

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

***Discipline : Génie des Procédés***

***Ecole Doctorale : Sciences des Procédés-Sciences des Aliments***

devant être soutenue le 23 octobre 2009

Par

Alexis MOTTET

---

**Titre :**

**Recherche d'indicateurs de biodégradabilité anaérobie et  
modélisation de la digestion anaérobie thermophile : Application  
aux boues secondaires d'épuration non traitées et prétraitées  
thermiquement**

---

**JURY**

<b>M<sup>me</sup> Hélène CARRERE</b> Directrice de Recherche, INRA Narbonne	, Directrice de Thèse
<b>M. Fernando FDZ-POLANCO</b> Professeur, Université de Valladolid	, Rapporteur
<b>M. Etienne PAUL</b> Professeur, INSA Toulouse	, Rapporteur
<b>M. Alain GRASMICK</b> Professeur, Université de Montpellier II	, Examineur
<b>M. Jean Philippe STEYER</b> Directeur de Recherche, INRA Narbonne	, Examineur
<b>M. Emmanuel TROUVE</b> Veolia Environnement, Maisons Laffitte	, Examineur



# PRODUCTION SCIENTIFIQUE

## Publications dans des revues internationales

**Mottet A., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Chauzy J., Carrère H. (2009).** Kinetics of thermophilic batch anaerobic digestion of thermal hydrolysed waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal*. 46(2) : 169-175.

**Ramirez I., Mottet A., Carrère H., Déléris S., Vedrenne F., Steyer J.P. (2009).** Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated waste activated sludge. *Water Research*. 43(14) : 3479-3492.

**Mottet A., François E., Latrille E., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Carrère H.** Estimation of anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge (*soumis à Chemical Engineering Journal*).

**Mottet A., Jimenez J., Ramirez I., Carrère H., Déléris S., Vedrenne F., Steyer J.P.** Two Distinct Organic Matter Fractions for Waste Activated Sludge Applied in a Modified ADM1 Disintegration/Hydrolysis Structures (en préparation).

## Communications orales

**Mottet A., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Carrère H.** Kinetics of batch thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge combined with thermal pretreatment. V<sup>th</sup> Anaerobic Digestion of Solid Wastes IWA, Hammamet, May 2008.

**Mottet A., François E., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Carrère H.** Caractérisation et estimation d'indicateurs de biodégradabilité anaérobie des boues activées. Réseau Matières Organiques et Environnement, Sainte-Maxime, Janvier 2009.



## REMERCIEMENTS

**M** comme Merci !! Les remerciements, certainement la partie la plus délicate d'une thèse afin de n'oublier et de ne froisser personne !! Ainsi, ce grand Merci va à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse et à ceux que j'aurais omis de citer dans la longue liste de remerciements qui va suivre...

**E** comme Enrichissant !! La thèse est une expérience enrichissante sur le plan scientifique et humain. Ainsi, je tiens tout d'abord à remercier particulièrement M. Jean-Philippe Steyer, directeur du LBE, pour son encadrement, ses conseils, son écoute, sa patience Yop Yop !! Bien sûr, mon épaule droite a encore du mal à lui pardonner son terrible coup droit au squash... Je remercie également M. Jean-Philippe Delgenès, ancien directeur du LBE, pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour sa cafetière expresso, compagne fidèle de la fin de rédaction. Mes plus sincères remerciements à Mme Hélène Carrère (Directrice de Recherche à l'INRA de Narbonne), qui a encadré ce travail, pour ses connaissances scientifiques et son implication tout au long de la thèse.

Mes remerciements vont également à M. Hervé Suty (Directeur d'Anjou Recherche) pour la confiance qu'il m'a accordé. Merci à M. Emmanuel Trouvé et M. Stéphane Délérès pour leur encadrement malgré l'éloignement et également leur soutien et leur confiance. Un Merci tout particulier à Fabien Vedrenne pour tes remarques pertinentes, tes lectures du manuscrit et le lien entre Narbonne et Maisons Laffitte.

Je remercie M. Alain Grasmick (Professeur à l'université de Montpellier II) d'avoir accepté la présidence du jury et participé à l'évaluation de ce travail. Merci à M. Fernando Fernández-Polanco (Professeur à l'université de Valladolid) et M. Etienne Paul (Professeur de l'INSA de Toulouse) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux et pour leurs remarques avisées qui ont contribué à la version finale de ce mémoire. Merci à M. Emmanuel Trouvé pour sa présence dans le jury de thèse et la qualité de ses critiques.

**R** comme Remercier !! Il me faut « re »remercier l'ensemble des personnes du LBE et des personnes d'Anjou Recherche. Un Merci très spécial à mes amis et amies rencontrés au LBE : Maialen et Bruno, fidèles compagnons de la hall 2, votre gentillesse, votre amitié à toujours gravées... Magali pour ton écoute, tes délires, ta joie de vivre... Maxime et Coralie, camarades toujours... Jérémy pour le chat du bureau... Mathieu et ton biotest... Ivan mon papi préféré... Laurie, Claire la coureuse, Mathieu, Fred, Romain, Kiki... Je remercie aussi Emilie, David et Aryanne pour leur grande contribution à cette thèse et leur souhaite une bonne continuation !! Merci aussi à Julie et cou'age pour la suite. Merci à Francis pour les prélèvements de boues.

**C** comme Courir, Danser, Nager... !! Et oui la thèse ne se résume pas qu'au laboratoire. Une grande pensée amicale va à l'ensemble des personnes qui me sont chères de l'Athlétisme Club Narbonne Méditerranéen. Je les remercie pour leur convivialité, leur bonne humeur et leur

gentillesse. Merci Rosa pour le partage de ton expérience et de tes entraînements estivaux le long du canal ou hivernaux à tourner sur la piste. Et surtout Merci : Serge, Stéphanie, Stéphane, Tiphaine, Clément, Gaétan, Julie, Florence, Martial, Gilles, René (le steepleur)... Une pensée caliente pour les salseros et salseras de Narbonne et des alentours et un merci tout particulier à Gina pour l'organisation d'un certain stage de salsa à Rosas...

**I** comme Indispensable !! Il est indispensable de remercier ma famille, mes parents et mon frère Maxime. La vie fait que nous ne nous voyons plus aussi souvent qu'auparavant mais vous restez les personnes les plus chères à mon cœur. Merci Maman, Merci Papa pour m'avoir permis d'en arriver là. Et enfin, Merci Isabelle pour le bonheur et les moments que nous partageons ensemble. Piou piou aussi te remercie !!

# SOMMAIRE

Liste des Figures.....	xi
<i>List of Figures</i> .....	xi
Liste des Tableaux.....	xv
<i>List of Tables</i> .....	xv
Abbréviations et symboles .....	xvii
Nomenclature .....	xviii
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1: Revue bibliographique.....</b>	<b>5</b>
1.1 La problématique des boues d'épuration dans un contexte industriel .....	7
1.1.1 Un exemple de contexte industriel .....	7
1.1.2 Les boues d'épuration .....	9
1.2 La digestion anaérobie des boues d'épuration .....	11
1.2.1 Aspects généraux.....	11
1.2.2 Les voies de transformations de la matière organique .....	13
1.2.3 Les facteurs physico-chimiques de la digestion anaérobie des boues.....	16
1.2.4 Les procédés de prétraitement pour améliorer les performances .....	18
1.2.5 Les boues secondaires .....	22
1.3 Biodisponibilité, bioaccessibilité et biodégradabilité de la matière organique : trois notions importantes. ....	27
1.4 Modélisation de la digestion anaérobie.....	29
1.4.1 Historique .....	30
1.4.2 Le modèle de digestion anaérobie : Anaerobic Digestion Model n°1.....	31
1.5 Les méthodes de caractérisation des boues d'épuration .....	37
1.5.1 La mesure du potentiel méthane.....	38
1.5.2 Les méthodes de caractérisation de la matière organique des boues d'épuration .....	48
1.6 Conclusions.....	57
1.7 Objectifs .....	58
<b>Chapitre 2: Matériels et méthodes.....</b>	<b>59</b>
2.1 Echantillons de boues d'épuration .....	61
2.2 Protocole opératoire des prétraitements thermiques .....	61
2.3 Protocoles de mesure de la biodégradation anaérobie .....	62
2.3.1 Test de mesure du potentiel méthane en fioles.....	62
2.3.2 Suivi des cinétiques de dégradation en réacteurs .....	63
2.4 Méthodes de calcul de paramètres .....	64
2.4.1 Solubilisation.....	64
2.4.2 Le potentiel méthane .....	64
2.4.3 Biodégradabilité .....	65

2.5	Les méthodes analytiques .....	65
2.5.1	Matières sèches et volatiles .....	65
2.5.2	Matières en suspension et matières volatiles en suspension .....	65
2.5.3	La demande chimique en oxygène (DCO) .....	66
2.5.4	L'analyse du carbone .....	66
2.5.5	L'analyse de l'azote .....	66
2.5.6	Le dosage des protéines.....	67
2.5.7	Le dosage des polysaccharides.....	68
2.5.8	Le dosage des graisses.....	69
2.5.9	Le dosage des acides gras volatils.....	69
2.5.10	Le fractionnement de Van Soest .....	70
2.5.11	La composition du biogaz .....	71
2.6	Expériences effectuées .....	71
<b>Chapitre 3: Relation entre la caractérisation initiale de boues secondaires et leur biodégradabilité anaérobie thermophile .....</b>		<b>73</b>
3.1	Introduction and objectives .....	77
3.1.1	Introduction .....	77
3.1.2	Objectives.....	79
3.2	Methodology .....	79
3.2.1	Waste activated sludge samples .....	79
3.2.2	Methodology for the characterization of sludge samples.....	79
3.3	Results and discussion .....	82
3.3.1	Organic matter characterisation .....	82
3.3.2	Prediction of WAS anaerobic biodegradability .....	86
3.3.3	Conclusions .....	94
3.4	Discussion .....	95
<b>Chapitre 4: Influence de la solubilisation du substrat sur les performances de dégradation anaérobie thermophile en réacteur batch.....</b>		<b>99</b>
4.1	Introduction and objectives .....	103
4.1.1	Introduction .....	103
4.1.2	Objectives.....	104
4.2	Methodology .....	104
4.3	Results and discussion .....	105
4.3.1	Impact of thermal pretreatment on sludge solubilisation and biodegradability .....	105
4.3.2	Kinetics of batch anaerobic digestion .....	108
4.3.3	Conclusions .....	115
4.4	Discussion .....	116
<b>Chapitre 5: Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile en réacteur batch : la cinétique de Contois introduite dans le modèle ADM1 .....</b>		<b>121</b>
5.1	Introduction and objectives .....	125



5.1.1	Introduction .....	125
5.1.2	Objectives.....	127
5.2	Methodology .....	127
5.2.1	Experimental approach.....	127
5.2.2	Modeling Approach.....	127
5.3	Results and discussion .....	133
5.3.1	Impact of thermal pretreatment on sludge solubilisation and biodegradability .....	133
5.3.2	Model Application.....	134
5.3.3	Conclusions .....	141
5.4	Discussion .....	142
<b>Chapitre 6: Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile : introduction de la bioaccessibilité de la matière particulaire dans un modèle ADM1 modifié .....</b>		<b>147</b>
6.1	Introduction and objectives .....	151
6.1.1	Introduction .....	151
6.1.2	Objectives.....	151
6.2	Methodology .....	152
6.2.1	Experimental approach.....	152
6.2.2	Model development.....	153
6.3	Model calibration .....	158
6.3.1	Procedure.....	158
6.3.2	Sensitivity analysis .....	165
6.4	Results and discussions .....	171
6.4.1	Degradation batch test performances .....	171
6.4.2	Model validation on batch degradation tests.....	171
6.4.3	Calculation of degradation rates.....	181
6.4.4	Model validation: application on continuous pilot scale digester .....	183
6.4.5	Conclusions .....	187
6.5	Discussions.....	188
<b>Chapitre 7: Conclusions générales et perspectives .....</b>		<b>191</b>
<b>Références .....</b>		<b>201</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>217</b>
I.	<i>Petersen matrix</i> .....	219
II.	<i>Fluorescence emission analysis on soluble fractions of WAS samples</i> .....	221



# LISTE DES FIGURES

## *LIST OF FIGURES*

### Chapitre 1. Revue bibliographique

- Figure 1.1:** Filières de valorisation des boues d'épuration pour Veolia Eau en 2007. 9
- Figure 1.2:** Filière traditionnelle de traitement des eaux usées. 10
- Figure 1.3:** Les principales étapes de la digestion anaérobie de la matière organique complexe. 13
- Figure 1.4:** Modèle de structure d'un floc bactérien (basé sur le modèle proposé par Nielsen *et al.*, 2004). 24
- Figure 1.5:** Structure de floes avec un temps de séjour aérobie de 4 j (a) et avec un temps de séjour aérobie de 20 j (Liao *et al.*, 2006). 26
- Figure 1.6:** Voies réactionnelles de la digestion anaérobie incluses dans l'ADM1. 32
- Figure 1.7:** Schéma d'un protocole de fractionnement d'un échantillon de boue illustrant l'utilisation des méthodes d'extraction et d'analyse. 55

### Chapitre 2. Matériels et méthodes

- Figure 2.1:** Dispositif expérimental pour la réalisation des tests de BMP. 63
- Figure 2.2:** Dispositif expérimental pour le suivi des cinétiques de dégradation anaérobie en condition batch des boues étudiées. 64

### Chapitre 3. Relation entre la caractérisation initiale de boues secondaires et leur biodégradabilité anaérobie thermophile

- Figure 3.1:** *Fractionation of sludge total solid by Van Soest method.* 84
- Figure 3.2:** *Correlation circle (A), mean squared prediction error (PRESS) (B), regression coefficient representation (C) and centered variables values of regression coefficients (D) for the dimension 3 model with all the 12 parameters.* 88
- Figure 3.3:** *Mean squared prediction error (PRESS) (A), regression coefficient representation (B) for the dimension 2 model with the most important parameters.* 89
- Figure 3.4:** *Mean squared prediction error (PRESS) (A) and regression coefficient representation (B) for the PLS model 4 with the parameters of the Van Soest characterization and SolOC and Ox.* 91
- Figure 3.5:** *Mean squared prediction error (PRESS) (A) and regression coefficient representation (B) for the PLS model 5 with the parameters of the biochemical characterization and SolOC and Ox.* 92
- Figure 3.6:** *Calculated and experimental biodegradabilities for model calibration and model validation based on the biochemical characterisation and SolOC and Ox (PLS model 5).* 94

## Chapitre 4. Influence de la solubilisation du substrat sur les performances de dégradation anaérobie thermophile en réacteur batch

**Figure 4.1:** Impact of treatment temperature on solubilisation of WAS. 107

**Figure 4.2:** Soluble compound concentrations during batch anaerobic digestion of each sludge (batch 4). 108

**Figure 4.3:** Methane production and VFA concentrations during batch anaerobic digestions of (A) untreated WAS, (B) pretreated at 110°C, (C) pretreated at 165°C in electric mode, (D) pretreated at 165°C in steam mode and (E) pretreated at 220°C. 111

**Figure 4.4:** Acetate (A), propionate (B) accumulation maximum rates and methane (C) production specific maximum rates with different conditions of pretreatment through batch experiments. 114

**Figure 4.5:** Variation des concentrations en composés solubles et débit de méthane au cours de la digestion anaérobie thermophile en condition batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée à 165°C (trait plein : concentration en DCO soluble moins la concentration en AGV totaux ; trait discontinu : concentration en protéines solubles ; trait en pointillé : concentration en glucides solubles). 118

## Chapitre 5. Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile en réacteur batch : la cinétique de Contois introduite dans le modèle ADM1

**Figure 5.1:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for untreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1) 133

**Figure 5.2:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for 110°C pretreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1). 136

**Figure 5.3:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for 165°C pretreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1). 137

**Figure 5.4:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for 220°C pretreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1). 138

**Figure 5.5:** Comparison between (A) measured VFA concentrations and simulated VFA concentrations (B) measured methane produced and simulated methane produced, for untreated and pretreated WAS. The simulation data come from modified ADM1 model. 140

<b>Figure 5.6:</b> Concentration en ammoniacque simulée par le modèle modifié ADM1 lors de la dégradation de la boue non traitée thermiquement.	144
<b>Figure 5.7:</b> Suivi des concentrations en $\text{NH}_4^+$ et en $\text{NH}_3$ sur 45 j dans deux réacteurs dégradant une boue secondaire non traitée et prétraitée à 165°C et un réacteur non alimenté en substrat.	145
<b>Chapitre 6. Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile : introduction de la bioaccessibilité de la matière particulaire dans un modèle ADM1 modifié</b>	
<i>Figure 6.1:</i> Methane specific production of WAS untreated and pretreated at 165°C and 220°C during the second feed of batch reactors (data from Chapter 4).	154
<i>Figure 6.2:</i> COD flows for a particulate substrate in dual-pathway disintegration modified ADM1 model structure.	155
<i>Figure 6.3:</i> Simulated biomass concentrations for untreated WAS through the four successive batch tests (A: batch test 1; B: batch test 2; C: batch test 3; D: batch test 4).	157
<i>Figure 6.4:</i> Chart of heuristic method procedure for optimising the model parameter values.	158
<i>Figure 6.5:</i> Simulated individual VFAs, pH and cumulative $\text{CH}_4$ production vs experimental data for untreated WAS (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions).	162
<i>Figure 6.6:</i> Simulated $X_{cs}$ , acetate and $\text{C}_2$ degrader concentrations for the third batch test fed with untreated WAS.	163
<i>Figure 6.7:</i> Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to $X_{cr}$ disintegration parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).	166
<i>Figure 6.8:</i> Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to $X_{cs}$ disintegration parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).	167
<i>Figure 6.9:</i> Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to propionate degradation parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).	168

- Figure 6.10:** Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to acetate degradation parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values). 169
- Figure 6.11:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for WAS pretreated at 110°C (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions). 174
- Figure 6.12:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for WAS pretreated at 165°C in electric mode (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions). 176
- Figure 6.13:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for WAS pretreated at 165°C in steam mode (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions). 178
- Figure 6.14:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for WAS pretreated at 220°C (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions). 180
- Figure 6.15:** Degradation rate dynamics for the fourth degradation batch test of untreated and pretreated WAS samples (rates are expressed in kg<sub>COD</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>). 182
- Figure 6.16:** Simulated vs experimental  $Q_{\text{biogas}}$ ,  $Q_{\text{CH}_4}$  and  $Q_{\text{CO}_2}$  for pilot scale digester in thermophilic condition with SRT changes. Comparison between the proposed model and the ADM1 standard model (red circles: experimental data points, black plain line: modified ADM1, black dashed line: standard ADM1, blue dashed thin line: SRT). 185
- Figure 6.17:** Simulated vs experimental individual VFAs, total COD and pH for pilot scale digester in thermophilic condition with SRT changes. Comparison between the proposed model and the ADM1 standard model (red circles: experimental data points, black plain line: modified ADM1, black dashed line: standard ADM1). 186
- Figure 6.18:** Simulated dynamic behavior of composite fractions for standard ADM1 model ( $X_c$ ) and model with two hydrolysable fractions ( $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ ). 187
- Figure 6.19:** Variations du débit de méthane simulé et des concentrations en  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$  simulées pour le digesteur pilote en condition thermophile lors de l'arrêt de l'alimentation. 190

# LISTE DES TABLEAUX

## *LIST OF TABLES*

### **Chapitre 1. Revue bibliographique**

<b>Tableau 1.1 :</b> Tableau de bord environnement de Veolia Environnement entre 2005 et 2007.	8
<b>Tableau 1.2 :</b> Impact de traitements thermiques sur la digestion anaérobie de boues d'épuration.	21
<b>Tableau 1.3 :</b> Protocoles de mesure du potentiel de méthane de substrats organiques proposés dans la littérature scientifique.	45
<b>Tableau 1.4 :</b> Exemples de productions spécifiques obtenues sur des substrats similaires et sur un même substrat d'alimentation analysé à différents instants t.	48
<b>Tableau 1.5 :</b> Méthodes de caractérisation de la matière organique de boues suivant l'objectif de l'étude et les méthodes d'extraction utilisées.	54

### **Chapitre 2. Matériels et méthodes**

<b>Tableau 2.1 :</b> Expériences réalisées au cours des travaux de la thèse.	72
--	----

### **Chapitre 3. Relation entre la caractérisation initiale de boues secondaires et leur biodégradabilité anaérobie thermophile**

<i>Table 3.1: Wastewater treatment plant characteristics.</i>	80
<i>Table 3.2: Macroscopic parameters of sludge samples.</i>	82
<i>Table 3.3: Biochemical composition of sludge samples.</i>	83
<i>Table 3.4: Mean reduction (%) of measured components between input and output of full scale anaerobic process.</i>	86
<i>Table 3.5: Methane potential and biodegradability of input sludge samples.</i>	87
<i>Table 3.6: PLS model for predicting biodegradability (BD) of sludge sample F output pretreatment.</i>	93

### **Chapitre 4. Influence de la solubilisation du substrat sur les performances de dégradation anaérobie thermophile en réacteur batch**

<i>Table 4.1: COD and VS solubilisation, methane potential and biodegradability of untreated and pretreated WAS at different conditions.</i>	106
<i>Table 4.2: Comparison of each methane production obtained with different thermal pretreatment conditions (mean values of 4 successive batch experiments).</i>	107

## **Chapitre 5. Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile en réacteur batch : la cinétique de Contois introduite dans le modèle ADM1**

*Table 5.1: COD flux for each sludge composite particulate material during the disintegration process and initial condition values of model variables.* 131

*Table 5.2: Biochemical parameters and yield of biomass on substrate of the new process rates related to disintegration and hydrolysis.* 132

## **Chapitre 6. Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile : introduction de la bioaccessibilité de la matière particulaire dans un modèle ADM1 modifié**

*Table 6.1: Yield of product on substrate determined from experimental data through the four successive degradation batch tests with untreated WAS.* 156

*Table 6.2: Main changes of kinetic parameters through the four successive degradation batch tests of untreated WAS. Comparison of the values with standard ADM1.* 160

*Table 6.3: Regression coefficients between measured VFA concentrations and simulated VFA concentrations, measured methane produced and simulated methane produced, for untreated and pretreated WAS in four successive batch tests.* 164

*Table 6.4: Significant effect of kinetic parameter changes on the dynamic evolution of acetate, propionate and methane production.* 171

*Table 6.5: Influent characteristics and performances of continuous pilot scale thermophilic anaerobic digester at different flow.* 184



# ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

<i>ADMI</i>	Anaerobic Digestion Model n°1	
<i>AGV</i>	Acides Gras Volatils	
<i>VFA</i>	<i>Volatile Fatty Acids</i>	
<i>BCA</i>	Acide BiCinchoninique <i>BiCinchoninic Acid</i>	
<i>BMP</i>	Potentiel Méthane Biochimique <i>Biochemical Methane Potential</i>	$\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCO}_{\text{intro}}}^{-1}$ $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{intro}}}^{-1}$
<i>CBIM</i>	<i>Continuity Based Interface Models</i>	
<i>CI</i>	Carbone Inorganique	
<i>IC</i>	Inorganic Carbon	$\text{g}_C \cdot \text{L}^{-1}$
<i>CNTP</i>	Conditions Normales de Température et de Pression	
<i>COT</i>	Carbone Organique Total	
<i>TOC</i>	<i>Total Organic Carbon</i>	$\text{g}_C \cdot \text{L}^{-1}$
<i>CT</i>	Carbone Total	
<i>TC</i>	<i>Total Carbon</i>	$\text{g}_C \cdot \text{L}^{-1}$
<i>DCO</i>	Demande Chimique en Oxygène	
<i>COD</i>	<i>Chemical Oxygen Demand</i>	$\text{kg}_{\text{O}_2} \cdot \text{m}^{-3}$ ou $\text{g}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>EH</i>	Equivalent Habitant	
<i>PE</i>	<i>Population Equivalent</i>	
<i>EPS</i>	Substances polymériques extracellulaires <i>Extracellular Polymeric Substances</i>	
<i>MES</i>	Matières En Suspension	
<i>TSS</i>	<i>Total Suspended Solids</i>	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>MI</i>	Matières Inorganiques	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>MS</i>	Matières Sèches	
<i>TS</i>	<i>Total Solids</i>	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>MV</i>	Matières Volatiles	
<i>VS</i>	<i>Volatile Solids</i>	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>MVS</i>	Matières Volatiles en Suspension	
<i>VSS</i>	<i>Volatile Suspended Solids</i>	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
<i>PLS</i>	Moindres carrés partiels <i>Partial Least Square</i>	
<i>PRESS</i>	Moyenne des erreurs de prédiction au carré <i>PREDiction Sum of Squares</i>	
<i>SAB</i>	Sérum Albumine Bovine	
<i>BSA</i>	<i>Bovine Serum Albumin</i>	
<i>STEP</i>	STation d'EPuration des eaux usées	
<i>WWTP</i>	<i>WasteWater Treatment Plant</i>	
<i>TSH</i>	Temps de Séjour Hydraulique (dans le digesteur)	<i>j</i>
<i>SRT</i>	<i>Sludge Retention Time</i>	<i>d</i>
<i>WAS</i>	Boues secondaires <i>Waste Activated Sludge</i>	

# NOMENCLATURE

## Stoichiometric coefficients

$V_{i,j}$	Stoichiometric coefficients for component $i$ on process $j$	$\text{kg}_{\text{COD}}.\text{m}^{-3}$
$f_{\text{product,substrate}}$	Yield (catabolism only) of product on substrate	$\text{kg}_{\text{COD}}.\text{kg}_{\text{COD}}^{-1}$

## Equilibrium coefficients and constants

$H_{\text{gas}}$	Gas law constant (equal to $K_H^{-1}$ )	$\text{bar}.\text{M}^{-1}$ ( $\text{bar}.\text{m}^3.\text{kmol}^{-1}$ )
$K_a$	Acid acid-base equilibrium coefficient	$\text{M} (\text{kmole}.\text{m}^{-3})$
$K_H$	Henry's law coefficient	$\text{M} \text{ bar}^{-1} (\text{kmole}.\text{m}^{-3}.\text{bar}^{-1})$
$pK_a$	$\text{Log}_{10}[K_a]$	
$R$	Gas law constant ( $8.314 \times 10^{-2}$ )	$\text{bar}.\text{M}^{-1}.\text{K}^{-1}$

## Kinetic parameters and rates

$k_{A/Bi}$	Acid base kinetic parameter	$\text{M}^{-1}.\text{d}^{-1}$
$k_{\text{dec,process}}$	First order decay constant	$\text{d}^{-1}$
$I_{\text{inhibitor, process}}$	Inhibition function (see $K_I$ )	
$k_{\text{process}}$	First order parameter (normally for hydrolysis)	$\text{d}^{-1}$
$k_L a_i$	Gas-liquid transfer coefficient of gas $i$	$\text{d}^{-1}$
$D_i$	Diffusivity of gas $i$	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
$K_{I, \text{inhibit, substrate}}$	50% Inhibitory concentration	$\text{kg}_{\text{COD}}.\text{m}^{-3}$
$k_{m, \text{process}}$	Monod maximum specific uptake constant ( $\mu_{\text{max}}/Y$ )	$\text{kg}_{\text{COD}_S}.\text{kg}_{\text{COD}_X}^{-1}.\text{d}^{-1}$
$K_{S, \text{process}}$	Half saturation value	$\text{kg}_{\text{COD}_S}.\text{m}^{-3}$
$\rho_j$	Kinetic rate of process $j$	$\text{kg}_{\text{COD}_S}.\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$
$Y_{\text{substrate}}$	Yield of biomass on substrate	$\text{kg}_{\text{COD}_X}.\text{kg}_{\text{COD}_S}^{-1}$
$\mu_{\text{max}}$	Monod maximum specific growth rate	$\text{d}^{-1}$

## Algebraic variables

$pH$	$-\log_{10}[H^+]$	
$p_{\text{gas},i}$	Partial pressure of gas $i$	$\text{bar}$
$p_{\text{gas}}$	Total gas pressure	$\text{bar}$
$S_i$	Soluble component $i$ concentration	$\text{kg}_{\text{COD}}.\text{m}^{-3}$
$t_{\text{res},X}$	Extended retention of solids	$\text{d}$
$T$	Temperature	$\text{K}$
$V$	Volume	$\text{m}^3$
$X_i$	Particulate component $i$ concentration	$\text{kg}_{\text{COD}}.\text{m}^{-3}$

## Dynamic State Variables

$X_{cr}$	<i>Readily hydrolysable composite fraction concentration</i>	
$X_{cs}$	<i>Slowly hydrolysable composite fraction concentration</i>	
$X_{ch}$	<i>Carbohydrates concentration</i>	
$X_{pr}$	<i>Proteins concentration</i>	
$X_{li}$	<i>Lipids concentration</i>	
$X_I$	<i>Particulate inerts concentration</i>	
$S_I$	<i>Soluble inerts concentration</i>	
$S_{su}$	<i>Monosaccharides concentration</i>	
$S_{aa}$	<i>Amino acids concentration</i>	
$S_{fa}$	<i>Total LCFA concentration</i>	
$S_{va}$	<i>Total valerate concentration</i>	
$S_{bu}$	<i>Total butyrate concentration</i>	
$S_{pro}$	<i>Total propionate concentration</i>	
$S_{ac}$	<i>Total acetate concentration</i>	
$S_{h2}$	<i>Hydrogen concentration</i>	
$S_{ch4}$	<i>Methane concentration</i>	
$S_{IC}$	<i>Inorganic carbon concentration</i>	$M^2$
$S_{IN}$	<i>Inorganic nitrogen concentration</i>	$M$
$X_{su} \dots X_{h2}$	<i>ADMI Biomass concentration</i>	
$X_{Xxc}, X_{Xch}, X$	<i>Modified ADMI Biomass concentration</i>	
$X_{pr}, X_{Xli}$		
$S_{cat}$	<i>Cations concentration</i>	$M$
$S_{an}$	<i>Anions concentration</i>	$M$

<sup>1</sup>  $kg_{COD} \cdot m^{-3}$  unless otherwise stated.

<sup>2</sup>  $M : kmole \cdot m^{-3}$



# Introduction générale

Les boues, issues des stations d'épuration (STEP), ont une existence en tant que telle relativement récente puisqu'elles n'existent que depuis la création des égouts et surtout des stations d'épuration. Cependant, la valeur des déjections et des déchets des villes a longtemps représenté un grand intérêt pour l'activité humaine. Ainsi, de très nombreux documents témoignent de l'expertise acquise par l'homme en matière de gestion de biodéchets.

Dans la plus haute antiquité et sur la base de fouilles archéologiques réalisées dans la colonie Grecque de Morgantina, datée du V<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ, les eaux des latrines étaient évacuées dans un égout se déversant sur des terres cultivées, principalement arborées. Puis, au premier siècle après JC, Pline écrivait dans son Histoire Naturelle que « tous les auteurs s'accordent à considérer les excréments humains comme une excellente base d'engrais pour formuler des mélanges », conviction réitérée au 10<sup>ème</sup> siècle par Constantin Porphyrogénète, empereur d'Orient dans un ouvrage intitulé « Les Géoponiques », et par Ibn Al-Awwam, agronome hispano-arabe de Séville dans « Le livre de l'agriculture, Kitâb Al-Filâha ». Au Moyen-âge, les moines de l'Abbaye cistercienne de Pontigny dans l'Yonne, « recyclaient une partie des eaux des latrines, qui alimentaient le vivier à poissons », ressource dont ils se nourrissaient car la viande leur était interdite...

Dans le contexte contemporain d'une activité humaine sans cesse croissante et de l'importance de préserver l'environnement, l'Europe a instauré des législations imposant aux différents acteurs (collectivités locales, industriels, consommateurs...) de promouvoir et assurer un traitement optimal des eaux usées urbaines et industrielles. L'application de la directive Européenne 91/271/EEC impose aux pays de l'Union Européenne d'implanter des traitements secondaires, principalement biologiques, pour les agglomérations de plus de 10 000 équivalent-habitants et les agglomérations de plus de 2 000 équivalent-habitants situées dans des zones naturelles sensibles. Cette amélioration du traitement des eaux usées a induit une amélioration de l'épuration des eaux usées, et parallèlement, une augmentation des quantités de boues, sous-produit de la filière eau.

La voie de traitement pour la valorisation des boues d'épuration, privilégiée par la législation Européenne, est une méthode ancestrale, il s'agit d'une valorisation par épandage agricole. Les boues sont en effet riches en fertilisants naturels (phosphore et azote), en oligo-éléments et en matière organique qui permettent, via leur épandage, d'améliorer la valeur agronomique des sols. Toutefois, les boues d'épuration concentrent également des éléments indésirables comme des métaux lourds, des micropolluants organiques et des organismes pathogènes.

La digestion anaérobie est utilisée comme une étape préalable à l'épandage. Elle présente de nombreux avantages qui sont de réduire le volume des boues, de les hygiéniser, de limiter les

nuisances olfactives, d'éliminer certains micropolluants organiques, d'améliorer leur qualité agronomique mais aussi de produire un biogaz, valorisable sous forme d'électricité ou de chaleur. Cependant, la digestion anaérobie des boues reste un processus complexe, difficilement maîtrisable industriellement et peu prévisible. Les performances de dégradation dépendent des conditions opératoires du digesteur mais aussi des caractéristiques de la boue. La composition et l'organisation de la matière organique des boues sont des facteurs importants jouant sur l'accessibilité des composés, en particulier lors de l'étape d'hydrolyse, ce qui va influencer sur la biodégradabilité de la boue.

Dans ce contexte, les travaux de la thèse ont pour **objectif de mettre en lien une caractérisation chimique de la matière organique de boues secondaires d'épuration avec leurs performances de digestion anaérobie thermophile**, afin de développer des **indicateurs pertinents de leur biodégradabilité**. Cette étude consiste (i) à caractériser par des mesures globales et spécifiques la matière organique de boues secondaires et (ii) de relier ces paramètres au potentiel méthane, via une méthode statistique et aux performances de la digestion, via la modélisation mathématique. Ce projet est au carrefour de domaines scientifiques complémentaires faisant intervenir des connaissances de biochimie, génie des procédés et de modélisation. Ainsi, la démarche scientifique choisie, combinant une étude chimique et biochimique de la composition de boues secondaires d'épuration à une étude macroscopique des performances de digestion anaérobie, doit permettre de **mieux comprendre l'influence de l'état et de la composition des boues sur les voies réactionnelles de dégradation et les performances de conversion**. Les connaissances acquises par ces travaux permettront de fournir des informations sur les méthodes pertinentes de caractérisation des boues et facilement applicables dans un contexte industriel. De plus, un **modèle mathématique adapté** afin de tenir compte des caractéristiques intrinsèques des boues est proposé, lequel pourra être utilisé comme un **outil d'étude, de compréhension et d'optimisation du procédé de digestion anaérobie**.

La thèse a été réalisée au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de l'INRA à Narbonne, grâce au soutien financier du dispositif CIFRE (Thèse CIFRE n°68/2006) proposé par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) et du Centre de Recherche sur l'Eau, Anjou Recherche, de la société Veolia Environnement.

Le manuscrit de thèse se base sur des articles scientifiques, rédigés en anglais. Afin de rendre la lecture plus facile, la mise en page des articles est identique tout au long du manuscrit. Un résumé et une partie introductive pour chaque chapitre a été réalisé afin de rappeler le contexte des travaux.

