connaît un début de production plus faible que celui à 20 mg/L, mais le rejoint au 25^{ème} jour pour amorcer sa phase de ralentissement dès le 29^{ème} jour. Du 33^{ème} jour à la fin de l'expérience, les tests à 20 et 200 mg/L présentent des pentes similaires. Le test à 1000 mg/L a une phase de production qui est plus faible encore que celle de 200 mg/L et affiche le même profil que cette dernière. Il entre en phase ralentie dès le 25^{ème} jour.

A 20 mg/L de tylosine, la phase de production rapide survient avant celle du témoin. Cette concentration aurait provoqué un stress qui n'aurait pas constitué un avantage pour la production puisqu'un ralentissement est observé par la suite. On note un ralentissement du test à 200 mg/L pendant la phase de production rapide. La tylosine a donc agi presque uniformément sur la mise en place de la communauté microbienne. Elle impacte plus la phase de production rapide où l'on note une diminution du volume de biogaz quand la concentration augmente.

L'évolution de la baisse de la production biogaz au cours du temps (figure IV.49) montre que le biogaz affiche une baisse brusque et forte dès les premiers jours, notamment pendant la phase de

mise en place de la communauté microbienne. Les profils des trois tests présentent la même allure, à la différence qu'un pic est notable au 19^{ème} jour pour les tests à 200 mg/L et 1000 mg/L. Après le 15^{ème} jour où a commencé la phase de production rapide, les tests à 20 mg/L et 200 mg/L affichent une amélioration temporaire de la production de biogaz vers le 20^{ème} jour, alors que le test à 1000 mg/L affiche toujours une baisse par rapport au témoin même si son intensité a diminué. Par la suite, les baisses ont augmenté progressivement pour se stabiliser autour de 33% et 37% pour les tests à 20 mg/L et 200 mg/L respectivement et autour de 46% pour le test à 1000 mg/L. Il faut noter que les baisses atteignent leur pseudo-palier au 52^{ème} jour pour tous les tests.

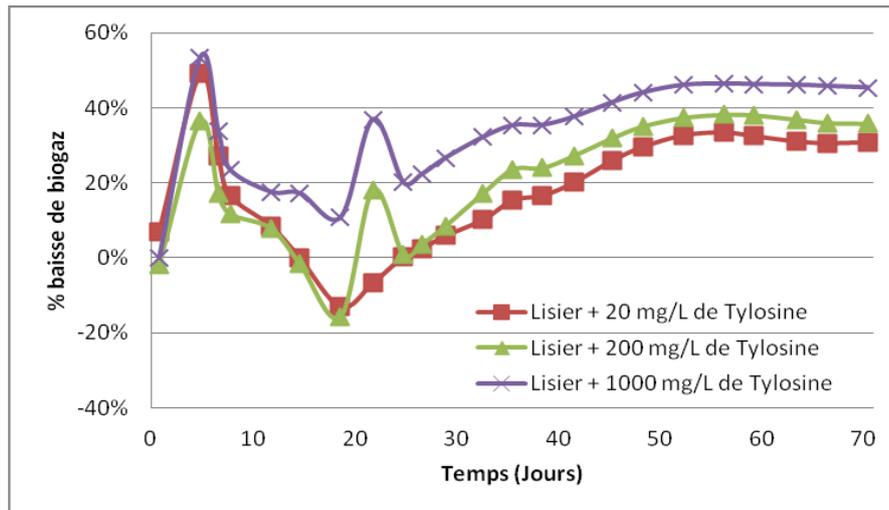


Figure IV.49 : Baisse de la production de biogaz pour le test avec la tylosine

La figure IV.50 met en relief les temps nécessaires pour atteindre une production fixe de biogaz, et notamment les décalages dus à l'addition de la tylosine.

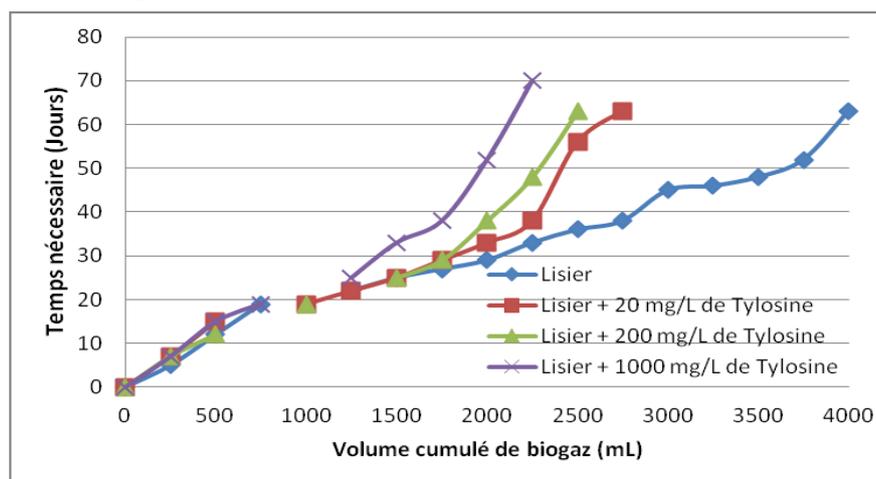


Figure IV.50 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de biogaz pour le test avec la tylosine

Les allures des courbes sont pareilles jusqu'à l'objectif volumique de 1250 mL. Le test à 1000 mg/L est le premier à présenter un décalage avec le témoin, avec le temps nécessaire qui croît à

mesure que le volume fixé augmente. A l'objectif 2250 mL de volume, le temps supplémentaire nécessaire est de 37 jours. Les tests à 20 et 200 mg/L se décalent tous du témoin à partir de 1750 mL et voient leur décalage augmenter, mais de façon plus rapide pour 200 mg/L. Au final, le test à 200 mg/L présente un décalage de 27 jours à l'objectif 2500 mL tandis que le test à 20 mg/L présente un décalage de 25 jours à l'objectif 2750 mL. En définitive, au-delà de 1250 mL de biogaz produits, le décalage est d'autant plus fort que la concentration en tylosine est élevée.

IV.2.3.3. Evolution des teneurs en CH₄

La figure IV.51 présente l'évolution des teneurs en CH₄ dans le ciel gazeux du témoin avec chaque concentration de tylosine testée.

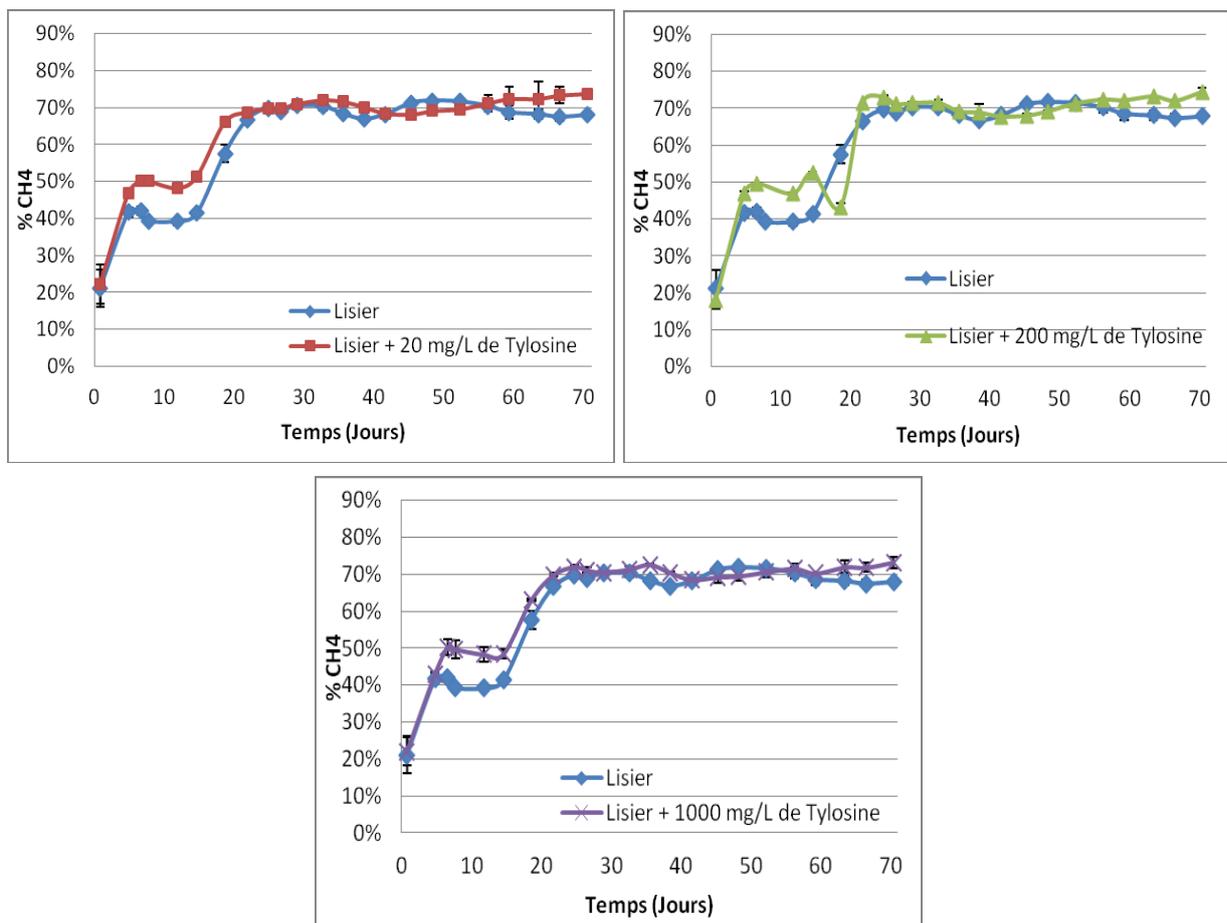


Figure IV.51 : Teneur en méthane des tests batch avec la tylosine

Tous les profils de teneur en méthane présentent une montée brusque dès les 5 premiers jours, une faible diminution, puis une remontée dès le 15^{ème} jour pour se stabiliser entre 68% et 74%.

Tous les tests de tylosine ont des teneurs en méthane proches de celle du témoin après le 22^{ème} jour. Cependant après le 56^{ème} jour, les teneurs en méthane de ces derniers deviennent supérieures à celle du témoin. Les écarts avec les témoins sont notés dès les début de réaction pendant la phase d'acclimatation des microorganismes. C'est ainsi que le test à 20 mg/L surpasse le témoin de 8 – 10% entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jour. Sur cette même, les tests à 200 mg /L et 1000

mg/L surpassent le témoin de 7 – 9%. On remarque aussi que le test à 20 mg/L atteint la stabilisation au 19^{ème} jour alors que les autres l’atteignent au 22^{ème} jour.

Il en résulte que l’effet de la tylosine sur la teneur en méthane est plus notable lors de la phase d’acclimatation. La tylosine améliore le pourcentage de méthane lors de cette phase, et aussi en début de phase de production. Les tests de tylosine présentent par la suite des teneurs en méthane proches du témoin et surpassent même ce dernier en fin d’expérience. La tylosine n’affecte donc pas la qualité du biogaz, mais les vitesses d’assimilation de la matière organique pour la production de biogaz.

IV.2.3.4. Production de méthane

Le tableau IV.23 présente le volume moyen de méthane produit pour chaque concentration de spiramycine et les pourcentages de baisse en volume par rapport au témoin.