Le chapitre 1 constitue une synthèse bibliographique, rappelant le principe de la digestion anaérobie, ainsi que l'origine et la composition des boues secondaires d'épuration. La présentation du modèle de digestion utilisé et une synthèse des méthodes de caractérisation permettent de mettre en avant les limites et les manques dans ces domaines.

Le chapitre 2 présente les méthodes analytiques mises en œuvre et la méthodologie utilisée pour suivre les performances de dégradation.

Le chapitre 3 s'intéresse dans un premier temps à l'étude de la composition de la matière organique de boues secondaires d'épuration en entrée et en sortie de procédés industriels de digestion anaérobie. Ensuite, la relation entre la caractérisation initiale des boues et leurs performances de dégradation anaérobie obtenues en laboratoire a été étudiée en détail, grâce à une méthode statistique.

Le chapitre 4 analyse l'impact de la biodisponibilité de la matière organique des boues et l'adaptation de l'inoculum sur les voies réactionnelles de la digestion anaérobie thermophile en réacteurs batch.

Les chapitres 5 et 6 développent un modèle mathématique pour la modélisation de la digestion anaérobie thermophile de boues secondaires afin de mieux représenter et d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de dégradation.

Enfin, ce manuscrit est accompagné de deux annexes. La première décrit les matrices de Petersen utilisées pour le modèle proposé et basées sur le modèle Anaerobic Digestion Model n°1 (ADM1) de l'IWA. L'annexe II présente sous forme d'un mini article rédigé en anglais, les résultats obtenus sur l'analyse par spectrophotométrie 3D des phases solubles de boues secondaires d'épuration en entrée et en sortie de digesteurs industriels. Ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec Yves Dudal (chargé de recherche à l'INRA UMR BSR de Montpellier).





# Chapitre 1: Revue bibliographique



# Chapitre 1. Revue bibliographique

## 1.1 La problématique des boues d'épuration dans un contexte industriel

### 1.1.1 Un exemple de contexte industriel

La Directive européenne n°91/271/CEE du Conseil du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires, impose de pourvoir à l'élimination des boues d'épuration. Elle est inscrite dans le droit français depuis 1992. L'obligation pour les collectivités locales de traiter les boues des stations d'épuration figure à l'article L2224-8 du Code Général des Collectivités Territoriales, auquel renvoie expressément l'article L214-14 du Code de l'Environnement. De ce fait, Veolia Environnement, ayant la gérance de l'assainissement d'un grand nombre de collectivités, assure le traitement des boues d'épuration. Ce groupe est l'un des leaders mondiaux des services à l'environnement et intègre au sein de son groupe, l'ensemble des services à l'environnement : des secteurs de l'eau avec Veolia Eau ; de la gestion des déchets avec Veolia Propreté ; des services énergétiques avec Veolia Energie ; et du transport avec Veolia Transport.

Veolia Environnement œuvre à travers Veolia Eau à faire évoluer la gestion de l'eau en favorisant la mise en place d'initiatives d'économie, de reconstitution des réserves et de distribution adaptées de l'eau.

La sophistication des traitements utilisés pour traiter les eaux usées, rendue nécessaire par l'aggravation des pollutions et l'élévation des standards de qualité de l'eau traitée, se traduit par une augmentation de la quantité de sous produits, avec en première ligne les boues d'épuration. Au niveau français, la quantité annuelle de boues produites est passée de 850 000 de tonnes de matières sèches en 1999 à 1 million de tonnes de matières sèches en 2005. Sur le plan européen, la production annuelle de matières sèches de boues d'épuration a également fortement augmenté de 5,5 millions de tonnes en 1992 pour atteindre 9 millions de tonnes en 2005. Dans le cadre des activités du groupe Veolia Environnement, à l'échelle internationale, les chiffres du tableau de bord (Tableau 1.1) indiquent que les volumes de boues d'épuration évacués ont augmenté de 17 % entre 2005 et 2007 pour ainsi atteindre 942 milliers de tonnes de matières sèches en 2007.

Tableau de bord environnement		Veolia Environnement			Veolia Eau
		2005	2006	2007	2007
	Unité				
Rendement épuratoire global (stations de traitement biologique d'une capacité de traitement supérieur à 50 000 EH) <sup>1</sup>	%		78	79,7	79,7
Rendement épuratoire DBO <sub>5</sub> (stations de traitement biologique d'une capacité de traitement supérieur à 3 tonnes de DBO <sub>5</sub> par jour-50 000 EH) <sup>1,2</sup>	%	91	90,1	90	90
Quantité de boues évacuées	Milliers tonnes MS	806	866	942	942
Production totale d'énergie (électrique et thermique) <sup>1</sup>	Millions MWh	71,5	73,9	77,9	0,5
Production d'énergie renouvelable ou alternative (électrique et thermique)	Millions MWh	11,2	12	15,4	0,5
dont énergies renouvelables <sup>1</sup>	Millions MWh			9,5	0,5

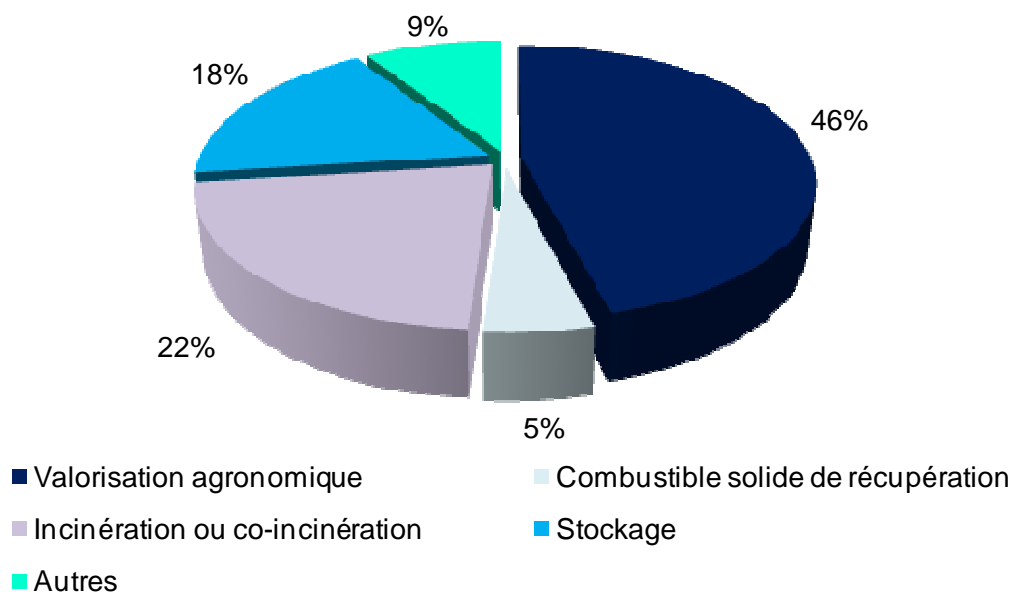
<sup>1</sup> Indicateur ayant fait l'objet d'une vérification externe

<sup>2</sup> Indicateur répondant aux exigences de la loi sur les Nouvelles Régulations Economiques

**Tableau 1.1 :** Tableau de bord environnement de Veolia Environnement entre 2005 et 2007.

Au sein de Veolia Environnement, plusieurs filières pour le traitement et la valorisation des boues produites par les stations d'épuration sont développées avec au premier rang la valorisation agronomique par épandage (logique déchet soumise à une utilisation contrôlée) et compost (logique produit soumise à une normalisation et à une homologation) représentant 46 % du tonnage en 2007 (Figure 1.1). La valorisation sous forme de combustibles solides de substitution et l'incinération avec récupération d'énergie qui représentent 27 %0 permettent dans certains cas, d'éviter la consommation de combustibles fossiles.

Par ailleurs, les missions de Veolia Eau sont de préserver les ressources naturelles en diminuant la consommation des matières premières, en réduisant les émissions de gaz à effet de serre (GES) et en valorisant la biomasse produite sous forme d'énergies renouvelables. Ces missions contribuent à développer la digestion anaérobie comme une réelle filière de valorisation des boues d'épuration au sein des stations d'épuration. Ce procédé s'intègre donc comme une étape dans la chaîne de traitement des boues pouvant conduire à une valorisation finale du produit stabilisé via l'épandage agricole ou comme combustible. Ce traitement biologique est l'une des solutions aux problèmes environnementaux actuels et auxquels Veolia Environnement contribue. Appels *et al.* (2008) ont estimé que le potentiel de production de biogaz à partir de la digestion anaérobie est de 200 billions de m<sup>3</sup> en Europe.

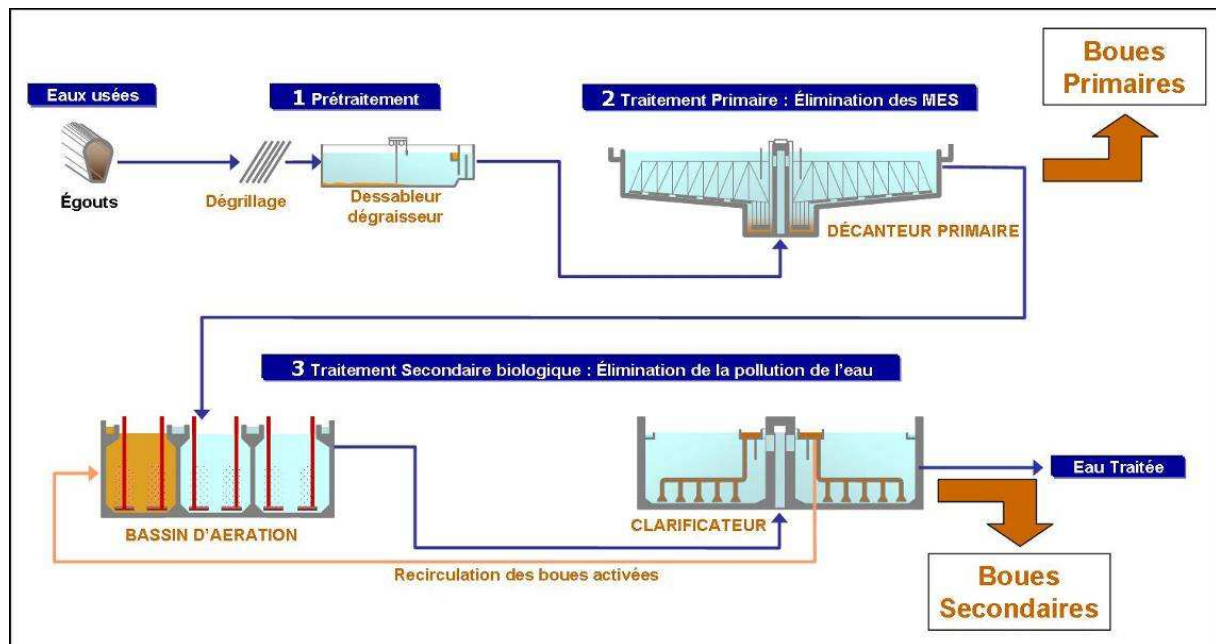


**Figure 1.1** : Filières de valorisation des boues d'épuration pour Veolia Eau en 2007.

Ainsi, Veolia Eau a augmenté de 53 % en 2007 sa production d'énergies renouvelables à travers notamment le traitement des boues d'épuration par méthanisation. Plusieurs procédés industriels ont vu le jour afin d'améliorer les rendements d'abattement et également de permettre une meilleure hygiénisation du produit stabilisé grâce à des procédés tels que Biothelys<sup>®</sup> (hydrolyse thermique à 150-180°C durant 30 min couplée à une digestion anaérobie mésophile), BioTherm<sup>®</sup> (digestion anaérobie thermophile) et BioPasteur<sup>®</sup> (prétraitement à 70°C durant 1 h permettant une hygiénisation des boues). Cette production d'énergie renouvelable au sein des stations d'épuration participe également à établir un meilleur bilan énergétique des procédés utilisés pour le traitement des eaux usées. En effet, la consommation d'énergie renouvelable produite par les unités de Veolia Eau atteint 6,8 % de la consommation totale d'énergie sous forme électrique et thermique, qui s'élève à 6,7 millions MWh.

### 1.1.2 Les boues d'épuration

Les boues d'épuration sont issues de la pollution présente dans les eaux usées, engendrée par l'activité anthropique. Trois types d'eaux usées ont été définis : les eaux résiduaires urbaines (originaires de l'activité domestique) ; les eaux résiduaires industrielles (issues de l'activité industrielle) et les eaux pluviales. Toutes ces eaux usées sont recueillies sur le réseau d'assainissement afin d'être dépolluées dans une station d'épuration. L'épuration des eaux résiduaires consiste à réduire la charge en matières organiques et minérales. Lors de cette étape, il se produit un transfert de la pollution de la phase liquide (eau) vers une phase plus concentrée (boues) et une phase gazeuse (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>...). La production de boues résiduaires est donc totalement dépendante de la filière de traitement des eaux usées. La Figure 1.2 représente la filière traditionnelle de traitement des eaux usées.



**Figure 1.2 :** Filière traditionnelle de traitement des eaux usées.

Les étapes qui vont engendrer la production de boues d'épuration sont le traitement primaire et le traitement secondaire :

- le traitement primaire regroupe des procédés physico-chimiques visant à éliminer par décantation une forte proportion de matières organiques et minérales en suspension. A l'issue de ce traitement, environ 50 à 60 % des matières en suspension sont récupérées et forment les boues primaires,
- le traitement secondaire s'appuie sur des réactions naturelles biologiques pour éliminer les matières polluantes solubles (carbone, azote et phosphore). La dégradation s'effectue par un procédé à boues activées (ou bassin d'aération forcée), qui nécessite un apport en oxygène par aération. Ce procédé produit des boues résiduelles, appelées boues secondaires ou boues activées. À l'issue de ce traitement, une ultime décantation permet de séparer l'eau épurée et les boues secondaires. Cette décantation est opérée dans des clarificateurs. L'eau épurée peut alors être rejetée dans le milieu naturel. Les boues secondaires sont récupérées en fond d'ouvrage puis soit sont renvoyées vers le bassin d'aération pour y maintenir la concentration voulue en microorganismes épuratoires, soit extraites et envoyées sur la ligne de traitement des boues.

**Le traitement secondaire est devenu le niveau minimal de traitement afin de répondre aux exigences réglementaires.** Dans les petites STEP et dans les STEP récentes, le traitement primaire n'est plus ou peu utilisé, privilégiant directement le traitement secondaire. Ainsi, **les travaux se sont axés sur l'étude des boues secondaires** qui, par leur structure et leur composition, engendrent **des performances limitées lors de leur valorisation par méthanisation.**

### 1.1.2.1 Filières de traitement des boues d'épuration urbaines

Les traitements appliqués aux boues "brutes" ont plusieurs objectifs. Ils visent, selon la dévolution finale des boues, à réduire leur volume, leur pouvoir de fermentation lié à leur teneur en matière organique, ou éventuellement à les hygiéniser, c'est-à-dire à éliminer les bactéries et parasites présents. Ces traitements permettent de limiter les nuisances olfactives, les risques sanitaires, mais aussi de faciliter leur stockage, avant leur élimination ou leur valorisation. En général, il existe trois étapes :

- l'épaississement : le principe de cette première étape consiste à enlever une partie plus ou moins importante de l'eau contenue dans les boues pour ainsi réduire le volume de boues et augmenter la concentration des matières sèches : 3 à 8 % de siccité selon les techniques utilisées. L'épaississement des boues peut être gravitaire, ou s'effectuer par flottation, par égouttage ou par centrifugation. L'épaississement facilite en particulier les traitements ultérieurs,
- la déshydratation : permet de poursuivre l'opération d'épaississement en donnant à la boue une consistance plus solide répondant aux exigences de la destination finale. La déshydratation recourt à trois grandes familles de techniques : la filtration, la centrifugation et l'évaporation. Ces procédés nécessitent un conditionnement préalable des boues, généralement par un réactif flocculant permettant d'agglomérer les matières solides et de favoriser ainsi la séparation liquide/solide. La siccité est d'environ 15 à 40% selon les boues et les installations utilisées,
- la stabilisation : elle permet de réduire le pouvoir fermentescible, ainsi que les nuisances olfactives. Il existe trois types de stabilisation : la stabilisation chimique (chaulage, stabilisation aux nitrites, oxydation), ou la stabilisation physique (séchage poussé), la stabilisation biologique (digestion aérobie ou anaérobie, compostage). Les stabilisations biologiques, notamment la digestion anaérobie, apportent plusieurs avantages : réduction de la matière organique, production d'un biogaz valorisable, diminution des nuisances olfactives, hygiénisation.

Ainsi, le procédé de méthanisation tend à devenir un procédé indispensable au sein des STEP grâce à ses nombreux avantages en termes de bilan environnemental et de bilan énergétique.

## 1.2 La digestion anaérobie des boues d'épuration

### 1.2.1 Aspects généraux

La digestion anaérobie ou méthanisation est un processus de dégradation de la matière organique, réalisé par la syntrophie d'un système microbien complexe en l'absence d'oxygène (McInerney *et al.* 1981). Une large variété de substrats organiques peut être convertie sous forme de méthane (CH<sub>4</sub>) et de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). C'est un mécanisme naturel se produisant dans des milieux tels que le système gastro-intestinal des animaux pluricellulaires, les zones humides et marécageuses, les sources hydrothermales et les sources chaudes en région volcanique...

La découverte de la méthanisation remonte à 1776 lorsque Alessandro Volta durant une de ses promenades observa que du gaz se libérait d'un marais. Après avoir étudié ce phénomène et fait plusieurs expériences, il mit en évidence que le "gaz des marais" était inflammable. Un peu plus tard (1787), Antoine Laurent Lavoisier lui donne le nom de "gas hidrogenium carbonatrum" mais le terme de "méthane" fut proposé en 1865 et confirmé en 1892 par un congrès international de nomenclature chimique. Pendant ce temps, la présence de ce gaz est mise en évidence dans d'autres milieux (dont le fumier) et son origine est attribuée à l'activité microbienne. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, la première installation produisant du méthane voit le jour à Exeter en Grande-Bretagne, elle permet l'éclairage des rues de la ville. Dans les années 1920, l'allemand Karl Imhoff met au point un système de digestion continu, qui équipe quelques années plus tard plusieurs villes allemandes. Les premiers systèmes fonctionnels discontinus de biométhanisation ont été développés en Algérie dès 1939, puis en France par Marcel Isman et Gilbert Ducellier. Durant les années de croissance qui suivirent, ces techniques ont été oubliées avant d'être redécouvertes dans les années soixante dix, lorsque les chocs pétroliers ont montré la nécessité de rechercher des sources d'énergies alternatives. De nouveaux procédés ont vu le jour tels que les systèmes semi-continus, avec ou sans fixation de biomasse qui permettent la méthanisation de substrats divers : effluents industriels dont la charge polluante est élevée (Austermann-Haun *et al.*, 1999), boues d'épuration (Appels *et al.*, 2008 ; Zupancic *et al.*, 2008), déchets ménagers (Mata-Alvarez *et al.*, 2000 ; Hartmann et Ahring, 2006), lisiers (Hansen *et al.*, 1999)... Ainsi, le procédé de méthanisation appliqué aux boues d'épuration comme procédé de dépollution présente des intérêts majeurs qui sont :

- un degré de réduction intéressant de la matière organique est atteint à partir d'une faible augmentation de la biomasse anaérobie contrairement aux procédés de digestion aérobie,
- la production du biogaz peut être utilisée comme sources d'énergies renouvelables pour générer trois types d'énergie : chaleur, électricité ou biocarburant,
- de faibles impacts environnementaux (stabilisation de la matière organique, réduction des nuisances olfactives, réduction des émissions de gaz à effet de serre...).

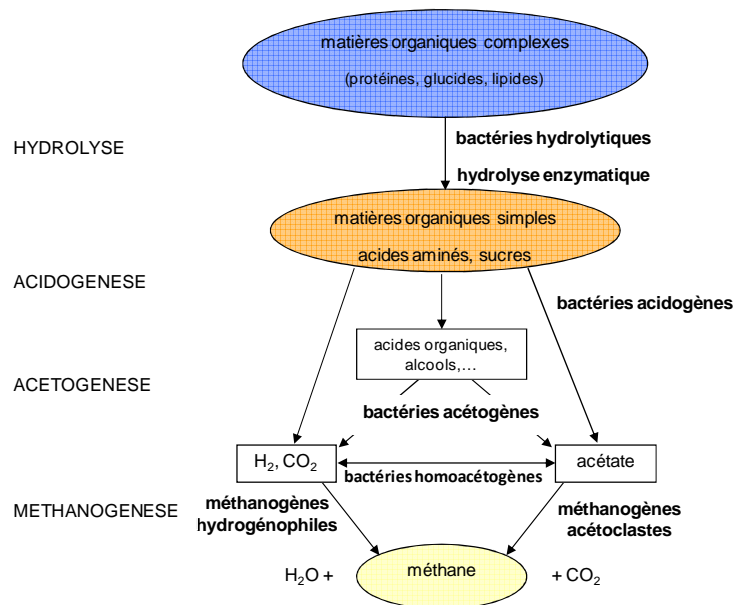
A l'échelle industrielle, la digestion anaérobie des boues d'épuration est réalisée à un taux de matières sèches d'environ 5 %, ce qui nécessite une étape préalable d'épaississement. Ainsi, le type de réacteur infiniment mélangé s'est imposé comme l'unique technologie pour traiter ce déchet. Le produit est continuellement brassé dans le digesteur avec en général une recirculation du biogaz.

**La digestion anaérobie implique 4 étapes majeures (hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse)** dont les microorganismes associés ont des caractéristiques de croissance et des constantes de cinétiques de réaction différentes et spécifiques suivant les conditions opératoires telles que la température, le temps de séjour, le substrat.



## 1.2.2 Les voies de transformations de la matière organique

Le modèle général de la dégradation anaérobie considère trois principaux groupes bactériens qui sont capables de convertir la matière organique, telle que les glucides, les protéines et les lipides en  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  et en eau. Les bactéries fermentatives hydrolysent les différents polymères en monomères solubles par l'action d'enzymes extracellulaires. Ces composés formés sont ensuite convertis en acétate et autres acides gras volatils (AGV) et à longue chaîne (AGLC), hydrogène ( $\text{H}_2$ ),  $\text{CO}_2$  et  $\text{CH}_4$  par d'autres groupes de microorganismes (Figure 1.3).



**Figure 1.3 :** Les principales étapes de la digestion anaérobie de la matière organique complexe.

### 1.2.2.1 L'hydrolyse

Les boues d'épuration sont constituées principalement de composés polymériques tels que les glucides, protéines et lipides. L'hydrolyse enzymatique a la fonction de dépolymériser la matière organique au moyen d'enzymes extracellulaires spécifiques à la matière à dégrader.

Les bactéries participant à la phase d'hydrolyse ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif (Archer and Kirsop, 1990) et forment un ensemble phylogénétique hétérogène regroupant de nombreux groupes bactériens qui seront dépendants du substrat à dégrader (McInerney *et al.*, 1995). Les bactéries hydrolytiques du genre *Clostridium* sont souvent présentes, ainsi que les *Coprothermobacter* qui sont spécifiques d'un substrat protéique en condition thermophile.

L'hydrolyse est généralement considérée comme l'étape limitante de la méthanisation des boues d'épuration en raison de la faible disponibilité de la matière organique organisée dans une matrice complexe (Appels *et al.*, 2008).

### 1.2.2.2 L'acidogénèse

Les monomères, issus de l'étape d'hydrolyse pénètrent à l'intérieur des cellules bactériennes où ils sont métabolisés grâce aux enzymes intracellulaires des bactéries acidogènes. Les produits obtenus sont essentiellement H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et AGV.

Les sucres sont transformés par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF, ou glycolyse, en acide pyruvique, lui-même fermenté en AGV, éthanol, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>.

Les acides aminés, issus de l'hydrolyse des protéines, sont convertis à 90% au moyen des réactions couplées d'oxydo-réduction de Stickland (Ramsay et Pullammanappallil, 2001). Deux acides aminés, l'un accepteur et l'autre donneur d'un atome de carbone, sont simultanément dégradés. La dégradation libre du CO<sub>2</sub> et de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Le radical carboné restant forme un AGV.

Les AGLC sont dégradés en acides gras plus courts et en H<sub>2</sub> au cours de la β-oxydation ou hélice de LYNNEN (Gujer and Zehender, 1983).

Les bactéries participant aux réactions fermentatives sont principalement des bactéries anaérobies strictes du type : *Bacteroides*, *Clostridium*, *Acetobacterium*.

L'acidogénèse est rapide par rapport aux étapes suivantes où les microorganismes ont un temps de génération plus long.

### 1.2.2.3 L'acétogénèse

L'acétogénèse est l'oxydation des AGV en acétate, précurseur direct du CH<sub>4</sub>. La thermodynamique des réactions est défavorable ( $\Delta G^0 > 0$ ) dans les conditions standards (concentration des réactifs = 1 M ; pression des gaz = 1 atm). Les réactions sont thermodynamiquement possibles lorsque la pression partielle en H<sub>2</sub> est comprise entre 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-6</sup> atm (réaction endergonique). Ainsi, l'hydrogène produit doit être consommé conjointement à sa production. Une syntrophie se met en place avec les microorganismes de l'étape de méthanogénèse.

Deux groupes principaux de bactéries sont présents dans l'étape d'acétogénèse : les acétogènes productrices obligées d'hydrogène (bactéries syntrophes) avec les genres *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophus*, *Syntrophococcus* (Archer and Kirsop, 1990) ; les bactéries homo-acétogènes qui produisent de l'acétate soit à partir d'un substrat carboné (*Butyribacterium*, *Peptococcus*), soit par la réduction du CO<sub>2</sub> par H<sub>2</sub> (*Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*...). Ainsi, ces dernières contribuent au maintien d'une pression partielle en hydrogène basse.

### 1.2.2.4 La méthanogénèse

Les produits issus des réactions d'acidogénèse et d'acétogénèse sont minéralisés par des microorganismes anaérobies stricts, principalement des *Archaea* (Baker, 1999), pour produire le CH<sub>4</sub>.

Ils existent deux groupes de méthanogènes :

- les méthanogènes acétoclastes, lesquelles convertissent l'acide acétique en CH<sub>4</sub> et en CO<sub>2</sub>,
- les méthanogènes hydrogénéophiles, utilisant le CO<sub>2</sub> comme accepteur d'électron, pour former le CH<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>O.

Les méthanogènes hydrogénéophiles appartiennent à différents genres de *Archaea* : les *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum* (Archer and Kirsop, 1990). Elles sont toutes anaérobies strictes et obtiennent leur énergie dans l'oxydation de H<sub>2</sub>. Ces réactions utilisent ainsi généralement le H<sub>2</sub> comme donneur d'électron, mais d'autres molécules (acétate, formate, méthanol, etc...) peuvent aussi jouer ce rôle. A cause de ce mode de vie autotrophe, la croissance cellulaire par unité de H<sub>2</sub> utilisé est faible. Elles jouent un rôle important dans le maintien d'une faible pression en hydrogène, favorisant la croissance des bactéries acétogènes. Durant leur métabolisme, ces *Archaea* utilisent également le CO<sub>2</sub> comme accepteur d'électron, formant ainsi le méthane, selon l'équation suivante :



En général, 70 % du CH<sub>4</sub> produit lors de la digestion anaérobie proviennent de la dégradation de l'acide acétique par les méthanogènes acétoclastes (Gujer and Zehender, 1983). Ainsi, les microorganismes de la méthanogénèse acétoclaste ont été largement étudiés. Il s'agit d'anaérobies strictes qui nécessitent des potentiels redox de -330 à -300 mV. Les deux genres les plus fréquemment rencontrés dans un digesteur sont *Methanosarcina* et *Methanosaeta*. Les *Archaea* du genre *Methanosarcina* prédominent pour des concentrations en acide acétique inférieures à 5 mM.



Le nombre de microorganismes participant aux différentes étapes de la méthanisation est très important, seulement les principaux phylotypes ont été donnés en exemple ci-dessus. Godon *et al.* (1997) ont montré que le nombre d'espèces est beaucoup plus important que le nombre de fonctions possibles. Cette spécificité de la communauté microbienne peut expliquer la stabilité fonctionnelle des digesteurs anaérobies face à des perturbations mais aussi l'adaptation des inoculums face à des conditions opératoires ou à un substrat spécifique. En effet, le consortium microbien est très riche et ce sont les conditions opératoires qui vont permettre de sélectionner les microorganismes ayant la meilleure adaptabilité. Ainsi, grâce à ce mécanisme, le procédé de méthanisation a une large possibilité d'applications dans le domaine de l'environnement pour traiter des déchets variés.

Cependant, les microorganismes ont des optima de taux et de vitesse de conversion différents selon les conditions physico-chimiques du milieu réactionnel.

### 1.2.3 Les facteurs physico-chimiques de la digestion anaérobie des boues

Il existe plusieurs paramètres physico-chimiques qui affectent les performances de dégradation des boues d'épuration. Les paramètres principaux sont le pH, la concentration en AGV, la présence d'ammoniac, le temps de séjour, la composition initiale du substrat à dégrader, la température, la configuration du procédé, etc.

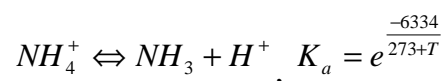
#### 1.2.3.1 Le pH et les AGV

Chaque groupe de microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie possède une gamme optimale de pH. En effet, les milieux acides et basiques altèrent l'équilibre chimique des réactions enzymatiques ou détruisent les enzymes. Les méthanogènes sont généralement très sensibles au pH avec un optimum compris entre 6,5 et 7,2 (Chen *et al.*, 2007). Les microorganismes de la phase de fermentation peuvent se développer dans une gamme plus large de pH, comprise entre 4,0 et 8,5 (Kim *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2007). Cependant, l'alcalinité produite par les méthanogènes sous forme de CO<sub>2</sub>, d'ammonium et de bicarbonate, lors de la digestion anaérobie des boues d'épuration permet de maintenir le pH dans la gamme de neutralité (Araujo *et al.*, 1998).

La baisse de pH dans le digesteur est essentiellement liée à la présence d'AGV. Leur accumulation peut traduire un dysfonctionnement de la syntrophie entre les microorganismes de la méthanisation, notamment ceux impliqués dans la production et la consommation de l'hydrogène, pouvant entraîner une accumulation de propionate (Speece *et al.*, 2006). Les surcharges organiques peuvent également engendrer une accumulation des AGV car l'apport de substrat dépasse les capacités de dégradation de l'écosystème microbien (Moletta *et al.*, 1994).

#### 1.2.3.2 La présence d'ammoniaque

L'ammoniaque est considéré comme un inhibiteur ayant un effet toxique sur les microorganismes de la digestion anaérobie et notamment des méthanogènes acétoclastes (Hansen *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2007). Cet effet inhibiteur est essentiellement dû à la forme libre NH<sub>3</sub>. Il est donc dépendant du pH et de la température suivant l'équilibre :



Ainsi, certains effluents comme les boues d'épuration ayant une forte concentration en composés protéiques peuvent être une source importante d'azote ammoniacal dans le digesteur.

#### 1.2.3.3 La pression partielle en hydrogène

L'hydrogène est une molécule clé dans le processus de la digestion anaérobie. Il est produit lors de l'acétogénèse à partir des produits de l'acidogénèse (AGV). La thermodynamique des réactions de production d'hydrogène est défavorable dans les conditions standards ( $\Delta G^\circ > 0$ ). Cette faible pression partielle est assurée par les bactéries homoacétogènes et hydrogénophiles qui consomment H<sub>2</sub> au fur et à mesure de sa production.

#### **1.2.3.4 Le temps de séjour**

Le temps de séjour hydraulique correspond au temps de rétention de la boue à traiter dans le digesteur. Ce paramètre opératoire a un impact direct sur les différentes étapes réactionnelles de la digestion anaérobie. En effet, un temps de séjour inférieur à 5 jours est insuffisant pour avoir une digestion stable en raison du lessivage des microorganismes méthanogènes.

Dans la pratique, les données d'exploitation montrent des performances optimales avec une réduction entre 53 et 57 % des matières volatiles en suspension pour un temps de séjour moyen de 30 jours en condition mésophile (Parravicini *et al.*, 2006). En général, l'objectif fixé de réduction de la teneur en matières volatiles des boues est de 40 à 50 %, lesquels sont atteints avec un temps de séjour compris entre 20 et 25 jours.

#### **1.2.3.5 La composition des boues à traiter**

La teneur en matières organiques de la boue à traiter, ainsi que la nature et l'organisation de ces matières organiques, influent sur les rendements d'élimination de la méthanisation. Ainsi, les boues primaires et les boues de type forte charge entraînent des rendements d'élimination compris entre 40 et 55 %. En revanche, pour des boues de type aération prolongée, les rendements s'abaissent à 25-35 % (Moletta, 2008).

#### **1.2.3.6 La température**

La température influence les taux de croissance des espèces microbiennes de la digestion anaérobie. Or les réactions liées à ce processus sont athermiques. Il est donc indispensable d'apporter une source de chaleur extérieure pour pouvoir atteindre les conditions optimales de température.

Il existe trois gammes opératoires de températures pour les procédés de digestion anaérobie où les microorganismes ont des vitesses de croissance et de dégradation maximales :

- Psychrophile pour des températures de 5 à 20°C,
- Mésophile de 25 à 45°C (optimum à 35°C),
- Thermophile de 45 à 65°C (optimum à 55°C).

Les avantages d'un régime thermophile par rapport à un régime mésophile sont une réduction du temps de séjour du procédé, une destruction des microorganismes pathogènes, une augmentation de la solubilité et de l'accessibilité des substrats. Les inconvénients sont une dépense énergétique importante pour le maintien de la température à 55°C, un potentiel d'instabilité plus élevé avec notamment un risque d'inhibition par l'ammoniac plus important.

#### **1.2.3.7 Configuration du procédé**

Le réacteur infiniment mélangé est la configuration la plus utilisée pour la digestion anaérobie des boues à l'échelle industrielle. La boue est chauffée à la température choisie (mésophile ou thermophile) et complètement agitée. Ainsi, un environnement uniforme est créé améliorant la stabilité et les performances du procédé. La technique la plus efficace pour réaliser l'agitation est le brassage au biogaz. Le biogaz est recirculé et introduit sous pression au sein de la masse

de boues. L'alimentation est réalisée en continu ou à intervalles très proches afin de maintenir des conditions stables et de réduire les surcharges organiques. Les gammes de dimensionnement habituelles en temps de séjour sont de 16 à 25 jours en condition mésophile et de 8 à 12 jours en condition thermophile (Degrémont, 2005).

La digestion anaérobie en deux étapes (thermophile/mésophile) est basée sur la dissociation des étapes d'hydrolyse et d'acidification et celle de la méthanogénèse. Ainsi, la phase d'hydrolyse enzymatique est optimisée à une température de traitement plus élevée et un pH acide puis une phase méthanogène stable est obtenue à une température plus basse et un pH proche de 7 (Pérot, 1989). Les rendements d'abattement de la matière organique et l'hygiénisation des boues à évacuer sont améliorés. Une application industrielle a été mise en place par Oswald Schulze avec le procédé ASTM (Anaerobic Stabilisation Thermophilic/Mesophilic). La STEP de Köln-Stammheim est équipée d'un tel procédé dont les temps de rétention sont de 5,5 jours pour le réacteur thermophile et de 21 jours pour le réacteur mésophile. Ainsi, les performances du digesteur en termes de réduction des matières sèches ont augmenté de 40 à 48 % et la production spécifique de biogaz de 0,36 à 0,45 m<sup>3</sup>.kg<sub>MVintro</sub> par rapport à une digestion en régime mésophile de 25 à 27 jours (Stowa, 2006).

La digestion anaérobie est donc un procédé possédant de nombreux avantages tels que la stabilisation des boues et la production de biogaz valorisable. Cependant, il est nécessaire d'optimiser la dégradation anaérobie des boues d'épuration afin d'améliorer les rendements et/ou les cinétiques de méthanisation et également le bilan énergétique du procédé de méthanisation. En particulier, une étape de prétraitement peut être associée pour améliorer la dégradation des boues.

#### **1.2.4 Les procédés de prétraitement pour améliorer les performances**

Les **procédés de prétraitement permettent de rendre plus disponible et/ou d'améliorer l'accessibilité de la matière organique** présente dans les boues secondaires en déstructurant la matrice des boues. Il est alors possible d'éliminer plus de matière organique, d'augmenter les productions de biogaz pour un temps donné de digestion, d'augmenter les vitesses des réactions et de diminuer les volumes des réacteurs.

Il existe plusieurs types de prétraitements : thermique (Bougrier *et al.*, 2007 ; Climent *et al.*, 2007 ; Jeong *et al.*, 2007), enzymatique (Davidasson *et al.*, 2007), mécanique (Barjenbruch et Koppow, 2003), par ultrasons (Nickel et Neis, 2007 ; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007), ozonation (Weemaes *et al.*, 2000 ; Battimelli *et al.*, 2003) et chimique (Tanaka *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2003). Perez-Elvira *et al.* (2006) a effectué une revue détaillée des différents prétraitements présents dans la ligne boue. Parmi eux, les traitements thermiques sont mis en avant non seulement pour leurs performances (Bougrier *et al.*, 2006) mais aussi pour leur capacité d'hygiénisation (Bonjoch et Blanch, 2009) et la possibilité d'utiliser le biogaz produit et l'énergie thermique dégagée pour améliorer le bilan énergétique (Perez-Elvira *et al.*, 2008 ; Ferrer, 2008a).

Le **traitement thermique permet la déstructuration des floes** composant les boues rendant ainsi la **matière organique plus disponible** aux microorganismes anaérobies. De plus, l'action de la chaleur induit une lyse des cellules présentes au sein des boues secondaires, libérant le matériel intracellulaire (Neyens et Baeyens, 2003). La durée du traitement thermique a peu d'influence sur la solubilisation de la matière organique et donc sur les performances de méthanisation. Par contre, la **température a une influence importante** sur ces paramètres. Ainsi, Bougrier *et al.* (2008) ont corrélé linéairement l'amélioration de la production de biogaz pour des boues traitées à des températures inférieures ou égales à 170°C au taux de solubilisation de la DCO et à la biodégradabilité initiale. En se basant sur les études réalisées sur le couplage prétraitement thermique et digestion anaérobie mésophile, la **gamme optimale de température de prétraitement est comprise entre 160 et 180°C pour une durée de traitement de 30 min** (Tableau 1.2). Il est intéressant de noter que Fdz-Polanco *et al.* (2008) ont montré que les boues secondaires sont plus sensibles au prétraitement thermique que les boues primaires : la solubilisation augmente de 9,6 contre 3,1 et la biodégradabilité en condition mésophile augmente de 1,62 contre 1,21, respectivement pour les boues secondaires par rapport aux boues primaires. De plus, Perez-Elvira *et al.* (2008) ont montré que le prétraitement thermique à 175°C durant 30 min améliore la production cumulée de méthane mais également les vitesses de production. Ainsi, pour un digesteur continu en régime mésophile traitant une boue mixte (40 % boues primaires et 60 % boues secondaires), ils ont obtenu une amélioration de 40 % de la production de biogaz pour un temps de séjour divisé par deux (12 j au lieu de 20 j).

Une application industrielle a été développée par Veolia Environnement sous le nom de BIOTHELYS®. Il s'agit du couplage d'un prétraitement thermique des boues à 160°C pendant 30 min avec une digestion anaérobie en condition mésophile avec un temps de séjour de 15 jours. Chauzy *et al.* (2005) ont publié les performances du procédé installé sur la STEP de Saumur. Ainsi, le taux d'abattement des matières sèches sur les boues faible charge a atteint 45 % contre 25 % pour une digestion sans prétraitement. La siccité après centrifugation a également été améliorée impliquant une réduction de 46 % du volume de boues à évacuer.

Auteurs	Substrat	Conditions de prétraitement	Conditions de digestion	Résultats
Wang <i>et al.</i> (2009)	Boues mixtes	170°C, 30 min	CSTR <sup>1</sup> et ASBR <sup>2</sup> TSH = 20 j, 35°C	Augmentation du taux d'abattement de la DCOt de 60 à 68 % entre un régime CSTR et ASBR Augmentation de la production spécifique de méthane de 213 à 243 mL <sub>CH4</sub> .g <sub>DCOintro</sub> <sup>-1</sup> entre un régime CSTR et ASBR
Fdz-Polanco <i>et al.</i> (2008)	Boues mixtes	170°C, 7 bars, 30 min	CSTR, TSH = 12 j, 35°C CSTR, TSH = 16 j, 55°C	Amélioration de 55% de la production de méthane en condition mésophile Amélioration de 48% de la production de méthane en condition thermophile
Ferrer <i>et al.</i> (2008b)	Boues mixtes	70°C, 9 h	CSTR, TSH = 10 j, 55°C	Augmentation du taux d'abattement de la MV de 33 à 37 % Augmentation de la production spécifique de méthane de 0.44 à 0.49 L <sub>CH4</sub> .g <sub>MVéliminée</sub> <sup>-1</sup>
Phothilangka <i>et al.</i> (2008)	Boues secondaires	180°C, 60 min	Batch, TSH = 192 h, 35°C	Augmentation de 80 % de la production cumulée de biogaz
Bougrier <i>et al.</i> (2007)	Boues secondaires	170°C, 30 min	CSTR, TSH = 20 j, 35°C	Augmentation de la production spécifique de méthane de 145 à 256 mL <sub>CH4</sub> .g <sub>MVintro</sub> <sup>-1</sup>
Climent <i>et al.</i> (2007)	Boues secondaires	70°C, 9 h	Batch, TSH = 32 j, 55°C	Augmentation de 50 % la production de biogaz
Jeong <i>et al.</i> (2007)	Boues secondaires	120°C, 30 min	Batch, TSH = 14 j, 35°C	Augmentation de 22 % la production de méthane



Auteurs	Substrat	Conditions de prétraitement	Conditions de digestion	Résultats
Bougrier <i>et al.</i> (2006)	Boues secondaires	170°C, 30 min	Batch, TSH = 24 j, 35°C	Augmentation de la production spécifique de méthane de 221 à 333 mL <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>DCOintro</sub> <sup>-1</sup>
Valo <i>et al.</i> (2004)	Boues secondaires	170°C, 60 min	CSTR, TSH = 20 j, 35°C	Augmentation de la production spécifique de méthane de 88 à 162 mL <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>DCOintro</sub> <sup>-1</sup>
Gavala <i>et al.</i> (2003)	Boues primaires	70°C, 4 j	Batch, 55°C	Augmentation de la production spécifique de méthane de 13,7 à 25,5 mmol·g <sub>MVintro</sub> <sup>-1</sup>
Kim <i>et al.</i> (2003)	Boues secondaires	121°C, 30 min	Batch, TSH = 7 j, 37°C	Augmentation de la production de biogaz de 3657 à 4843 L·m <sup>-3</sup> <sub>boues secondaires intro</sub>
Li et Noike (1992)	Boues secondaires	175°C, 30 min	CSTR, TSH = 5 j, 35°C	Augmentation de la production spécifique de méthane de 108 à 216 mL <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>DCOintro</sub> <sup>-1</sup>

<sup>1</sup> CSTR = Continuous Stirred Tank Reactor

<sup>2</sup> ASBR = Anaerobic Sequencing Batch Reactor

**Tableau 1.2 :** Impact de traitements thermiques sur la digestion anaérobie de boues d'épuration.

Il existe cependant **peu de travaux réalisés sur le couplage du prétraitement thermique et de la digestion anaérobie en condition thermophile des boues secondaires**. Climent *et al.*, (2007) ont obtenu une augmentation de 50 % de la production de biogaz pour un prétraitement à 70°C durant 9 h. De plus, Ferrer (2008a) a montré qu'avec une température ambiante de 20°C et un système optimisé d'échange de chaleur, la demande d'énergie nécessaire au fonctionnement du procédé de couplage entre un prétraitement à faible température (70°C) et une digestion anaérobie thermophile d'un mélange de boues primaires et secondaires peut être compensée par le surplus de biogaz produit.

Le prétraitement thermique appliqué de façon optimale permet d'améliorer en général les performances de méthanisation des boues secondaires. Ainsi, l'application du prétraitement thermique et une température élevée de digestion ont une action directe et positive sur les effets limitant de l'étape d'hydrolyse des boues d'épuration. Cependant, les **rendements de conversion obtenus sont encore limités**. Ces limitations sont **principalement dues à un manque de connaissances sur le lien entre la composition du substrat et les mécanismes réactionnels prépondérants lors de la digestion anaérobie**. En effet, l'organisation et la composition de la matière organique constituant le substrat sont des facteurs à considérer. Ainsi, **l'objectif principal de la thèse a été d'étudier la relation entre la composition initiale des boues secondaires et les performances de digestion anaérobie thermophile**. Le prétraitement thermique a été utilisé comme un outil de déstructuration de la matière afin d'observer l'impact de l'état de la matière sur les performances de digestion. Les mécanismes permettant une amélioration de l'étape d'hydrolyse et donc des performances du procédé de méthanisation fonctionnant en condition thermophile ont été étudiés.

Il est nécessaire maintenant de définir la composition des boues secondaires afin de mettre en évidence les barrières physico-chimiques limitant leur dégradation par voie anaérobie

### **1.2.5 Les boues secondaires**

Les boues d'épuration secondaires sont un sous-produit ou déchet de la filière eau, produites lors de l'étape du traitement biologique en condition aérobies des eaux usées. La description des mécanismes du traitement biologique aérobie est utile pour ainsi déterminer et identifier la composition des boues secondaires.

Le traitement biologique secondaire utilise des réactions biologiques naturelles de l'auto-épuration des systèmes aquatiques en conditions optimisées. Les microorganismes impliqués dans ce système de traitement sont des bactéries aérobies hétérotrophes. Ekama et Marais (1979) ont proposé une compartimentation de la matière organique potentiellement dégradable en trois groupes distincts :

- une fraction facilement biodégradable, qui se dégrade en quelques heures,
- une fraction rapidement hydrolysable, partiellement soluble, consommée en quelques dizaines d'heures,
- une fraction lentement biodégradable, qui va se retrouver dans la filière boue.

Ainsi les boues secondaires sont essentiellement composées d'une communauté bactérienne enchevêtrée dans une matrice mucilagineuse, constituée de substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par la biomasse ou apportées par l'effluent à traiter. L'ensemble de ces composés sont responsables de la structure et des propriétés des floccs telles que la biofloculation, la décantabilité, la déshydratabilité et la digestibilité.

### 1.2.5.1 Composition et structure

La matière organique des floccs est principalement sous forme d'exopolymères (EPS), lesquels sont constitués en majorité de protéines mais également de polysaccharides, de lipides, d'acides nucléiques, de substances humiques et de divers hétéropolymères (Flemming et Wingender, 2001). Les EPS participent au processus de floculation ou biofloculation en liant les différents microorganismes dans une matrice gélatineuse au sein de laquelle les particules et fibres organiques et inorganiques et les colloïdes peuvent s'adsorber. C'est un micro-environnement qui permet la proximité des microorganismes et où la matière organique peut être piégée et digérée par les enzymes extracellulaires (Laspidou and Rittmann, 2002). Ainsi les EPS sont importants pour la structure et la stabilité des floccs ainsi que pour les propriétés physico-chimiques et biologiques (Raszka *et al.*, 2006).

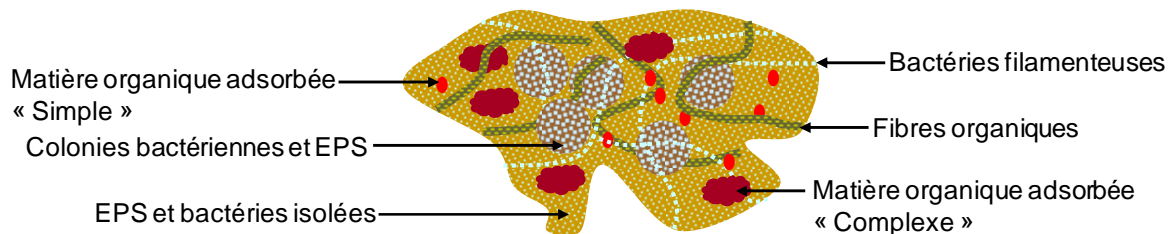
La communauté bactérienne constitue une fraction mineure de la matière organique des floccs, avec une valeur estimée entre 5 et 20 % selon Frolund *et al.* (1996). Le nombre de bactéries dans les boues activées est compris entre  $10^{12}$  et  $10^{13} \text{ .g}_{MVS}^{-1}$  (Nielsen, 2002). Elles sont présentes en cellules isolées, en micro colonies ou sous forme de bactéries filamenteuses. Selon Wilèn *et al.* (2008), Klausen *et al.* (2004), et Schmid *et al.* (2003), la dominance des groupes phylogénétiques des bactéries dans les boues activées de différentes STEP est assez similaire. Le groupe phylogénétique le plus important est *Betaproteobacteria* suivi par *Alphaproteobacteria* et enfin *Gammaproteobacteria*. Les *Betaproteobacteria* grandissent souvent dans de larges colonies (10-100  $\mu\text{m}$ ) alors que les *Alphaproteobacteria* sont présentes en cellules libres ou dans de petites colonies (5-20  $\mu\text{m}$ ) (Lee *et al.*, 2002).

L'eau est le principal constituant des boues et son état physique au sein de la structure dicte les propriétés rhéologiques des boues. Vésilind (1994) distingue quatre états de l'eau dans les boues : l'eau libre, l'eau interstitielle, l'eau vicinale et l'eau liée.

L'eau libre représente la fraction la plus importante dans la boue liquide. Elle se comporte thermodynamiquement comme de l'eau pure, sa tension de vapeur correspond à la saturation pour chaque température. Cette fraction peut être éliminée par simple épaissement, sous l'action de la gravité. Il s'agit donc de molécules d'eau entièrement disponibles, qui peuvent avoir un impact important sur les mécanismes d'hydrolyse, selon le pourcentage présent. L'eau interstitielle est l'eau présente dans les enchevêtrements des polymères ou dans les pores des floccs suite à l'agglomération des particules. Cette eau est libérée par déstructuration des floccs. L'eau vicinale est liée à la surface des particules solides par des liaisons hydrogènes fortes. L'eau vicinale représente la couche d'eau autour des particules, son épaisseur est équivalente à une dizaine de molécules d'eau. L'eau liée est la fraction d'eau chimiquement

liée aux molécules telles que les protéines et les polysaccharides présents dans les boues secondaires.

Plusieurs études (Li and Ganczarczyk, 1989 ; Jorand *et al.*, 1995 ; Nielsen *et al.*, 2004) ont ainsi proposé un modèle de floc avec des niveaux d'agrégation des différents constituants à l'intérieur du floc et entre les floccs (Figure 1.4).



**Figure 1.4 :** Modèle de structure d'un floc bactérien (basé sur le modèle proposé par Nielsen *et al.*, 2004).

### 1.2.5.2 Les interactions au sein des floccs bactériens

La stabilité des floccs bactériens est assurée par les interactions intermoléculaires qui contribuent aux liaisons des différents constituants des floccs. Les interactions sont essentiellement d'origines chimiques telles que les liaisons ioniques, les liaisons hydrophobes et les liaisons entre les molécules d'eau et les EPS.

Les liaisons ioniques se formant entre les cations divalents et trivalents et les EPS chargés négativement sont un mécanisme important dans le processus de bioflocculation et le maintien de la structure agrégée. A pH 7, les liaisons se créent entre les groupements carboxyles des acides aminés déprotonés et des sucres tels que les acides uroniques et les groupements phosphates des acides nucléiques (Neyens *et al.*, 2004). Les principaux cations intervenant dans ces interactions sont les  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Al^{3+}$  et  $Fe^{3+}$  (Park *et al.*, 2006). Novak *et al.* (2003) montrent que le rapport cations monovalents/divalents dans les eaux usées influence les propriétés des floccs des boues activées. Une forte concentration en cations monovalents entraîne une structure faible des floccs et un grand taux de biocolloïdes en solution.

Les liaisons hydrophobes ont lieu entre les EPS et/ou les surfaces des cellules (Urbain *et al.*, 1993). Les EPS pouvant engendrer ce type de liaisons sont des molécules portant des groupements hydrophobes (longues chaînes carbonées, cycles aromatiques) ou des structures de repliement moléculaires qui induisent des régions hydrophobes.

Pour les liaisons entre les molécules d'eau et les EPS, deux types peuvent être considérés (Forster, 1983) :

- les liaisons électrostatiques : il s'agit d'une interaction entre le dipôle permanent de la molécule d'eau et du dipôle permanent ou induit des groupements fonctionnels des EPS. Ces interactions correspondent aux forces de Keesom (dipôle permanent/permanent) et aux forces de Debye (dipôle permanent/induit). Les

groupements carboxyles et hydroxyles sont les plus impliqués grâce à leurs forts potentiels d'interactions,

- les liaisons hydrogènes : elles se créent essentiellement entre les groupements hydroxyles des EPS (très fréquents dans les polysaccharides) et les molécules d'eau.

L'ensemble de ces liaisons participe à l'énergie totale de liaisons de la structure des floccs. Ces interactions possèdent des énergies de liaison faibles. Pour les forces de Keesom, l'énergie de liaison est de 0,5 à 3 kJ.mol<sup>-1</sup>, les forces de Debye ont une énergie de 0,002 à 0,5 kJ.mol<sup>-1</sup> et les liaisons ioniques et hydrogènes ont une énergie de 5 à 40 kJ.mol<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont très inférieures aux énergies de liaisons covalentes. Cependant, le nombre important de groupements fonctionnels sur une macromolécule peut entraîner une énergie de liaison totale comparable à la valeur de l'énergie de plusieurs liaisons covalentes.

La cohésion du flocc est dépendante des propriétés physico-chimiques des composés présents qui vont dicter les différents types de liaisons pouvant se créer, mais elle est également fortement influencée par les conditions opératoires du bassin d'aération.

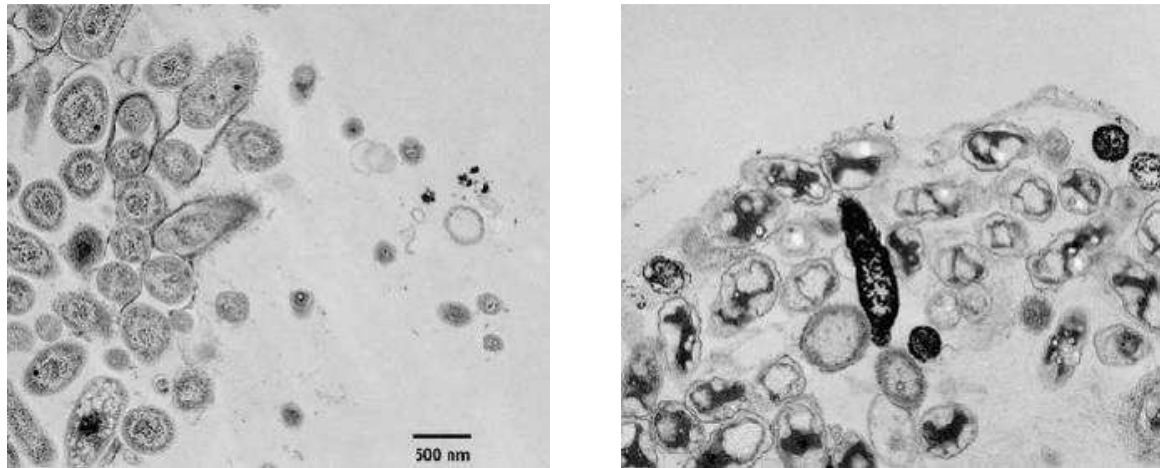
### **1.2.5.3 Influence des conditions opératoires du bassin d'aération**

Le processus de floculation ou biofloculation qui permet la formation des floccs bactériens est fortement influencé par l'activité et la nature de la communauté microbienne (Muller *et al.*, 2002), lesquelles sont contrôlées par les conditions environnementales et opératoires du bassin d'aération (concentration en O<sub>2</sub>, temps de séjour).

Les conditions d'aération dans le bassin de boues activées peuvent affecter la structure des floccs bactériens en impactant sur les différentes espèces et groupes fonctionnels de microorganismes. Wilèn et Balmer (1999) ont montré qu'un court évènement de condition anaérobie peut causer une désintégration des floccs des boues activées, en revanche une refloculation est possible lorsque l'oxygène est ajouté en excès. De façon similaire, Klausen (2001) a observé que la turbidité de la phase liquide obtenue après centrifugation d'une boue, placée sous condition anaérobie, était plus importante par rapport à celle placée sous condition aérobie. Cette turbidité a été reliée à la présence de groupes bactériens. Ainsi, soit l'oxygène favorise la présence de microorganismes sécrétant les composés nécessaires à une bonne cohésion du flocc, soit les conditions anaérobies stimulent l'activité hydrolytique de microorganismes anaérobies, conduisant à l'excrétion d'exo-enzyme qui peuvent dégrader la matrice d'EPS.

Un temps de séjour (ou âge de boue) court (4-9 j) entraîne une structure irrégulière et une distribution granulométrique plus variable par rapport à un temps de séjour long (16-20 j) qui induit une structure plus compacte et sphérique. L'observation par microscopie de la structure d'un flocc a montré que l'interface de l'agrégat avec le volume d'eau est assez poreuse lors d'un temps de séjour court (Figure 1.5). En revanche, la surface des floccs est moins rugueuse et les EPS colloïdaux s'agglomèrent pour former une couche de surface lors d'un temps de séjour long (Liao *et al.*, 2006). Les travaux de cette étude ont pu confirmer l'hypothèse de Martins *et al.* (2004) qui ont souligné l'importance des gradients de substrat et d'oxygène

dissous pour le développement de structures filamenteuses dans les floccs. Ils ont observé qu'une concentration en oxygène dissous faible associée à un TSH de l'ordre de 4 à 6 j, induisant une charge organique élevée, crée une limitation de la diffusion d'oxygène dans le flocc, favorisant la croissance de floccs plus irréguliers.



**Figure 1.5** : Structure de floccs avec un temps de séjour aérobie de 4 j (a) et avec un temps de séjour aérobie de 20 j (Liao *et al.*, 2006).

Le temps d'aération influence également les propriétés chimiques des boues. L'hydrophobicité de la surface des floccs augmente tandis que la charge naturellement négative de l'agrégat diminue avec un temps d'aération long (Liss *et al.*, 2002). Ces paramètres évoluent dans le sens d'une meilleure biofloculation. La nature des EPS est également influencée par le temps d'aération. En effet, Liss *et al.* (2002) ont montré que le rapport d'EPS d'origine protéique sur les EPS d'origine polysaccharide (PN/PS) augmente avec l'accroissement du temps d'aération. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Kara *et al.* (2008) et Ahimou *et al.* (2007), qui ont mis en évidence que la stabilité des floccs était favorisée par une dominance d'EPS d'origine polysaccharide et une diminution du rapport PN/PS. Les résultats évoqués dans ces études sont obtenus à partir de floccs dont les conditions de croissance et l'origine des effluents sont variables. Il est donc probable que ces conditions affectent les propriétés des floccs mais aussi l'efficacité des méthodes d'extraction et de quantification des EPS, d'où des corrélations divergentes entre la cohésion et les EPS extraites. Cependant, la nature des EPS reste un paramètre clef dans l'organisation de la structure des floccs bactériens.

La floculation cationique polyélectrolyte est utilisée pour le conditionnement des boues. Ce processus permet d'augmenter la taille des floccs et de diminuer la teneur en eau liée, favorisant ainsi la décantabilité et la déshydratabilité des boues (Katsiris and Kouzelikatsiri, 1987; Senthilnathan and Sliger, 1993). Chu *et al.* (2004) ont observé, par l'analyse de la distribution granulométrique de boues flocculées par l'ajout de polymères cationiques, une augmentation du diamètre médian de  $87 \pm 26 \mu\text{m}$  à  $989 \pm 73 \mu\text{m}$ . Ainsi, la floculation par polymères cationiques augmente significativement la taille des floccs par liaisons ioniques et

rend les floccs bactériens plus larges et compacts, réduisant ainsi la disponibilité de la matière organique.

Les interactions présentes au sein des floccs assurent la stabilité de la matrice et elles sont grandement dépendantes des conditions opératoires du bassin d'aération. Ainsi pour appréhender la stabilité de la matière, il faut prendre en considération l'histoire de la boue. L'âge de boue est un bon indicateur de la complexité de la boue à traiter. En effet, le temps d'aération est un paramètre impactant directement la disponibilité et l'accessibilité de la matière organique présente au sein des boues secondaires. Ces deux notions sont importantes car elles dictent les performances de biodégradation en termes de production de méthane et de taux de matière organique éliminée. Le paragraphe suivant s'intéresse à définir les notions de biodisponibilité, de bioaccessibilité et de biodégradabilité de la matière organique qui influent sur les performances de méthanisation.

### **1.3 Biodisponibilité, bioaccessibilité et biodégradabilité de la matière organique : trois notions importantes.**

La matière organique d'un substrat convertie en méthane dans un digesteur anaérobie est appelée la fraction biodégradée. Cependant, cela ne signifie pas que toute la matière organique potentiellement biodégradable soit effectivement dégradée. En effet, trois notions, qui sont la biodisponibilité, la bioaccessibilité et la biodégradabilité contrôlent la dégradation d'un substrat tel que les boues secondaires.

La biodisponibilité et la bioaccessibilité ont des définitions différentes suivant le domaine scientifique (pharmacologie, toxicologie). Par exemple, dans le domaine de l'étude du devenir des micropolluants au cours de la digestion anaérobie, Barret (2009), en se basant sur les travaux de Semple *et al.* (2004), a défini un composé trace organique comme biodisponible s'il peut traverser la membrane cellulaire d'un microorganisme à un instant  $t$ . Il est bioaccessible s'il est disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un microorganisme depuis son environnement, lorsque l'organisme accède à cet environnement.

Ainsi, il est possible de faire un parallèle de ces notions en les appliquant à la matière organique des boues secondaires dégradées par les microorganismes de la digestion anaérobie. Aquino *et al.* (2008) a défini une molécule comme biodisponible lorsque les microorganismes ont déjà un accès direct à la molécule. La molécule peut donc traverser la paroi cellulaire des microorganismes. Elle est à l'état soluble et la taille estimée pour une diffusion à travers la paroi cellulaire est de l'ordre de 1 000 Da (Madigan *et al.*, 2003). Des obstacles stériques, des vitesses de transferts de masse limitées et des vitesses d'hydrolyse lentes résultent de l'organisation complexe des boues secondaires en couches de matière successives et imbriquées les unes entre les autres (Jorand *et al.*, 1995 ; Nielsen *et al.*, 2004). Il est donc possible d'ajouter la notion de bioaccessibilité de la matière organique qui réfère au possible accès des molécules emprisonnées dans une matrice par les microorganismes. Cette bioaccessibilité dépend de plusieurs paramètres dont :

- la durée de la dégradation : en effet, une molécule à un instant  $t$  peut être bioaccessible et devenir après un temps  $\Delta t$  biodisponible grâce à l'action des processus de dégradation et notamment des processus d'hydrolyse,
- la température du processus de dégradation : l'augmentation de température accroît les taux de diffusion et la solubilité des composés, ainsi l'accessibilité des molécules organiques est améliorée,
- l'activité des bactéries hydrolytiques : l'absence d'exoenzymes hydrolytiques ou l'absence de fonctionnalité participant à l'hydrolyse ne permettent pas de rendre la molécule biodisponible,
- l'application d'un prétraitement : l'objectif du prétraitement est de rendre plus disponible ou accessible les molécules organiques, ainsi un prétraitement optimisé permet de maximiser la biodisponibilité et/ou l'accessibilité de la matière organique.

Enfin, la biodégradabilité est reliée à la capacité de la molécule à être dégradée biologiquement par des microorganismes qui ont déjà accès à la molécule. Ainsi, la biodégradation des boues secondaires est fonction de la biodisponibilité, de la bioaccessibilité et de la biodégradabilité de la matière organique. Par exemple, à l'état initial une boue secondaire possède une structure complexe principalement sous forme particulaire. La faible bioaccessibilité de la matière limitera donc fortement la biodégradation. Une caractérisation exhaustive de la matière organique est également nécessaire pour identifier les composés présents et connaître leur potentiel de dégradabilité. En effet, la matière organique d'une boue secondaire peut être rendue largement biodisponible par l'action d'un prétraitement thermique à très haute température (supérieure à 200°C). Cependant, de telles températures entraînent la formation de composés réfractaires tels que les mélanoidines et les composés d'Amadori (Stuckey et McCarty, 1984, Müller, 2001 ; Bougrier *et al.*, 2007) qui diminuent la biodégradabilité de la matière.

Pour synthétiser, la matière biodisponible correspond donc à la matière organique présente initialement sous forme soluble dans le substrat à traiter. La matière bioaccessible est la matière organique particulaire qui deviendra disponible après un temps  $\Delta t$  de dégradation, dépendant de l'activité des bactéries hydrolytiques, des conditions opératoires de digestion et de la présence ou non d'un prétraitement. Enfin, la biodégradabilité correspond à la capacité de la molécule à être dégradée biologiquement par des microorganismes qui ont déjà accès à la molécule.

A l'heure actuelle, **peu de travaux scientifiques ont étudié le lien entre la caractérisation de la boue et les performances de biodégradation et défini précisément les notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité.** Les premiers travaux à s'intéresser à l'impact de la composition du substrat sur les vitesses de conversion et de production de méthane sont ceux de Owens et Chynoweth (1993) mais appliqués aux déchets solides municipaux. De plus, la composition du substrat est rapportée comme un paramètre influant, au même titre que les



conditions opératoires de digestion (Demirel *et al.*, 2006 ; Bengtsson *et al.*, 2008 ; Montusiewicz, 2008).

Les relations entre la composition du substrat et les performances de méthanisation ont été identifiées dans les travaux de la thèse grâce à une méthode statistique et par modélisation. La méthode statistique consiste à utiliser un modèle statistique pour mettre en relation les variables initiales caractérisant le substrat et une variable finale caractérisant les performances d'un processus de dégradation telle que la biodégradabilité anaérobie. Ainsi, dans le domaine de la minéralisation des boues d'épuration dans le sol, les travaux de Hattori et Mukai (1986), Gilmour et Skinner (1999), Parnaudeau *et al.* (2004) ont relié par des analyses statistiques en composantes principales certains paramètres du substrat aux performances de minéralisation. Parnaudeau *et al.* (2004) ont ainsi montré que la fraction de « lignine-like » a un impact négatif sur les vitesses de dégradation des boues. Récemment, Schievano *et al.* (2008) ont réalisé des régressions linéaires entre des paramètres chimiques et biologiques de mélanges de boues d'épuration et de déchets agricoles. Ils ont défini une régression linéaire avec quatre variables significatives pour prédire le potentiel de production de biogaz. Ces variables sont la teneur en matières volatiles, la demande en oxygène lors d'un test de respirométrie de 20 h, le carbone organique total et la fraction soluble définie par le fractionnement de Van Soest. Ainsi, leur modèle permet de prédire la production de biogaz avec une erreur moyenne de 16 %. De plus, les paramètres de caractérisation permettent d'identifier la teneur et la qualité de la matière organique présente dans le substrat.

La seconde méthode correspond à l'utilisation d'un modèle mathématique qui intègre les différents processus réactionnels de la digestion anaérobie. Les avantages de la modélisation sont de pouvoir apporter des informations sur le comportement des différentes voies de dégradation et d'étudier l'influence de la composition initiale du substrat sur les performances de digestion. Le paragraphe suivant présente le modèle mathématique utilisé lors des travaux de la thèse pour relier la caractérisation de boues et leurs performances de dégradation anaérobie.

## **1.4 Modélisation de la digestion anaérobie**

Une des stratégies appropriée pour étudier l'influence de la composition du substrat sur les performances de digestion anaérobie est le développement d'un modèle mathématique. Cet outil apporte des informations sur les différentes étapes réactionnelles de la méthanisation en fonction des variables initiales caractérisant le substrat. Une fois calé et validé, il devient un outil d'étude afin de tester différentes configurations et d'optimiser le fonctionnement d'un procédé.

Le paragraphe suivant présente un état de l'art de la modélisation de la digestion anaérobie, ainsi que certains points limitants du modèle Anaerobic Digestion Model n°1 (ADM1) appliqué aux boues d'épuration.

### 1.4.1 Historique

Le premier modèle dynamique du procédé de digestion anaérobie voit le jour grâce aux travaux de Andrews (1969). La limite de ce modèle est induite par l'absence du pH, alors que celui-ci influence grandement les réactions biologiques. Andrews et Graef (1971) sont les premiers à prendre en considération les interactions physico-chimiques entre les phases liquides, gazeuses et biologiques. Cependant, seul le groupe de microorganismes produisant le méthane à partir de l'acétate est intégré dans le modèle.

Les travaux de Hill et Barth (1977) sur la digestion anaérobie du lisier d'animaux permettent d'élaborer un modèle capable de prédire la syntrophie existant lors de la dégradation anaérobie de la matière. Ainsi, l'étape d'hydrolyse des composés particuliers, les microorganismes produisant les AGV et ceux produisant le méthane sont intégrés dans le modèle. L'action de l'ammoniaque en tant que composé inhibiteur et donc perturbateur de la stabilité du système est prise en compte grâce à une fonction d'inhibition sur les microorganismes produisant le méthane.

L'étude plus spécifique de la dégradation anaérobie d'un simple composé, tel que le glucose et les travaux portant sur la thermodynamique des réactions biologiques ont permis d'intégrer un plus grand nombre de réactions biologiques avec leur biomasse spécifique (Mosey, 1983), ainsi que le rôle important de l'hydrogène sur la syntrophie entre les méthanogènes hydrogénophiles et les bactéries acétogènes (Thauer *et al.*, 1977 ; Mc Inerney *et al.*, 1981 ; Harper et Pohland, 1986).

Les substrats complexes nécessitent une étape d'hydrolyse des composés particuliers pour les rendre accessibles à la biomasse épuratrice, incluant différents phénomènes (réactions enzymatiques, diffusion...). Massé et Droste (2000) et Von Münch *et al.* (1999) ont proposé un fractionnement du substrat initial sous forme de compartiments biochimiques (glucides, protéines et lipides), présents sous forme particulière ou soluble. L'hydrolyse des composés organiques particuliers est représentée par une réaction d'ordre un.