Tableau IV.23 : Volume moyen de méthane pour les tests batch avec la tylosine (Tyl)

	Volume moyen de méthane (mL)	Ecart relatif sur les duplicats	Baisse par rapport au lisier seul (%)	Part du méthane (%)
Lisier	2668±13	0		64
Lisier + 20 mg/L de Tyl	1867±141	8	30	65
Lisier + 200 mg/L de Tyl	1640±254	15	39	62
Lisier + 1000 mg/L de Tyl	1462±5	0	45	65

L’écart relatif sur les duplicats du test témoin par rapport à leur moyenne est proche de 0%. Les baisses de volume de méthane de 30%, 39% et 45% pour les tests à 20, 200, et 1000 mg/L de tylosine respectivement, sont donc significatives. La tylosine agit sur la production de biogaz, et non sur les équilibres de production de chacun des gaz constitutifs du biogaz (méthane et dioxyde de carbone). Elle n’affecte pas particulièrement une classe de microorganismes. Par ailleurs, l’impact de la tylosine sur la production de méthane reste similaire à celui sur la production de biogaz, les pourcentages de baisses étant similaires. Aussi, la part de méthane dans le biogaz est quasi identique pour les réacteurs considérés. Ce qui confirme le faible impact de la spiramycine sur le taux de génération du méthane.

La figure IV.52 montre l’évolution du pourcentage de baisse sur la production totale de méthane en fonction des concentrations de tylosine.

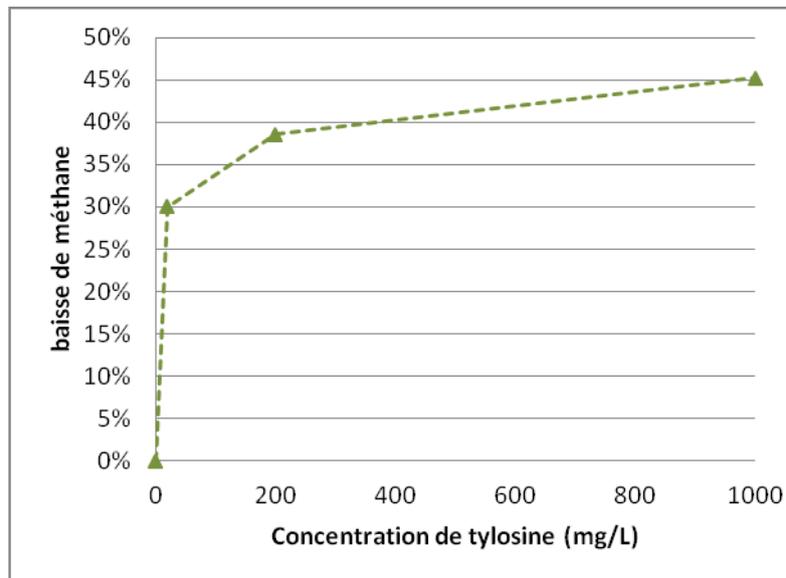


Figure IV.52 : Pourcentage final de baisse de méthane pour le test avec la tylosine

L'évolution comme constatée avec les autres antibiotiques n'est pas linéaire. On note une montée rapide de baisse pour les faibles concentrations de tylosine, qui contrairement aux autres antibiotiques tend à s'accroître lorsqu'on approche les concentrations élevées. En effet, il apparaît que l'augmentation de la concentration de tylosine de 20 à 200 mg/L (facteur 10) apporte 8% de baisse de volume supplémentaire, tandis que le passage de 200 à 1000 mg/L (facteur 5) apporte autant de baisse supplémentaire à hauteur de 7%.

L'effet de la tylosine au cours du temps est observable sur la figure IV.53 qui montre le volume cumulé de méthane pour chaque concentration testée.

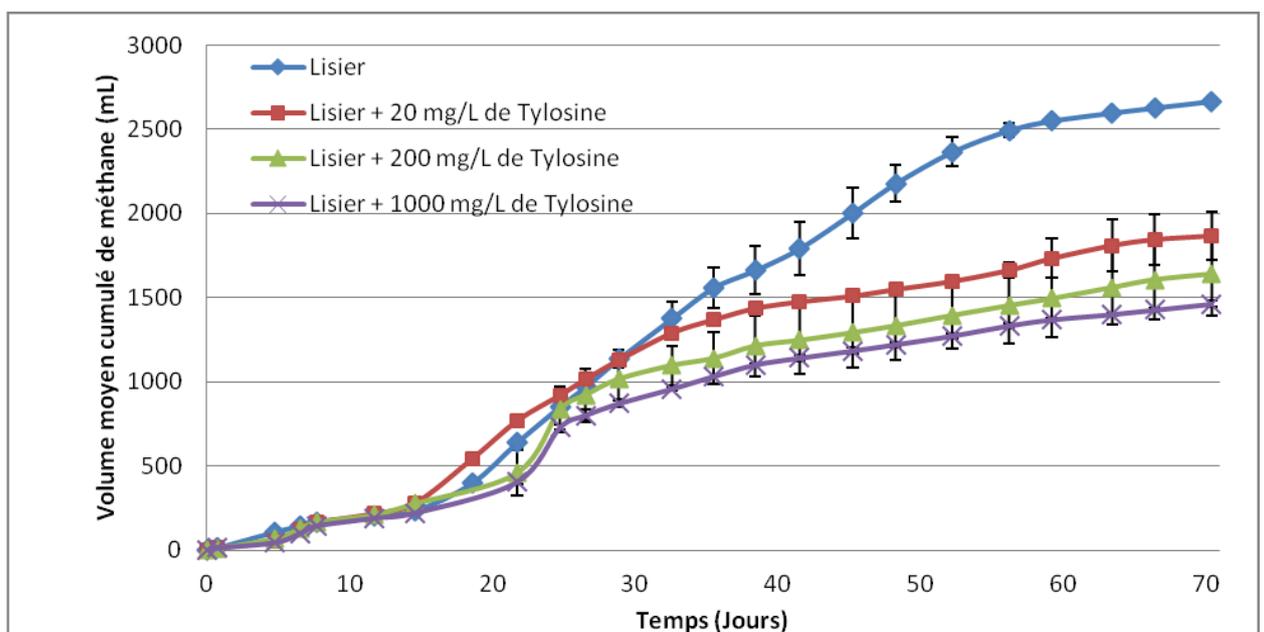


Figure IV.53 : Volume moyen cumulé de méthane pour les tests batch avec la tylosine

Le test témoin présente une phase d'acclimatation jusqu'au 15^{ème} jour, au bout de laquelle commence sa phase de production rapide qui dure jusqu'au 56^{ème} jour. Tout comme dans le cas du biogaz, les tests de tylosine présente un ralentissement du 1^{er} au 5^{ème} jour, mais rejoignent le profil du témoin dès le 8^{ème} jour où les tests à 200 et 1000 mg/L surpassent le témoin. Le test à 20 mg/L est le premier à montrer une phase de production rapide, mais ralentit à partir du 29^{ème} jour. Les tests à 200 et 1000 mg/L ne démarre leur production rapide qu'au 22^{ème}, et entament leur phase de ralentissement à partir du 25^{ème} jour.

Les concentrations testées pour la tylosine ont permis de mettre en évidence un ralentissement temporaire au début de la phase d'acclimatation des microorganismes, assimilable ainsi à un effet bactériostatique. L'effet observé pendant la phase de production rapide qui traduit un ralentissement plus marqué et plus long est assimilable à un effet de type bactéricide. En effet, lors de cette phase de production, le procédé ne revient pas à une production proche de celle du témoin après le ralentissement et a gardé la même pente.

L'évolution du pourcentage de baisse de méthane au cours de l'expérience (figure IV.54) montrent que la tylosine a conduit à une amélioration de la production pour 20 mg/L et 200 mg/L, dont le pic est observable vers le 20^{ème} jour. La production baisse ensuite progressivement pour atteindre sa valeur finale déjà au 48^{ème} jour pour toutes les concentrations.

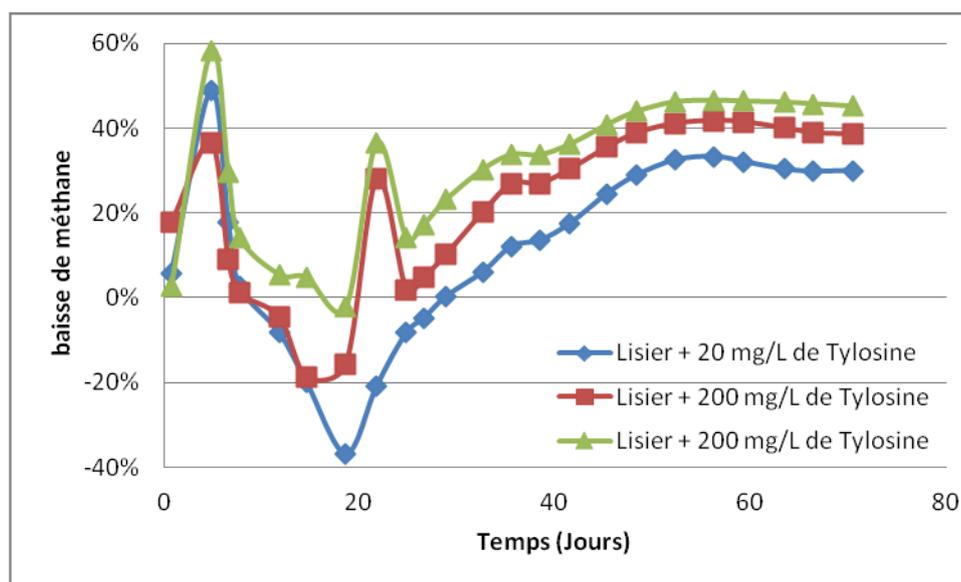


Figure IV.54 : Pourcentage de baisse de méthane pour le test avec la tylosine

La figure IV.55 qui affiche le temps nécessaire pour atteindre un volume donné, montre que les courbes sont identiques jusqu'à un objectif volumique de 500 mL. A partir de 750 mL, on note que le test à 1000 mg/L se décale, pour afficher au final un décalage de 37 jours pour un objectif de 1500 mL. S'en suivent le test à 200 mg/L qui affiche un décalage final de 32 jours, et le test à 20 mg/L qui affiche un décalage de 18 jours pour un volume objectif de 1750 mL. Plus la concentration de tylosine est élevée, plus le décalage survient plus vite et plus élevé il est.

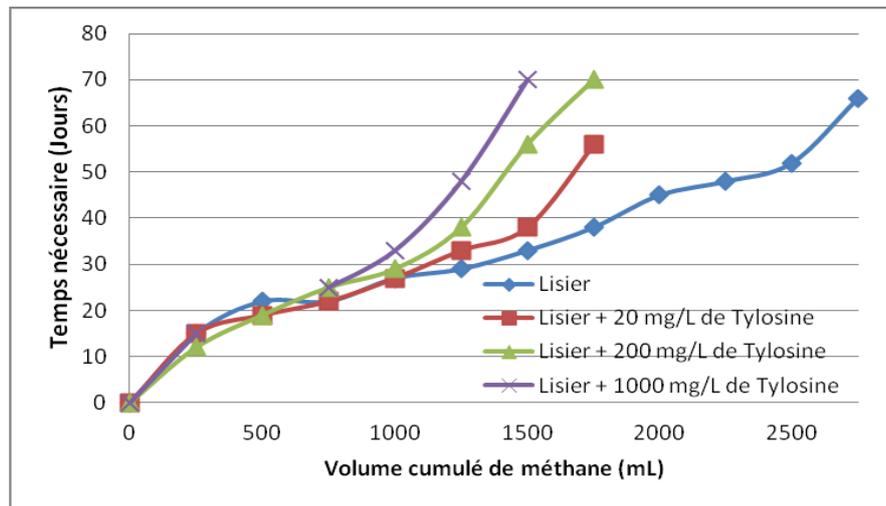


Figure IV.55 : Temps nécessaire pour atteindre un volume de méthane pour le test avec la tylosine

IV.2.3.5. Vitesses de production de méthane et profils de baisse de production

La figure IV.56 présente les vitesses de production de méthane exprimées en $\text{m}^3_{\text{CH}_4}$ par jour et par m^3 de réacteur et les pourcentages de baisse par rapport au témoin.

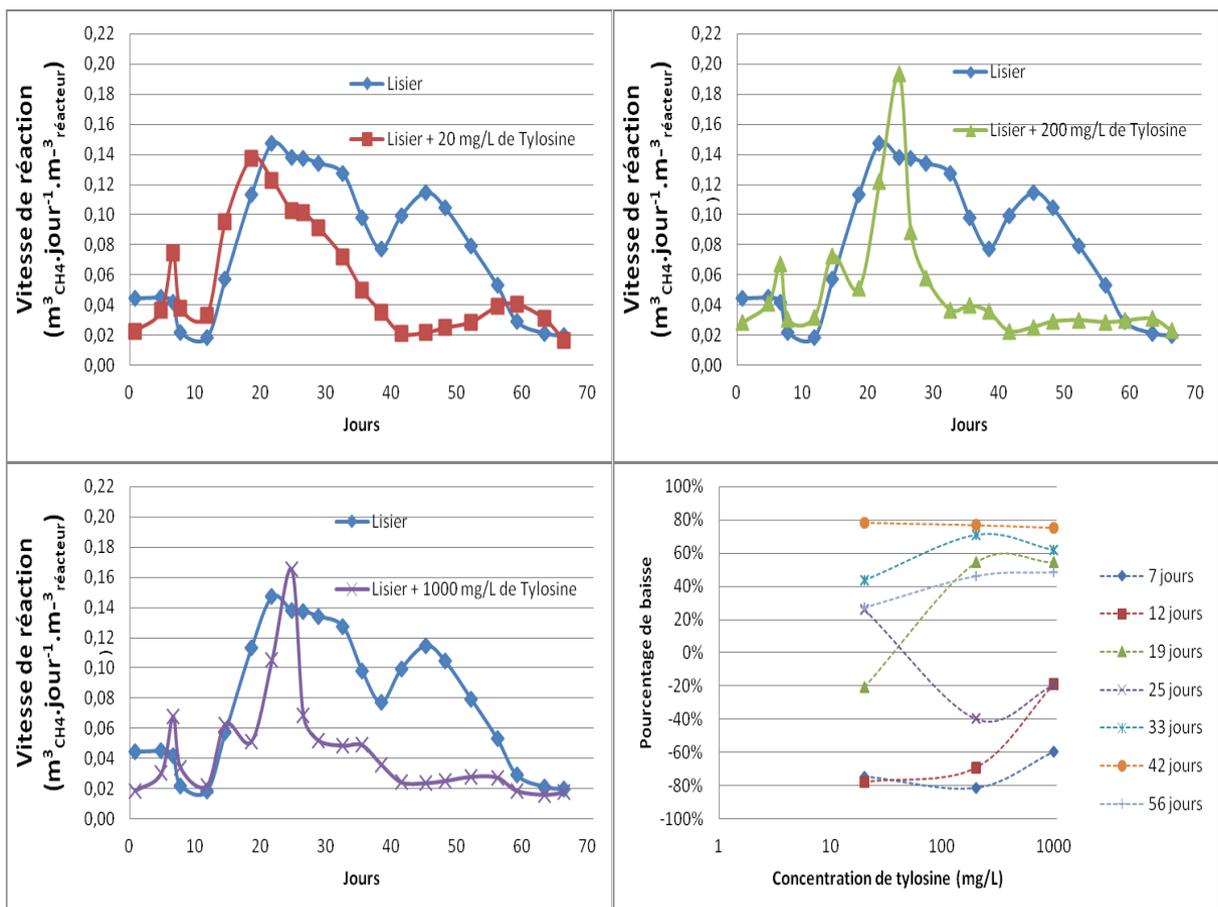


Figure IV.56 : Vitesses de production de méthane en $\text{m}^3_{\text{CH}_4}$ par jour et par m^3 de réacteur et pourcentages de baisse par rapport au témoin des tests batch de tylosine

La vitesse de production du profil témoin présente 4 pics, dont les 2^{ème} et 3^{ème} se chevauchent, qui correspondent à quatre phases réactionnelles de production. Pour toutes les concentrations, le 1^{er} pic améliore la production mais influence très peu le total puisque ce dernier se situe dans la phase d'acclimatation. A 20 mg/L de tylosine, les 2^{ème} et 3^{ème} pics surviennent légèrement plus tôt tout en étant inférieurs en intensité. Quant au 4^{ème} pic, il est totalement décalé vers la droite de 14 jours. A 200 mg/L et 1000 mg/L, le 2^{ème} pic est décalé vers la droite, et le 3^{ème} pic subit un décalage plus important qu'à 20 mg/L avec son intensité qui baisse considérablement. Le 4^{ème} pic présente à 200 mg/L un décalage plus important encore qu'à 20 mg/L, et n'est pas observable à 1000 mg/L. Il faut noter que pour ces 2 dernières concentrations, un pic supplémentaire est apparu entre les 1^{er} et 2^{ème} pic du témoin. La continuité observée pour le profil du témoin serait donc dû à une succession rapide de phases réactionnelles. La tylosine à 200 mg/L et 1000 mg/L a donc induit un retardement sur la phase réactionnelle du jour 19.

L'évolution des pourcentages de baisse montre qu'à 20 mg/L on atteint 25% de baisse à 25 jours et 45% à 33 jours. Pour les tests à 200 et 1000 mg/L, à 19 jours déjà, on atteint 46 – 48% d'inhibition, et une baisse comprise entre 60% et 70% à 33 jours. Les pics observés pour les tests à 200 et 1000 mg/L conduisent à des améliorations par rapport au témoin de 40% et 19% respectivement. En fin de phase de production, à 56 jours, la baisse est de 27% pour 20 mg/L alors qu'elle est à 46% et 48% pour 200 mg/L et 1000 mg/L respectivement.

La tylosine affecterait négativement donc les phases réactionnelles les moins intenses prioritairement, puis les plus importantes. On note en effet qu'à 20 mg/L, seule le 4^{ème} pic est affecté, alors que pour 200 mg/L et 1000 mg/L une phase réactionnelle de la production rapide est affectée.

IV.2.3.5. Conclusion partielle

Les tests effectués en batch avec la tylosine conduisent à des baisses de volume de biogaz de 31%, 36% et 45%, et de volume de méthane de 30%, 39% et 45% pour 20 mg/L, 200 mg/L et 1000 mg/L respectivement. Les baisses observées sont plus en accord avec les résultats de Sanz et al. (1996) et Shimada et al. (2008) qui notaient des baisses de performance des réacteurs entre 25 mg/L et 250 mg/L de tylosine. A concentrations égales, les impacts sur le méthane et le biogaz ne présentent pas de différence significative. Au vu des valeurs finales de pH, la baisse de production n'est pas concomitante à une acidification du milieu réactionnel ; le mécanisme d'action de la tylosine pourrait ne pas être le blocage de la méthanogenèse. Les études de Cheliapan et al. (2006) ont en effet montré que même à 800 mg/L, l'activité méthanogène persistait et n'affectait pas le rendement de méthane. En outre, on note sur le profil des volumes cumulés que la baisse provient du fort ralentissement de la phase de production rapide. La vitesse de production de cette phase étant liée à la disponibilité en monomères et l'hypothèse de l'inhibition des méthanogènes étant écartée, la tylosine agirait donc sur les bactéries fermentatives comme le mentionne Shimada et al. (2008). Par ailleurs, les vitesses de production

de méthane montrent que pour nos concentrations, la baisse de production résulte de la diminution en intensité voire de la suppression des phases réactionnelles. A 20 mg/L déjà, on observe que la première phase réactionnelle de production à 22 jours n'est pas affectée, contrairement aux phases qui la suivent. La première phase réactionnelle, même si elle est plus stable que les suivantes qui sont supprimées à 20 mg/L, est affectée aussi par une diminution ponctuelle à 200 mg/L et 1000 mg/L. Selon la concentration, la tylosine agirait donc à divers stades de la conversion en méthane.

IV.2.4. Comparaison des profils de baisse des antibiotiques en batch

Les antibiotiques testés en batch sont : la tétracycline qui fait partie de la famille des tétracyclines, et la spiramycine et la tylosine qui sont des macrolides. Ces antibiotiques possèdent le même mode d'action qui consiste à interférer avec la synthèse protéique des bactéries. Si les tétracyclines ont uniquement un effet bactériostatique, la spiramycine et la tylosine peuvent s'avérer bactéricide à forte concentration. Le tableau IV.24 résume les pourcentages de baisse observés sur les productions de biogaz et de méthane pour les concentrations des antibiotiques testées en fin d'expérience.

Tableau IV.24 : Pourcentages de baisse en biogaz et méthane pour les concentrations d'antibiotiques testées

Antibiotique - Concentration	Pourcentage de baisse de biogaz (%)	Pourcentage de baisse de méthane (%)
Tétracycline - 8 mg/L	22	23
Tétracycline - 16 mg/L	26	28
Tétracycline - 80 mg/L	34	37
Tétracycline - 160 mg/L	35	38
Spiramycine - 1,4 mg/L	4	5
Spiramycine - 14 mg/L	38	40
Spiramycine - 140 mg/L	36	36
Tylosine - 20 mg/L	31	30
Tylosine - 200 mg/L	36	39
Tylosine - 1000 mg/L	45	45

Les pourcentages de baisse de biogaz montrent qu'à 16 mg/L de tétracycline, on atteint 26% et qu'à 20 mg/L de tylosine on atteint 31% de baisse. Cependant, à 14 mg/L de spiramycine on atteint déjà 38% de baisse. La spiramycine affecte donc plus la production de biogaz aux plus faibles concentrations testées dans nos expériences. Lorsqu'on applique un facteur 10 à ces concentrations, on n'observe plus les précédentes disparités. Ainsi, à 160 mg/L de tétracycline,

140 mg/L de spiramycine et 200 mg/L de tylosine, on observe 35%, 36% et 36% de baisse respectivement.

Les pourcentages de baisse observés pour le méthane ne sont pas significativement différents (<5%) de ceux du biogaz. Ceci serait relié au fait que la présence d'antibiotiques influence très peu la teneur en méthane du biogaz. En effet, les antibiotiques inhibent les phases d'acidogénèse et d'acétogénèse alors que l'hydrolyse et la méthanogénèse fonctionnent (Delfosse, 2011). Ce qui a pour conséquence de diminuer la production de biogaz, sans que le milieu ne s'acidifie fortement puisque les méthanogènes encore actives transforment les acides produits. Comme dans le cas du biogaz, la spiramycine inhibe plus la production de méthane que la tétracycline et la tylosine aux faibles concentrations de nos expériences. 14 mg/L de spiramycine conduisent à une baisse de 40% alors que 16 mg/L de tétracycline baissent le volume de 28% et 20 mg/L de tylosine baissent le volume de méthane de 30%. Cette différence disparaît lorsque ces concentrations sont multipliées par 10, et on aboutit à des baisses de 36%, 38% et 39% respectivement.

La figure IV.57 présente les profils de baisse pour chaque antibiotique aux concentrations testées.