La complexité et la multitude des mécanismes de dégradation présents dans la digestion anaérobie ainsi, qu'un développement sommaire des procédés anaérobies à l'échelle industrielle par rapport aux procédés aérobies a entraîné un manque de standardisation des modèles de simulation. Ainsi, Batstone *et al.* (2002) ont développé et proposé un modèle aussi générique que possible, l'ADM1, regroupant l'ensemble des étapes réactionnelles importantes de la dégradation anaérobie de la matière organique. Une bibliographie, des différents paramètres et coefficients cinétiques à intégrer pour chaque cas d'application, est également proposée. Ce modèle offre un outil mathématique capable d'assister l'optimisation du fonctionnement d'un procédé de digestion anaérobie tout en offrant des possibilités d'extensions ou de simplifications suivant le substrat à dégrader ou le type de procédé étudié.

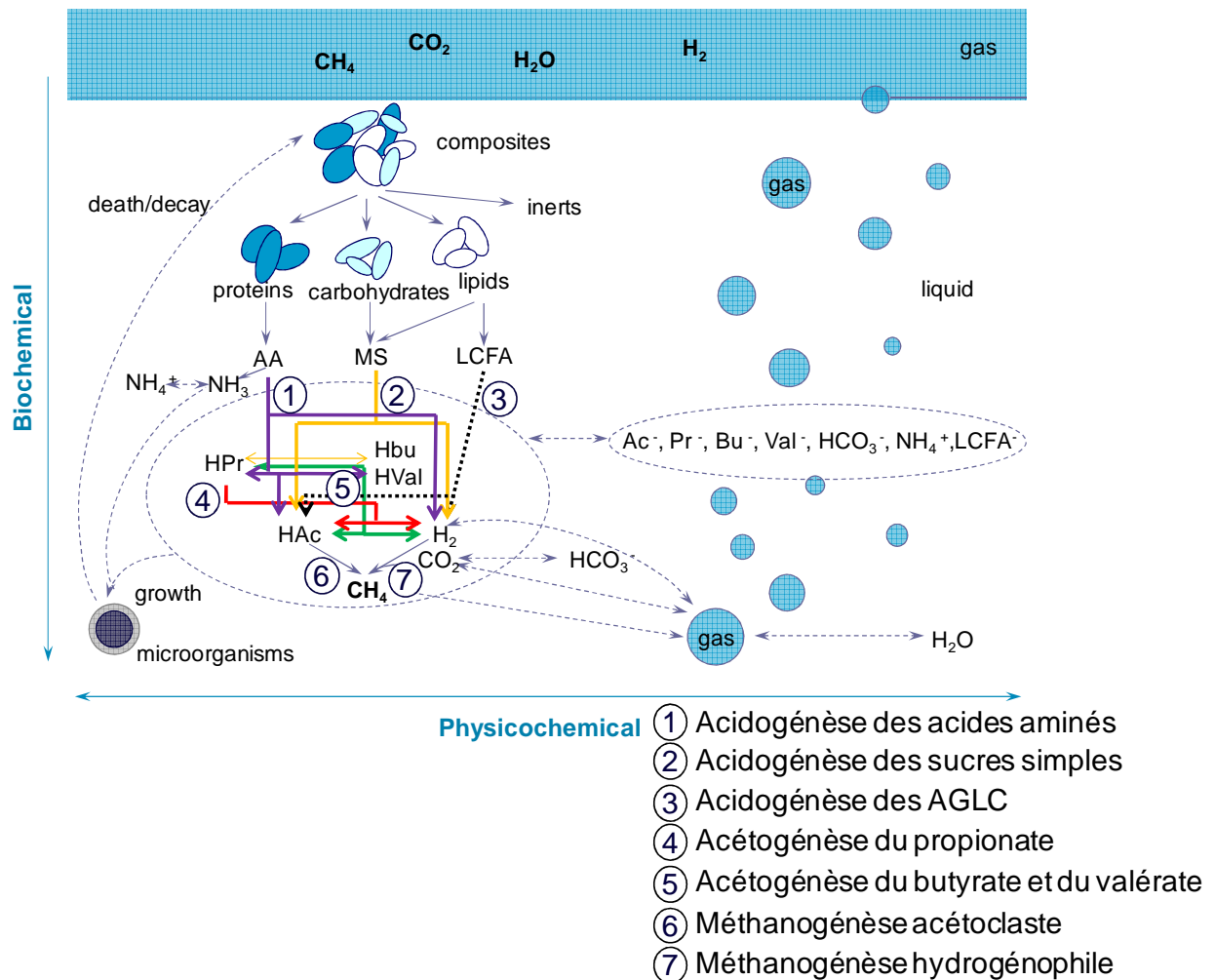
## 1.4.2 Le modèle de digestion anaérobie : Anaerobic Digestion Model n°1

### 1.4.2.1 Description

Le modèle ADM1 est un modèle mathématique intégrant les principales étapes réactionnelles de la conversion de la matière organique particulaire en  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  et en matières inertes via des processus physico-chimiques et biologiques (Figure 1.6).

Les mécanismes de solubilisation extracellulaire sont divisés en une étape de désintégration et une étape d'hydrolyse. La première est considérée comme une réaction de déstructuration qui consiste à convertir la matière organique complexe en protéines, glucides, lipides et matières inertes. Cette étape a été introduite afin de décrire la dégradation de matières organiques de natures différentes agglomérées dans une structure complexe telle que les boues secondaires. La seconde est une hydrolyse enzymatique des composés biochimiques particuliers en acides aminés, sucres simples et AGLC. Elle permet de décrire la dégradation de substrats purs ou bien définis tels que la cellulose, l'amidon ou protéines. Les étapes intracellulaires incluses dans la structure du modèle sont les suivantes : l'acidogénèse qui est la conversion des sucres simples ou des acides aminés en AGV et en hydrogène, les AGLC sont oxydés pour produire de l'acétate et de l'hydrogène ; l'acétogénèse où le propionate, le butyrate et le valérate sont convertis en acétate et en hydrogène ; la méthanogénèse acétoclaste au cours de laquelle le méthane est produit par clivage de l'acétate en  $\text{CH}_4$  ; la méthanogénèse hydrogénéophile qui est la réduction du  $\text{CO}_2$  par l' $\text{H}_2$  pour produire du  $\text{CH}_4$ .

Le modèle ADM1 compte 26 ou 32 variables d'état permettant ainsi de décrire le comportement dynamique des différentes réactions. L'ensemble des variables de l'ADM1 s'expriment en  $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3}$  ou  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ , et le bilan est donc réalisé en DCO. L'azote et le carbone inorganiques s'expriment en leurs concentrations molaires respectives,  $\text{kmol} \cdot \text{m}^{-3}$ . Les composés particuliers sont représentés avec un « X », il s'agit des composés organiques particuliers et des microorganismes actifs qui ne peuvent pas traverser la paroi cellulaire des bactéries. Les espèces microbiennes incluses dans le modèle sont les microorganismes dégradant les sucres simples  $X_{su}$ , les acides aminés  $X_{aa}$ , les AGLC  $X_{fa}$ , le butyrate et le valérate  $X_{ca}$ , le propionate  $X_{pro}$ , l'acétate  $X_{ac}$  et l'hydrogène  $X_{h_2}$ . La mortalité des microorganismes actifs est incorporée dans le modèle. Les cellules mortes retournent en entrée du modèle dans la fraction  $X_c$  (composites) qui est elle-même convertie en protéines  $X_{pr}$ , glucides  $X_{ch}$  et en lipides  $X_{li}$ . Les composés solubles sont les molécules capables de diffuser à travers la paroi cellulaire des microorganismes épurateurs. Il s'agit des monomères des composés biochimiques particuliers tels que les acides aminés  $S_{aa}$ , les sucres simples  $S_{su}$ , les AGLC  $S_{fa}$ , et les produits des réactions biologiques tels que le valérate  $S_{va}$ , le butyrate  $S_{bu}$ , le propionate  $S_{pro}$ , l'acétate  $S_{ac}$ , l'hydrogène  $S_{H_2}$  et le méthane  $S_{CH_4}$ .



**Figure 1.6 :** Voies réactionnelles de la digestion anaérobie incluses dans l'ADM1.

Le calcul du pH est intégré dans l'ADM1 en considérant les réactions de dissociation des couples acido-basiques tels que les AGV (acétate, propionate, butyrate et valérate), le bicarbonate et l'ammonium. Il s'effectue par un système d'équations différentielles ou un système d'équation algébrique. Le modèle tient également compte des équilibres ioniques et des échanges liquide-gaz pour le dioxyde de carbone, le méthane et l'hydrogène. Plusieurs types d'inhibition peuvent apparaître lors de la digestion anaérobie à cause de l'accumulation de produits intermédiaires. Ainsi, l'inhibition par le pH sur la croissance des microorganismes est décrite par des fonctions empiriques. L'inhibition par l' $H_2$  sur les étapes d'acidogénèse, l'inhibition par l'ammoniaque sur les méthanogènes acétoclastes sont décrites par des fonctions de type non-compétitives.

Les étapes réactionnelles incluses dans le modèle sont exprimées en fonction de la concentration du substrat. Ainsi, la désintégration de  $X_c$  et l'hydrolyse de  $X_{pr}$ ,  $X_{ch}$  et  $X_{li}$  sont décrites par une fonction cinétique d'ordre un. Les réactions intracellulaires sont décrites par une fonction de type Monod basée sur la dégradation du substrat. Enfin, la mortalité des microorganismes est représentée par une fonction d'ordre un.

Le modèle ADM1 ne décrit pas l'ensemble des mécanismes réactionnels de la digestion anaérobie tels que la précipitation de solides et la réduction des sulfates (Batstone *et al.*, 2006) et ni la diversité microbienne (Ramirez et Steyer, 2008). Cependant, l'objectif principal fut de développer un outil mathématique assez complet pour simuler la dynamique des phénomènes clefs dans le but d'évaluer, de comprendre et d'optimiser les procédés de digestion anaérobie. En raison du large domaine d'applications de ce modèle, une étape de calibration et de validation est nécessaire pour chaque utilisation.

Le modèle ADM1 est donc un outil mathématique devenant une référence pour la modélisation de procédé anaérobie et relativement bien détaillé suivant le cas d'application. Dans les travaux de la thèse, ce modèle a servi de structure de référence à laquelle certaines modifications ont été apportées pour ainsi mieux décrire les phénomènes réactionnels de la méthanisation des boues secondaires et également améliorer leur compréhension.

#### 1.4.2.2 Les limites du modèle

La complexité des boues secondaires est la résultante de l'accumulation de matières organiques non biodégradées lors du traitement aérobie, de matières minérales et de biomasses actives ou mortes. Cette organisation entraîne une accessibilité limitée et une biodégradabilité variable des différents constituants de la matière organique et par conséquence rend l'étape d'hydrolyse limitante. Ainsi, dans notre cas d'étude, le modèle ADM1 présente **deux principales limites** qui sont : la **définition des variables initiales du modèle** et la **représentation des étapes de désintégration et d'hydrolyse par une cinétique d'ordre un**.

##### 1.4.2.2.1 Implémentation des variables initiales

L'application du modèle ADM1 nécessite une caractérisation du substrat à traiter adaptée aux variables initiales du modèle, ce qui représente l'une des principales limites de ce modèle. En effet, dans le cas de la digestion anaérobie de composés organiques complexes tels que les boues secondaires, le substrat est défini suivant les fractions  $X_c$ ,  $X_{pr}$ ,  $X_{ch}$ ,  $X_{li}$ ,  $X_I$  et  $S_I$ . Ainsi,  $X_c$  permet de représenter des substrats complexes qui sont déstructurés en composés biochimiques particuliers via des rendements de fractionnement  $f_{X_{pr}X_c}$ ,  $f_{X_{ch}X_c}$ ,  $f_{X_{li}X_c}$ ,  $f_{X_I X_c}$ ,  $f_{S_I X_c}$ , prédéfinis dans le modèle ADM1 proposé par Batstone *et al.* (2002) mais qui nécessitent d'être réévalués pour chaque application (Buffière *et al.*, 2008).

Les fractions de matière considérées comme inertes dans le modèle,  $X_I$  et  $S_I$ , sont définies à partir de la biodégradabilité de la boue étudiée. Ces paramètres doivent être définis de façon précise car ils dictent les performances du digesteur. Cependant, l'analyse de ces paramètres nécessite de mettre en place des tests de dégradation anaérobie en condition batch ou en condition continu (Angelidaki et Sanders, 2004).

Il est donc difficile de définir les variables initiales du modèle. Plusieurs travaux proposent différentes méthodes afin de faciliter l'implémentation de ces variables.

Les interfaces, créées entre différents modèles utilisés au sein des STEP, permettent d'assurer la continuité des flux de matières et donc d'obtenir les variables initiales d'un modèle. Le « Continuity Based Interface Models » (CBIM) développé par Vanrolleghem *et al.* (2005) est basé sur la conservation du bilan de l'analyse élémentaire du substrat et de la DCO. Le « MCN transformer » proposé par Copp *et al.* (2003) a été spécialement développé pour coupler les modèles ASM1 et ADM1. Il se base sur la conservation de la DCO et de l'azote total. Cependant, l'utilisation d'interfaces nécessite d'éliminer les degrés de liberté lorsque le modèle de destination a un nombre de variables d'entrée plus grand que le modèle initial. Cela est le cas lors d'une implémentation des variables d'entrée de l'ADM1 à partir de l'ASM1. Zaher *et al.* (2007) ont testé ces deux méthodes afin de comparer leur efficacité pour relier l'ASM1 et l'ADM1 (et vice-versa). Les résultats ont montré que le CBIM est plus performant puisqu'il permet la conservation du carbone à travers la transformation des variables ASM1 vers ADM1 et de créer la variable  $S_{aa}$ . Ainsi, la conservation du bilan de carbone assure une bonne prédictibilité de l'alcalinité dans les deux modèles et la conservation des acides aminés permet de représenter correctement la dynamique des AGV, notamment dans le cas de la digestion de boues secondaires. Nopens *et al.* (2009) ont proposé une interface modifiée à partir de celle de Copp *et al.* (2003) pour définir directement la matière entrant dans le modèle ADM1 en variables  $X_{pr}$ ,  $X_{ch}$ ,  $X_{li}$  et  $X_I$  sans définir  $X_c$ . Ils ont montré que l'utilisation de  $X_c$  ne permet pas de représenter les différentes vitesses de dégradation qu'ils ont observées lors de la digestion de boues mixtes. De plus, cette variable unique impose un rapport DCO/MV identique sur les deux substrats mélangés alors que leur matière organique ne possède pas le même état d'oxydation. Les interfaces élaborées sont intéressantes pour définir les variables d'entrée du modèle ADM1. Cependant, leur application est complexe et nécessite les données issues de la modélisation du bassin d'aération. Les travaux de la thèse ont porté sur l'étude de l'étape de méthanisation de boues d'épuration et n'ont donc pas pu permettre l'utilisation de ces interfaces.

Certains travaux se basent sur cette stratégie pour déterminer les variables initiales du modèle ADM1. Yasui *et al.* (2006) et Ekama *et al.* (2007) ont réalisé un lien entre les modèles ASM et ADM1 afin d'estimer les variables initiales, notamment les fractions inertes du modèle de digestion anaérobie. Ainsi, ils ont montré que la fraction inerte prédite par le modèle ASM1 est similaire à celle obtenue par dégradation anaérobie en condition mésophile. Jones *et al.* (2008) et Phothilangka *et al.* (2008) ont également utilisé cette hypothèse pour simuler la dégradation anaérobie de boues primaires et de boues secondaires en condition mésophile. Cependant, dans le cas de Phothilangka *et al.* (2008), cela ne permet pas de prévoir l'augmentation de dégradabilité apportée par le prétraitement thermique. Des tests de potentiel méthane restent nécessaires pour évaluer la fraction inerte des boues prétraitées thermiquement. Huete *et al.* (2006) et Sotemann *et al.* (2006) ont également utilisé l'algorithme des matrices de Petersen pour définir les variables d'entrée du modèle à partir d'analyses globales tels que la DCO, le carbone et des analyses sur la phase soluble pour mesurer les AGV, l'alcalinité, l'ammonium. L'un des inconvénients de cette méthode est le fait que les erreurs de mesure même faibles réalisées sur les paramètres globaux, entraînent des erreurs importantes sur l'estimation des variables, dues à l'accumulation des erreurs.

L'implémentation des variables initiales du modèle ADM1 peut donc être réalisée selon différentes méthodes qui nécessitent un travail important. Ainsi, l'un des objectifs de la thèse a été de proposer une méthode de caractérisation des boues, se basant sur des analyses chimiques et biochimiques de la matière, afin de définir correctement les variables initiales du modèle.

#### 1.4.2.2.2 Représentation des étapes de désintégration et d'hydrolyse

La représentation des étapes de désintégration et d'hydrolyse telle qu'elle est proposée dans le modèle ADM1 est jugée simpliste dans le cas de la dégradation d'un composé particulaire complexe. En effet, l'hydrolyse enzymatique est un processus complexe faisant intervenir différents phénomènes tels que la production d'enzymes hydrolytiques, la diffusion, l'adsorption, désactivation des enzymes,... qui vont participer à la dégradation des composés particuliers en leurs monomères ainsi assimilables par les microorganismes de l'étape d'acidogénèse.

Zavarzin (1986) a proposé une description du processus d'hydrolyse enzymatique en deux étapes. La première étape correspondrait à une colonisation bactérienne durant laquelle les bactéries hydrolytiques recouvrent la surface disponible du substrat. La seconde étape serait la production d'enzymes par les bactéries hydrolytiques au voisinage de la surface du substrat qui permettrait ainsi la dégradation du composé particulaire en monomères.

La réaction d'ordre un, choisie dans le modèle ADM1 (Batstone *et al.*, 2002) pour décrire l'étape d'hydrolyse enzymatique, est une fonction simple qui suppose que :

- la réaction d'hydrolyse est indépendante de la croissance des bactéries hydrolytiques,
- les concentrations en substrat particulaire et en biomasse sont en excès ainsi l'association substrat particulaire/biomasse, permettant la production d'enzymes, se fait de façon immédiate et spontanée.

Cette hypothèse entraîne une surestimation de la dégradation puisqu'en réalité la biomasse peut ne pas avoir un accès direct au substrat à dégrader (Rotter *et al.*, 2008). Ainsi, il semble essentiel d'utiliser un autre type de fonction permettant une meilleure description de l'étape d'hydrolyse afin d'améliorer la représentation des voies réactionnelles de la digestion anaérobie des boues d'épuration.

Le modèle de Contois semble être une fonction adaptée pour décrire la dégradation de composés complexes. En effet, ce modèle utilise le rapport de la concentration en substrat particulaire sur la concentration en biomasse hydrolytique. Il peut ainsi intégrer les limitations de transfert de matières dues à des surfaces d'échanges limitées qui sont rencontrées lors de la colonisation de la surface du composé particulaire par la biomasse hydrolytique. Ce rapport est donc une représentation plus réaliste du phénomène limitant de l'étape d'hydrolyse (Vavilin *et al.*, 1996).

L'équation du modèle de Contois est la suivante :

$$\rho_{process} = k_{m,process} X \frac{S}{K_{S,process} X + S} = k_{m,process} X \frac{S/X}{K_{S,process} + S/X}$$

Où,

$\rho_{process}$  est la vitesse de réaction ( $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ ),

$k_{m,process}$  est la constante spécifique maximale de dégradation ( $\text{kg}_{\text{DCO}_S} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}_X}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ),

$K_{S,process}$  est le coefficient de demi-saturation pour le rapport  $S/X$  ( $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$X$  est la concentration en biomasse hydrolytique ( $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$S$  est la concentration en substrat particulaire ( $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3}$ ).

Suivant l'expression du modèle de Contois, il existe deux cas limites. Lorsque la concentration en substrat particulaire est largement supérieure à la concentration en biomasse ( $S/X \gg K_{S,process}$ ), la vitesse de croissance est maximale et indépendante de la concentration en substrat. C'est la cinétique biologique qui est limitante. Les sites d'adsorption au niveau des membranes cellulaires sont saturés. La vitesse est alors d'ordre 1 par rapport à la concentration en biomasse :

$$\rho_{process} \approx k_{m,process} X$$

Le second cas, lorsque la concentration en substrat est faible ( $S/X \ll K_{S,process}$ ), la vitesse est d'ordre 1 par rapport à la concentration en substrat disponible. C'est le transfert du substrat qui est limitant :

$$\rho_{process} \approx k_{m,process} X \frac{S/X}{K_{S,process}} \approx k_{m,process} \frac{S}{K_{S,process}}$$

Ainsi, le modèle de Contois a été appliqué avec succès dans de nombreux cas de digestion anaérobie de composés particuliers. Von Munch *et al.* (1999) ont observé que la vitesse d'hydrolyse diminuait lorsque la concentration en biomasse augmentait au dessus d'une certaine concentration. Ainsi, ils ont utilisé le modèle de Contois pour intégrer l'effet limitant entraîné par des limitations de transferts de matière entre les concentrations en substrat particulaire et en biomasse. Myint et Nirmalakhandan (2006) ont obtenu une simulation correcte de la digestion anaérobie en continu de lisiers de bétail ( $R^2 = 0,914$ ) et une meilleure prédiction de la DCO totale en sortie de réacteur par rapport au modèle utilisant une vitesse de



réaction d'ordre un pour représenter l'étape d'hydrolyse ( $R^2 = 0,881$ ). L'utilisation du modèle de Contois a permis à Nopharatana *et al.* (2007) de modéliser correctement les données observées en continu de la production de méthane et de DCO soluble lors de la dégradation anaérobie de déchets solides municipaux.

Le modèle de Contois est donc une équation mathématique bien adaptée pour intégrer le phénomène de colonisation de la surface du substrat particulaire par la biomasse hydrolytique qui se produit lors de l'hydrolyse. Il est capable de mieux représenter les étapes de désintégration et d'hydrolyse de composés particuliers par rapport à une vitesse de réaction d'ordre un. Cependant, les applications du modèle de Contois proposées dans la littérature n'ont pas été réalisées dans l'ADM1. Ainsi, dans les travaux de la thèse, nous avons évalué cette fonction dans le modèle ADM1 à travers le cas de la digestion anaérobie thermophile de boues secondaires. L'intérêt de conserver la structure du modèle ADM1 est qu'il apporte de nombreuses informations sur le comportement des différents intermédiaires réactionnels en phases solide, liquide et gazeuse.

L'objectif principal de la thèse est l'étude de la relation entre la composition initiale de boues d'épuration et les performances de biodégradation anaérobie avec comme cas d'application la digestion anaérobie thermophile de boues secondaires. Pour se faire, il est nécessaire de définir des méthodes de caractérisation permettant d'identifier la composition des boues et leur potentiel méthane. Dans la littérature, de nombreux protocoles de caractérisation ont été présentés et ont permis de définir la composition et l'organisation globales de la matière organique présente au sein des boues secondaires. Cependant, ces méthodes sont dépendantes de l'objectif de l'étude et peuvent par conséquent cibler soit la matière totale soit un compartiment de matière. Le paragraphe suivant est donc une synthèse succincte des différentes méthodes de caractérisation appliquées aux boues d'épuration suivant l'objectif de l'étude.

## **1.5 Les méthodes de caractérisation des boues d'épuration**

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'approches standards pour caractériser les boues d'épuration. En effet, les méthodes utilisées dans les travaux de recherches dépendent de l'objectif fixé. Les méthodes de caractérisation développées ont été mises en place vis-à-vis des problématiques rencontrées au niveau des procédés de bassin d'aération et au niveau de la ligne de traitement des boues avec comme objectif principal de réduire la quantité de boues à éliminer. Ainsi, plusieurs stratégies de réduction ont été entreprises avec notamment :

- le développement de méthodes optimisées pour la déshydratation des boues d'épuration (Murthy et Novak, 1998 ; Neyens *et al.*, 2004),
- l'utilisation de procédés physico-chimiques combinés au procédé de traitement des eaux usées afin de réduire à la source la production de boues secondaires (Déléris *et al.*, 2002 ; Paul *et al.*, 2006 ; Campos *et al.*, 2009),

- l'utilisation à grande échelle de la digestion anaérobie afin de produire une énergie renouvelable (Appels *et al.*, 2008).

De ce fait, un grand nombre de méthodes de caractérisation peut être trouvé dans la littérature. Pour l'ensemble des stratégies de recherche développées, la caractérisation de la qualité, de la quantité et de l'organisation de la matière organique composant les boues d'épuration est la problématique majeure. Elle permet d'améliorer les connaissances de l'influence des propriétés physico-chimiques des boues sur les performances des procédés de traitement telles que les vitesses et les taux de dégradation pour les unités de digestion des boues.

Une synthèse non exhaustive des méthodes de mesure du potentiel méthane et des méthodes de caractérisation de la matière organique des boues est présentée dans ce paragraphe. La revue sur les méthodes de caractérisation de la matière est axée sur les méthodes d'extraction et d'analyses biochimiques.

### **1.5.1 La mesure du potentiel méthane**

Depuis une vingtaine d'années, différents protocoles de mesure ont été proposés (Muller *et al.*, 2004). Ils se divisent en deux groupes : des protocoles pour déterminer la biodégradabilité anaérobie de composés chimiques (ISO 14853 -1999; ASTM D 5511-1994; ASTM 5210 - 1992; ASTM E 2170- 2001; ISO 15473-2002...) et des protocoles pour déterminer la biodégradabilité ultime de composés organiques complexes ou la production de méthane (ISO 11734-1995; ISO/DIS 14853-1999; UK Environment Agency 2005...). Cependant, ces protocoles contiennent des divergences et sont généralement modifiés par les chercheurs afin d'évaluer la biodégradabilité anaérobie du composé organique étudié (Angelidaki *et al.*, 2009). En conséquence, les protocoles utilisés ainsi que les conditions opératoires et les équipements mis en œuvre pour évaluer les performances de biodégradation anaérobie ne sont pas standardisés. Ainsi, le grand nombre de données générées depuis une vingtaine d'années sur l'évaluation du potentiel méthane de substrats organiques peut s'avérer difficilement comparable entre différents auteurs. Le Tableau 1.3 présente une liste non exhaustive de protocoles de mesure pour estimer la dégradabilité anaérobie de différents substrats organiques. Nous nous sommes intéressés uniquement aux tests de dégradation en condition batch afin d'observer les différentes étapes intermédiaires de la dégradation des boues et d'évaluer un potentiel de méthane maximal de l'échantillon. En effet, les tests de dégradation réalisés en condition continue ne permettent pas d'évaluer un potentiel maximal mais plutôt un taux de dégradation transposable à des procédés industriels et n'apporte pas d'information sur les variations des composés intermédiaires en régime de fonctionnement normal.

Le Tableau 1.3 montre des différences importantes sur les protocoles utilisés au cours des dernières années pour évaluer le potentiel méthane de boues d'épuration :

- la valeur du ratio d'alimentation qui correspond au rapport de la quantité de substrat sur la quantité d'inoculum introduit dans la fiole de suivi est très variable d'une étude à une autre. De plus, ce ratio est rarement exprimé avec la même unité. Certains auteurs utilisent le volume ou la masse pour décrire les quantités introduites,

- l'agitation est aussi un paramètre très hétérogène. Certains auteurs effectuent leur expérience sans agitation ou par agitation intermittente et d'autres utilisent une agitation constante,
- la température de dégradation dépend de la condition étudiée. Cependant, pour des travaux réalisés à un régime mésophile, la température choisie n'est pas standard et varie entre 35 et 38°C,
- l'ajout de solution tampon est effectué dans certains tests afin d'ajuster l'alcalinité du milieu,
- la qualité de la mesure est évaluée en réalisant un témoin blanc, c'est-à-dire sans substrat afin de vérifier l'activité endogène de l'inoculum, en réalisant plusieurs réplicats et en contrôlant l'activité de l'inoculum par un test avec un substrat totalement dégradable (témoin positif). Dans certains travaux, ces données sont manquantes.

Par contre, un point commun aux différents travaux est l'utilisation d'un inoculum adapté au substrat à étudier. Seuls les travaux de Lee et Shoda (2008a) utilisent une solution commerciale contenant certains microorganismes participant à la dégradation anaérobie.

Auteurs	Substrat	Inoculum	Conditions opératoires	Objectifs
Dogan et Dilek Sanin (2009)	Boues secondaires non traitées et prétraitées chimiquement et par microondes	Boue digérée traitant la boue étudiée	Volume utile de 120 mL Ratio inoculum/substrat = 0,5 Ajout d'une solution de macro et micronutriments Flux d'azote pour éliminer l'O <sub>2</sub> durant 5 min Mésophile à 35 °C Triplicat Fiole de 250 mL	Evaluation de l'impact de prétraitements chimiques et par microondes sur la biodégradabilité anaérobie mésophile
Luostarinen <i>et al.</i> (2009)	Mélange boues d'épuration et boues issues de bac à graisse	Boue digérée traitant la boue étudiée	Volume utile de 60 mL Ratio g <sub>MV</sub> inoculum/g <sub>MV</sub> substrat = 1 Concentration dans le réacteur à 3 g <sub>MV</sub> .L <sup>-1</sup> pH ajusté à 7 avec 1 M NaOH ou 1 M HCl Flux d'azote pour éliminer l'O <sub>2</sub> Agitation manuelle lors de la mesure du biogaz produit Mésophile à 35 °C Duplicat Fiole de 118 mL	Etude de la faisabilité de la codigestion mésophile de boues d'épuration et de boues issues de bac à graisse
Carrère <i>et al.</i> (2008)	Boues secondaires non traitées et prétraitées thermiquement	Boues digérées traitant un mélange d'effluents vinicoles et de boues (4/1)	Volume utile de 100 mL Protocole basé sur Buffière <i>et al.</i> (2006) Ratio inoculum/substrat = 0,5 g <sub>DCO</sub> substrat.g <sub>MV</sub> inoc <sup>-1</sup> Flux d'azote pour éliminer l'O <sub>2</sub> Agitation à 200 rpm Mésophile à 35 °C	Evaluation de l'impact de différents types de boues secondaires sur les performances de solubilisation lors du traitement thermique et sur la biodégradabilité anaérobie mésophile

Auteurs	Substrat	Inoculum	Conditions opératoires	Objectifs
Dwyer <i>et al.</i> (2008)	Boues secondaires non traitées et prétraitées thermiquement	Boues digérées traitant une boue d'épuration prétraitée thermiquement	<p>Fiole de 160 mL</p> <p>Ratio inoculum/substrat = <math>0,66 \text{ g}_{\text{substrat}} \cdot \text{g}_{\text{inoc}}^{-1}</math></p> <p>Protocole similaire à Owen <i>et al.</i> (1979)</p> <p>pH ajusté à 7,2 avec 1 M NaOH ou 1 M HCl</p> <p>Dilution avec de l'eau distillée</p> <p>Volume utile de 50 mL</p> <p>Flux d'azote pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Triplicat</p> <p>Sans agitation</p> <p>Blanc effectué avec un mélange inoculum et eau distillée</p> <p>Mésophile à 38 °C</p> <p>Contrôle abiotique effectué avec un échantillon de boue autoclavé à 121°C pdt 3 h inoculé avec <math>1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}</math> d'acétate</p>	Evaluation de la formation de composés récalcitrants au cours du traitement thermique et de l'impact sur la biodégradabilité anaérobie
Eskicioglu <i>et al.</i> (2008)	Boues primaires, secondaires et digérées et prétraitées par microondes	Boues digérées traitant un mélange de boues primaires et secondaires (42/52)	<p>Fiole de 0,5 ou 1 L</p> <p>Protocole basé sur Owen <i>et al.</i> (1979)</p> <p>Ajout d'un mélange de NaHCO<sub>3</sub> et de KHCO<sub>3</sub> pour obtenir une alcalinité de <math>4\ 000\text{-}9\ 000 \text{ mg}_{\text{CaCO}_3} \cdot \text{L}^{-1}</math></p> <p>Flux d'azote pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Agitation à 50-90 rpm</p> <p>Mésophile à 35°C</p>	Evaluation de l'impact du traitement par micro-ondes sur la solubilisation de la matière et la sur la dégradation anaérobie

Auteurs	Substrat	Inoculum	Conditions opératoires	Objectifs
Ferrer <i>et al.</i> (2008b)	Mélange de boues primaire/secondaire et prétraitées à 70°C	Boues digérées thermophile traitant un mélange de boues primaires et secondaires, provenant de réacteurs de laboratoire	<p>Fiole de 300 mL (SIGG®)</p> <p>Ratio inoculum/substrat = <math>0,5 \text{ g}_{\text{substrat}} \cdot \text{g}_{\text{inoc}}^{-1}</math></p> <p>Protocole basé sur Soto <i>et al.</i> (1993)</p> <p>Flux d'azote pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Triplicat</p> <p>Blanc effectué avec l'inoculum seul</p> <p>Thermophile à 55 °C</p>	Evaluation de l'impact du temps de prétraitement à 70°C sur la production de biogaz en condition thermophile
Jeong <i>et al.</i> (2008)	Boue secondaire	Boue digérée traitant la boue étudiée	<p>Fiole de 120 mL</p> <p>Ratio inoculum/substrat = 40 mL<sub>inoc</sub> et 40 mL<sub>substrat</sub> sont introduits</p> <p>Flux d'un mélange N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Volume utile de 80 mL</p> <p>Mésophile à 35°C</p>	Evaluation de l'impact du ratio COD/sulfate sur la digestion anaérobie de boues non traitées et prétraitées thermiquement
Lee et Shoda (2008a)	Boues d'épuration épaissies et boues provenant d'un procédé de Fenton	Solution commerciale GAM n°0 (GAM 0) composant de 10 sortes de microorganismes (méthanogènes, levures, bactéries dégradant l'acide lactique)	<p>Fiole de 1,3 L</p> <p>Ratio inoculum/substrat = <math>9 \text{ g}_{\text{substrat}} \cdot \text{g}_{\text{inoc}}^{-1}</math></p> <p>Volume utile de 400 mL</p> <p>Blanc effectué avec l'inoculum seul</p> <p>Agitation deux fois par jour</p> <p>Mésophile à 37 °C</p>	Evaluation de la co-digestion de boues d'épuration et de boues enrichies en fer issues du procédé de Fenton
Schievano <i>et al.</i> (2008)	Mélange de lisiers porcins, déchets agro-industriels et de fractions organiques des déchets solides municipaux	Boue digérée traitant le substrat étudié	<p>Fiole de 100 mL</p> <p>Concentration dans la fiole de <math>3,5 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}</math></p> <p>Flux d'azote pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Volume utile de 60 mL</p> <p>Blanc effectué avec l'inoculum seul</p> <p>Batch suivi sur 60 jours</p> <p>Mésophile à 37°C</p>	Evaluation de la dégradation d'un substrat complexe en entrée et en sortie de digesteur