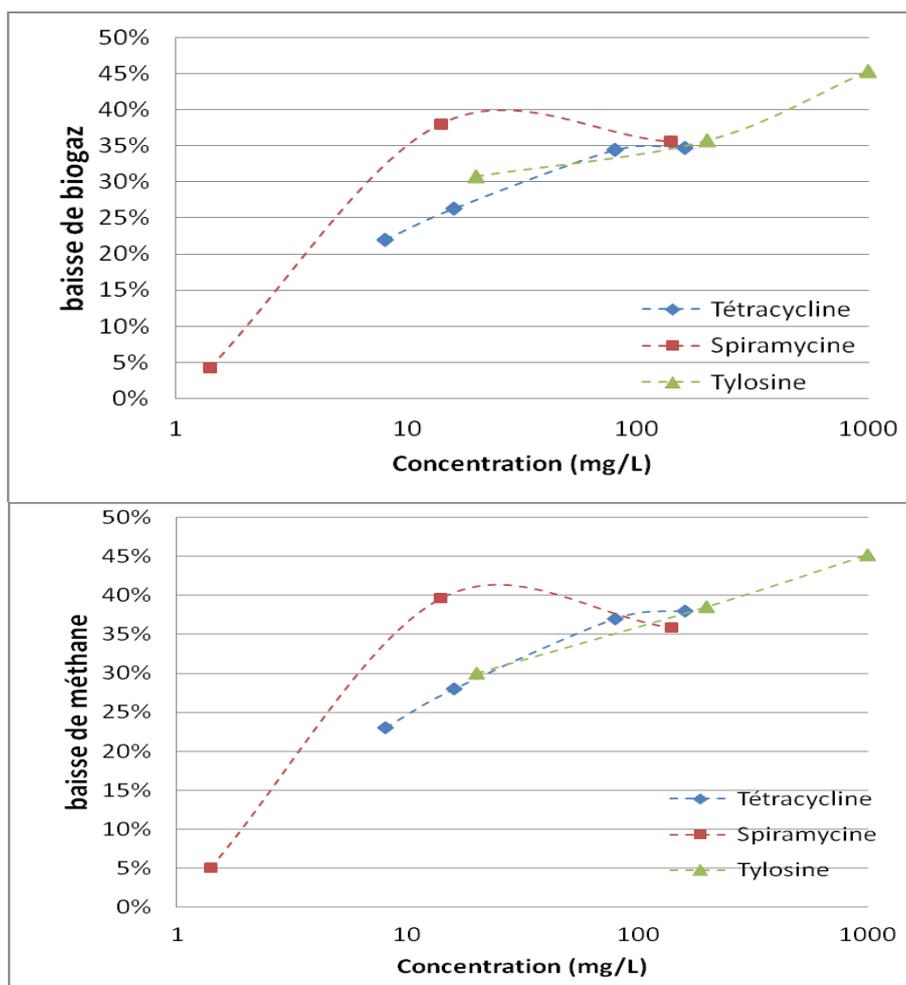


Figure IV.57 : Profils de baisse de production des antibiotiques aux concentrations testées en batch

La figure IV.57 montre que la spiramycine conduit aux plus fortes baisses de production de 0 à 14 mg/L pour le biogaz, mais son impact n'évolue plus au-delà de cette concentration. Le pourcentage de baisse de biogaz se situe autour de 35% pour 80 et 160 mg/L de tétracycline, 140 mg/L de spiramycine et 200 mg/L de tylosine. Comme mentionné précédemment, la baisse occasionnée par la spiramycine à 14 mg/L est plus importante que celle de la tétracycline jusqu'à 160 mg/L et celle de la tylosine jusqu'à 200 mg/L. Pour le méthane, les profils restent similaires à ceux du biogaz mais les tendances sont légèrement différentes. La spiramycine présente toujours la plus forte inhibition aux basses concentrations mais n'évolue plus entre 14 mg/L et 140 mg/L. Quant à la tétracycline et la spiramycine, elles s'inscrivent dans la même tendance jusqu'à 200 mg/L, avec des baisses en fonction de la concentration qui suivent une évolution quasi linéaire.

Conclusion générale et perspectives

Dans le but de trouver de meilleures conditions de fonctionnement pour un méthaniseur de ferme, nous avons dans notre travail étudié : la production de biogaz lors de la co-digestion de différents substrats utilisables toute l'année, la qualité du digestat du point de vue de la présence de micropolluants, et la baisse de la production de biogaz par la présence de micropolluants antibiotiques.

Des tests de co-digestion ont été réalisés avec le lisier bovin comme substrat principal. L'herbe (après ensilage), et les lactosérums de chèvre et de vache ont été utilisés comme co-substrats. Les tests de co-digestion avec l'herbe ensilée, avec un ratio massique herbe/lisier de 1/5, ont permis d'étudier l'effet de la durée d'ensilage sur les rendements de production du procédé. La caractérisation des substrats a permis de conclure que les conditions expérimentales étaient adéquates pour un bon déroulement de procédé. Néanmoins, les rendements finaux de production de méthane (exprimés en volume de CH₄ produit par masse de matière organique des substrats) au bout de 30 jours de suivi, montrent que l'ajout d'herbe ensilée à 3, 5 et 8 semaines conduit à une baisse par rapport au témoin de 16%, 30% et 17% respectivement. Seule l'incorporation de l'herbe ensilée pendant 36 semaines présente une amélioration du rendement du procédé de 20%. Cependant, les rendements obtenus avec l'herbe montrent qu'il existe une durée d'ensilage comprise entre 8 et 36 semaines avec un gain de production nul. A cette durée d'ensilage, il est possible de l'utiliser sans affecter significativement le procédé. Dans une logique de gestion des déchets, l'incorporation de l'herbe ensilée où le gain sera nul, est une alternative intéressante qui perturbe peu le procédé existant. Selon que l'objectif soit la valorisation des déchets organiques (optimiser la production de méthane) ou uniquement leur gestion efficace (éliminer les déchets disponibles sans créer d'accumulation), un temps d'ensilage compris entre 8 et 36 semaines sera conseillé pour assurer l'efficacité de la co-digestion anaérobie utilisant de l'herbe ensilée (sans additifs) comme co-substrat.

Les tests de co-digestion avec le lactosérum de chèvre réalisés sur une durée de 38 jours montrent qu'à 0,5 g/L et 2 g/L de lactose (la quantité de lisier restant la même, le lactosérum étant ajouté en plus), le volume de méthane produit est augmenté de 3% et 4% respectivement. Le test à 0,5 g/L de lactose est le seul à ne pas présenter une diminution du rendement de production (rendement qui tient compte de la quantité de MO totale, donc aussi de la quantité de MO du lactosérum ajouté) ; le gain de rendement est proche de 0%. Le test de co-digestion du lisier avec le lactosérum de vache, réalisé sur une plus longue durée de 80 jours, montre aussi que c'est la concentration de 0,5 g/L de lactose qui améliore le volume de méthane produit (5%). Une comparaison des tests avec les lactosérums de chèvre et de vache sur une même durée de 38 jours montre que le lactosérum conduit à une augmentation de volume de méthane de 3% et 4% respectivement à 0,5 g/L et 2 g/L de lactose pour le lactosérum de chèvre, alors qu'on observe une diminution de 7% et 20% pour 0,5 g/L et 2 g/L de lactose de vache.

L'essai de co-digestion simultanée réalisé sur 38 jours des trois substrats que sont le lisier bovin, l'herbe ensilée pendant 36 semaines et le lactosérum de chèvre conduit à des rendements de méthane plus faibles encore que dans les cas de co-digestion avec deux substrats (lisier+herbe ou lisier+lactose). La combinaison qui affecte le moins le rendement de méthane consiste à co-digérer le lisier bovin avec l'herbe ensilée et le lactosérum à 0,5 g/L. L'ajout de co-substrat rallonge la durée de démarrage de la production de méthane, qui correspond à la mise en place de la communauté microbienne. Cet effet de rallongement est d'autant plus prononcé que les trois substrats sont co-digérés simultanément. Par ailleurs, l'analyse des teneurs en métaux effectuée pour tous les tests de co-digestion montre que les digestats sont en accord avec la réglementation.

Concernant la deuxième partie qui traite de l'effet des micropolluants, les herbes de bordure de routes avoisinantes de la ferme, dont l'incorporation au digesteur est envisagée, ont été suivies. Le suivi des herbes récoltées en bordure de route en mai et septembre sur les années 2012 et 2013 montrent que les herbes coupées en septembre présentent une teneur en MS et un ratio C/N plus élevés que celles de mai. De plus, pour une même campagne d'échantillonnage (et pour chaque station), plus on s'éloigne du bord de la route, plus la teneur en MS et le ratio C/N augmente. En ces points éloignés, elles sont composées de jeunes herbes et d'herbes plus matures dont la présence s'expliquerait par les variations de largeurs de fauchage : 2 m en mai et sur toute la largeur en septembre. Sur l'ensemble des campagnes, les métaux lourds présentent des valeurs relativement faibles, qui, si ces herbes sont incorporées à un digesteur, n'affecteront pas la qualité du digestat. Comme observé pour la teneur en MS et le ratio C/N, pour chaque station d'une même campagne, la teneur en Manganèse et Nickel augmente pour la plupart des stations, à mesure que l'on s'éloigne de la bordure de route. En revanche, les concentrations en Plomb, Chrome et Aluminium, diminuent quand on s'éloigne de la route. Pour l'Arsenic, le zinc et le Cadmium, les évolutions ne sont pas significatives. Enfin, la concentration en Cuivre semble rester plus ou moins constante, sauf pour quelques points où les concentrations augmentent fortement lorsqu'on s'éloigne de la route. Les 16 HAPs prioritaires définis comme dangereux par l'U.S.EPA ont aussi été suivis. Les teneurs mesurées sont aussi bien en deçà des limites imposées par la réglementation. Les herbes en bordure de route ne représentent pas des composés problématiques pour la qualité sanitaire des digestats qui résulteraient de leur incorporation dans un digesteur anaérobie.

Dans cette deuxième partie concernant les micropolluants, différentes concentrations d'antibiotiques ont été étudiées. La tétracycline, la spiramycine et la tylosine ont été étudiés en réacteur batch, et les deux premières en réacteur continu. Quatre concentrations de tétracycline ont été testées en batch à savoir 8 mg/L, 16 mg/L, 80 mg/L et 160 mg/L. Elles ont conduit à des baisses finales de la production de méthane de 23%, 28%, 37% et 38% respectivement au bout de 68 jours. La tétracycline affecte négativement la phase de production rapide de méthane, mais son effet sur la phase d'acclimatation dépend de sa concentration. Sa présence a écourté cette phase pour 8 mg/L, alors qu'elle l'a rallongée pour 80 mg/L et 160 mg/L. La spiramycine a

entraîné en batch une baisse de production de méthane de 5%, 40% et 36% à 1,4 mg/L, 14 mg/L et 140 mg/L respectivement. Le profil du volume cumulé de méthane montre qu'elle n'induit pas de retard dans l'acclimatation des microorganismes, mais agit sur la phase de production rapide de méthane. On note cependant que les effets à 14 mg/L et 140 mg/L sont similaires malgré le facteur 10 entre ces deux concentrations. Les tests en batch avec la tylosine ont entraîné des baisses de production de méthane de 30%, 39% et 45% pour les concentrations de 20 mg/L, 200 mg/L et 1000 mg/L respectivement. La tylosine affecte négativement la phase de production rapide, alors que son effet sur la phase d'acclimatation varie selon les concentrations. En effet, on observe à 20 mg/L une amélioration de la production de méthane pendant l'acclimatation tandis qu'à 200 mg/L et 1000 mg/L, cette phase est retardée. Les profils des vitesses de réaction montrent pour la tétracycline et la spiramycine que la production de méthane est une succession de phases réactionnelles, et que la présence d'antibiotique diminue l'intensité de ces phases et retarde leur démarrage ou les supprime, selon les concentrations. On note cependant que le premier pic de la phase de production rapide est le moins affecté. Dans le cas de la tylosine, le premier pic de la phase de production rapide augmente en intensité à 200 et 1000 mg/L, mais les pics suivants sont diminués et/ou décalés.

L'étude de l'effet de la tétracycline en réacteur continu montre une amélioration d'environ 5% de la production de méthane pour 0,2 mg/L et 2 mg/L. A 20 mg/L, on observe une baisse d'environ 10%, mais temporaire car au bout de 7 jours le système récupère. En revanche, à 200 mg/L et 2000 mg/L, on assiste à une baisse de production qui atteint 30% et 40% respectivement, et le procédé ne récupère pas après une semaine. La spiramycine en réacteur continu à 1,4 mg/L, 14 mg/L et 140 mg/L conduit à une baisse de 14%, 24% et 39% respectivement. Au 7^{ème} jour après ajout des concentrations, une baisse résiduelle est toujours observable. Le procédé affiche une récupération de 10% environ à 1,4 mg/L et de 15% environ à 14 mg/L et 140 mg/L. Suite à l'analyse des digestats issus des tests en continu avec la tétracycline et la spiramycine, le cadmium et l'arsenic n'ont pas été détectés. Les autres métaux lourds analysés montrent que le digestat résultant des expériences est en accord avec la législation.

Perspectives

Les tests de co-digestion qui encouragent l'utilisation d'herbe ensilée (durée allant de 8 à 36 semaines) ayant été réalisés en batch, il serait intéressant de poursuivre l'étude avec un système fonctionnant en continu. La conduite d'une telle expérience pourrait permettre à terme de déterminer un programme de chargement du digesteur en herbe. En effet, on peut supposer logiquement que l'apport en continu d'herbe pourrait à terme conduire à un ratio C/N trop élevé, et entraîné une faillite du procédé.

Dans une logique de gestion optimale des déchets provenant des activités de la ferme, il faudrait également s'intéresser à l'incorporation au méthaniseur des eaux de lavage issues de l'activité fromagère. Ces eaux sont chargées en matière organique et représentent un bon sujet pour la méthanisation, mais leur fort pouvoir fermentescible et la présence éventuelle de métaux lourds peuvent très vite devenir problématiques pour la conduite du procédé.

L'incorporation des déchets organiques issus des activités avoisinantes de la ferme, notamment les fumiers issus de club hippiques, est à envisager aussi.

Concernant les antibiotiques, les expériences réalisées en batch ont permis de déterminer si les antibiotiques affectaient ou pas la phase de mise en place des microorganismes et/ou la phase de production rapide de méthane. Ces deux étapes ne constituant pas des phases distinctes de la digestion anaérobie, il serait utile de considérer d'autres paramètres de suivi pour mieux cibler les différentes phases réactionnelles cause des baisses observées. Cela pourrait intégrer le suivi de l'évolution des acides gras volatiles et du FOS/TAC qui sont des paramètres clés pour l'équilibre entre les phases réactionnelles et pour la production de méthane. La digestion anaérobie étant un procédé mettant en œuvre tant des équilibres chimiques que des réactions biologiques, une autre alternative pour une meilleure compréhension du mode d'action des antibiotiques sur les phases réactionnelles pourrait être le suivi des microorganismes. Ces paramètres permettraient de détecter une éventuelle accumulation de sous-produits lors de la digestion et d'observer les changements éventuels dans la communauté microbienne.

A partir des observations réalisées sur les effets des antibiotiques testés, une implémentation dans le modèle ADM1, développé par l'International Water Association, pourrait être effectuée. Le modèle modifié en découlant, pourrait permettre une meilleure prédiction de la production de méthane en prenant en compte la présence des antibiotiques. Pour limiter les écarts de ce modèle avec l'expérimental, il est important d'étudier les effets des antibiotiques selon d'autres méthodologies que celles utilisées pendant notre thèse pour apporter des informations complémentaires. Cette étude suppose qu'il faudrait étudier tous les antibiotiques utilisés sur la ferme, que ce soit séparément ou en mélange. En effet, nos expériences ont évalué distinctement l'effet des antibiotiques sur la production de méthane, mais ces antibiotiques sont souvent présents simultanément dans le lisier puisque les opérations de médication ne concernent pas toujours une seule pathologie, ou nécessitent pour la même pathologie plusieurs molécules différentes. Il serait donc intéressant d'étudier (en batch et en continu) l'effet simultané des antibiotiques les plus utilisés sur la ferme, dans les concentrations qui y sont appliquées. Cette expérience permettrait de déceler les effets « cocktail » induits par les antibiotiques. Pour connaître la durée des effets, il faudrait observer aussi le temps de récupération du système pour des concentrations qui conduiraient à une baisse de production. Une attention particulière devrait être portée à la colistine qui est un antibiotique figurant parmi les plus utilisés sur la ferme (et en Europe) et qui est caractérisé par une bactéricidie rapide.

Références bibliographiques

- Angelidaki, I., Ahring, B., 1995. Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic (55-degrees-c) enrichment culture degrading long-chain fatty-acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2442–2445.
- Angelidaki, I., Ahring, B., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature. *Water Res.* 28, 727–731. doi:10.1016/0043-1354(94)90153-8
- Angenent, L.T., Mau, M., George, U., Zahn, J.A., Raskin, L., 2008. Effect of the presence of the antimicrobial tylosin in swine waste on anaerobic treatment. *Water Res.* 42, 2377–84. doi:10.1016/j.watres.2008.01.005
- Arikan, O. a., Sikora, L.J., Mulbry, W., Khan, S.U., Rice, C., Foster, G.D., 2006. The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves. *Process Biochem.* 41, 1637–1643. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.010
- Arikan, O., Mulbry, W., Ingram, D., Millner, P., 2009. Minimally managed composting of beef manure at the pilot scale: effect of manure pile construction on pile temperature profiles and on the fate of oxytetracycline and chlortetracycline. *Bioresour. Technol.* 100, 4447–53. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.063
- Aslanzadeh, S., Taherzadeh, M.J., Horvath, I.S., 2011. Pretreatment of straw fraction of manure for improved biogas production. *Bioresources* 6, 5193–5205.
- Astals, S., Nolla-Ardèvol, V., Mata-Alvarez, J., 2012. Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: biogas and digestate. *Bioresour. Technol.* 110, 63–70. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.080
- Atandi, E., Rahman, S., 2012. Prospect of anaerobic co-digestion of dairy manure: a review. *Environ. Technol. Rev.* 1, 127–135. doi:10.1080/09593330.2012.698654
- Bagge, E., Sahlström, L., Albiñ, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39, 4879–86. doi:10.1016/j.watres.2005.03.016
- Balussou, D., Kleyböcker, A., McKenna, R., Möst, D., Fichtner, W., 2012. An economic analysis of three operational co-digestion biogas plants in Germany. *Waste and Biomass Valorization* 3, 23–41. doi:10.1007/s12649-011-9094-2
- Barret, M., Barcia, G.C., Guillon, a., Carrère, H., Patureau, D., 2010a. Influence of feed characteristics on the removal of micropollutants during the anaerobic digestion of contaminated sludge. *J. Hazard. Mater.* 181, 241–247. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.05.003
- Barret, M., Carrère, H., Delgadillo, L., Patureau, D., 2010b. PAH fate during the anaerobic digestion of contaminated sludge: Do bioavailability and/or cometabolism limit their biodegradation? *Water Res.* 44, 3797–3806. doi:10.1016/j.watres.2010.04.031

- Béline, F., Daumer, M.L., Guiziou, F., 2004. Biological aerobic treatment of pig slurry in France: nutrients removal efficiency and separation performances. *Transactions of the ASAE* 47 (3), 857.
- Benabdallah El-Hadj, T., Dosta, J., Mata-Alvarez, J., 2006. Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Water Sci. Technol.* 53, 99–107.
- Bender, A., Breves, G., Stein, J., Leonhard-Marek, S., Schröder, B., Winckler, C., 2001. Colonic fermentation as affected by antibiotics and acidic pH: Application of an in vitro model. *Z. Gastroenterol.* 39, 911–8. doi:10.1055/s-2001-18537
- Bertin, L., Grilli, S., Spagni, A., Fava, F., 2013. Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. *Bioresour. Technol.* 128, 779–83. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.118
- Bjornsson, L., Murto, M., Mattiasson, B., 2000. Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 844–849.
- Boone, D.R., Xun, L., 1987. Effects of pH, Temperature, and Nutrients on Propionate Degradation by a Methanogenic Enrichment Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1589–92.
- Boxall, A.B.A., 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO Rep.* 5, 1110–6. doi:10.1038/sj.embor.7400307
- Boxall, A.B.A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol. Lett.* 131, 19–28. doi:10.1016/S0378-4274(02)00063-2
- Burton C. H. et Turner C. (2003). *Manure management - Treatment strategies for sustainable agriculture*. 451 pages.
- Callaghan, F.J., Wase, D.A.J., Thayanithy, K., Forster, C.F., 1999. Co-digestion of waste organic solids: batch studies. *Bioresour. Technol.* 67, 117–122. doi:10.1016/S0960-8524(98)00108-4
- Chang, B., Shiung, L., Yuan, S., 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* 48, 717–724. doi:10.1016/S0045-6535(02)00151-0
- Chang, B.V., Chang, I.T., Yuan, S.Y., 2008. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 145–149. doi:10.1007/s00128-007-9333-1
- Chelliapan, S., Wilby, T., Sallis, P.J., Effect of hydraulic retention time on up-flow anaerobic stage reactor performance at constant loading in the presence of antibiotic tylosin. *Brazilian J. Chem. Eng.* 28, 51–61.
- Chen, Y., Zhang, H., Luo, Y., Song, J., 2012. Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in East China. *Chinese Sci. Bull.* 57, 606–614. doi:10.1007/s11434-011-4830-3

- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–60 ; second page, table of contents. doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Christensen, N., Batstone, D.J., He, Z., Angelidaki, I., Schmidt, J.E., 2004. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from sewage sludge by anaerobic degradation. *Water Sci. Technol.* 50, 237–244.
- Comino, E., Riggio, V.A., Rosso, M., 2012. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. *Bioresour. Technol.* 114, 46–53. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.090
- De Liguoro, M., Cibin, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C., 2003. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52, 203–12. doi:10.1016/S0045-6535(03)00284-4
- De Moor, S., Velghe, F., Wierinck, I., Michels, E., Ryckaert, B., De Vocht, A., Verbeke, W., Meers, E., 2013. Feasibility of grass co-digestion in an agricultural digester, influence on process parameters and residue composition. *Bioresour. Technol.* 150, 187–94. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.011
- De Vries, J.W., Vinken, T.M.W.J., Hamelin, L., De Boer, I.J.M., 2012. Comparing environmental consequences of anaerobic mono- and co-digestion of pig manure to produce bio-energy--a life cycle perspective. *Bioresour. Technol.* 125, 239–48. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.124
- Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S.,. Antibiotic degradation during manure composting. *J. Environ. Qual.* 37, 1245–53. doi:10.2134/jeq2007.0399
- Du, L., Liu, W., 2011a. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 309–327. doi:10.1007/s13593-011-0062-9
- Du, L., Liu, W., 2011b. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 309–327. doi:10.1007/s13593-011-0062-9
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1981. Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11, 29–45
- Feinman, S.E. and Matheson III, J.C. 1978. Draft environmental impact statement subtherapeutic antibacterial agents in animal feeds. Bureau of Veterinary Medicine. Rockville, MD: Food and Drug Administration.
- Gallert, C., Bauer, S., Winter, J., 1998. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 495–501.
- Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R., Kuemmerer, K., 2007. Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests. *Chemosphere* 67, 604–613. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.08038
- Gerardi, M., 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. Wiley-Interscience, New York