Auteurs	Substrat	Inoculum	Conditions opératoires	Objectifs
Yasui <i>et al.</i> (2008)	Boues secondaires	Boues digérées traitant les boues secondaires étudiées	<p>FiOLE de 1 L</p> <p>Utilisation du respiromètre AER-200 (Challenge Technology)</p> <p>Ratio inoculum/substrat = <math>0,45 \text{ g}_{\text{DCO}_{\text{substrat}}} \cdot \text{g}_{\text{DCO}_{\text{inoc}}}^{-1}</math></p> <p>Concentration dans le réacteur entre 3 et <math>4 \text{ g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}^{-1}</math></p> <p>Flux d'azote pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Ajout d'une solution tampon</p> <p>Mésophile à 35°C</p> <p>Blanc effectué avec l'inoculum seul</p>	Evaluation de la biodégradabilité anaérobie mésophile afin d'étudier le lien entre la biodégradabilité aérobie et anaérobie
Benabdallah El-Hadj <i>et al.</i> (2007)	Mélange de boues primaire/secondaire (3/1)	Boues digérées traitant un mélange de boues primaires et secondaires (3/1), provenant de réacteurs de laboratoire	<p>FiOLE de 250 mL</p> <p>Ratio inoculum/substrat = <math>0,5 \text{ g}_{\text{DCO}_{\text{substrat}}} \cdot \text{g}_{\text{MV}_{\text{inoc}}}^{-1}</math></p> <p>Ajout de 1 mL Na<sub>2</sub>S<sub>9</sub>H<sub>2</sub>O (<math>13,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}</math>)</p> <p>Ajout de 1 mL NaHCO<sub>3</sub> (<math>172,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}</math>)</p> <p>Dilution avec de l'eau distillée</p> <p>Volume utile de 200 mL</p> <p>Blanc effectué avec un mélange inoculum et eau distillée</p> <p>Triplicat</p>	Evaluation de l'impact de la sonication sur la biodégradabilité anaérobie en condition mésophile et thermophile
Bougrier <i>et al.</i> (2007)	Boues secondaires non traitées et prétraitées thermiquement	Boues digérées traitant un mélange d'effluents vinicoles et de boues (4/1)	<p>Volume utile de 400 mL</p> <p>Protocole basé sur Buffière <i>et al.</i> (2006)</p> <p>Inoculum dilué à <math>4 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}</math></p> <p>Ratio inoculum/substrat = <math>0,5 \text{ g}_{\text{DCO}_{\text{substrat}}} \cdot \text{g}_{\text{MVS}_{\text{inoc}}}^{-1}</math></p> <p>Flux d'azote pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Agitation à 200 rpm</p> <p>Mésophile à 35 °C</p> <p>Blanc effectué avec l'inoculum seul</p> <p>Activité de l'inoculum évalué avec de l'éthanol</p>	Evaluation de l'impact du traitement thermique sur la biodégradabilité anaérobie mésophile

<b>Auteurs</b>	<b>Substrat</b>	<b>Inoculum</b>	<b>Conditions opératoires</b>	<b>Objectifs</b>
Angelidaki <i>et al.</i> (2006)	Fractions organiques des déchets solides municipaux	Boues digérées traitant des déchets industriels et des déchets organiques municipaux	<p>Fiolle de 550 mL</p> <p>Ratio inoculum/substrat = 150 mL<sub>inoc</sub> et 100 mL d'un mélange eau et substrat sont introduits</p> <p>Flux d'azote pdt 3 min pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Duplicat</p> <p>Sans agitation</p> <p>Blanc effectué avec un mélange inoculum et eau</p>	<p>Evaluer l'impact du ratio inoculum/substrat sur la production de méthane</p> <p>Teneur en MS du substrat de 0 à 30 %</p> <p>Evaluer l'impact de la température sur la production de méthane</p> <p>Température testée de 5 à 65°C</p>
Arnaiz <i>et al.</i> (2006)	Boues primaires, secondaires et mélange primaire/secondaire (1/1)	Boues digérées traitant un mélange de boues primaires et secondaires (1,5/1)	<p>Fiolle de 250 mL</p> <p>Ratio inoculum/substrat = 20 mL<sub>inoc</sub> et 180 mL<sub>substrat</sub></p> <p>Flux d'azote pdt 15 min pour éliminer l'O<sub>2</sub></p> <p>Tripliquat</p> <p>Agitation à 250 rpm</p> <p>Mésophile à 35 °C</p>	<p>Evaluation de la concentration en MV et de la concentration en biomasse active au cours de la digestion anaérobie de différents types de boues</p>



Auteurs	Substrat	Inoculum	Conditions opératoires	Objectifs
Buffière <i>et al.</i> (2006)	Déchets solides	Boue digérée thermophile traitant un mélange de déchets organiques	Réacteur de 3,5 L Protocole basé sur Owen et Chynoweth (1993) et Angelidaki et Sanders (2004) Ratio inoculum/substrat = $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}_{\text{substrat}}} \cdot \text{g}_{\text{MV}_{\text{inoc}}}^{-1}$ Concentration dans le réacteur entre 3 et 4 $\text{g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}^{-1}$ Flux d'un mélange $\text{N}_2/\text{CO}_2$ (75/25) pour éliminer l' $\text{O}_2$ Quatre alimentations successives Thermophile à 55°C Blanc effectué avec l'inoculum seul Activité de l'inoculum évalué avec de la cellulose cristalline	Trouver une corrélation entre la composition des substrats et leur biodégradabilité anaérobie thermophile et évaluation de l'adaptation de l'inoculum
Bonmati <i>et al.</i> (2001)	Boues provenant d'effluents porcins	Boues digérées traitant des boues d'épuration	Fiolle de 120 mL Ratio inoculum/substrat = $9 \text{ g}_{\text{substrat}} \cdot \text{g}_{\text{inoc}}^{-1}$ Flux d'un mélange $\text{N}_2/\text{CO}_2$ pdt 3 min pour éliminer l' $\text{O}_2$ Quatre réplicats Mésophile à 35°C	Evaluation de l'impact du traitement thermique l'amélioration de la phase d'hydrolyse et sur la digestion anaérobie mésophile

<sup>1</sup> Non disponible

**Tableau 1.3 :** Protocoles de mesure du potentiel de méthane de substrats organiques proposés dans la littérature scientifique.

Les travaux de Owen *et al.* (1979) et Owens et Chynoweth (1993) sont les premiers à proposer un protocole détaillé de mesure du potentiel méthane de déchets organiques. A l'heure actuelle, ce protocole est encore une référence dans ce domaine comme le prouve certaines recherches listées dans le Tableau 1.3. Owens et Chynoweth (1993) mettent en avant la qualité de ce protocole qui a été contrôlée grâce à la réalisation de triplicat, d'un témoin blanc, d'un témoin positif, chaque test ayant de plus été réalisé à la même concentration en MV.

Un groupe de travail de l'IWA dont le but est d'élaborer un protocole commun pour la mesure du potentiel méthane de déchets organiques a été créé au cours du IXème congrès mondial « Anaerobic Digestion » en 2001 à Anvers en Belgique, sous l'initiative principale du Professeur Alberto Rozzi. Ainsi, le groupe « Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition » (ABAI) a publié très récemment un article afin de proposer un guide pour effectuer un test de mesure du potentiel méthane de déchets solides organiques (Angelidaki *et al.*, 2009). Ce guide permet ainsi de suivre les points importants à respecter pour réaliser un test fiable et reproductible entre différents laboratoires de recherche. Il synthétise en partie les travaux de Owens et Chynoweth (1993), Angelidaki et Sanders (2004) et Hansen *et al.* (2004). Ils mettent en avant plusieurs points dont les plus importants applicables aux boues sont les suivants :

- l'inoculum doit provenir d'un digesteur traitant le même type de substrat à étudier. Il est nécessaire d'éliminer les résidus organiques présents dans l'inoculum avant le début des tests grâce à une pré-incubation,
- la qualité de l'inoculum est à vérifier par un test avec un composé facilement dégradé (acétate ou cellulose),
- le volume d'inoculum à utiliser dépend de l'activité, de la concentration en biomasse de l'inoculum mais également de la concentration en substrat. Un volume plus important est préconisé lorsque l'inoculum est une boue digérée car elle est moins concentrée en biomasse active par rapport à des granules anaérobies,
- une solution de macro et micronutriments peut être utilisée afin d'assurer un fonctionnement optimal des microorganismes, essentiellement dans le cas de déchets solides ou de biomasses issus de l'agriculture,
- la réalisation de témoins blanc et chaud est nécessaire afin de déterminer la production réelle du substrat étudié. Un nombre de réplicats de trois est recommandé mais il peut dépendre de l'hétérogénéité du substrat,
- l'agitation facilite le contact entre les microorganismes et le substrat et garantit un milieu homogène. L'agitation a une grande influence dans l'étude des vitesses de réactions (Vavilin *et al.*, 2008a),

- un mélange de gaz  $N_2/CO_2$  à 80/20 est utilisé pour éliminer l'oxygène présent dans l'inoculum et le substrat,
- les productions mesurées de chaque constituant du biogaz sont calculées dans les conditions normales de température et de pression (CNTP) afin de pouvoir publier et comparer plus facilement les résultats.

Les productions de biogaz ou de méthane mesurées sont généralement normalisées par la quantité de matière introduite ou éliminée afin de comparer les performances issues de différents échantillons. Il s'agit alors d'une production spécifique qui est exprimée dans la littérature de différentes façons : en  $mL.g_{MV}^{-1}$ , en  $mL.g_{DCO}^{-1}$ , en  $mL.g_{MS}^{-1}$ . Ces unités sont les plus couramment utilisées. Il serait également nécessaire pour ce paramètre de standardiser l'unité de la production spécifique afin de comparer facilement les résultats issus de la littérature scientifique.

Cependant, les productions spécifiques exprimées par rapport à la quantité de matière organique ou de DCO, mesurées lors des tests de dégradation, ne permettent pas d'expliquer les différences de dégradation obtenues sur des substrats similaires ou sur un même substrat d'alimentation analysé à différents instants  $t$ . Le Tableau 1.4 présente les productions spécifiques de deux études : l'étude de Carrère *et al.* (2008) porte sur l'évaluation de la dégradabilité de différentes boues secondaires et l'étude de Schievano *et al.* (2008) porte sur la mesure de la dégradabilité d'un même mélange de composés organiques alimentant un digesteur mésophile au cours du temps. Les productions spécifiques des boues secondaires et du mélange organique sont très variables avec des valeurs moyennes respectives de  $151 \pm 39 mL_{CH_4}.g_{DCOintroduite}^{-1}$  et de  $650 \pm 75 mL_{biogaz}.g_{MS}^{-1}$ . Ainsi, les mesures des paramètres globaux tels que la quantité de MV, MS ou encore de DCO, sur les substrats à étudier, ne suffisent pas pour expliquer les différences sur les performances de dégradation anaérobie obtenues à partir d'un même type de substrat. Il est donc important de s'intéresser à la composition et à l'origine du substrat en analysant les différents composés présents et en déterminant l'agencement de la matière. Pour cela, différentes méthodes de caractérisation sont proposées dans la littérature. Le paragraphe suivant présente des méthodes d'extraction et d'analyses qui sont intéressantes pour définir l'organisation et identifier les composés organiques présents dans les boues secondaires.

Auteurs	Substrat		Productions spécifiques	Unité
Carrère <i>et al.</i> (2008)	Boues secondaires	A	185,5	$\text{mL}_{\text{CH}_4 \cdot \text{gDCOintroduite}}^{-1}$
		B	182	
		C	168	
		D	115,5	
		E	101,5	
Schievano <i>et al.</i> (2008)	Mélange de lisiers porcins, déchets agro-industriels et de fractions organiques des déchets solides municipaux	01/02/06	608 ± 6	$\text{mL}_{\text{biogaz} \cdot \text{gMS}}^{-1}$
		09/02/06	636 ± 2	
		15/02/06	627 ± 6	
		23/02/06	498 ± 26	
		02/03/06	692 ± 11	
		08/03/06	720 ± 23	
		22/03/06	715 ± 7	
27/03/06	700 ± 19			

**Tableau 1.4 :** Exemples de productions spécifiques obtenues sur des substrats similaires et sur un même substrat d'alimentation analysé à différents instants t.

## 1.5.2 Les méthodes de caractérisation de la matière organique des boues d'épuration

Les méthodes de caractérisation proposées dans la littérature sont élaborées pour répondre à deux types d'objectifs qui sont :

- soit de décrire un compartiment de matière ciblé afin de déterminer l'influence de cette fraction sur une propriété ou une opération d'un procédé,
- soit de décrire l'ensemble de la matière grâce à des méthodes d'extraction totales ou de fractionnement.

Par exemple, le modèle des boues secondaires proposé par Nielsen *et al.* (2004) se base sur des méthodes d'extraction de la matière totale (Jorand *et al.*, 1995) et des méthodes d'extraction de compartiments ciblés (Mikkelsen et Keiding, 2002) mais également sur des méthodes d'analyse afin d'identifier la matière organique présente. La limite entre les deux méthodes d'extraction est difficile à définir et dépend fortement de l'objectif de l'étude. En effet, une même méthode d'extraction peut être utilisée mais seulement l'intensité du traitement sera plus ou moins importante. Par exemple, Ras (2008a) s'est intéressée uniquement aux compartiments des EPS alors que Jorand *et al.* (1995) ont cherché à déstructurer l'ensemble des différentes matrices constituant les boues secondaires grâce à l'utilisation des ultrasons. Ensuite, les deux groupes d'auteurs ont tenté d'identifier la matière des compartiments extraits par le dosage des protéines et des glucides.

### 1.5.2.1 Les méthodes d'extraction physiques

Les méthodes d'extraction physique telles que la sonication, le broyage, la centrifugation, la chaleur, la séparation par la taille apportent des informations sur la stabilité et la nature des

flocs des boues d'épuration. En effet, selon la quantité de matière organique extraite en fonction de l'intensité et de la durée d'extraction, il est possible d'obtenir des informations sur la quantité de matière organique qui peut être directement ou facilement disponible pour les microorganismes épurateurs. Cependant, les méthodes d'extraction physiques peuvent engendrer une lyse cellulaire. Ainsi, il est important de vérifier que l'action d'une extraction mécanique n'entraîne pas de contaminations des composés extraits par des matières intracellulaires lorsque le but est d'identifier la structuration de la boue secondaire. La méthode de vérification utilisée dépend étroitement de la méthode d'extraction employée mais généralement, elle s'effectue soit par la mesure de l'acide désoxyribonucléique (Liu et Fang, 2002), soit par la mesure de l'activité d'une enzyme intracellulaire, la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (Frolund *et al.*, 1996 ; Ras, 2008a).

### 1.5.2.2 Les méthodes d'extraction chimiques

En règle générale, les méthodes d'extraction physique qui permettent une déstructuration plus ou moins importante de la matière suivant l'intensité du traitement appliqué sont couplées à des méthodes d'extraction chimique. Ainsi, il est possible d'identifier la nature des interactions qui lient les différents composés des boues d'épuration et d'extraire de façon optimale les composés présents dans les boues. Les méthodes d'extraction chimique permettent d'identifier la nature des interactions et des composés tels que les composés ioniques et hydrophobes présents dans les boues. Par exemple, les extractions chimiques comprennent :

- l'ajout d'eau distillée pour caractériser les composés facilement solubles (Parnaudeau *et al.*, 2004),
- l'ajout de NaCl, des résines échangeuses de cations (CER) qui retiennent les composés chargés positivement (Sheng *et al.*, 2008, Tsai *et al.*, 2008, Wilen *et al.*, 2008, Mc Swain *et al.*, 2005, Liu et Fang, 2002),
- l'ajout de soude (NaOH) qui permet de dissocier les groupements acides et génère la répulsion des EPS chargés négativement (McSwain *et al.*, 2005, Esparza-Soto et Westerhoff, 2001),
- l'ajout d'EDTA qui complexe les cations divalents (Ras *et al.*, 2008b, Liu et Fang, 2002),
- l'ajout de Tween qui permet la dissolution des liaisons hydrophobes (Ras *et al.*, 2008b),
- l'ajout de formaldéhyde qui réagit avec les groupements amines, hydroxyles et carboxyles des protéines membranaires (Liu et Fang, 2002)...

Le Tableau 1.5 montre la grande variété des méthodes d'extraction utilisées et notamment l'importante hétérogénéité des résultats obtenus sur les quantités d'EPS extraits. Le travail de Ras *et al.* (2008) est à souligner car il propose une méthode optimisée et fiable de l'extraction

des EPS présents dans les agrégats microbiens sans contamination par le matériel intracellulaire des microorganismes.

Les méthodes d'extraction présentées sont intéressantes pour connaître la cohésion des différents composés organiques constituant les boues secondaires. Elles permettent de définir l'accessibilité de la matière via l'action de techniques ou de solutions ayant un pouvoir d'extraction plus ou moins fort. Cependant, ces méthodes sont lourdes à développer car elles exigent une phase d'optimisation importante. Dans l'optique de développer des indicateurs de la dégradation anaérobie basés sur la composition des boues d'épuration, exploitables à l'échelle industrielle et facilement intégrables à un modèle de modélisation, il est important d'utiliser des méthodes de caractérisation qui peuvent être facilement et rapidement mises en place.

### **1.5.2.3 Les méthodes analytiques**

La Figure 1.7 illustre l'utilisation des méthodes d'extraction et des méthodes analytiques afin de déterminer l'organisation et d'identifier les composés organiques présents dans les boues d'épuration. Ainsi, les méthodes analytiques servent à identifier les constituants composant la matière présente dans la boue étudiée. Elles sont utilisées sur la fraction totale ou sur les fractions extraites de l'échantillon. Une caractérisation biochimique est généralement effectuée pour mesurer les composés majoritaires de la matière organique. Des méthodes plus fines sont de plus en plus utilisées afin d'identifier des fonctions spécifiques des composés présents.

#### *1.5.2.3.1 La caractérisation biochimique*

Les méthodes de mesures biochimiques sont utilisées généralement sur la matière totale de l'échantillon étudié et sur les fractions extraites. Il existe des mesures dites globales telles que la mesure des matières sèches, volatiles, la mesure de la DCO, l'analyse élémentaire dont les deux principaux composés mesurés sont le carbone et l'azote. Les trois constituants essentiels de la matière organique qui sont les protéines, les glucides et les lipides sont également mesurés grâce à des méthodes colorimétriques pour les deux premiers et des méthodes d'extraction par solvant pour le dernier.

Auteurs	Substrat	Objectif de l'étude	Méthodes d'extraction	Conditions opératoires	Méthodes analytiques	Résultats
Ras <i>et al.</i> (2008b)	Boues activées	Mise au point d'une méthode d'extraction et de quantification des EPS	1.Sonication 2.Tween 3.EDTA	1. 3*2 min, 0,75 W/mL, 4°C 2. 0,25%, 1h à 500 rpm 3. 2%, 1h à 500 rpm	Analyses sur fractions extraites des glucides (méthode d'Anthrone), protéines (méthode de BCA)	Optimisation de l'extraction à 8/9 extractions successives: 522 mg.g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> de protéines extraites et 75 mg.g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> de polysaccharides extraits
Sheng <i>et al.</i> (2008)	Boues activées et boues anaérobies	Détermination des propriétés d'adsorption des EPS extraits à partir de la phase solide de boues sur des micropolluants organiques	CER	12 h, 4°C à 200 rpm	Analyses sur fractions extraites des glucides (méthode d'Anthrone), protéines (méthode de Lowry), acides humiques (méthode de Lowry modifiée), carbone organique	Boue activée: 9,2 mg <sub>prot.gMVS</sub> <sup>-1</sup> , 3,2 mg <sub>glu.gMVS</sub> <sup>-1</sup> , 8,4 mg <sub>humique.gMVS</sub> <sup>-1</sup>  Boue anaérobie: 8,0 mg <sub>prot.gMVS</sub> <sup>-1</sup> , 5,6 mg <sub>glu.gMVS</sub> <sup>-1</sup> , 14,2 mg <sub>humique.gMVS</sub> <sup>-1</sup>
Tsai <i>et al.</i> (2008)	Boues activées	Influence de la matière organique dissoute des boues sur la nanofiltration	1.Centrifugation/Acétone 2.NaCl/Sonication/Agitation/Sonication/Centrifugation/Acétone 3.NaCl/Sonication/Chauffage/Acétone	1. 10 min à 6 000 g/4°C, 24h 2. 0,85 %/20kHz (330W/L), 2 min 120 rpm, 10 min/20kHz (330W/L), 2 min/4°C, 24h 3. 0,85 %/20kHz (330W/L), 2 min/80°C, 30 min/4°C, 24h	Analyses sur les fractions extraites: HPLC-SEC <sup>1</sup> , DCO, spectrofluorimétrie 3D	Caractérisation de 3 fractions: SMP <sup>2</sup> , LB-EPS <sup>3</sup> , TB-EPS <sup>4</sup>  Les composés de la fraction TB-EPS d'une taille de 3 000 à 7 000 Da sont d'origine protéique et humique et sont difficilement retenus par nanofiltration

Auteurs	Substrat	Objectif de l'étude	Méthodes d'extraction	Conditions opératoires	Méthodes analytiques	Résultats
Wilen <i>et al.</i> (2008)	Boues activées	Influence de la composition microbienne sur la stabilité de la matrice	CER	4 h, 4°C à 900 rpm	Analyses sur fractions totale et extraites des glucides (méthode d'Anthrone), protéines (méthode de Lowry), acides humiques (méthode de Lowry modifiée) et carbone organique Analyses par FISH <sup>5</sup>	Fraction totale: 388 mg <sub>prot.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 95 mg <sub>glu.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 183 mg <sub>humique.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> EPS extraits: 56 mg <sub>prot.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 8 mg <sub>glu.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 26 mg <sub>humique.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup>  Abondance de microorganismes de types Gammaproteobacteria à cause de leur faible propriété de floculation
			Test de cisaillement	2h à 700 rpm		
McSwain <i>et al.</i> (2005)	Boues activées	Composition et distribution des EPS à l'intérieur des floccs microbiens	CER	4 h, 4°C à 750 rpm	Analyses sur fractions extraites des glucides (méthode d'Anthrone), protéines (méthode de Lowry), carbone organique	EPS extraits: 39 mg <sub>prot.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 5 mg <sub>glu.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 33 mg <sub>COT.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup>
			NaOH/chauffage	1 M pH = 11/80°C, 30 min	Analyse par CLSM <sup>6</sup> de marqueurs fluorescents des cellules, protéines et polysaccharides	EPS extraits: 199 mg <sub>prot.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 26 mg <sub>glu.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> , 227 mg <sub>COT.</sub> ·g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> (contamination par lyse cellulaire)



Auteurs	Substrat	Objectif de l'étude	Méthodes d'extraction	Conditions opératoires	Méthodes analytiques	Résultats
Parnaudeau <i>et al.</i> (2004)	Boues d'épuration	Trouver des indicateurs sur la matière totale des boues pour prédire leur minéralisation dans le sol	Solubilité à l'eau distillée	30 min, 20°C/30 min, 100°C	Analyses sur fractions solides et solubles du carbone et de l'azote Test de minéralisation en sol (4 réplicats) Analyse statistique: Analyse Factorielle multiple	La méthode la plus pertinente est l'hydrolyse acide qui isole des fractions organiques reliables à la minéralisation
			Méthode Van Soest	Fraction soluble: 30 min, 100°C à l'eau/60 min, 100°C au détergent neutre, Hemicellulose, Cellulose et Lignine "like"		
			Méthode de Bremmer (hydrolyse acide)	12 M HCl, agitation 4 h, 20°C, repos 20 h Dilution à 6 M HCl de l'échantillon, extraction à reflux pdt 16 h		Paramètres pertinents: rapport C/N et la fraction lignine
Liu et Fang (2002)	Boues activées et boues anaérobies	Evaluation de procédures d'extraction des EPS	EDTA	2%, 3 h, 4°C	Analyses sur fractions extraites des glucides (méthode d'Anthrone), protéines (méthode de Lowry), acides humiques (méthode de Lowry modifiée), ADN (méthode par le diphenylamine)	Méthode la plus efficace: Formaldéhyde/NaOH; 165 mg <sub>EPS.g<sub>MV</sub></sub> <sup>-1</sup> (boues activées), 103 mg <sub>EPS.g<sub>MV</sub></sub> <sup>-1</sup> (boues méthanogènes), 179 mg <sub>EPS.g<sub>MV</sub></sub> <sup>-1</sup> (boues acidogènes) CER; 58 mg <sub>EPS.g<sub>MV</sub></sub> <sup>-1</sup> Présence non négligeable de substances humiques entre 8 et 31 %
			CER	1 h, 4°C		
			Formaldéhyde	1 h, 4°C		
			Formaldéhyde/NaOH	1 N, 3 h, 4°C		
			Formaldéhyde/Sonication	60 W, 2,5 min		

Auteurs	Substrat	Objectif de l'étude	Méthodes d'extraction	Conditions opératoires	Méthodes analytiques	Résultats
Esparza-Soto et Westerhoff (2001)	Boues activées	Etablir un traceur des EPS pour les procédés de traitement des eaux usées	1.Solution saline (3 lavages)	0.01 M NaCl, 4 mM NaHCO <sub>3</sub> , agitation 15 min, centrifugation 15 min à 1 800 rpm	Distribution du poids moléculaire par filtration, Spectrofluorimétrie 3 D, DCO, carbone organique soluble, UV à 254 nm	Caractérisation de 2 fractions d'EPS: soluble et facilement extractibles
			2.NaOH	10 mM NaOH et NaCl, agitation 15 min, centrifugation 15 min à 1 800 rpm		
Jorand <i>et al.</i> (1995)	Boues activées	Examiner la complexité de la structure des boues activées	Sonication	38 mm diamètre, 37 W, 15-420 s	Granulométrie Analyses sur fractions extraites des glucides (méthode de Dubois), protéines (méthode de Lowry) et ADN (méthode de Deriaz)	A t = 240 s, 100 mg.g <sub>MES</sub> <sup>-1</sup> de protéines, 30 mg.g <sub>MES</sub> <sup>-1</sup> de glucides et d'ADN  Modèle de structure du floc bactérien

<sup>1</sup> HPLC-SEC: High Performance Liquid Chromatograph-Steric Exclusion Chromatograph

<sup>2</sup> SMP: Soluble Microbial Products

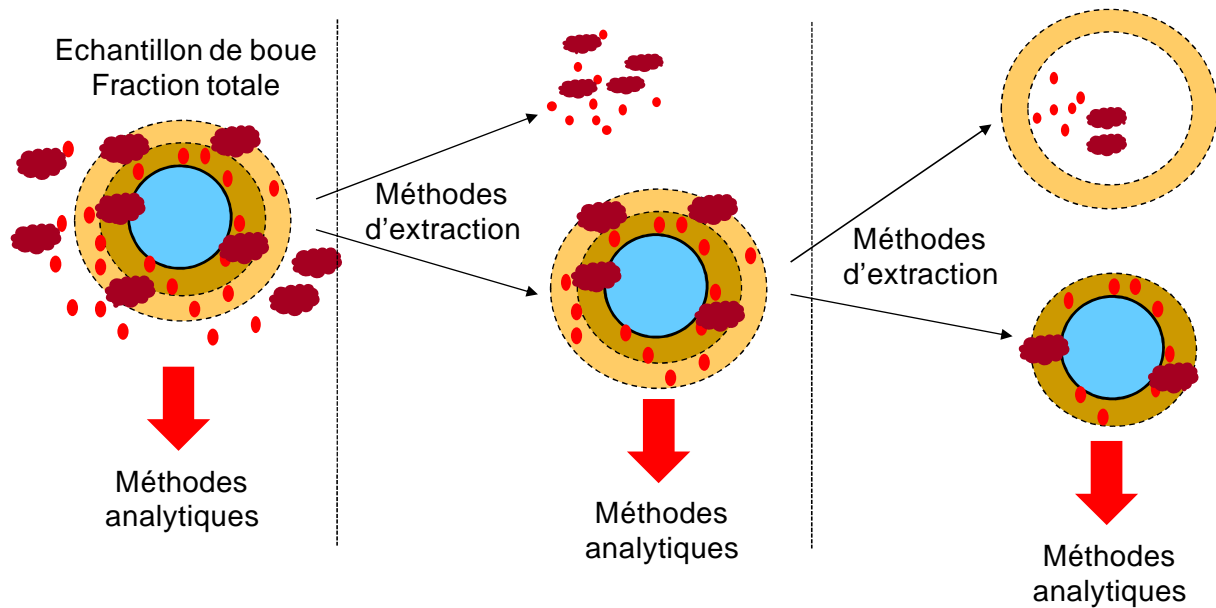
<sup>3</sup> LB-EPS: Loosely Bound EPS

<sup>4</sup> TB-EPS: Thinning Bound EPS

<sup>5</sup> FISH: Fluorescent In Situ Hybridization

<sup>6</sup> CLSM: *Confocal laser scanning microscopy*

**Tableau 1.5 :** Méthodes de caractérisation de la matière organique de boues suivant l'objectif de l'étude et les méthodes d'extraction utilisées.



**Figure 1.7 :** Schéma d'un protocole de fractionnement d'un échantillon de boue illustrant l'utilisation des méthodes d'extraction et d'analyse.

Pour les protéines, la méthode de Lowry est régulièrement utilisée (Sheng *et al.*, 2008 ; Wilèn *et al.*, 2008 ; McSwain *et al.*, 2005 ; Liu et Fang, 2002). Une méthode modifiée de celle de Lowry est également utilisée pour estimer la concentration en substances humiques. En effet, la structure macromoléculaire complexe des acides humiques les rend aptes à répondre comme des protéines vis-à-vis du dosage de Lowry (Frolund *et al.*, 1996). Ras (2008a) a réalisé une comparaison très détaillée de la méthode de Lowry modifiée et de la méthode à l'acide bincinchonique (BCA) pour doser les protéines dans les agrégats microbiens. Elle a montré que les deux méthodes ne peuvent pas s'affranchir des interférents présents au sein des boues d'épuration, notamment le glucose et les substances humiques. De plus, la présence de particules et de colloïdes est une seconde source d'interférence. Une étape de dilution peut être une solution pour contourner l'interférence apportée par ces composés. La méthode BCA est moins sensible aux produits chimiques utilisés lors des méthodes d'extraction par rapport à la méthode de Lowry modifiée. Une troisième méthode peut être utilisée pour doser les protéines, elle se base sur la détermination de l'azote organique par la méthode Kjeldahl et sur l'estimation que les protéines sont composées de 16 % d'azote (Miron *et al.*, 2000 ; Huete *et al.*, 2006). La méthode Kjeldahl peut être préférée pour l'analyse des protéines sur la fraction totale car elle permet de s'affranchir des interférents et des particules présents et la méthode colorimétrique est préférée pour l'analyse sur la fraction soluble comme le propose Miron *et al.* (2000). Par contre, la méthode Kjeldahl peut surestimer la concentration en protéines, car d'autres composés peuvent contenir de l'azote tels que les substances humiques, l'urée. Le choix entre les deux méthodes colorimétriques s'effectue suivant la présence de méthodes d'extraction utilisant des produits chimiques.

Pour les glucides, les méthodes les plus utilisées sont la méthode de Dubois (Dubois *et al.*, 1956) et la méthode à l'antrone (Dreywood, 1946). La méthode à l'antrone quantifie

correctement les hexoses (Koehler, 1952) qui sont les sucres majoritaires dans les eaux usées ce qui peut expliquer son utilisation préférentielle (Ras, 2008a).

Les lipides sont généralement extraits par un solvant organique à partir d'un échantillon sec par la méthode du Soxhlet, soit sur la fraction totale ou la fraction particulière, (Conrad *et al.*, 2003 ; Cirne *et al.*, 2007). Ensuite, la teneur en lipides est déterminée à partir du poids de matière extraite.

Cependant, toutes ces méthodes analytiques ne sont pas des méthodes spécifiques. En effet, les méthodes colorimétriques sont calibrées la plupart du temps sur un seul composé et pour la méthode d'extraction des lipides, un grand nombre de composés peuvent être solubles dans les solvants organiques utilisés. Ainsi, **il est nécessaire de considérer les taux de composés mesurés comme des indicateurs et non comme des concentrations réelles** (Buffière *et al.*, 2006).

#### 1.5.2.3.2 Les méthodes analytiques spectroscopiques et autres

Il existe des méthodes analytiques plus spécifiques qui se basent sur les propriétés chimiques de la matière ou qui permettent la mesure ou l'observation de composés définis. Les travaux suivants sont donc intéressants car ils présentent l'application de techniques de mesures fines pour caractériser les boues d'épuration.

Zhou *et al.* (2001) présentent une caractérisation de la matière organique dissoute et des EPS par l'utilisation de méthodes spectroscopiques afin de mieux comprendre ou de prédire la capacité de liaisons de ces fractions avec les métaux lourds et ainsi de prévoir la disponibilité de ces métaux lors de l'épandage de boues. Les techniques employées sont la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) à deux dimensions ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ). L'IRTF utilise les propriétés d'absorption de la matière organique dans l'infrarouge et permet de renseigner sur les groupements fonctionnels et donc sur la structure moléculaire. Smidt et Parravicini (2009) ont également utilisé l'infrarouge pour caractériser les modifications de la matière organique de boues d'épuration au cours du procédé de dégradation anaérobie. La RMN utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique et identifie les protons et les carbones couplés. De plus, la RMN se situe à l'échelle la plus basse des énergies mises en jeu, ce qui permet un examen extrêmement détaillé de la structure moléculaire des composés constituant la matière organique.

Dignac *et al.* (2005) ont utilisé la pyrolyse pour étudier le compostage de déchets organiques tels que les boues d'épuration et ainsi tenter de développer des indicateurs de la stabilité du déchet. Karayildirim *et al.* (2006) ont étudié la pyrolyse de boues issues de l'industrie pétrochimique afin de proposer des voies de valorisation des produits gazeux et liquides obtenus après oxydation à hautes températures. La pyrolyse est une technique dégradative d'oxydation qui permet soit de dégrader un composé complexe en composés gazeux et liquides valorisables, soit une caractérisation dans sa globalité de la matière organique et inorganique du composé initial. Ainsi, l'utilisation d'un procédé pyrolytique couplé à une

chromatographie gazeuse et un spectromètre de masse (GC-MS) permet de séparer et d'identifier les composés libérés, ce qui apporte des informations riches sur la structure initiale de la matière organique.

La spectroscopie de fluorescence 3D est une technique analytique largement utilisée pour caractériser la matière organique dissoute dans les milieux aquatiques (Marhaba et Lippincott, 2000; Baker et Spencer, 2004; Bengraine et Marhaba, 2004, Mariot *et al.*, 2007). Pour les boues d'épuration, cette méthode est encore peu développée. Pourtant, elle présente un potentiel intéressant puisqu'elle permet l'observation de fluorophores spécifiques des composés protéiques, largement présents dans les boues secondaires, et des substances humiques.

La microscopie confocal à balayage laser est une méthode intéressante pour observer la structure physique des matrices présentes dans les boues d'épuration et notamment les boues secondaires (Schmid *et al.*, 2003). En associant cette technique à l'analyse statistique d'images, il est possible d'obtenir des informations sur le volume et l'architecture des matrices.

Cependant, ces techniques analytiques ont une limitation non négligeable. Bien qu'elles présentent un aspect qualitatif performant, leur aspect quantitatif lors de la caractérisation de composés complexes est encore peu développé, ce qui est un verrou notamment lors de leur utilisation dans un but de prédire les performances de digestion anaérobie.

## **1.6 Conclusions**

La digestion anaérobie de boues secondaires réalisée en condition thermophile présente plusieurs avantages qui sont une réduction du temps de séjour du procédé, une destruction des microorganismes pathogènes, une augmentation de la solubilité et de l'accessibilité des substrats. Cependant, les rendements de production de méthane et de dégradation de la matière restent limités. La composition et l'organisation de la matière au sein des boues secondaires sont présentées comme des facteurs importants sur les performances de dégradation observées. Mais peu de travaux scientifiques ont tenté de mettre en relation ces paramètres avec la biodégradation anaérobie dans un but de développer des indicateurs initiaux pertinents. Le Chapitre 3 est centré sur cet aspect.