- Gourlay, C., 2004. Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique 1–2112.
- Guo, J., Ostermann, A., Siemens, J., Dong, R., Clemens, J., 2012. Short term effects of copper, sulfadiazine and difloxacin on the anaerobic digestion of pig manure at low organic loading rates. *Waste Manag.* 32, 131–136. doi:10.1016/j.wasman.2011.07.031
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J., 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 263–71. doi:10.1007/s00244-001-0017-2
- Hartmann, H., Ahring, B.K., 2005. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: influence of co-digestion with manure. *Water Res.* 39, 1543–52. doi:10.1016/j.watres.2005.02.001
- Hassan, A.N., Nelson, B.K., 2012. Invited review: anaerobic fermentation of dairy food wastewater. *J. Dairy Sci.* 95, 6188–203. doi:10.3168/jds.2012-5732
- Hedge, G., Pullammanappallil, P., 2007. Comparison of thermophilic and mesophilic one-stage, batch, high- solids anaerobic digestion. *Environ. Technol.* 28, 361–369
- Hermann, B.G., Debeer, L., De Wilde, B., Blok, K., Patel, M.K., 2011. To compost or not to compost: Carbon and energy footprints of biodegradable materials' waste treatment. *Polym. Degrad. Stab.* 96, 1159–1171. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.026
- Holbrook, R.D., Massie, K.A., Novak, J.T., 2005. A Comparison of Membrane Bioreactor and Conventional-Activated-Sludge Mixed Liquor and Biosolids Characteristics. *Water Environ. Res.* 77, 323–330. doi:10.2175/106143005X51905
- 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 Res.* 44, 3225–3233. doi:10.1016/j.watres.2010.03.004
- Ilani, T., Schulz, E., Chefetz, B., Interactions of organic compounds with wastewater dissolved organic matter: Role of hydrophobic fractions. *J. Environ. Qual.* 34, 552–562.
- Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., 2006. Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1164–74. doi:10.1007/s00216-005-0261-9
- Jin, H., Chang, Z., 2011. Distribution of heavy metal contents and chemical fractions in anaerobically digested manure slurry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 268–282. doi:10.1007/s12010-010-9133-7
- Kanfer, I., Skinner, M.F., Walker, R.B., 1998. Analysis of macrolide antibiotics. *J. Chromatogr. A* 812, 255–286. doi:10.1016/S0021-9673(98)00276-3
- Kim, M., Gomec, C., Ahn, Y., Speece, R., 2003. Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Environ. Technol.* 24, 1183–1190.

- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W., Lester, J.N., 2005. The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere* 61, 1221–30. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.043
- Lehtomäki, a, Björnsson, L., 2006. Two-stage anaerobic digestion of energy crops: methane production, nitrogen mineralisation and heavy metal mobilisation. *Environ. Technol.* 27, 209–218. doi:10.1080/09593332708618635
- Lehtomaki, A., Huttunen, S., Rintala, J.A., 2007. Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. *Resour. Conserv. Recycl.* 51, 591–609. doi:10.1016/j.resonrec.2006.11.004
- Lindorfer, H., Corcoba, A., Vasilieva, V., Braun, R., Kirchmayr, R., 2008. Doubling the organic loading rate in the co-digestion of energy crops and manure--a full scale case study. *Bioresour. Technol.* 99, 1148–56. doi:10.1016/j.biortech.2007.02.033
- Lindorfer, H., Pérez López, C., Resch, C., Braun, R., Kirchmayr, R., 2007. The impact of increasing energy crop addition on process performance and residual methane potential in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 56, 55–63. doi:10.2166/wst.2007.728
- Liu, L., Roets, E., Hoogmartens, J., 1997. 3iquid chromatography of spiramycin on poly(styrene-divinylbenzene). *J. Chromatogr. A* 764, 43–53. doi:10.1016/S0021-9673(96)00876-X
- Liu, L., Saevels, J., Louis, P., Nelis, H., Rico, S., Dierick, K., Guyomard, S., Roets, E., Hoogmartens, J., 1999. Interlaboratory study comparing the microbiological potency of spiramycins I, II and III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 217–224. doi:10.1016/S0731-7085(99)00024-2
- Liu, T., Sung, S., n.d. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *WATER Sci. Technol.* 45, 113–120.
- Liu, X., Liu, H., Chen, J., Du, G., Chen, J., 2008. Enhancement of solubilization and acidification of waste activated sludge by pretreatment. *Waste Manag.* 28, 2614–22. doi:10.1016/j.wasman.2008.02.001
- Loftin, K. a, Adams, C.D., Meyer, M.T., Surampalli, R., 2008. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. *J. Environ. Qual.* 37, 378–86. doi:10.2134/jeq2007.0230
- Loftin, K. a, Henny, C., Adams, C.D., Surampali, R., Mormile, M.R., 2005. Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 782–788. doi:10.1897/04-093R.1
- Loke, M.-L., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J., 2000. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* 40, 759–765. doi:10.1016/S0045-6535(99)00450-6
- Louvet, J.-N., Heluin, Y., Attik, G., Dumas, D., Potier, O., Pons, M.-N., 2010. Assessment of erythromycin toxicity on activated sludge via batch experiments and microscopic techniques (epifluorescence and CLSM). *Process Biochem.* 45, 1787–1794. doi:10.1016/j.procbio.2010.03.036

- Luna-delRisco, M., Orupöld, K., Dubourguier, H.C., 2011. Particle-size effect of CuO and ZnO on biogas and methane production during anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater.* 189, 603–608. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.02.085
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473-474, 619–41. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 45, 540–555. doi:10.1016/j.rser.2015.02.032
- Marañón, E., Castrillón, L., Quiroga, G., Fernández-Nava, Y., Gómez, L., García, M.M., 2012. Co-digestion of cattle manure with food waste and sludge to increase biogas production. *Waste Manag.* 32, 1821–5. doi:10.1016/j.wasman.2012.05.033
- Massé, D., Saady, N., Gilbert, Y., 2014. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals* 4, 146–163. doi:10.3390/ani4020146
- Marcato, C.E., Pinelli, E., Pouech, P., Winterton, P., Guisresse, M., 2008. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. *Bioresour. Technol.* 99, 2340–2348. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.013
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M.S., Fonoll, X., Peces, M., Astals, S., 2014. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 412–427. doi:10.1016/j.rser.2014.04.039
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* 74, 3–16. doi:10.1016/S0960-8524(00)00023-7
- Maxin, C.R., Kogel-Knabner, I., 1995. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) to water-soluble soil organic matter. *Eur. J. Soil Sci.* 46, 193–204. doi:10.1111/j.1365-2389.1995.tb01827.x
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concepts. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 522-550
- Moletta, R. (2002). La digestion anaérobique des déchets municipaux. *L'eau, l'industrie, les nuisances* (257):75-82.
- Moletta, R., 2008. Méthanisation de la biomasse. *Tech. l'ingénieur* 1–21.
- Moletta, R., 2011. *La méthanisation* (2e ed.). Lavoisier.
- Moorhead, K.K., Nordstedt, R.A., 1993. Batch anaerobic digestion of water hyacinth: Effects of particle size, plant nitrogen content, and inoculum volume. *Bioresour. Technol.* 44, 71–76. doi:10.1016/0960-8524(93)90211-S

- Mosey, F., Fernandes, X., 1989. Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic-digestion of milk-sugars. *WATER Sci. Technol.* 21, 187–196.
- Mourier, P., Brun, A., 1997. Study of the metabolism of spiramycin in pig liver. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 704, 197–205. doi:10.1016/S0378-4347(97)00477-5
- Mrozik, a, P, 2003. Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish J. Environ. Stud.* 12, 15–25.
- Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A.K., Rubindamayugi, M.S.T., Mattiasson, B., 2006. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renew. Energy* 31, 2385–2392. doi:10.1016/j.renene.2005.10.015
- Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2009. Co-digestion of cow manure, food waste and intermittent input of fat. *Bioresour. Technol.* 100, 1957–62. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.030
- Nonaka, C.K. V., Oliveira, A.M.G., Paiva, C.R., 2012. Occurrence of antimicrobial residues in Brazilian food animals in 2008 and 2009 29, 526–534.
- Palmisano, A.C. & Barlaz, M.A. (1996) *Microbiology of solid waste. CRC Press.* 224 p.
- Parawira, W., Read, J.S., Mattiasson, B., Björnsson, L., 2008. Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 32, 44–50. doi:10.1016/j.biombioe.2007.06.003
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 2011. *Kinetics of Anaerobic Treatment.*
- Potier O., Louvet JN, Merlin C, Pons MN, Dumas D, and Goldstein W. E., 2014. Effect of Antibiotics on Biological Wastewater Treatment Processes. *Pharmaceutical Accumulation in the Environment: Prevention, Control, Health Effects, and Economic Impact*, CRC Press.
- Pullammanappalil, S., Honjas, B., Unruh, J., & Monastero, F. (2001). Use of advance data processing techniques in the imaging of the Coso geothermal field, paper presented at 26th Workshop on Geothermal Reservoir Engineering.
- Raber, B., Kögel-Knabner, I., 2008. Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Eur. J. Soil Sci.* 48, 443–455. doi:10.1111/j.1365-2389.1997.tb00210.x
- Robra, S., Serpa da Cruz, R., de Oliveira, A.M., Neto, J.A.A., Santos, J.V., 2010. Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. *Biomass and Bioenergy* 34, 1330–1335. doi:10.1016/j.biombioe.2010.04.021
- Rubinstein, E., 1998. Spiramycin renaissance. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 572–576. doi:10.1093/jac/42.5.572
- Sahlström, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 87, 161–166. doi:10.1016/S0960-8524(02)00168-2

- Samanta, S.K., Singh, O. V, Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–248. doi:10.1016/S0167-7799(02)01943-1
- Sánchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., Martín, A., 2000. Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure. *Bioprocess Eng.* 22, 0247–0252. doi:10.1007/s004490050727
- Sanz, J.L., Rodríguez, N., Amils, R., 1996. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 587–592. doi:10.1007/s002530050865
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. a, 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- Shimada, T., Zilles, J.L., Morgenroth, E., Raskin, L., 2008. Inhibitory effects of the macrolide antimicrobial tylosin on anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 73–82. doi:10.1002/bit.21864
- Tchobanoglous, G., Crites, R. (Eds.), 2003. *Wastewater Engineering (Treatment Disposal Reuse)*, fourth ed. Metcalf & Eddy, Inc. McGraw-Hill, NY.
- Thamsiriroj, T., Nizami, a. S., Murphy, J.D., 2012. Why does mono-digestion of grass silage fail in long term operation? *Appl. Energy* 95, 64–76. doi:10.1016/j.apenergy.2012.02.008
- Thiele-Bruhn, S., 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166, 145–167. doi:10.1002/jpln.200390023
- Thiele, J.H. (1991). Mixed-culture interactions in methanogenesis. In : *Mixed Cultures in Biotechnology*, Zeikus, J.G., et Johnson, E.A. (Eds.), The McGraw-Hill Environmental Biotechnology Series (Vol 1), 260-292
- Trably, E., Patureau, D., Delgenes, J., n.d. Enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons removal during anaerobic treatment of urban sludge. *WATER Sci. Technol.* 48, 53–60.
- Wang, J., Wang, J.Q., Bu, D.P., Guo, W.J., Song, Z.T., Zhang, J.Y., 2010. Effect of storing total mixed rations anaerobically in bales on feed quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* 161, 94–102. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.08.004
- Wang, X., Yang, G., Feng, Y., Ren, G., Han, X., 2012. Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. *Bioresour. Technol.* 120, 78–83. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.058
- Wei, X., Wu, S.C., Nie, X.P., Yediler, A., Wong, M.H., 2009. The effects of residual tetracycline on soil enzymatic activities and plant growth. *J. Environ. Sci. Health. B.* 44, 461–71. doi:10.1080/03601230902935139
- Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–60. doi:10.1007/s00253-009-2246-7

- Weinberg, Z.G., Ashbell, G., 2003. Engineering aspects of ensiling. *Biochem. Eng. J.* 13, 181–188. doi:10.1016/S1369-703X(02)00130-4
- Winckler, C., Grafe, A., 2001. Use of veterinary drugs in intensive animal production: evidence for persistence of tetracyclines in pig slurry. *J. Soils Sed.* 1, 66–70
- Woolford, M.K., 1990. The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 101–116. doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x
- Xie, S., Lawlor, P.G., Frost, J.P., Hu, Z., Zhan, X., 2011. Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage. *Bioresour. Technol.* 102, 5728–5733. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.009
- Yamamoto, H., Liljestrand, H.M., Shimizu, Y., Morita, M., 2003. Effects of Physical–Chemical Characteristics on the Sorption of Selected Endocrine Disruptors by Dissolved Organic Matter Surrogates. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2646–2657. doi:10.1021/es026405w
- Yu, H., 2002. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1359–1365. doi:10.1016/S0360-3199(02)00073-3
- Zhang, L., Yin, J., Liu, L., Zang, L., n.d. Mesophilic two-phase anaerobic digestion of waste activated sludge with different VS contents. 2009 3RD Int. Conf. Bioinforma. Biomed. Eng. VOLS 1-11 4874–4877.
- Zhu, P., Chen, D., Liu, W., Zhang, J., Shao, L., Li, J., Chu, J., 2014. Hydroxylation and hydrolysis: two main metabolic ways of spiramycin I in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 153, 95–100. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.073

Annexes

A.1. Acid Detergent Fibers

Le réactif utilisé pour la digestion est une solution digestive obtenue en dissolvant 20 g de bromure de cétyl-triméthylammonium (CTAB) dans 1 L d'acide sulfurique à 1,00 N. Il est conseillé d'agiter et de chauffer la solution pour faciliter la dissolution du CTAB. Les herbes sont coupées au ciseau en fragments de 2 mm environ.