L'état initial de la boue à traiter affecte fortement les performances de dégradation anaérobie. Le prétraitement thermique est utilisé pour solubiliser la matière et ainsi la rendre plus biodisponible aux microorganismes épurateurs. Le couplage de ce procédé thermique avec la digestion anaérobie en condition thermophile a été peu étudié. De plus, l'évaluation de l'influence de l'état du substrat sur les performances de dégradation anaérobie thermophile à travers un suivi détaillé des voies réactionnelles n'est généralement pas proposée. Ainsi, l'ensemble de ces points est développé dans le Chapitre 4.

L'utilisation d'un outil mathématique de simulation est très intéressante pour étudier l'influence de la caractérisation du substrat et ainsi obtenir les performances de la dégradation

anaérobie. L'ADM1 proposé par Batstone *et al.* (2002) est un modèle de base très complet. Cependant, l'implémentation des variables initiales du modèle suivant le substrat étudié est une problématique importante. De plus, la fonction utilisée pour décrire les étapes de désintégration et d'hydrolyse du modèle est jugée simpliste au vue des phénomènes réactionnels qui se produisent lors de l'hydrolyse de composés particuliers complexes. Les Chapitres 5 et 6 sont dédiés à ces deux points.

## 1.7 Objectifs

L'objectif principal de la thèse a été d'étudier le lien entre la caractérisation chimique et biochimique de la matière organique de boues secondaires d'épuration et les performances de digestion anaérobie thermophile. Ainsi, plusieurs méthodes de caractérisation, basées sur des mesures globales et spécifiques de la matière organique de boues secondaires, ont été proposées et reliées à leur potentiel méthane via une méthode statistique. Les performances de digestion ont été suivies dans des réacteurs batchs en régime thermophile. Les effets de la solubilisation du substrat et de l'adaptation de l'inoculum ont été évalués. Enfin, un modèle mathématique a été proposé afin de mieux représenter et mieux comprendre les voies réactionnelles de la matière organique des boues lors de la digestion anaérobie.

Ainsi, la thèse s'articule autour de différents axes de recherches qui sont :

- Etudier la composition de la matière organique de boues secondaires d'épuration en entrée et en sortie de procédés industriels de digestion anaérobie et mettre en lien grâce à une méthode statistique la caractérisation initiale des boues avec leurs performances de dégradation anaérobie obtenue au laboratoire (Chapitre 3),
- Etudier l'impact de la biodisponibilité de la matière organique des boues et l'adaptation de l'inoculum sur les voies réactionnelles de la digestion anaérobie thermophile en réacteurs batchs (Chapitre 4),
- Proposer un modèle mathématique pour la modélisation de la digestion anaérobie thermophile de boues secondaires afin de mieux représenter et d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de dégradation (Chapitre 5 et Chapitre 6).

## Chapitre 2: Matériels et méthodes





# Chapitre 2. Matériels et méthodes

## 2.1 Echantillons de boues d'épuration

Les boues utilisées dans les travaux de la thèse ont été issues de différentes STEP dont leurs propres caractéristiques sont développées dans les parties méthodologies de chaque chapitre. Selon les études réalisées, les échantillons de boues d'épuration ont été prélevés en entrée et en sortie des digesteurs au niveau de la ligne boue dans les stations d'épuration. Les prélèvements étaient de 20 L pour avoir une représentabilité suffisante vis-à-vis des analyses à effectuer.

Pour récupérer la fraction soluble de la boue étudiée, les échantillons ont subi une centrifugation grâce à une centrifugeuse Beckman J2-MC. Les conditions de centrifugation étaient une accélération de 50 000 g, pendant 15 min à 5°C. Ensuite, le surnageant obtenu a été filtré à l'aide d'un filtre constitué d'une membrane en acétate de cellulose à 0,45 µm, montée sur une seringue. Le filtrat obtenu constitue donc la fraction soluble. Quant à la phase particulaire, elle est assimilée au culot de la centrifugation. Le terme de fraction totale désigne les échantillons de boues non centrifugés.

## 2.2 Protocole opératoire des prétraitements thermiques

Les prétraitements thermiques ont été réalisés dans un réacteur de 10 L fonctionnant avec un volume utile de 6 L. Cet appareil a été conçu en conformité avec la Directive appareil à pression 97/23/CE (Décret n°9961046 du 13 décembre 1999 relatif aux équipements sous pression). Il s'agit d'un réacteur de type Autoclave 1660 1000, de catégorie IV. La gamme de température admissible est de 15°C à +350°C et la pression maximale admissible est de 140 bars. La durée de traitement débute lorsque la température désirée est atteinte à l'intérieur de l'autoclave.

Le traitement thermique s'est effectué selon deux modes de montée en température :

- par l'action de colliers chauffants entourant la paroi de l'autoclave, soit le mode électrique,
- par injection de vapeur sous pression (12 bars) créée par un générateur de pression, soit le mode vapeur. Ce mode est similaire aux procédés de traitements thermiques industriels, fonctionnant par alimentation en vapeur vive.

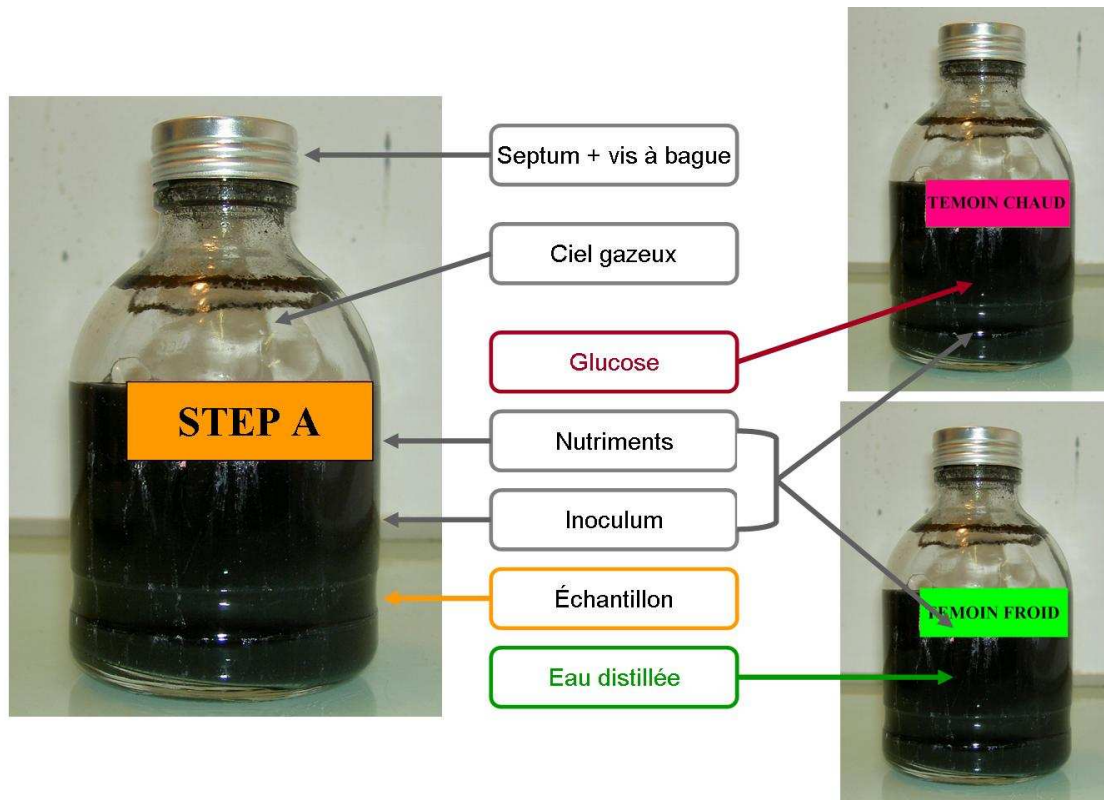
Les températures et la durée de prétraitement ont été définies à partir des données bibliographiques, en fonction de leur impact sur les performances de digestion des boues. Les conditions opératoires sont de 110°C, 165°C et 220°C réalisées en mode électrique et de 165°C réalisée en mode vapeur. La durée de traitement est de 30 min.

## 2.3 Protocoles de mesure de la biodégradation anaérobie

### 2.3.1 Test de mesure du potentiel méthane en fioles

Les tests de mesure du potentiel méthane biochimique (BMP) permettent de comparer les productions de méthane de différents types de boues sur un même inoculum. Les tests de mesure BMP réalisés en fioles consistent donc en une dégradation anaérobie en condition batch, d'un échantillon à tester avec un excès de nutriments et d'inoculum, afin de limiter les carences et d'avoir un rapport substrat sur biomasse favorable pour ainsi optimiser la dégradation.

Les tests BMP se basent sur un protocole INRA et sont réalisés en condition thermophile (55°C) sur table agitante (250 rpm). L'inoculum utilisé a été prélevé dans un digesteur industriel traitant une boue secondaire forte charge en régime thermophile. Chaque test est réalisé en triplicat dans des fioles plasma de 500 mL dont le volume utile est de 400 mL. Une charge de 0,5 g<sub>DCO</sub> de substrat par g<sub>MV</sub> d'inoculum a été appliquée. Deux témoins sont nécessaires aux tests BMP : un témoin froid qui permet de quantifier l'activité endogène de l'inoculum et un témoin chaud qui permet de vérifier l'activité de dégradation de l'inoculum. Le dispositif expérimental est présenté dans la Figure 2.1. Au cours de ce test, les paramètres suivis sont le volume et la qualité du biogaz. A intervalles de temps réguliers, le volume de biogaz est mesuré à l'aide d'une éprouvette renversée. Le volume de biogaz est déterminé à partir d'un dispositif de mesure constitué d'une aiguille qui est introduite dans le septum de la fiole à plasma, reliée par un tuyau à une éprouvette renversée remplie d'eau. L'eau utilisée dans ce dispositif est acidifiée (pH = 2) et salée à 10 % afin de minimiser la dissolution du dioxyde de carbone dans l'eau. Par différence de pression, le biogaz du ciel gazeux de la fiole est libéré dans le tuyau, ce qui déplace le niveau d'eau contenue dans l'éprouvette. Ainsi, le volume de biogaz produit est relevé par différence du niveau d'eau de l'éprouvette. La composition du biogaz est déterminée grâce à un prélèvement de 1 mL de ciel gazeux de la fiole qui est ensuite injecté en chromatographie gazeuse. Le test est poursuivi jusqu'à l'obtention d'un plateau sur la courbe de production de méthane.



**Figure 2.1** : Dispositif expérimental pour la réalisation des tests de BMP.

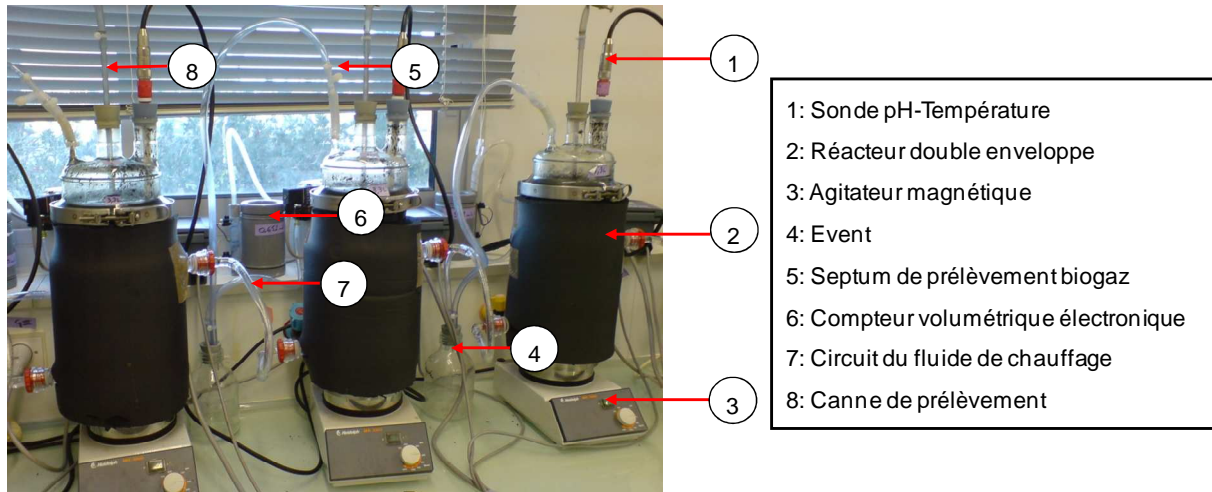
### 2.3.2 Suivi des cinétiques de dégradation en réacteurs

Les cinétiques de dégradation des boues ont été étudiées en réacteurs sous condition batch afin de suivre les concentrations des principaux composés intermédiaires de la digestion anaérobie. Le protocole utilisé a été développé par Buffière *et al.* (2006) qui se base sur les travaux de Owens et Chynoweth (1993) et Angelidaki et Sanders (2004). Ainsi, ce protocole permet le suivi de plusieurs sous-produits :

- le suivi du produit final : le méthane, qui permet de refléter la biodégradation du substrat,
- le suivi de sous-produits : les AGV, protéines, glucides,
- le suivi de la DCO soluble.

Six réacteurs anaérobies ont fonctionné en condition thermophile à 55°C grâce à une circulation d'eau thermostatée dans une double enveloppe. Les réacteurs ont une capacité de 3,5 L et fonctionnent en parallèle et en mode batch. L'inoculum utilisé a été prélevé dans un digesteur industriel traitant une boue secondaire forte charge en régime thermophile. Un réacteur a servi de témoin, pour quantifier l'activité endogène de l'inoculum. Les cinq autres réacteurs ont permis d'étudier les cinétiques de dégradation anaérobie des différents substrats étudiés. Une charge de 0,5 g<sub>DCO</sub> de substrat par g<sub>MV</sub> d'inoculum a été appliquée afin d'assurer une activité microbienne élevée, d'éviter une surcharge et ainsi avoir un faible risque

d'inhibition. Le mélange substrat/inoculum a été dégazé grâce à un gaz composé de 75 % de N<sub>2</sub> et de 25 % de CO<sub>2</sub> afin d'assurer des conditions anaérobies. La production de biogaz et le pH ont été mesurés en continu dans chaque réacteur. Des compteurs volumétriques électroniques ont permis de mesurer le volume de biogaz produit au cours de l'expérience. Enfin, au cours de chaque test, la DCO totale et soluble, les AGV et la composition du biogaz ont été mesurés régulièrement, à raison de 2 à 3 fois par semaine, afin de suivre la formation des sous-produits. La Figure 2.2 présente le dispositif expérimental utilisé.



**Figure 2.2 :** Dispositif expérimental pour le suivi des cinétiques de dégradation anaérobie en condition batch des boues étudiées.

## 2.4 Méthodes de calcul de paramètres

### 2.4.1 Solubilisation

La solubilisation de la DCO et de la matière volatile ont été choisies pour évaluer l'impact du prétraitement thermique. Ce paramètre définit le transfert de matière de la fraction particulaire vers la fraction soluble. La solubilisation est exprimée en % et se calcule selon l'expression suivante.

$$S_x (\%) = \frac{S_s - S_{s_0}}{X_{p_0}} * 100$$

Où,  $S_s$  est la concentration de la fraction soluble mesurée dans l'échantillon prétraité thermiquement,  $S_{s_0}$  est la concentration de la fraction soluble mesurée dans l'échantillon non traité,  $X_{p_0}$  est la concentration de la fraction particulaire mesurée dans l'échantillon non traité.

### 2.4.2 Le potentiel méthane

Le potentiel méthane biochimique correspond à la production spécifique finale de méthane, issue de la digestion anaérobie d'un déchet organique. Le paramètre BMP est exprimé en mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>.g<sub>DCOintro</sub><sup>-1</sup>. Le volume est exprimé dans les CNTP, c'est-à-dire sous 1 atm et 0°C.

$$BMP(mL_{CH_4} \cdot g_{DCO_{intro}}^{-1}) = \frac{volume_{CH_4}}{masse_{DCO_{introduite}}}$$

### 2.4.3 Biodégradabilité

La biodégradabilité est exprimée par rapport à la biodégradabilité maximale théorique en méthane, qui est de  $350 mL_{CH_4} \cdot g_{DCO_{éliminée}}^{-1}$ .

$$Biodégradabilité (\%) = \frac{BMP}{350} * 100$$

## 2.5 Les méthodes analytiques

### 2.5.1 Matières sèches et volatiles

La détermination des différentes fractions de la matière est réalisée par pesées et séchages des boues secondaires, selon la méthode normalisée 2540G (APHA, 1999).

Les matières sèches (MS) correspondent à la matière résiduelle obtenue après une étape de séchage à  $105^{\circ}C$ . Après homogénéisation, 30 mL de boues sont introduits dans un creuset préalablement séché et taré. Ensuite, l'ensemble est mis au four à  $105^{\circ}C$  pendant 24 h, puis refroidi dans un dessiccateur et pesé pour obtenir les MS.

Après avoir pesé et mesuré les MS, le creuset est mis au four à  $550^{\circ}C$  pendant deux heures. Puis, il est refroidi et pesé pour obtenir les matières minérales ou inertes (MI). Ainsi, la différence entre les MS et les MI correspond aux matières volatiles (MV). Les MV sont assimilées à la matière organique.

Cependant, une large fraction des AGV se volatilisent lors de la première étape de séchage. Ainsi, les matières sèches et les matières volatiles sont corrigées en ajoutant la concentration en AGV totale pour ainsi prendre en compte les AGV perdus par volatilisation lors de l'étape d'évaporation de l'eau.

L'erreur de mesure est de l'ordre de 1 à 5 %.

$$MS (g.L^{-1}) = \frac{masse_{105^{\circ}C}}{masse_{boue\ fraîche}} * 1000$$

$$MV (g.L^{-1}) = \frac{masse_{105^{\circ}C} - masse_{550^{\circ}C}}{masse_{boue\ fraîche}} * 1000$$

### 2.5.2 Matières en suspension et matières volatiles en suspension

Les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVS) sont déterminées de la même façon que les MS et MV, mais à partir du culot de centrifugation et du retentât de filtration.

Les MES correspondent aux composés non solubles et résiduels obtenus après une étape de séchage à 105°C. Après homogénéisation, 50 mL de boue sont centrifugés à 25 000 g, pendant 15 min à 5°C. Le surnageant obtenu est filtré sous vide sur un filtre constitué de microfibrilles de verres à 1,2 µm. La fraction particulaire est obtenue en récupérant le filtre, préalablement pesé avec le creuset sec, et le culot de centrifugation que l'on dépose dans le creuset. Ensuite, l'ensemble est mis dans un four à 105°C pendant 24 h, puis est refroidi et pesé.

$$MES (g.L^{-1}) = \frac{masse_{105^{\circ}C}}{volume_{boue\ int\ roduit}} * 1000$$

$$MVS (g.L^{-1}) = \frac{masse_{105^{\circ}C} - masse_{550^{\circ}C}}{volume_{boue\ int\ roduit}} * 1000$$

### 2.5.3 La demande chimique en oxygène (DCO)

La mesure de la DCO, exprimée en g<sub>O<sub>2</sub></sub>.L<sup>-1</sup> est effectuée selon une micro-méthode, à l'aide de kits commercialisés, qui correspond à une mesure de densité optique selon la loi de Beer-Lambert. La mesure de la DCO permet de déterminer l'ensemble des matières oxydables d'un échantillon. Cette mesure donne une évaluation de la matière organique qui réagit avec un oxydant, le dichromate de potassium (2K<sup>+</sup>, Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>), orange initialement, et en milieu acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'oxydation de la matière produit des ions Cr<sup>3+</sup>, donnant une coloration verte. La gamme de mesure du kit est de 0 à 1,5 g<sub>O<sub>2</sub></sub>.L<sup>-1</sup>. L'erreur est de l'ordre de 5 à 15 %.

### 2.5.4 L'analyse du carbone

Avant de doser le carbone total (CT) et le carbone inorganique (CI) sur la fraction totale des boues, les échantillons subissent une préparation : ils sont broyés à moins de 2 mm par un Ultrathurax à 12 000 rpm pendant 8 min. Le dosage du COT et du CI est effectué par un analyseur Shimadzu doté d'un module Carbone TOC-V.

Pour le dosage du CT, 100 µL d'échantillon dilué subissent une oxydation catalytique à 720°C, le débit d'air comprimé étant de 130-140 mL.min<sup>-1</sup>. Le carbone total est alors sous forme de CO<sub>2</sub> et est dosé par infrarouge.

Pour le CI, une acidification de 100 µL d'échantillon est effectuée par l'acide chlorhydrique (HCl à 2 N). Ceci permet de libérer le carbone inorganique sous forme de CO<sub>2</sub> qui sera dosé par infrarouge.

Le carbone organique (CO) est déterminé en effectuant la différence entre le CT et le CI. L'erreur est de l'ordre de 5 à 10 %.

### 2.5.5 L'analyse de l'azote

Les formes azotées majoritaires dans les boues d'épuration sont : l'azote organique et l'azote ammoniacal sous d'ammonium NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et d'ammoniac NH<sub>3</sub>.

La méthode de Kjeldhal est applicable pour le dosage de l'azote de différents composés azotés, mais ne permet pas le dosage direct des nitrites et des nitrates.

Pour doser l'azote total de l'échantillon, la méthode de Kjeldhal a été utilisée. Elle se décompose en trois étapes : une minéralisation à chaud de l'échantillon, une distillation et une titration.

La phase de minéralisation est réalisée par le BÜCHI digestion unit K 424, grâce à un catalyseur (sélénite de cuivre) en milieu acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 96 %), et à haute température pendant 3 h. Pendant cette phase, la molécule organique est détruite par oxydation à ébullition : le carbone s'élimine sous forme de  $\text{CO}_2$ , l'hydrogène sous forme de  $\text{H}_2\text{O}$  et l'azote reste en solution sous forme de  $\text{NH}_4^+$ .

Après refroidissement et alcalinisation par ajout de soude à 32 % grâce à l'analyseur BÜCHI 370-K, l'ammonium passe sous d'ammoniac et est ensuite entraîné par la vapeur d'eau sous forme gazeuse  $\text{NH}_3$ . Les vapeurs d'ammoniac condensées au contact d'un tube réfrigérant, sont recueillies dans une quantité connue et en excès d'acide borique afin de piéger le gaz ammoniac.

Ensuite, la quantité totale de  $\text{NH}_3$  ayant ou n'ayant pas réagi avec l'acide borique est dosée. Ce dosage est effectué par l'acide chlorhydrique à  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ . L'azote total est mesuré dans les fractions totales et solubles des boues. L'erreur de mesure est de 10 %. Le dosage de l'azote ammoniacal est effectué de la même façon que l'azote total, sans l'étape de minéralisation. L'azote ammoniacal est mesuré sur la fraction soluble. L'erreur de mesure est de 5 %.

L'azote organique se calcule par différence entre l'azote total et l'azote ammoniacal.

### **2.5.6 Le dosage des protéines**

Le dosage des protéines est effectué par la méthode colorimétrique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Cette méthode permet de quantifier les liaisons peptidiques. Cette méthode utilise une gamme d'étalonnage entre 20 et  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , réalisée avec des solutions de sérum albumine bovine (SAB). Les étalons ainsi préparées et les échantillons subiront la même procédure de dosage.

Un volume de 1 mL d'échantillon ou d'étalon, 3 mL d'une solution mélange (composée de 50 mL de bicarbonate de sodium :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2 % préparée dans la soude  $\text{NaOH}$  à 0,1 N + 1 mL de solution de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  à 1 % et de tartrate double de sodium et de potassium  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ) et 0,3 mL de réactif de Folin (solution commerciale diluée au demi) sont ensuite ajoutés.

En milieu alcalin, les protéines réagissent avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  : une complexation de ces ions avec les atomes d'azote contenus dans les liaisons peptidiques se forme, soit une réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  et une oxydation des acides aminés. Les ions formés réduisent ensuite les ions phosphotungstique/acide phosphomolybdique contenus dans le réactif de Folin. Le

réactif de Folin ainsi réduit, donne une coloration bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines.

La réaction dure 2 h à l'obscurité. L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 750 nm avec le spectrophotomètre mono-faisceau DV-640 (Beckman). Ce spectrophotomètre contient deux lampes : une lampe à deutérium qui permet de balayer les longueurs d'ondes inférieures de 190 à 350 nm et une lampe à filament en tungstène qui permet de balayer les longueurs d'ondes comprises entre 350 et 1100 nm. Le système dispersif est un monochromateur et le système de détection est une barrette de photodiodes. Ainsi, la concentration en protéines des échantillons est calculée après lecture de l'absorbance de la gamme étalon SAB de 20 à 100 mg.L<sup>-1</sup>. Les résultats seront donc exprimés en grammes équivalents de SAB par litre (g<sub>SAB</sub>.L<sup>-1</sup>). L'erreur de mesure est de 5 % pour la fraction soluble et de 15 % pour la fraction totale.

La concentration en protéines peut également être obtenue selon la méthode de Kjeldhal à partir de la concentration en azote organique. Il est estimé que les protéines sont constituées à partir de 16 % d'azote. Ce coefficient est adapté dans l'agroalimentaire mais certains auteurs l'appliquent aux domaines de l'épuration.

### **2.5.7 Le dosage des polysaccharides**

Le dosage des sucres est effectué par la méthode colorimétrique avec l'anthrone (Dreywood, 1946). Ce dosage permet de mesurer les sucres totaux réducteurs. Le dosage à l'anthrone (ou oxo-9-dihydro-10-anthracène) mesure les fonctions carbonyles (C=O). Il est basé sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide, à chaud. Les dérivés furfuraliques obtenus (5-hydroxyméthyl-furfural pour les hexoses) se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés (verts pour les hexoses) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration glucidique.

Cette méthode, une gamme d'étalonnage entre 20 et 100 mg.L<sup>-1</sup>, a été réalisée avec des solutions de glucose.

Un volume de 2 mL de réactif à l'anthrone (2% d'anthrone dans du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajouté à 1 mL d'échantillon ou d'étalon. Le mélange est réalisé dans des tubes en verre, qui sont ensuite plongés dans de la glace afin d'arrêter la réaction. Les échantillons et les étalons sont ensuite plongés dans un bain marie d'eau bouillante pendant 10 min. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes à nouveau dans de la glace. L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 625 nm avec le même spectrophotomètre mono-faisceau DV-640 (Beckman) que pour le dosage des protéines.

Ainsi, la concentration en glucides des échantillons est calculée après lecture de l'absorbance de la gamme étalon de glucose de 20 à 100 mg.L<sup>-1</sup>. Les résultats seront donc exprimés en gramme équivalent de glucose par litre (g<sub>Glu</sub>.L<sup>-1</sup>). L'erreur de mesure est de 10 % pour la fraction totale et de 5 % pour la fraction soluble.



### 2.5.8 Le dosage des graisses

Le dosage des graisses est effectué par une extraction par solvant (l'éther de pétrole) au Soxhlet. Trois grammes d'échantillon lyophilisé et broyé sont introduits dans une cartouche d'extraction en cellulose, ainsi que la même masse de sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Du coton dégraissé est placé au-dessus de l'échantillon pour éviter les pertes. La cartouche est ensuite placée dans le tube extracteur de l'appareil et un ballon monocol, rempli de 200 mL d'éther de pétrole, est assemblé au tube extracteur.

L'éther de pétrole est chauffé à sa température d'ébullition (40-60°C) où il se vaporise et s'élève jusqu'à la colonne de refroidissement en passant par le tube extracteur où il se condense et tombe dans le tube extracteur contenant la cartouche. A ce stade, le solvant entre en contact avec les particules de l'échantillon. Le solvant solubilise les graisses de l'échantillon, puis est reflué dans le ballon. Ensuite, le solvant est évaporé sous pression réduite. L'évaporation est réalisée par l'évaporateur rotatif Rotavapor de BÜCHI et les conditions de fonctionnement sont : une température de 70°C et une pression à vide. Le ballon est mis au four à 105°C pendant 16 h. La quantité de graisses est calculée par différence entre la masse du ballon vide et la masse du ballon refroidit après évaporation du solvant. Elle s'exprime en fonction de la matière introduite. L'erreur de mesure est de l'ordre de 15 %

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \frac{\text{masse}_{\text{matières extraites après évaporation}}}{\text{masse}_{\text{matière int roduite}}} * 100$$

### 2.5.9 Le dosage des acides gras volatils

Le dosage des AGV se fait par chromatographie gazeuse. Le chromatographe utilisé est le GC800 (Fisons Instruments) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un passeur automatique d'échantillons AS800 (Fisons Instruments).

La colonne utilisée est une colonne semi-capillaire Econocap FFAP (Altech) d'une longueur de 15 m et d'un diamètre de 0,53 cm, avec une épaisseur de film de 1,2  $\mu\text{m}$ . La température de l'injecteur (injection totale sans division, spitless) est de 250°C, celle du détecteur de 275°C. La montée en température du four est programmée de 80°C à 120°C en 3 min. Le gaz vecteur utilisé est un mélange d'azote (25 kPa), d'hydrogène (50 kPa) et d'air (100 kPa). Le volume d'échantillon injecté est de 1  $\mu\text{L}$ . L'analyse est effectuée sur la phase soluble.

La méthode employée est celle de l'étalon interne (1 g d'acide éthyl-2-butyrique dans 1 L d'eau acidifiée à 5 % avec du  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). La gamme d'étalonnage est préparée à partir de six acides : acétique ( $\text{C}_2$ ), propionique ( $\text{C}_3$ ), butyrique ( $\text{C}_4$ ), iso-butyrique ( $i\text{C}_4$ ), valérique ( $\text{C}_5$ ) et iso-valérique ( $i\text{C}_5$ ), à 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  chacun. Les échantillons sont préparés en mélangeant 0,5 mL d'échantillon et 0,5 mL d'étalon interne dans un vial de 2 mL. Le standard est réalisé en mettant 1 mL d'étalon interne dans un vial de 2 mL. La gamme d'étalonnage est comprise entre 0,25 et 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et le seuil de quantification est situé à 0,1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . L'erreur de mesure est de l'ordre de 2 à 5 %.

### 2.5.10 Le fractionnement de Van Soest

Le fractionnement de Van Soest est une méthode qui permet l'extraction successive de 4 fractions de matière grâce à l'action d'un détergent neutre suivi d'un détergent acide et d'un acide fort. Cette méthode a été développée pour la caractérisation de la matière végétale en 4 fractions qui sont les composés solubles, l'hémicellulose, la cellulose et la lignine (Van Soest, 1963). Dans le cas d'une application aux boues d'épuration, ces fractions devront être considérées comme assimilables ou « like » car la matière présente n'est pas de la même origine que la matière végétale.

Cette méthode étant sensible à la présence de graisses. Un prétraitement à l'éther de pétrole (40-60°C) est réalisé en immergeant les sacs comportant 2,5 g d'échantillon dans 40 mL de solvant, successivement dans trois bains différents afin d'extraire les lipides de l'échantillon. Les sacs utilisés sont des sacs Fiber Bag (Gerhardt). Ces sacs sont ensuite nettoyés à l'acétone et à l'eau distillée, avant d'être séchés pendant une nuit à 105°C. Ensuite des extractions successives de composés de plus en plus difficiles à solubiliser sont réalisées sur 1 g d'échantillon initial.

Les étapes d'extraction au détergent neutre (NDF) et au détergent acide (ADF) s'effectuent de la même manière. Les sacs munis des porte-sacs en verre sont plongés dans 360 mL de solution NDF ou ADF selon l'étape (NDF est constitué de 30 g de dodécylhydrogénosulfate de sodium, 6,81 g de tétraborate de sodium, de 18,61 g d'EDTA et de 4,56 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , dans 1L d'eau distillée ; ADF est constitué de 20 g de bromure d'hexadécyltriméthylammonium et de 29,8 mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 96 %, dans 1 L d'eau distillée QSP). Puis, la solution est portée à ébullition pendant 1 h et ensuite les sacs sont rincés à l'eau distillée. L'extraction à l'acide fort (ADL) consiste à immerger les sacs dans 40 mL d'acide sulfurique à 72 % pendant 3 h, puis ils sont rincés à l'eau distillée. Après chaque extraction, le résidu est séché à 105°C et pesé. Après l'extraction ADL, une calcination à 550°C est effectuée afin d'obtenir la matière minérale restante (résidus).

Les résidus (NDF, ADF, ADL) s'expriment en fraction de la matière sèche. Chaque résidu est calculé comme le reste après séchage moins le reste après calcination. Une correction par rapport à la masse du sac est effectuée (99,2 % de la masse du sac est calcinée lors du passage à 550°C).

$$NDF = \frac{(M_1 - M_4 - (0,992 * (TS - T)))}{(M_0 - TS) * \tau_{MS}} * 100$$

$T$  : tare du creuset ou bécher

$TS$  : masse du bécher + sac

$M_0$  : masse du bécher + sac + échantillon

$$ADF = \frac{(M_2 - M_4 - (0,992 * (TS - T)))}{(M_0 - TS) * \tau_{MS}} * 100$$

$M_1$  : pesée après extraction NDF et séchage

$M_2$  : pesée après extraction ADF et séchage

$$ADL = \frac{(M_3 - M_4 - (0,992 * (TS - T)))}{(M_0 - TS) * \tau_{MS}} * 100$$

$M_3$  : pesée après extraction ADL et séchage

$M_4$  : pesée après calcination

A partir des résidus, les quantités représentées par chaque fraction sont calculées selon les expressions suivantes (les résultats sont exprimés en fraction de la matière sèche).

$$SOLU \text{ (fraction soluble)} = 1 - NDF$$

$$HEMI \text{ (hémicellulose)} = NDF - ADF$$

$$CELL \text{ (cellulose)} = ADF - ADL$$

$$LIGN \text{ (lignine)} = ADL$$

### 2.5.11 La composition du biogaz

La composition du biogaz est déterminée par chromatographie en phase gazeuse avec une GC-8A (Shimadzu) relié à un intégrateur du type C-R8A (Shimadzu). Ce chromatographe permet de doser cinq gaz : le CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et le CH<sub>4</sub>.

La colonne Alltech CTR 1 est constituée de deux colonnes concentriques. La colonne intérieure, garnie de Sillicagel et de diamètre 3,175 mm, permet de séparer le CO<sub>2</sub> des autres gaz. La colonne externe, de diamètre 6,350 mm, est garnie d'un tamis moléculaire et permet de séparer l'O<sub>2</sub>, le N<sub>2</sub>, le H<sub>2</sub> et le CH<sub>4</sub>.

Le gaz vecteur utilisé est de l'argon (2,8 bar). La température du four est de 30°C, celle de l'injecteur et du détecteur de 100°C. Le volume d'injection est de 1 mL et se fait au niveau de l'injecteur à froid. La détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre (basé sur la conductibilité thermique des composés) dont l'intensité du courant est fixée à 80 mA. La concentration des échantillons est déterminée par étalonnage externe. Le gaz étalon utilisé est composé de 25 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, de 5 % d'H<sub>2</sub>, de 2 % d'O<sub>2</sub>, de 10 % de N<sub>2</sub> et de 57,8 % de CH<sub>4</sub>. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 5 %.

## 2.6 Expériences effectuées

Le Tableau 2.1 synthétise les analyses réalisées au cours des travaux de la thèse.

Echantillon	Caractérisation	Analyses effectuées		Test de dégradation	Analyses effectuées	Travaux
Boues de 6 STEP	Entrée et sortie de digesteurs industriels	Matière	Total/soluble	BMP en condition thermophile (55°C) sur boues d'entrée	Biogaz	Chapitre 3 : relation entre la caractérisation initiale et la biodégradabilité
		DCO				
		Carbone				
		Protéines				
		Glucides	Soluble			
		AGV				
		Lipides	Total			
Van Soest						
Boue forte charge Boue digérée Cellulose <sup>1</sup>	Initiale	Matière	Total/soluble	Suivi des cinétiques de dégradation en réacteur batch (55°)	Biogaz	Chapitre 3 : validation du modèle statistique
		DCO				
		Carbone				
		Protéines				
		Glucides	Soluble			
		AGV				
Lipides	Total					
Boue non traitée Boues prétraitées à 110°C 165°C électrique 165°C vapeur 220°C	Initiale et après traitement thermique	Matière	Total/soluble	Suivi des cinétiques de dégradation en réacteur batch (55°) sur quatre alimentations successives	Biogaz DCO soluble AGV	Chapitre 4 : Influence de la solubilisation du substrat Chapitre 5 et 6 : élaboration d'un modèle mathématique
		DCO				
		Protéines				
		Glucides				
		AGV				
Boue non traitée Boue prétraitée à 165°C électrique	Initiale et après traitement thermique	Matière	Total/soluble	Suivi des cinétiques de dégradation en réacteur batch (55°)	Biogaz DCO soluble Protéines solubles Glucides solubles AGV	Chapitre 4 (discussion) : suivi des composés solubles Chapitre 5 (discussion) : suivi des concentrations en azote inorganique
		DCO				
		Protéines				
		Glucides				
		AGV				

<sup>1</sup> : seulement la matière totale a été mesurée sur la cellulose

**Tableau 2.1** : Expériences réalisées au cours des travaux de la thèse.

Chapitre 3: Relation entre la caractérisation  
initiale de boues secondaires et leur  
biodégradabilité anaérobie thermophile



# Chapitre 3. Relation entre la caractérisation initiale de boues secondaires et leur biodégradabilité anaérobie thermophile

## Résumé

Le chapitre suivant est présenté sous forme d'un article scientifique.

L'organisation et la composition de la matière organique constituant les boues secondaires ont un impact important sur les performances de dégradation anaérobie. Cependant, peu de travaux s'intéressent à étudier le lien direct entre la composition initiale de la boue et leur potentiel méthane afin de développer des indicateurs de dégradation.

Deux méthodes de caractérisation ont été proposées afin d'identifier de façon globale la matière constituant les boues d'entrée et de sortie de digesteurs industriels. La caractérisation biochimique a permis d'identifier environ 80 % de la matière organique des boues d'entrée et de sortie. La matière organique a été divisée en quatre familles de composés qui sont les protéines, les glucides (exprimés respectivement en équivalent sérum albumine bovine et en équivalent glucose), les lipides et les AGV. La caractérisation par la méthode de Van Soest effectue un fractionnement de la matière en quatre compartiments plus ou moins extractibles. Elle a été développée pour caractériser des déchets végétaux en une fraction soluble, hémicellulose, cellulose et lignine. Cette méthode a également été appliquée aux déchets solides (Buffière *et al.*, 2006) et au compost (Parnaudeau *et al.*, 2004) pour identifier des indicateurs de dégradation anaérobie ou de maturation. Dans le domaine des boues d'épuration, elle pourrait nous fournir des informations sur la complexité et l'accessibilité de la matière. Cependant, la matière étudiée est différente de celle présente dans un déchet végétal ainsi les fractions identifiées doivent être considérées comme des fractions assimilables à de l'hémicellulose, de la cellulose et de la lignine.

La première approche consiste à identifier les composés majoritaires et minoritaires présents dans les boues d'épuration municipales d'entrée et de sortie de digesteurs industriels. Ainsi, un bilan sur les performances en termes de rendements d'abattement des composés mesurés a été effectué. Nous avons également mis en évidence des limites de dégradation avec l'identification de composés réfractaires ou lentement dégradables. Cette approche a donc l'avantage d'apporter des informations sur le fonctionnement de digesteurs à l'échelle industrielle. Cependant, en France, à l'heure actuelle, peu de STEP sont équipées de digesteurs anaérobies thermophiles. Ainsi, cet aspect ne nous a pas permis de réaliser une comparaison des performances entre différents digesteurs industriels thermophiles. Notre

étude a été conduite sur six STEP gérées par Veolia Eau et intégrant un digesteur anaérobie. Les régimes de température des digesteurs étudiés sont des conditions mésophiles (réacteurs A et B), thermophiles (réacteurs C et D), en deux étapes thermo/mésophile (réacteur E) et un réacteur en condition mésophile équipé d'une étape de prétraitement thermique à 165°C (réacteur F). Les boues secondaires à traiter sont de différents types : boues fortes charges (réacteurs A et B) ; boues très fortes charges (réacteurs C et D) et boues faibles charges (réacteurs E et F). De plus, les conditions opératoires entre des digesteurs fonctionnant au même régime de température peuvent être différentes et bien souvent, les productions de biogaz et de méthane ne sont pas accessibles.

La seconde approche a consisté à déterminer la biodégradabilité anaérobie en condition thermophile de chaque boue étudiée et de la mettre en lien avec leur caractérisation initiale. Ainsi, des tests de dégradation au laboratoire ont été effectués dans les mêmes conditions. Ils permettent de déterminer le potentiel méthane de chaque boue et de les comparer. Ensuite une approche statistique a été utilisée pour élaborer un modèle permettant de prédire la biodégradabilité des boues à partir des caractéristiques de la matière initiale des boues étudiées. Plusieurs modèles ont été testés afin d'évaluer la pertinence des méthodes de caractérisation utilisées. Enfin, le modèle basé sur la caractérisation biochimique et sur les mesures du carbone soluble et du degré d'oxydation semble le plus performant pour d'une part apporter des informations pertinentes sur la qualité de la matière organiques des boues d'épuration et d'autre part prédire la biodégradabilité.

Basé sur:

**Mottet A., François E., Latrille E., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Carrère H.**  
Estimation of anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge (En préparation).



## **3.1 Introduction and objectives**

### **3.1.1 Introduction**

#### **3.1.1.1 Anaerobic digestion of sewage sludge : a renewable energy resource**

The European Union has the aim of increasing the part of renewable energy sources in the final overall energy consumption of the Union from 8.5% in 2005 to 20% in 2020. This ambitious objective will contribute to the global fight against climate change and towards better control over European energy dependence.

The anaerobic digestion of sewage sludge can be a major contribution to achieve this European directive. Indeed the amount of sewage sludge is growing with the increase of the treated wastewater volumes and thus sewage sludge management is becoming an environmental and economic issue. Thanks to anaerobic digestion, sewage sludge can be considered as a renewable energy resource because the organic matter is converted into biogas, composed of 60-70 % of methane (CH<sub>4</sub>), which can be transformed into heat and/or electricity or biofuel. The annual potential of biogas production from sludge in Europe is estimated to more than 200 billion m<sup>3</sup> (Appels *et al.*, 2008). Thus, the anaerobic conversion of sewage sludge must become an essential process in the modern waste water treatment plant.

#### **3.1.1.2 Optimisation parameters of anaerobic digestion**

Studies on the optimisation of anaerobic digestion operating conditions showed that several parameters clearly impact the biological conversion step rates. The anaerobic biomass is very sensitive to pH and each population has different optimal range of pH (Chen *et al.*, 2007). The temperature induces an important effect on the growing rates (Kosobucki *et al.*, 2008) and on the microbial diversity (Lee *et al.*, 2008b). The mixing strategy and intensity affect significantly the performances and the production of methane (Kaparaju *et al.*, 2008). The retention time also impacts the process performances and the biomass growing (Demirel *et al.*, 2006). Therefore several strategies can be applied to improve the anaerobic conversion: the thermophilic digestion (55°C) to increase the degradation rates and the methane production (Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007); the increase of sludge retention time (Appels *et al.*, 2008); the pretreatment step to make the organic matter more available by the anaerobic biomass as thermal pretreatment (Bougrier *et al.*, 2007), sonication (Kim and Lee, 2005), enzymatic hydrolysis (Davidsson *et al.*, 2007) and chemical pretreatment (Ardic and Taner, 2005).

#### **3.1.1.3 The effect of the sludge composition**

However the anaerobic digestion mechanisms are yet not perfectly known. In the case of sewage sludge, the process performances are limited with an organic matter mean conversion from 30 to 50 % (Carrère *et al.*, 2008). Moreover, the methane production depends on the sludge type. Indeed, the waste active sludge (WAS) biodegradability is lower than primary sludge (Eskicioglu *et al.*, 2008). The WAS matrix is more complex because of biological origin and so less available to the anaerobic biomass (Barbusinki and Koscielniak, 1997;

Nielsen *et al.*, 2004; Wilen *et al.*, 2008). Among WAS, biodegradability may be affected with operating conditions of aerated tank in wastewater treatment line. Sludge samples originating from extended aeration process are less biodegradable than sludge from high load process (Carrère *et al.*, 2008).

However, few studies focus on the accurate characterisation of input sludge organic matter and on the relation between this organic matter and the performances of anaerobic conversion. Recently, some works concluded that the organic matter composition of substrate has a strong impact on the anaerobic digestion performances, in the same way as the operating conditions (Montusiewicz, 2008). Indeed, the co-digestion of municipal sludge with fresh and readily available organic matter such as organic waste of domestic refuse can improve by 80 % the biogas production against a digester fed with a mixture of municipal sludge (Zupancic *et al.*, 2008). Neves *et al.* (2008) studied the anaerobic digestion of restaurant wastes and they showed that the highest methane production rate and the lowest VFA accumulation were obtained in the case of a waste with a high content of carbohydrates. In the same way, the C/N ratio can influence the VFA production and the distribution patterns of individual VFAs. The increase of C/N ratio from 10 to 30 can be beneficial for the acidogens biomass activities and can improve the conversion of organic matter into VFAs (Liu *et al.*, 2008). Bengtsson *et al.* (2008) concluded that the observed differences among four wastewaters regarding degrees of acidification, composition of produced VFAs are most likely due to differences in organic matter composition of the wastewaters. Demirel *et al.* (2006) showed that the substrate composition impacts the microbial diversity and the conversion pathways in the digester. The composition and the availability of organic fractions present in a substrate are the key factors to determine the methane production.

In a recent work, Schievano *et al.* (2008) realised linear regression models between biogas potential and some chemical and biological parameters of both feed and digested mixtures of energetic crops, pig manure and organic fraction of municipal solid waste. They found a linear regression between four most significant variables, in particular volatile solids content (VS), oxygen demand during 20 hours of respirometry assay (OD20), total organic carbon (TOC) and soluble fraction (CS according to Van Soest fractionation). These parameters represented well both organic matter content and organic matter quality of the matrices and allowed to predict biogas potential with a mean error of 16 %.

In the field of the sewage sludge mineralization in soil, several studies tried to establish relationships between the sludge organic matter quality, by considering chemical and biochemical composition, and their decomposition and C and N mineralization on the soil. By statistical analysis, Hattori and Mukai (1986), Gilmour and Skinner (1999), Parnaudeau *et al.* (2004) found that the N mineralization is generally related to the C to N ratio and the N concentration of organic residues. Moreover, the decomposition rates of sludge in soil are negatively linked to lignin “like” fraction from Van Soest characterization.

However, the relationships between the initial organic composition and the anaerobic digestion performances have not been studied for the sludge. Thus, it is interesting to define

appropriated initial indicators to predict the anaerobic performances. It is therefore necessary to study accurately the substrate composition by defining a characterisation methodology. It will allow to have a topology of the sewage sludge and thus a better knowledge of the input sludge quality.

### **3.1.2 Objectives**

The aim of the study is to propose different methods in order to characterise the WAS solid matter, before and after full scale anaerobic digestion. The objective is to determine the major components of organic matter contained in the WAS and their removal during full scale anaerobic digestion. In a second stage, the initial sludge characterization has been linked to sludge thermophilic anaerobic biodegradability, determined by BMP tests, in order to find suitable indicators.

## **3.2 Methodology**

### **3.2.1 Waste activated sludge samples**

Waste activated sludge samples were taken from different full scale sludge anaerobic digesters. They were selected in function of the load type of wastewater treatment plant and the temperature range of anaerobic digester. One wastewater treatment plant (F) was equipped with Biothelys<sup>®</sup> process. It consists in a thermal hydrolysis (165°C) applied as a pretreatment of anaerobic digestion. Table 3.1 presents the wastewater treatment plant main characteristics. Three samples were collected in wastewater treatment F: before and after thermal hydrolysis (F input pretreatment and F output pretreatment) and at the output of anaerobic digestion (F output). It has to be noted that F output pretreatment corresponds to F input of the digester.

### **3.2.2 Methodology for the characterization of sludge samples**

The chemical characterization was performed on influent (input) and effluent (output) sludge samples. The methane potential was evaluated on the influent sludge samples in order to link sludge initial composition and anaerobic biodegradability.

All the analyses were performed in triplicate. The particulate fraction was separated by centrifugation at 50 000 g, 15 min and 5°C. Supernatant was then filtered through a cellulose acetate membrane with a pore size of 0.45 µm to obtain the soluble fraction. For the Van Soest fractionation and lipids determination, samples were freeze-dried and sieved with a 1 mm grid. Analyses were performed according three types of characterisation: macroscopic characterisation which gathers methods generally used in sludge or waste management, biochemical characterisation and Van Soest fractionation.

Analytical methods are detailed in Chapter 2 (Section 2.5).

WWTP	A	B	C	D	E	F <sup>1</sup>
Size of the plant (PE)	5 500 000	260 000	250 000	470 000	160 000	62 000
Wastewater	Urban	Urban and industrial (70/30)	Urban	Urban	Urban	Urban
Aerobic process	High load	High load	Very high load	Very high load	Extended aeration	Extended aeration
Sludge age (d)	2	1.5	0.36	0.6	11	21
Anaerobic process	Mesophilic	Mesophilic	Thermophilic	Thermophilic	Thermo/Mesophilic	Mesophilic
Sludge Retention Time (d)	21	27	14	16	2/13	15

<sup>1</sup> Wastewater treatment plant F: Biothelys<sup>®</sup> process as pretreatment of anaerobic digestion (thermal hydrolysis at 165°C)

**Table 3.1:** Wastewater treatment plant characteristics.

### **3.2.2.1 Macroscopic characterisation**

Organic solids were assimilated to volatile solids: Total solids (TS), volatile solids (VS), total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were measured on total and particulate fractions.

Chemical oxygen demand (COD) was measured on total and soluble fractions. The particulate fraction COD was determined by the difference between total and soluble fraction COD values.

Organic carbon (OC) were analysed in the total and soluble fractions.

### **3.2.2.2 Biochemical characterisation**

The biochemical analysis was realised to identify the volatile solid composition. The biochemical compounds (i.e. proteins, carbohydrates, lipids and volatile fatty acids) were analysed.

### **3.2.2.3 Van Soest fractionation**

Van Soest method (Van Soest, 1963) was used to fractionate the organic matter of sludge samples with sequential extractions by neutral and acid detergents, followed by strong acid extraction. This method is usually used for vegetal materials and fractionates the organic matter into soluble components, hemicellulose, cellulose and lignin. In the case of WAS, these fractions will be called fractions “like”.

### **3.2.2.4 Anaerobic biodegradability measurement**

The batch anaerobic tests are described in Chapter 2 (Section 2.3.1). The methane potentials of WAS samples were determined adapting the biochemical methane potential (BMP). The experiment time was 24 days. The degradation performances were evaluated from the calculated parameters presented in Chapter 2 (Sections 2.4.2 and 2.4.3).

### **3.2.2.5 Partial Least square analysis**

Partial least square (PLS) regression technique is based in constructing PLS factors (also called principal components) by minimising the covariance between the dependent variables (Y block) and the explicative variables (X block). Then, the prediction of the Y block was calculated with a multivariable linear regression on X block through PLS1 models using the software R version R 1.2.2 for Windows and by using PLS functions developed by Durand *et al.* (1998). The algorithm builds orthogonal PLS factors in each block by minimising the covariance between the X and Y blocks. The first PLS factor contains the highest percentage of variance, and the following factors account for decreasing amounts of variance. The number of PLS factors (also called dimensions, dim) of the model was determined by minimising the mean squared prediction error (PRESS) through a leave-one-out cross-validation procedure.

### 3.3 Results and discussion

#### 3.3.1 Organic matter characterisation

##### 3.3.1.1 Input sludge composition

The distribution of macroscopic parameters and biochemical components in sludge samples is given in Table 3.2 and Table 3.3, respectively. The total solids were mainly particulate from 85.3 %<sub>TS</sub> to 97.5 %<sub>TS</sub>. The volatile solid content in the input sludge was ranging from 66 %<sub>TS</sub> to 81 %<sub>TS</sub> and was mainly composed of proteins between 0.34 to 0.47 g<sub>BSA</sub>·g<sub>VS</sub><sup>-1</sup>. The carbohydrate and lipid contents in the input sludge samples were around 0.12 to 0.30 g<sub>glu</sub>·g<sub>VS</sub><sup>-1</sup> and 0.00 to 0.03 g·g<sub>VS</sub><sup>-1</sup>, respectively. Proteins are the main compound of WAS because they originate from microbiological activities during wastewater treatment. Indeed, WAS are mainly composed of extracellular polymeric substances produced by microbial metabolism, cells and organic matter not degraded under aerobic condition, involved in the sludge matrix (Nielsen *et al.*, 2004).

Sludge	TS g·L <sup>-1</sup>	TSS % <sub>TS</sub>	VS % <sub>TS</sub>	COD/TOC g <sub>COD</sub> ·g <sub>C</sub> <sup>-1</sup>	Sol OC g·g <sub>VSsoluble</sub> <sup>-1</sup>
A input	38.0 ± 0.2	90.0 ± 1.0	76.1 ± 0.7	3.13 ± 0.30	0.23
A output	23.6 ± 1.3	53.4 ± 5.0	43.6 ± 5.0	6.06 ± 0.73	0.03
B input	59.7 ± 0.4	91.6 ± 1.0	72.0 ± 1.3	3.24 ± 0.19	0.55
B output	35.0 ± 0.1	97.5 ± 3.0	54.0 ± 0.7	3.50 ± 0.01	0.21
C input	51.0 ± 0.1	85.3 ± 1.0	73.5 ± 0.3	2.58 ± 0.14	0.22
C output	28.4 ± 0.2	90.1 ± 1.0	64.0 ± 0.8	4.15 ± 0.12	0.39
D input	29.9 ± 0.6	93.3 ± 3.0	81.0 ± 2.7	4.98 ± 0.12	0.46
D output	27.0 ± 0.4	88.5 ± 3.0	56.0 ± 2.3	3.18 ± 0.12	0.38
E input	31.6 ± 0.2	94.0 ± 2.0	75.3 ± 0.8	3.04 ± 0.19	0.18
E output	26.9 ± 0.1	90.7 ± 1.0	66.0 ± 1.0	3.32 ± 0.18	0.29
F input pretreatment	177.5 ± 1.4	97.5 ± 2.0	66.0 ± 1.1	2.95 ± 0.09	0.37
F output pretreatment	143.5 ± 0.7	77.0 ± 1.0	66.0 ± 1.1	3.39 ± 0.15	0.8
F output	84.8 ± 0.3	89.2 ± 1.0	53.9 ± 0.4	3.00 ± 0.05	ND

**Table 3.2:** Macroscopic parameters of sludge samples.

In the output sludge, around 76 % of the measured organic matter in the input sludge and around 77 % were characterised by the analytic methods used to determine biochemical compounds. Thus, a part of components were not measured by the applied analytic methods.

It could be due to the measurement errors. Moreover, all the biochemical components that compose the organic matter were not quantified such as humic substances or nucleic acids. Besides, the concentrations of biochemical components have to be considered as indicators and not as real concentrations, because colorimetric methods were calibrated with referent components (bovine serum albumin and glucose). Finally, the structure of the sludge floc, which presents a high cohesion (Chu *et al.*, 2004) with several interactions (Novak *et al.*, 2003) may make some compounds unavailable for chemical dosage. Specially, the sludge from an extended aeration process can show a higher cohesion and stabilisation of the matrix organic matter and so this structure did not allow to quantify completely the analysed biochemical compound (Liao *et al.*, 2006). Indeed, in the case of WAS from extended aeration process (sludge E and F), only 66 % and 62 % of the organic matter were quantified against 76 % in average.

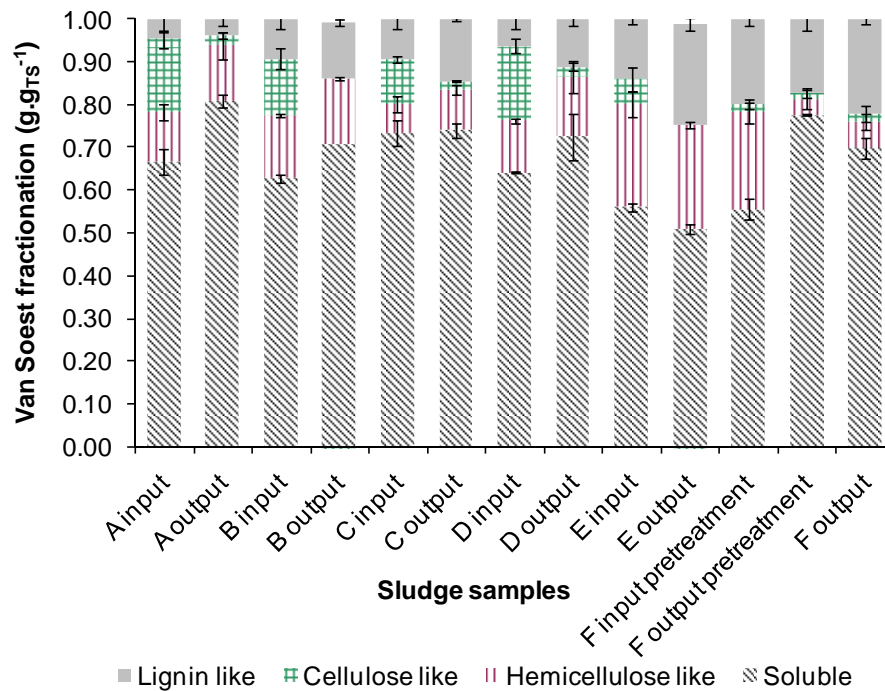
Sludge	Proteins	Carbohydrates	Lipids	VFAs	Identified organic matter
	$\text{g}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$	$\text{g}_{\text{Glu}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$
A input	$0.47 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.01$	0.06	$0.06 \pm 0.00$	$0.82 \pm 0.03$
A output	$0.82 \pm 0.13$	$0.20 \pm 0.04$	0.02	$0.00 \pm 0.00$	$1.04 \pm 0.17$
B input	$0.34 \pm 0.02$	$0.28 \pm 0.01$	0.07	$0.08 \pm 0.00$	$0.77 \pm 0.03$
B output	$0.55 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.01$	0.04	$0.00 \pm 0.00$	$0.71 \pm 0.03$
C input	$0.40 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.01$	0.09	$0.10 \pm 0.00$	$0.89 \pm 0.02$
C output	$0.51 \pm 0.04$	$0.19 \pm 0.03$	0.07	$0.03 \pm 0.00$	$0.80 \pm 0.07$
D input	$0.45 \pm 0.07$	$0.23 \pm 0.02$	0.06	$0.04 \pm 0.00$	$0.78 \pm 0.09$
D output	$0.58 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.02$	0.05	$0.02 \pm 0.00$	$0.78 \pm 0.05$
E input	$0.47 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.03$	0.00	$0.02 \pm 0.00$	$0.66 \pm 0.04$
E output	$0.43 \pm 0.06$	$0.12 \pm 0.02$	0.01	$0.00 \pm 0.00$	$0.56 \pm 0.08$
F input pretreatment	$0.47 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.01$	0.01	$0.02 \pm 0.00$	$0.62 \pm 0.03$
F output pretreatment	$0.56 \pm 0.03$	$0.10 \pm 0.01$	0.04	$0.03 \pm 0.00$	$0.73 \pm 0.04$
F output	$0.63 \pm 0.02$	$0.08 \pm 0.02$	0.04	$0.01 \pm 0.00$	$0.76 \pm 0.04$

**Table 3.3:** Biochemical composition of sludge samples.

The Van Soest method was used to define another fractionation of sludge total solid. This method allows to determine 4 fractions: soluble in neutral detergent, hemicellulose “like”, cellulose “like” and lignin “like”. It may be assumed that these fractions have different biodegradabilities. In this way, this fractionation could allow to characterise the bioaccessibility of the matter, however it brings few informations on the real nature of the matter.

Figure 3.1 shows that the soluble fraction in neutral detergent was the most important fraction, representing around 63 % of total solid. This fraction was mainly composed of

soluble matter, extracellular substances and inorganic matter which were soluble in a neutral detergent. The other fractions were very variable and represented around 37 % of total solids.



**Figure 3.1:** Fractionation of sludge total solid by Van Soest method.

### 3.3.1.2 Output sludge and matter reduction

For the output sludge samples, the results showed a reduction of total solids and the organic content was decreased because of the mineralisation of matter during the digestion step. The proteins were the most important biochemical component of organic matter, ranging from 0.43 to 0.62  $\text{g}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$  with a high value of 0.82  $\text{g}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$  mainly due to the anaerobic biomass which is present in the sludge effluent (Table 3.3).

With the input and output sludge characterizations, we could determine the mean reduction of each measured component during the full scale anaerobic digester process. The results are given in Table 3.4. A low reduction was obtained for the proteins with  $34 \pm 9$  % of reduction that indicates the proteins could be considered as a lowly biodegradable component or that they were lowly accessible. These results are in agreement with the ones of Miron *et al.* (2000). Indeed, the proteins originate from the biological activity. Thus, they need a breakdown of the floc structure and of the membrane cell to be available to the anaerobic biomass and this phenomenon reduces the protein degradation. Moreover, a large concentration of proteins was measured in the effluent which is due to the biological activity of anaerobic process, and this could also explain the low reduction of proteins. On the other hand, a high reduction for sugars, lipids and VFAs was obtained with a mean reduction of  $67 \pm 12$ ,  $66 \pm 13$  and  $88 \pm 11$  %, respectively. The carbohydrates present in the WAS are defined as polysaccharides that can take part in forming a gel-matrix which acts as cement in



sludge floc (Raszka *et al.*, 2006). These components form the first layer of the floc and they are more available during the anaerobic conversion. Thus, the type of component, that composes the sludge, strongly influences the biodegradability as already stated by Hartmann and Ahring (2006).

Concerning the Van Soest fractionation, the results in Figure 3.1 show that the soluble and cellulose “like” fractions were the most biodegradable with a mean reduction of  $53 \pm 10$  and  $81 \pm 26$  %, respectively. In the other hand, the hemicellulose and lignin “like” fractions were hardly biodegradable with a reduction of  $33 \pm 21$  and  $33 \pm 15$  %. The high standard deviations can be induced by the successive extractions method and the analysis which were performed manually in triplicate.

The Van Soest method is based on consecutive extractions by solvents with an extracting power stronger and stronger. Therefore the extracted fractions have a decreasing accessibility. Thus the biodegradability of the first fraction can be supposed higher than the second fraction, the second fraction is higher than the third fraction and so on... Moreover, the real hemicellulose is more biodegradable than real cellulose. However, the results showed that the most biodegradable fractions were soluble and cellulose “like”. This could confirm that the biodegradability depends on the accessibility and on the chemical nature of the sludge compounds. This confirms that the fractions have to be called “like”.

In the case of sludge F treatment, a step of thermal pretreatment was present. This process leads to enhance the anaerobic conversion into energy while reducing the sludge treatment plant size, and so the investment costs (Chauzy *et al.*, 2005). The positive impact of the thermal pretreatment can be shown by the increase of anaerobic biodegradability, determined by BMP tests, increasing from  $46 \pm 2$  % to  $55 \pm 1$  % (Table 3.5). The applied heat breaks the sludge floc cohesion and allows the solubilisation of organic matter. Thus, the organic matter is more accessible to the anaerobic biomass that leads to a better conversion of matter into methane. Figure 3.1 confirms this impact. Indeed, the thermal pretreatment mainly impacts the soluble “like” and the hemicellulose “like” fractions and a decrease of hemicellulose “like” fraction and an increase of soluble “like” fraction were observed. The applied heat leads to transfer the matter extracted with an acid detergent and slowly biodegradable to the fraction soluble in a neutral detergent and readily biodegradable. This could be assimilated to a solubilisation. The other both fractions are not or weakly impacted by the thermal pretreatment. This was already observed for manure samples (Carrère *et al.*, 2009). The increase of manure biodegradability by thermal or thermo-alkali pretreatments was linked to a decrease of the hemicellulose “like” fraction and an increase of the soluble in neutral detergent fraction.

Components	TS	VS	Proteins	Sugars	Lipids	VFAs	Soluble Van Soest	Hemicellulose like	Cellulose like	Lignin like
Digester A	38	64	38	70	87	100	62	53	87	53
Digester B	41	56	30	81	70	100	54	40	100	18
Digester C	44	52	39	70	63	88	49	48	88	34
Digester D	10	37	20	64	52	70	40	ND <sup>1</sup>	89	ND <sup>1</sup>
Digester E	15	25	30	44	ND <sup>1</sup>	86	48	19	93	ND <sup>1</sup>
Digester F	41	51	45	63	58	84	67	4	28	27
Mean	31	48	34	65	66	88	53	33	81	33
reduction (%)										
Standard deviation (%)	14	14	9	12	13	11	10	21	26	15

<sup>1</sup>ND: not detected

**Table 3.4:** Mean reduction (%) of measured components between input and output of full scale anaerobic process.

However it was not possible to compare reduction coefficients obtained from each anaerobic process. Indeed, the operating conditions of full scale anaerobic digesters were different and some abnormal performances were observed. The digesters D and E had low reduction coefficients which seemed underestimated. These problems could be due to the sampling or a variation of operating conditions such as a decrease of SRT before the sampling of input and output sludge. In conclusion of this part, a rigorous comparison of the biodegradability of different sludge samples did not be performed from the measurements of sludge components removals. It was thus necessary to have a standard measurement of anaerobic degradability which was performed by BMP tests.

### 3.3.2 Prediction of WAS anaerobic biodegradability

The BMP tests were carried out with input sludge samples as substrates, under thermophilic condition and during 24 days. The results are listed in the Table 3.5 and showed a good repeatability in each case.

An objective of this study was to find a characterization method that allows to explain the different values of biodegradabilities among WAS samples and the biodegradability improvement by thermal pretreatment. The used strategy consisted in looking for relationships between the sludge characterization and the anaerobic biodegradability by a statistical method to develop a simple tool of prediction. Moreover, the model application has to be fast and relevant in order to minimise the demanding laboratory work and time-consuming. A PLS analysis was thus carried out to analyse the influence of the sludge sample characterization on the anaerobic biodegradability and to find pertinent biodegradability indicators. Six sludge samples were taken into account (samples A, B, C, D, E and F). The sludge sample F after thermal pretreatment was not considered for the model construction and was used to validate the model. The dependent variable (Y block) was thus the 6 sludge samples biodegradabilities measured in triplicate (18 points).

Sludge	BMP		Biodegradability
	$\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$	$\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}}^{-1}$	
A input	$335.9 \pm 7.0$	$190.4 \pm 4.0$	$0.54 \pm 0.01$
B input	$345.0 \pm 12.8$	$230.0 \pm 8.5$	$0.66 \pm 0.02$
C input	$250.0 \pm 16.7$	$183.3 \pm 12.2$	$0.52 \pm 0.04$
D input	$427.2 \pm 10.2$	$263.5 \pm 6.3$	$0.75 \pm 0.02$
E input	$206.5 \pm 14.1$	$123.9 \pm 8.5$	$0.35 \pm 0.02$
F input pretreatment	$268.7 \pm 11.5$	$161.2 \pm 6.9$	$0.46 \pm 0.02$
F output pretreatment	$322.1 \pm 7.8$	$193.2 \pm 4.7$	$0.55 \pm 0.01$

**Table 3.5:** Methane potential and biodegradability of input sludge samples.

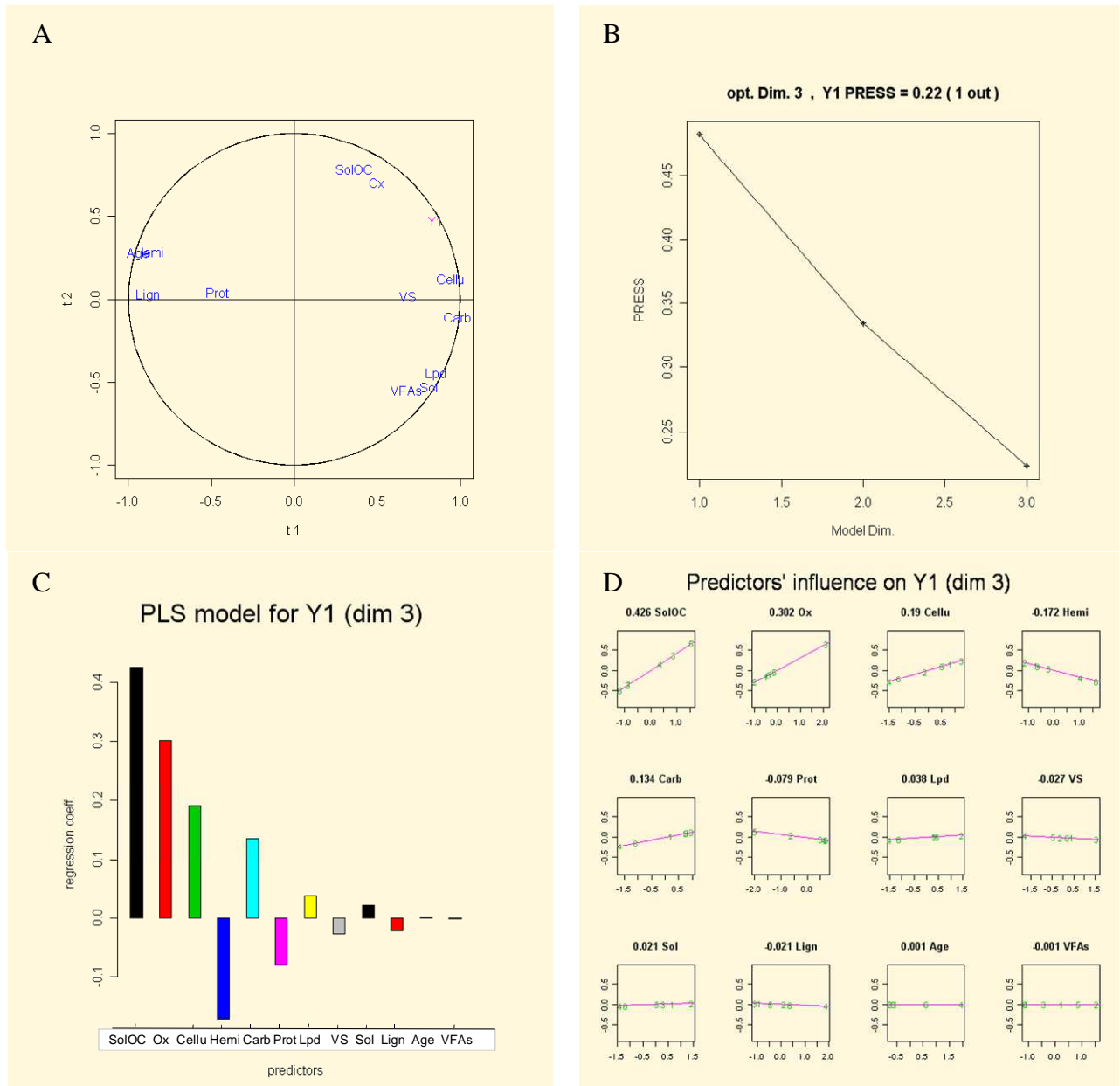
### 3.3.2.1 PLS analysis with the main analysed parameters

The first PLS model was carried out with the main analysed parameters, e.g. 12 explicative variables: the organic matter content (VS expressed in  $\text{g}_{\text{VS}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$ ), the soluble organic carbon (SolOC) (expressed in  $\text{g}_{\text{C}} \cdot \text{g}_{\text{vssoluble}}^{-1}$ ), the biochemical fractions defined by proteins (Prot expressed in  $\text{g}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ ), carbohydrates (Carb expressed in  $\text{g}_{\text{glu}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ ), lipids (Lpd expressed in  $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ ), VFAs (expressed in  $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ ), the Van Soest fractions defined by soluble (Sol), hemicellulose (Hemi), cellulose (Cellu), lignin (Lign) (expressed in  $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$ ), the sludge age (Age expressed in days) and the COD/TOC ratio (Ox). In the field of wastewater treatment, this ratio indicates the complexity of substrates (Zaher, 2005). This ratio can be used as a degradation indicator because it represents the availability of organic carbon as an energy resource (Millot, 1986). A low COD/TOC ratio indicates a more oxidised state of organic carbon which is less available as an energy resource. Thus the sludge samples with a high COD/TOC ratio are assumed to have a higher biodegradability.