La procédure suivie est la suivante :

- Utiliser le marqueur résistant pour nommer les sacs, peser le sac (P_1) et tarer la balance. Il n'est pas utile de sécher les sacs à l'étuve car toute humidité sera prise en compte par le calcul de correction par le témoin (sac sans échantillon)
- Peser 0,45 à 0,55 g d'échantillon dans le sac (P_2), en évitant de mettre d'avoir de l'échantillon dans les 4 mm du haut du sac
- Sceller le sac avec la thermoscelleuse
- Peser un sac vide et l'inclure dans la série d'analyse pour déterminer le facteur de correction C_1
- Placer les sacs (24 au maximum) sur les supports d'analyse. Il est conseillé d'utiliser tous les neuf supports quel que soit le nombre de sacs. Placer trois sacs par support, et empiler les supports sur la tige centrale
- Insérer la structure dans l'appareil de digestion et placer la masse métallique au dessus pour assurer l'immersion des sacs
- Ajouter 1900 à 2000 mL de solution digestive à température ambiante pour les 24 sacs. Si moins de 20 sacs sont analysés, ajouter 100 mL de solution par sac analysé. Veiller néanmoins à utiliser un minimum de 1500 mL pour assurer l'immersion des supports d'analyse
- Activer l'agitation et le chauffage de l'appareil de digestion, et vérifier que l'agitation fonctionne
- Régler le compte à rebours sur 60 min et fermer le couvercle de l'appareil
- A la fin de l'extraction, arrêter l'agitation et le chauffage, ouvrir la vanne de purge (doucement au début) et vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle. La solution dans l'appareil est sous pression, et il est plus sécurisant de libérer la surpression et de vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle.
- Ajouter 1900 mL à 2000 mL d'eau à 70 – 90 °C pour le rinçage. Activer l'agitation et le chauffage, fermer le couvercle et attendre 5 min. Répéter deux fois le rinçage, l'objectif étant que l'eau ayant servi au rinçage soit à pH neutre

- Récupérer les sacs d'échantillon, et presser doucement pour retirer l'eau en excès
- Placer les sacs dans un bécher de 250 mL, les couvrir d'acétone, et laisser tremper pendant 3 à 5 minutes
- Retirer les sacs de l'acétone et les placer sur une grille pour évaporer l'acétone à l'air
- Sécher les sacs à l'étuve à 102±2 °C (la plupart des étuves effectuent le séchage en 2 – 4 heures)
- Retirer les sacs de l'étuve, les mettre dans une poche pliable de déshydratant, et aplatir pour évacuer l'air. Il est déconseillé d'utiliser un dessiccateur classique.
- Laisser refroidir et peser les sacs (P₃).

Le pourcentage des fibres est obtenu en appliquant la formule qui suit :

$$\% ADF = \frac{(P_3 - (P_1 \times C_1))}{P_2} \times 100$$

Avec,

P₁ : Masse du sac vide

P₂ : Masse d'échantillon

P₃ : Masse sèche du sac après extraction

C₁ : Facteur de correction du sac témoin (la masse après analyse divisée par la masse originale). Un facteur supérieur à 1,0000 indique des pertes d'échantillon contenu dans les sacs.

A.2. Neutral Detergent Fibers

Les réactifs utilisés pour l'analyse sont : une solution de détergent neutre acquise chez ANKOM Technology® (vérifier que le pH est entre 6,9 et 7,1), de l'alpha-amylase thermostable à activité 17 400 unités liquefon / mL acquise chez Laboratoires Humeau®, et du sulfite de sodium anhydre acquis chez ANKOM Technology®. Les herbes sont coupées au ciseau en fragments de 2 mm environ.

La procédure suivie est la suivante :

- Utiliser le marqueur résistant pour nommer les sacs, peser le sac (P_1) et tarer la balance. Il n'est pas utile de sécher les sacs à l'étuve car toute humidité sera prise en compte par le calcul de correction par le témoin (sac sans échantillon)
- Peser 0,45 à 0,55 g d'échantillon dans le sac (P_2), en évitant de mettre d'avoir de l'échantillon dans les 4 mm du haut du sac
- Sceller le sac avec la thermoscelleuse
- Peser un sac vide et l'inclure dans la série d'analyse pour déterminer le facteur de correction C_1
- Placer les sacs (24 au maximum) sur les supports d'analyse. Il est conseillé d'utiliser tous les neuf supports quel que soit le nombre de sacs. Placer trois sacs par support, et empiler les supports sur la tige centrale
- Insérer la structure dans l'appareil de digestion et placer la masse métallique au-dessus pour assurer l'immersion des sacs
- Ajouter 1900 à 2000 mL de solution de détergent neutre à température ambiante pour les 24 sacs. Si moins de 20 sacs sont analysés, ajouter 100 mL de solution par sac analysé. Veiller néanmoins à utiliser un minimum de 1500 mL pour assurer l'immersion des supports d'analyse
- Ajouter 20 g (0,5 g / 50 mL de solution) de sulfite de sodium anhydre et 4,0 mL d'alpha-amylase à la solution détergente
- Activer l'agitation et le chauffage de l'appareil de digestion, et vérifier que l'agitation fonctionne
- Régler le compte à rebours sur 75 min et fermer le couvercle de l'appareil
- A la fin de l'extraction, arrêter l'agitation et le chauffage, ouvrir la vanne de purge (doucement au début) et vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle. La solution dans l'appareil est sous pression, et il est plus sécurisant de libérer la surpression et de vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle
- Ajouter 1900 mL à 2000 mL d'eau (70 – 90 °C) et 4,0 mL d'alpha-amylase pour le premier et le second rinçage. Activer l'agitation et le chauffage, fermer le couvercle et

attendre 5 min. Effectuer un troisième rinçage avec uniquement de l'eau, l'objectif étant que l'eau ayant servi au rinçage soit à pH neutre

- Récupérer les sacs d'échantillon, et presser doucement pour retirer l'eau en excès
- Placer les sacs dans un bécher de 250 mL, les couvrir d'acétone, et laisser tremper pendant 3 à 5 minutes
- Retirer les sacs de l'acétone et les placer sur une grille pour évaporer l'acétone à l'air
- Sécher les sacs à l'étuve à 102 ± 2 °C (la plupart des étuves effectuent le séchage en 2 – 4 heures)
- Retirer les sacs de l'étuve, les mettre dans une poche pliable de déshydratant, et aplatir pour évacuer l'air. Il est déconseillé d'utiliser un dessiccateur classique
- Laisser refroidir et peser les sacs (P_3).

Le pourcentage des fibres est obtenu en appliquant la formule qui suit :

$$\% NDF = \frac{(P_3 - (P_1 \times C_1))}{P_2} \times 100$$

Avec, P_1 : Masse du sac vide

P_2 : Masse d'échantillon

P_3 : Masse sèche du sac après extraction

C_1 : Facteur de correction du sac témoin (la masse après analyse divisée par la masse originale). Un facteur supérieur à 1,0000 indique des pertes d'échantillon contenu dans les sacs.

A.3. Crude Fibers

Les réactifs utilisés pour l'analyse sont : l'acide sulfurique à $0,255 \pm 0,005$ N et l'hydroxyde de sodium à $0,313 \pm 0,005$ N, tous deux obtenus à base de solutions standards acquises chez ANKOM Technology®. Les herbes sont coupées au ciseau en fragments de 2 mm environ.

La procédure suivie est la suivante :

- Utiliser le marqueur résistant pour nommer les sacs, peser le sac (P_1) et tarer la balance. Il n'est pas utile de sécher les sacs à l'étuve car toute humidité sera prise en compte par le calcul de correction par le témoin (sac sans échantillon)
- Peser 0,45 à 0,55 g d'échantillon dans le sac (P_2), en évitant de mettre d'avoir de l'échantillon dans les 4 mm du haut du sac
- Sceller le sac avec la thermoscelleuse
- Peser un sac vide et l'inclure dans la série d'analyse pour déterminer le facteur de correction C_1
- Placer les sacs (24 au maximum) sur les supports d'analyse. Il est conseillé d'utiliser tous les neuf supports quel que soit le nombre de sacs. Placer trois sacs par support, et empiler les supports sur la tige centrale
- Insérer la structure dans l'appareil de digestion et placer la masse métallique au-dessus pour assurer l'immersion des sacs
- Ajouter 1900 à 2000 mL de la solution acide à température ambiante pour les 24 sacs. Si moins de 20 sacs sont analysés, ajouter 100 mL de solution par sac analysé. Veiller néanmoins à utiliser un minimum de 1500 mL pour assurer l'immersion des supports d'analyse
- Activer l'agitation et le chauffage de l'appareil de digestion, et vérifier que l'agitation fonctionne
- Régler le compte à rebours sur 40 min et fermer le couvercle de l'appareil
- A la fin de l'extraction, arrêter l'agitation et le chauffage, ouvrir la vanne de purge (doucement au début) et vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle. La solution dans l'appareil est sous pression, et il est plus sécurisant de libérer la surpression et de vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle
- Ajouter 1900 mL à 2000 mL d'eau ($70 - 90$ °C), et activer l'agitation et le chauffage, fermer le couvercle et attendre 5 min. Effectuer un deuxième rinçage
- Ajouter 1900 à 2000 mL de la solution basique à température ambiante pour les 24 sacs. Si moins de 20 sacs sont analysés, ajouter 100 mL de solution par sac analysé. Veiller néanmoins à utiliser un minimum de 1500 mL pour assurer l'immersion des supports d'analyse
- Activer l'agitation et le chauffage de l'appareil de digestion, et vérifier que ça agite

- Régler le compte à rebours sur 40 min et fermer le couvercle de l'appareil
- A la fin de l'extraction, arrêter l'agitation et le chauffage, ouvrir la vanne de purge (doucelement au début) et vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle. La solution dans l'appareil est sous pression, et il est plus sécurisant de libérer la surpression et de vider la solution chaude avant d'ouvrir le couvercle
- Ajouter 1900 mL à 2000 mL d'eau (70 – 90 °C), et activer l'agitation et le chauffage, fermer le couvercle et attendre 5 min. Répéter deux fois le rinçage
- Récupérer les sacs d'échantillon, et presser doucement pour retirer l'eau en excès
- Placer les sacs dans un bécher de 250 mL, les couvrir d'acétone, et laisser tremper pendant 3 à 5 minutes
- Retirer les sacs de l'acétone et les placer sur une grille pour évaporer l'acétone à l'air
- Sécher les sacs à l'étuve à 102±2 °C (la plupart des étuves effectuent le séchage en 2 – 4 heures)
- Retirer les sacs de l'étuve, les mettre dans une poche pliable de déshydratant, et aplatir pour évacuer l'air. Il est déconseillé d'utiliser un dessiccateur classique. Laisser refroidir et peser les sacs
- Brûler le sac avec son contenant dans des creusets pré-pesés pendant deux heures à 600±15 °C
- Laisser refroidir au dessiccateur et peser pour calculer la perte de masse de matière organique (P₃).

Le pourcentage des fibres est obtenu en appliquant la formule qui suit :

$$\% \text{ Fibres brutes} = \frac{(P_3 - (P_1 \times C_1))}{P_2} \times 100$$

Avec, P₁ : Masse du sac vide

P₂ : Masse d'échantillon

P₃ : Masse de matière organique (perte de poids pendant le brûlage à 600±15 °C)

C₁ : Facteur de correction du sac témoin (la masse après analyse divisée par la masse originale). Un facteur supérieur à 1,0000 indique des pertes d'échantillon contenu dans les sacs.

A.4. Lignine

Le réactif utilisé pour la digestion est une solution d'acide sulfurique à 72% de pourcentage en masse. Il peut être obtenu en diluant 1200 g d'acide sulfurique pur dans 350 mL d'eau ultrapure afin d'obtenir une densité de 1634 g/L à 20°C. Les herbes sont coupées au ciseau en fragments de 2 mm environ.

La procédure suivie pour l'analyse est la suivante :

- Utiliser le marqueur résistant pour nommer les sacs, peser le sac (P_1) et tarer la balance. Il n'est pas utile de sécher les sacs à l'étuve car toute humidité sera prise en compte par le calcul de correction par le témoin (sac sans échantillon)
- Peser 0,45 à 0,55 g d'échantillon dans le sac (P_2), en évitant de mettre d'avoir de l'échantillon dans les 4 mm du haut du sac
- Sceller le sac avec la thermoscelleuse
- Peser un sac vide et l'inclure dans la série d'analyse pour déterminer le facteur de correction C_1
- Placer les sacs (24 au maximum) sur les supports d'analyse. Il est conseillé d'utiliser tous les neuf supports quel que soit le nombre de sacs. Placer trois sacs par support, et empiler les supports sur la tige centrale
- Insérer la structure dans l'appareil de digestion et placer la masse métallique au dessus pour assurer l'immersion des sacs
- Effectuer la procédure pour l'analyse des ADF (Acid Detergent Fiber)
- Placer ensuite les sacs séchés obtenus à la fin de l'ADF dans un bécher de 3 L et couvrir les sacs avec l'acide sulfurique à 72%
- Placer un bécher de 2 L dans le bécher de 3 L pour garder les sacs submergés. Agiter les sacs au début, puis par intervalles de 30 minutes en appuyant et relâchant le bécher de 2 L par un mouvement lent de va-et-vient 30 fois environ
- Après 3 heures, déverser l'acide et rincer les sacs avec de l'eau du robinet pour enlever l'acide. Rincer jusqu'à ce que le papier pH affiche la neutralité quand il touche les sacs
- Rincer ensuite avec 250 mL d'acétone environ pendant 3 minutes pour éliminer l'eau
- Retirer les sacs de l'acétone et les placer sur une grille pour évaporer l'acétone à l'air
- Sécher les sacs à l'étuve à 105 °C (la plupart des étuves effectuent le séchage en 2 – 4 heures)
- Retirer les sacs de l'étuve, les mettre dans une poche pliable de déshydratant, et aplatir pour évacuer l'air. Il est déconseillé d'utiliser un dessiccateur classique.
- Laisser refroidir et peser les sacs (P_3).

Le pourcentage des fibres est obtenu en appliquant la formule qui suit :

$$\% ADL = \frac{(P_3 - (P_1 \times C_1))}{P_2} \times 100$$

Avec,

P_1 : Masse du sac vide

P_2 : Masse d'échantillon

P_3 : Masse sèche du sac après extraction

C_1 : Facteur de correction du sac témoin (la masse après analyse divisée par la masse originale). Un facteur supérieur à 1,0000 indique des pertes d'échantillon contenu dans les sacs.

A.5. Coordonnées des points de prélèvements d'herbe de bordure de route

	Distance /route	Position GPS
Station 1 - 2m	1,8m	48°43303'
Station 1 - 4,5m	4,5m	6°16248'
Station 2 - 2m	2m	48°7234053
Station 2 - 4m	4m	6°2754751
Station 3 - 2m	2m	48°7272184
Station 3 - 4,5m	4,5m	6°286367
Station 4 - 2m	2m	48°730475
Station 4 - 4m	4m	6°2987295
Station 5 - 2m	2m	48°7338969
Station 5 - 4m	4m	6°3088347
Station 6 - 2m	2m	48°74015746
Station 6 - 4m	4m	6°32212978
Station 7 - 2m	2m	48°7400002
Station 7 - 4m	4m	6°3327063
Station 7 - 6m	6m	
Station 8 - 2m	2m	48°7566972
Station 8 - 4m	4m	6°3782185
Station 9 - 2m	2m	48°7530971
Station 9 - 4m	4m	6°37284820
Station 10 - 2m	2m	48°7260853
Station 10 - 4m	4m	6°36118696
Station 11 - 2m	2m	48°73000775
Station 11 - 4,5m	4,5m	6°28221123

A.6. Paramètres pour l'analyse CHNS

Paramètres	Valeurs
Manomètre Helium	4 bar
Manomètre Oxygène	3 bar
Pression appareil Helium	250 kPa
Pression appareil Oxygène	200 kPa
Four contenant le tube CHNS	960 °C
Four contenant le tube O	400 °C
Injecteur	70 °C
Débit Helium	140 mL/min
Débit Oxygène	90 mL/min
Débit Helium de référence	120 mL/min
Durée de l'analyse	600 s
Démarrage d'analyse	27 s
Injection d'oxygène en fin	17 s

A.7. Paramètres de la méthode d'extraction par ASE

Paramètres	Valeurs
Température d'extraction	100 °C
Pression d'extraction	140 bar
Chauffage (<i>Heat</i>)	5 min
Temps statique (<i>Static time</i>)	5 min
Nombre de cycles	2
Volume de rinçage	50 %
Purge	100 s
Solvant A	1, Dichlorométhane
Solvant B	1, Acétone
Type de cellule (<i>Cell type</i>)	SST

A.8. Conditions opératoires pour l'analyse des HAP par HPLC

Conditions initiales		Programme d'analyse		
		Temps (min)	Fonction	Valeur
Eluant A	Eau ultrapure			
Eluant B	Acétonitrile			
Pump B Conc.	40 %	7,00	Ex/Em	225 / 340
Débit	2 mL / min	8,40	Ex/Em	255 / 310
Température de la colonne	30 °C	9,00	Ex/Em	246 / 368
Bande d'acquisition du PDA	190 – 500 nm	10,00	Ex/Em	250 / 420
		11,00	Ex/Em	280 / 462
Température des cellules des détecteurs	35 °C	12,00	Ex/Em	236 / 396
λ initial d'excitation (Ex)	224 nm	14,00	Ex/Em	280 / 392
λ initial d'émission (Em)	330 nm	16,00	Ex/Em	261 / 384
Volume d'injection	50 μ L	17,50	Ex/Em	250 / 444
		19,50	Ex/Em	290 / 410
		20,70	Ex/Em	257 / 410
		22,00	Ex/Em	290 / 401
		23,00	Ex/Em	294 / 413
		23,60	Ex/Em	290 / 508
		25,00	Pump B Conc.	100
		35,00	Pump B Conc.	100
		40,00	Pump B Conc.	40
		40,00	Stop	

A.9. Liste des antibiotiques utilisés sur la ferme expérimentale de la Bouzule

Antibiotiques utilisés sur la ferme expérimentale de la Bouzule	
Colistine	BenzylPénicilline
Spiramycine	Sulfaméthoxypyridazine
Oxytocine	oxytétracycline
Bacitracine	Florfénicol
Cloxacilline	Néomycine
Tétracycline	Closantel
DihydroStreptomycine	Flunixinine
Gentamicine	Moxidectine
Sulfadimidine	Cefquinome

Résumé

La limitation des ressources énergétiques fossiles et les lourds impacts environnementaux pouvant résulter de leur exploitation, entraînent un regain d'intérêt pour la digestion anaérobie. Face aux enjeux énergétiques et sanitaires, la conduite d'un méthaniseur implique l'optimisation de la production de méthane, mais aussi d'assurer la qualité sanitaire du digestat du point de vue des micropolluants. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet de thèse réalisé en partenariat avec la ferme expérimentale de la Bouzule. L'optimisation de la co-digestion de substrats a montré que l'ajout d'herbe ensilée durant 36 semaines, améliorait le rendement du procédé de 20%. Le suivi des micropolluants (métaux lourds et HAPs) contenus dans les herbes provenant des bordures de route a montré que la qualité du digestat ne serait pas affectée si elles sont incorporées au digesteur. L'étude en réacteur batch de l'impact des antibiotiques sur la production de méthane a montré que : à 8 mg/L et 16 mg/L de tétracycline on observe une baisse de 23% et 28% respectivement, à 14 mg/L de spiramycine on observe une baisse de 40%, et à 20 mg/L de tylosine on observe une baisse de 30%. En réacteur continu, les faibles concentrations de tétracycline (0,2 mg/L et 2 mg/L) amélioraient d'environ 5% de la production de méthane au bout de 7 jours. A 200 mg/L et 2000 mg/L de tétracycline, on atteint des baisses de 30% et 40%, et le système ne récupère pas au bout de 7 jours. Quant à la spiramycine, à 1,4 mg/L, 14 mg/L et 140 mg/L, les baisses ont été de 14%, 24% et 39% respectivement, et au bout de 7 jours, une baisse résiduelle est toujours observable. Par ailleurs, les digestats issus des tests avec les antibiotiques sont en accord avec la réglementation.

Mots clés : Co-digestion anaérobie, lisier bovin, herbe, méthane, micropolluants, antibiotiques, métaux lourds.

Abstract

The limitation of fossil energy resources and heavy environmental impacts arising from their operation, there is a renewed interest for anaerobic digestion. According to the energy, and health issues, the monitoring of an anaerobic digester involves the maximization of the methane production, but also to ensure a good quality of digestate from the perspective of micropollutants. It is within this framework that this project of thesis is realized in partnership with the experimental farm of "La Bouzule". The optimization of the co-digestion of substrates, showed that the use of 36 weeks grass silage improved the process yield by 20%. The monitoring of heavy metals and PAHs content in the grasses from roadsides showed that these grasses – if used as co-substrate in the digester – will not affect the digestate quality. The study of the impact of antibiotics on methane production in batch reactor showed that: 8 mg/L and 16 mg/L of tetracycline led to 23% and 48% decrease respectively, 14 mg/L of spiramycin led to 40% decrease, and 20 mg/L tylosin to 30% decrease. The monitoring of the continuous reactor showed that low levels of tetracycline (0.2 mg/L and 2 mg/L) led to an improvement of about 5% of the methane production. At 200 mg/L and 2000 mg/L of tetracycline, reductions of 30% and 40% are achieved, and the system did not recover after 7 days. The addition of spiramycin to the continuous reactor at 1.4 mg/L, 14 mg/L and 140 mg/L resulted in decreases of 14%, 24% and 39% respectively. For the latter, after one week, a residual drop is still observable. Furthermore, the digestate resulting from the monitoring of the continuous reactor during the tests with antibiotics is in accordance with current regulations.

Keywords: Anaerobic co-digestion, cow manure, grass, methane, micropollutants, antibiotics, heavy metals.