Figure 3.2 presents the correlation circle, the mean squared prediction error (PRESS) and the regression coefficients (centered variables) for the PLS model 1. The PRESS is the prediction quality on each sample. The PRESS was equal to 0.22 and was obtained for a model dimension equal to 3.

The correlation circle (Figure 3.2.A) showed a correlation between hemicellulose “like” and lignin “like” fractions from Van Soest method and the sludge age. According to Metcalf and Eddy (1991) sludge samples are the reflect of input wastewater characteristics and operating conditions of aerobic process. Thus, the retention time of aerobic process (or sludge age) can have an important impact on the organic matter composition and on the sludge floc cohesion. This result could be confirmed by the characterisation of input sludge samples. Indeed, the Van Soest method (Figure 3.1) showed that the sludge samples E and F (F input pretreatment) from an extended aeration process contained more lignin, cellulose and hemicellulose “like” than other sludge samples. The soluble fraction was also less important and represented only 56 % of the solid matter against around 67 % for the sludge with a high load. Moreover, the

matter content identified by biochemical characterization (proteins, carbohydrates, lipids, VFA) represented a fraction of organic matter that was less important than in the case of sludge with a high load (Table 3.3). Thus, the matter of sludge samples that originated from an extended aeration process is more embedded in the floc matrix and is more difficult to extract. Proteins and carbohydrates in a lower extend were less accessible for their quantification.

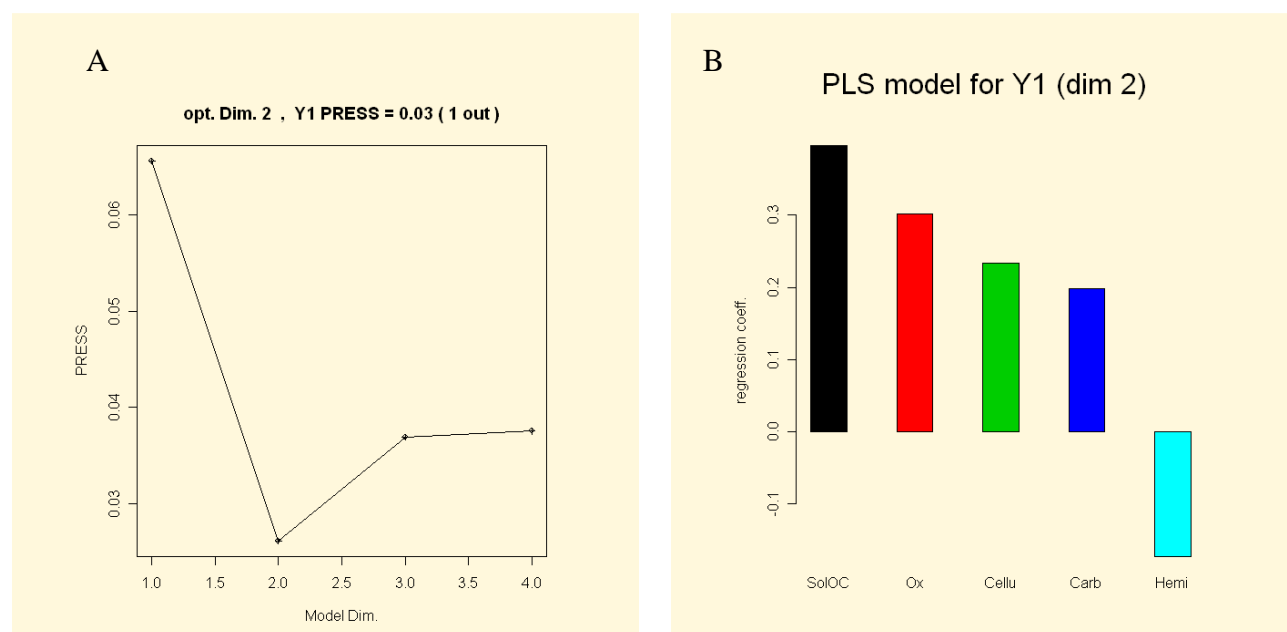


Model equation: PLS model 1

$$BD = 0.311 - 0.001VS - 0.219Prot + 0.283Carb + 0.181Lpd + 0.051Ox + 0.396SolOC + 2.10^{-5} Age + 0.054Sol - 0.352Hemi + 0.434Cellu - 0.060Lign - 0.003VFAs$$

**Figure 3.2:** Correlation circle (A), mean squared prediction error (PRESS) (B), regression coefficient representation (C) and centered variables values of regression coefficients (D) for the dimension 3 model with all the 12 parameters.

The purpose of the model is to predict the sludge biodegradability with a limited number and relevant parameters. Consequently, a second PLS model was performed with only the most relevant parameters obtained in the previous model: SolOC, Ox, Cellu, Hemi and Carb. Figure 3.3 presents the regression coefficients (centered variables) for a model dimension equal to 2. The mean squared prediction error (PRESS) of the PLS model 2 was better than the PLS model 1 with a value of 0.03 compared to 0.22. We could expect a lower prediction quality by decreasing the number of explicative variables. Therefore, few parameters used in the first PLS analysis were not relevant and decreased the prediction quality. This may be due to the VS and VFAs parameters which have a negative impact, since an important organic matter fraction and a high VFA concentration should have a positive impact on the biodegradability.



Model equation: PLS model 2

$$BD = 0.165 + 0.418Lpd + 0.050Ox + 0.368SolOC - 0.353Hemi + 0.534Cellu$$

**Figure 3.3:** Mean squared prediction error (PRESS) (A), regression coefficient representation (B) for the dimension 2 model with the most important parameters.

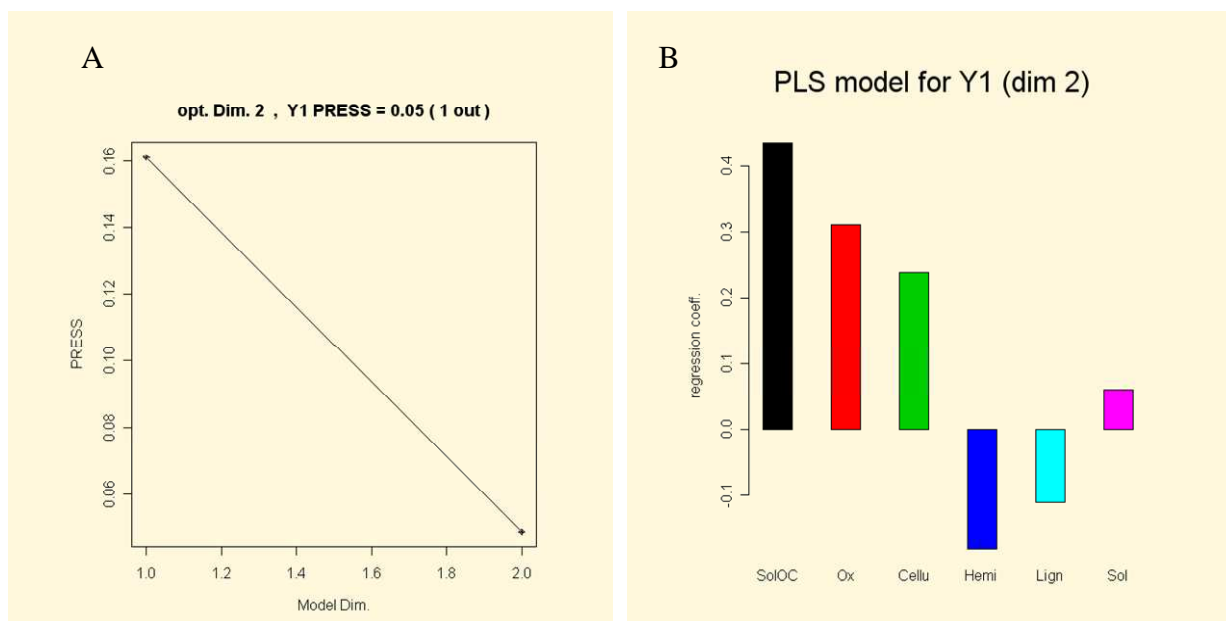
For the PLS models 1 and 2, the most influential parameters are soluble organic carbon concentration and COD/TOC ratio. The soluble organic carbon concentration, which represents the organic matter easily available to the anaerobic biomass, appears in the correlation with a positive coefficient. Thus, the biodegradability will be higher for sludge that contained a large fraction of soluble matter. Moreover, this was already observed by Climent *et al.* (2007), Carrère *et al.* (2008) and Ferrer *et al.* (2008a) who showed that the solubilisation of sludge improves the biodegradability. The COD/TOC ratio (Ox) has a positive coefficient in the linear correlations. This is in agreement with the definition of this parameter. A high COD/TOC ratio indicates a lower oxidised state of organic carbon which it is more availability as an energy resource.

We tested a simplified regression (PLS model 3) with these two parameters only. As expected, the PRESS was higher and equal to 42 % for a model dimension of 1. Thus these two macroscopic parameters are important but not enough to predict sludge biodegradability. Other important parameters are cellulose “like” fraction and carbohydrates concentration with positive coefficients and hemicellulose “like” fraction with a negative coefficient. However, these two parameters belong to two different characterization methods which were used to identify the quantity and the quality of organic matter: Van Soest fractionation and biochemical analysis. The model application has to be fast and relevant in order to minimise the demanding laboratory work and time-consuming. Thus, it is necessary to determine the most relevant analytic methods for the methane potential prediction.

Further PLS models were performed with two parameters groups: the first group was the Van Soest characterization method and the second group was the biochemical composition. The most influential parameters which belong to macroscopic analysis (SolOC and Ox) were kept in the both models. Thus, six variables in the first case (PLS model 4) and five variables in the second case (PLS model 5) were used to carry out both PLS analysis. The sludge age was put aside since it was correlated with parameters of the both groups.

### **3.3.2.2 PLS analysis with Van Soest characterisation method**

The results of PLS model 4 from the Van Soest characterization led to a mean squared prediction error (PRESS) equal to 0.05 with the dimension 2 (Figure 3.4). The fractions of hemicellulose and lignin “like” have a negative impact on the biodegradability determination. This is in agreement with the results of Hattori and Mukai (1986) and Parnaudeau *et al.* (2004). Indeed, these authors found a negative correlation between hemicellulose and lignin “like” concentrations of sewage sludge and their carbon decomposition rates in soil. The impacts of the fractions of soluble and cellulose “like” are in agreement with the mean reduction of these fractions (Table 3.4) which are a positive correlation with the biodegradability. Indeed, the soluble fraction represents a large quantity of matter which is readily solubilised by the method and thus readily available for the biomass. However, the cellulose “like” is a harder extractable fraction which it is degraded well. This could mean that the anaerobic biomass has enough enzymatic materials to bring more available and degrade this matter contained in the cellulose “like” fraction.



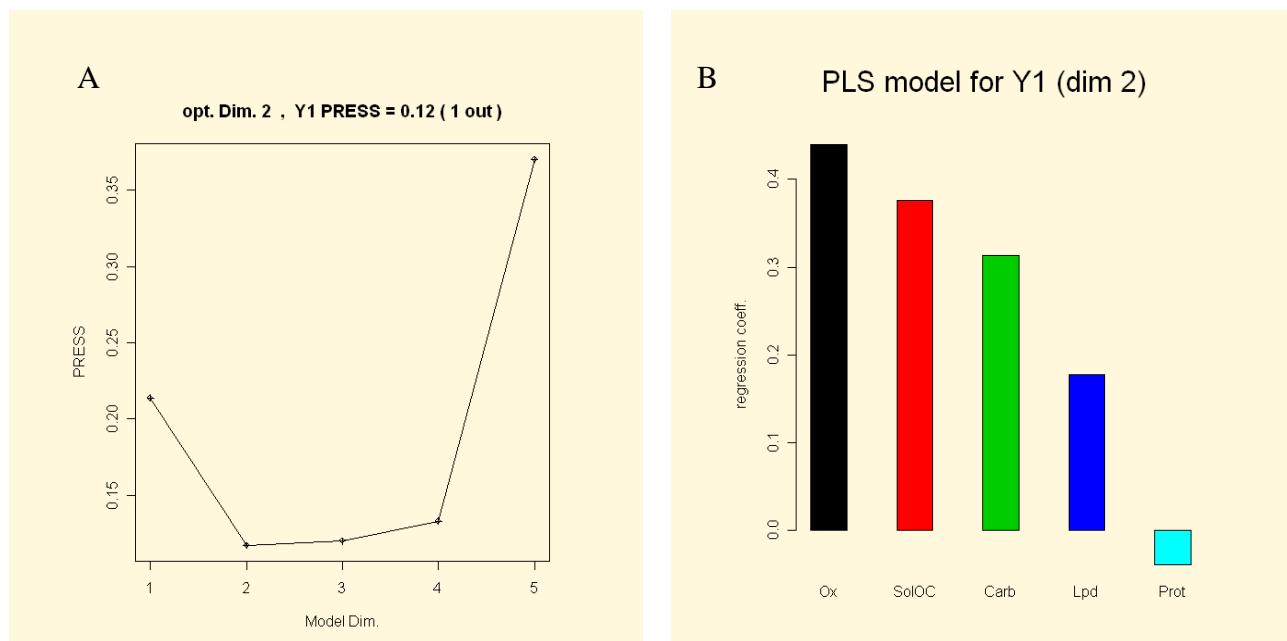
Model equation: PLS model 4

$$BD = 0.180 + 0.052Ox + 0.404SolOC + 0.155Sol - 0.371Hemi + 0.543Cellu - 0.319Lign$$

**Figure 3.4:** Mean squared prediction error (PRESS) (A) and regression coefficient representation (B) for the PLS model 4 with the parameters of the Van Soest characterization and SolOC and Ox.

### 3.3.2.3 PLS analysis with biochemical characterisation

The results from the biochemical characterization are presented in Figure 3.5. The PLS model 5 was carried out with five explicative variables which were: Prot, Carb, Lpd, Ox and SolOC. The best mean squared prediction error (PRESS = 12 %) was obtained when the dimension of the model was equal to 2. The results showed a positive correlation of carbohydrates and lipids concentrations and a negative correlation of protein concentrations. This observation is in agreement with the results of Miron *et al.* (2000) who found that carbohydrates are more easily hydrolyzed or decomposed than proteins.



Model equation : PLS model 5

$$BD = 0.043 - 0.106Prot + 0.661Glu + 0.836Lpd + 0.074Ox + 0.349SolOC$$

**Figure 3.5:** Mean squared prediction error (PRESS) (A) and regression coefficient representation (B) for the PLS model 5 with the parameters of the biochemical characterization and SolOC and Ox.

### 3.3.2.4 PLS analysis validation

The WAS after thermal pretreatment from WWTP F were used to validate the different PLS models. Thus, the PLS models were used to predict the biodegradability of this sludge. The results are presented in the Table 3.6. The best biodegradability estimation was obtained for the PLS model 5 based on the biochemical characterization with a calculated value of 61 % against an experimental value of 55 %, which represented an error of 11%. For the other PLS models, the calculated values were overestimated for more than 22 %. In particular, the PLS model based on the Van Soest characterization did not succeed to estimate the biodegradability of the pretreated sludge sample in spite of very low PRESS value.

The biodegradability of three other samples, not measured in this study, was estimated from the PLS model 5. These samples were: one WAS from a high load process with a sludge age of 0.36 d which was partially digested in thermophilic condition (sludge retention time of 8 days in the digester) and a crystalline cellulose sample. The calculated biodegradability from the model against the measured biodegradability, including the four points of validation, is presented in the Figure 3.6. A good regression coefficient, equal to 0.826, was obtained.

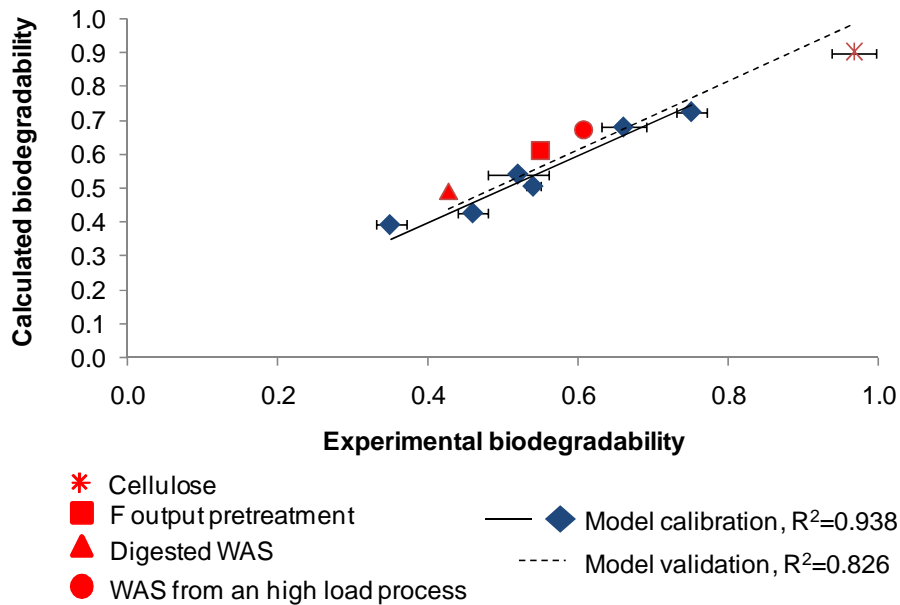


PLS models	Explicative variables	PRESS (model dimension)	R <sup>2</sup>	Validation model <sup>1</sup> (prediction error)
1	SolOC, Ox, Cellu, Hemi, Carb, Prot, Lpd, VS, Sol, Lign, Age, VFAs	0.22 (3)	0.982	0.69 (25 %)
2	SolOC, Ox, Cellu, Carb, Hemi	0.03 (2)	0.987	0.67 (22 %)
3	Ox, SolOC	0.42 (1)	0.608	0.76 (38%)
4	SolOC, Ox, Cellu, Hemi, Lign, Sol	0.05 (2)	0.979	0.74 (35 %)
5	Ox, SolOC, Carb, Lpd, Prot	0.12 (2)	0.957	0.61 (11 %)

<sup>1</sup> Validation model = estimation of biodegradability of sludge sample F output pretreatment (experimental biodegradability = 0.55)

**Table 3.6:** PLS model for predicting biodegradability (BD) of sludge sample F output pretreatment.

The biochemical characterization method, associated with 2 macroscopic parameters (SolOC and Ox) seems to be relevant parameters since a good prediction of sludge samples biodegradabilities was obtained. These parameters are related to an initial characterisation of the quality and quantity of organic matter. In agreement with Schievano *et al.* (2008), the qualitative and quantitative aspects of the organic matter were found to be important to predict the anaerobic degradation. They linked the quality of organic matter to the oxygen demand during 20 hours of respirometry assay (OD20), and soluble fraction according to Van Soest fractionation (CS). These two parameters represent the oxidation degree and the available readily matter. In our study, these aspects were related to the Ox and the SolOC parameters. Moreover, the biochemical fractions allow to bring an accurate characterization of the organic matter content by identifying the compounds more or less degradable whereas Schievano *et al.* (2008) only identified the quantity of matter by COT and VS.



**Figure 3.6:** Calculated and experimental biodegradabilities for model calibration and model validation based on the biochemical characterisation and SolOC and Ox (PLS model 5).

The sludge composition is thus a relevant parameter to determine the biodegradability. The biochemical characterisation and the measurement of macroscopic parameters, as presented in this work, lead a faster laboratory work. Moreover, the method brings enough data to define both availability and degradability concepts of matter and allows to predict the measured anaerobic biodegradability of our WAS samples.

### 3.3.3 Conclusions

Different characterisation methods of WAS organic matter were presented. The effect of the organic matter composition on the performances of anaerobic degradation biodegradability was evaluated by linking these two parameters with statistical analysis. From this work the following conclusions can be drawn:

- the macroscopic and biochemical characterisation gave informations on the bioavailability and the nature of the sludge sample compounds. The volatile solids represented a large fraction of the total solids from 66 to 88 %<sub>TS</sub>. The organic matter in the input sludge samples was mainly composed of proteins from 0.34 to 0.56  $\text{g}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$  followed by the carbohydrate and lipid fractions, respectively. After the anaerobic digestion, the proteins remained the main compound. It can be explained by the fact the sludge samples originated from microbiological activities during wastewater treatment and sludge digestion,
- a part of organic matter was not quantified by the biochemical characterisation. It could be due to the measurement errors. All the biochemical components that compose the organic matter were indeed not quantified such as humic substances and finally,

the structure of the sludge floc may make some compounds unavailable for chemical dosage. Thus, the unidentified organic matter could be considered as matter strongly embedded in the WAS matrix and hardly accessible by the anaerobic microorganisms,

- the biochemical characterisation and two macroscopic parameters (Ox and SolOC) seem to be the most relevant parameters to assess the available matter and to predict the anaerobic biodegradability of WAS samples. Four samples were used to validate the model which was able to predict well their biodegradability. The measurements, which are needed to perform the model, are relatively quick and show thus important advantages for routine applications. They could be considered as indicators of biodegradability,
- finally, the Van Soest fractionation was used to identify the bioaccessibility of the organic matter but it did not led to a good prediction tool of biodegradability. This could be explained by the fact that the method was not appropriated for the sludge organic matter. It will be more relevant to establish a successive extraction method better adapted to the sludge samples.

### 3.4 Discussion

La dégradation anaérobie d'un substrat complexe tel que les boues secondaires dépend de trois notions qui sont la biodisponibilité, la bioaccessibilité et la biodégradabilité. Dans l'optique de développer des indicateurs issus de la caractérisation initiale des boues secondaires pour prédire les performances de digestion, il est nécessaire de trouver les paramètres pertinents qui permettraient de définir ces trois notions.

A travers la caractérisation des boues en entrée et en sortie de digesteurs industriels, il a été possible d'apporter des informations sur la biodisponibilité et la biodégradabilité de la matière. En effet, cette étude a permis d'identifier les composés majoritaires et minoritaires suivant leur présence en phase soluble ou en phase particulaire, ainsi que la capacité des composés à être dégradés en condition anaérobie.

La mesure des paramètres macroscopiques ont montré que la matière organique des boues d'entrée représente entre  $66 \pm 1$  et  $81 \pm 3$  %<sub>MS</sub>. Grâce à la caractérisation biochimique, la matière organique a été identifiée sous forme de protéines, de glucides, de lipides et d'AGV. Elle se compose majoritairement de protéines entre  $0,34 \pm 0,02$  et  $0,47 \pm 0,02$  g<sub>SAB</sub>.g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>, de glucides entre  $0,12 \pm 0,02$  et  $0,30 \pm 0,02$  g<sub>Glu</sub>.g<sub>MV</sub><sup>-1</sup> puis de lipides et d'AGV. Ces données renseignent sur la quantité de matière dégradable et également sur la qualité de la matière. La biodisponibilité est définie dans notre étude à travers la matière présente initialement sous forme soluble, c'est-à-dire inférieure à 0,45 µm. Le paramètre de carbone organique soluble permet d'apporter des informations sur la qualité de la matière disponible initialement. Une autre méthode d'analyse par spectroscopie a été utilisée pour identifier la qualité de la matière organique soluble. Ainsi, la spectrofluorimétrie 3D a été appliquée sur les fractions solubles de nos échantillons de boues. Elle permet une analyse fine et qualitative des composés protéïques et des composés aromatiques. L'objectif de cette approche était de montrer

l'évolution de la matière protéique en fraction soluble au cours de la digestion anaérobie afin de mettre en évidence des composés réfractaires (molécules difficilement hydrolysables, précurseurs de composés humiques...). Une introduction bibliographique de la méthode et les résultats obtenus sur les fractions solubles des boues étudiées sont présentés en Annexe II. Cependant, les mesures ont montré que la matière organique initiale est principalement sous forme particulaire entre  $85,3 \pm 1,0$  et  $97,5 \pm 3,0$  %<sub>MS</sub>. Ainsi, la matière constituant les boues secondaires est peu disponible initialement. La conversion sous forme de méthane nécessitera donc la mise en place d'une étape hydrolyse importante afin de solubiliser la matière.

En sortie de digesteurs, la matière organique est convertie à  $48 \pm 12$  %. Les protéines restent le composé majoritaire. En revanche les glucides, les lipides et les AGV ont des rendements d'abattement moyens élevés qui sont de  $65 \pm 12$  %,  $66 \pm 13$  % et de  $88 \pm 11$  %, respectivement. A travers ces résultats, nous avons donc pu observer la capacité de certains composés à être dégradés au cours de la digestion anaérobie et ainsi apporter des informations sur la biodégradabilité de la matière des boues.

Cependant, les informations obtenues sur la biodégradabilité des composés identifiés en entrée et en sortie de digesteurs industriels ne sont pas comparables car les conditions opératoires ne sont pas similaires. Des tests de dégradation anaérobie en condition thermophile ont donc été réalisés afin d'obtenir des performances de dégradation en termes de production de méthane comparables entre les boues étudiées. Ensuite, une étude statistique par PLS a été utilisée pour mettre en relation les caractérisations initiales des boues et leur potentiel méthane. Cette approche a permis d'évaluer la pertinence des paramètres afin d'être considérés comme des indicateurs de la dégradation anaérobie thermophile.

Le modèle basé sur la caractérisation biochimique et sur certains paramètres macroscopiques (carbone organique soluble et le degré d'oxydation) est le plus pertinent pour déterminer le potentiel méthane des boues étudiées. Il a été validé sur un échantillon de boue issu de la même étude mais ayant subi un prétraitement thermique. Le modèle a estimé la valeur de biodégradabilité avec une erreur de 11 % ce qui est correct avec les méthodes analytiques utilisées. Trois autres échantillons, une boue forte charge, une boue partiellement digérée et de la cellulose ont également permis de valider le modèle. Le coefficient de régression obtenu entre les données expérimentales et les données estimées est de 0,825. Le modèle est donc capable de prédire la biodégradabilité de boues ayant subi une solubilisation ou une dégradation anaérobie. Les paramètres inclus dans le modèle sont donc pertinents et prennent en compte la biodégradabilité de la matière, soit la capacité des molécules à être dégradée et la biodisponibilité, soit la matière initialement disponible pour les microorganismes épurateurs pour déterminer le potentiel méthane des boues.

Cependant, nous pouvons nous poser la question de la dépendance des modèles présentés au déchet étudié et aux conditions opératoires de dégradation. En effet, le modèle a été développé à partir d'échantillons de boues et validé avec des échantillons de boues. De plus, les conditions pour la mesure du potentiel méthane ont été fixées à un temps de séjour de 24 j (pente de la courbe de production de méthane quasiment nulle), en condition thermophile.

Ainsi, la prédiction de la biodégradabilité est limitée par ces conditions. Seule la cellulose a été utilisée comme substrat totalement indépendant, c'est-à-dire ne possédant pas les mêmes caractéristiques en termes de composition physique et chimique. L'estimation de la biodégradabilité de la cellulose par le modèle est correcte mais une validation complémentaire doit être effectuée pour évaluer le caractère « déchet-dépendant » du modèle.

Une autre limite importante des méthodes de caractérisation proposées et du modèle élaboré, est le manque d'information concernant la bioaccessibilité de la matière. La notion de bioaccessibilité de la matière organique réfère au possible accès des molécules emprisonnées dans une matrice par les microorganismes. Cependant, les méthodes de caractérisation ont mis en évidence cette notion de bioaccessibilité. En effet, la caractérisation biochimique ne permet pas d'identifier l'ensemble de la matière organique initiale des boues, soit entre  $0,62 \pm 0,03$  et  $0,89 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{matière identifiée}} \cdot \text{g}_{\text{MV}}^{-1}$ . Une partie de la matière organique n'est pas identifiée car les méthodes analytiques utilisées ne permettent pas de mesurer l'ensemble des composés constituant les boues. Mais nous avons observé que les faibles valeurs de fractions de matières identifiées correspondent aux boues secondaires ayant un âge de boue élevé. En effet,  $66 \pm 4 \%$  (boue d'entrée E) et  $62 \pm 3 \%$  (boue d'entrée F) de la matière organique est identifiée sur les boues secondaires faibles charges ayant un âge de boue respectif de 11 j et de 21 j, contre 76 % en moyenne de matières identifiées sur les boues secondaires fortes charges. Cependant, après traitement thermique sur la boue F,  $73 \pm 4 \%$  de matière organique est identifiée contre  $62 \pm 3 \%$  initialement. Une partie de la matière est rendue accessible aux méthodes de dosage. Ainsi, une partie non négligeable de la matière est difficilement accessible à cause de la structure plus compacte des boues secondaires et notamment de celles ayant un âge de boue élevé (Liao *et al.*, 2006). La méthode de Van Soest avait été utilisée pour mettre en évidence l'accessibilité de la matière au travers de la détermination de fractions plus ou moins extractibles. Les résultats ont également mis en évidence une accessibilité moins importante de la matière dans le cas de boues faibles charges. En effet, la fraction soluble à un détergent neutre ne représente qu'environ 56 % pour les boues faibles charges contre environ 67 % pour les boues fortes ou très fortes charges. Cependant, l'analyse statistique a montré que les fractions déterminées par la méthode Van Soest ne sont pas pertinentes pour évaluer la biodégradabilité des boues. Enfin, la fraction soluble qui semblerait facilement accessible représente environ  $67 \pm 7 \%$  de la matière sèche, ce qui est largement supérieur à la biodégradabilité mesurée pour chaque boue. Cette méthode de fractionnement, qui détermine une accessibilité de plus en plus difficile grâce à l'utilisation de solutions ayant un pouvoir d'extraction croissant, n'est donc pas adaptée pour définir l'accessibilité de la matière constituant les boues. Une méthode de caractérisation qui apporterait des informations sur la bioaccessibilité de la matière permettrait d'améliorer la prédiction des modèles.



Chapitre 4: Influence de la solubilisation du  
substrat sur les performances de  
dégradation anaérobie thermophile en  
réacteur batch





## **Chapitre 4. Influence de la solubilisation du substrat sur les performances de dégradation anaérobie thermophile en réacteur batch**

### **Résumé**

Le chapitre suivant est présenté sous forme d'un article scientifique. Il est consacré à l'étude de l'influence de la biodisponibilité de la matière organique d'une boue secondaire non traitée et prétraitée thermiquement sur les productions de méthane mais également sur les voies réactionnelles intermédiaires de la digestion anaérobie thermophile. L'adaptation de l'inoculum vis-à-vis des substrats a également été étudiée. Les données ont été suivies au travers de réacteurs batchs de 3,5 L montés en parallèle durant quatre alimentations successives. L'intérêt du batch a été d'observer le comportement des composés intermédiaires au cours de la dégradation anaérobie d'une boue secondaire.

Les procédés de prétraitement thermique présentent un grand intérêt pour l'amélioration de la dégradation anaérobie des boues secondaires. L'action de chaleur permet une solubilisation de la matière organique et également une hygiénisation des boues. De plus, l'énergie thermique dégagée peut être récupérée afin d'améliorer le bilan énergétique du couplage. Cependant, les procédés de traitement thermique ont essentiellement été étudiés sur un couplage avec une digestion anaérobie mésophile. Un régime thermophile peut avoir l'avantage de diminuer le temps de séjour des boues dans le digesteur, améliorer la destruction des microorganismes pathogènes et augmenter la solubilité de la matière organique. Ainsi, le potentiel du couplage a été étudié en réacteurs batchs sur une boue secondaire non traitée et prétraitée thermiquement à 110°C, 165°C en mode électrique et en mode vapeur et à 220°C.

Les conditions optimales de prétraitement thermique ont été obtenues à 165°C (selon les deux modes de montée en température) avec une solubilisation de 18 % de la DCO et de 15 % de la matière organique. Le taux de dégradation de la boue a augmenté de 47 à 61 %. A 220°C, la conversion sous forme de méthane est diminuée à cause de la formation de composés lentement et difficilement biodégradables.

L'hydrolyse des composés particuliers est considérée comme l'étape limitante lors de la digestion anaérobie de substrats tels que les boues d'épuration. Cependant, le suivi des principaux produits intermédiaires de la dégradation des boues a permis de montrer que la production de méthane est également reliée aux vitesses de dégradation de l'acétate et du propionate.

L'observation détaillée des étapes réactionnelles de la digestion anaérobie a permis de mettre en évidence l'impact positif de l'augmentation de la disponibilité de la matière organique. La dégradation du propionate reste importante dans le cas de la dégradation de la boue traitée à une température optimale de 165°C. Le traitement thermique entraîne une large solubilisation de la matière organique, ce qui a pour effet d'améliorer sa disponibilité et permettre d'optimiser les étapes intracellulaires pour ainsi éviter l'accumulation du propionate.

Enfin, les quatre alimentations successives, destinées à observer l'adaptation de l'inoculum aux différents substrats étudiés, ont confirmé que l'utilisation d'un inoculum adapté aux boues secondaires permet d'évaluer directement leur potentiel méthane. De plus, les alimentations successives, lors de l'utilisation d'un inoculum adapté, sont à éviter car un risque d'accumulation du propionate est possible. Il est donc nécessaire de suivre les AGV au cours de la dégradation afin d'observer une éventuelle accumulation d'un composé intermédiaire.

Basé sur:

**Mottet A., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Chauzy J., and Carrère H.** Kinetics of thermophilic batch anaerobic digestion of thermal hydrolysed waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal*. 46(2) : 169-175.

## **4.1 Introduction and objectives**

### **4.1.1 Introduction**

#### **4.1.1.1 Anaerobic digestion of sewage sludge**

Anaerobic digestion is a multi-step biological process where the organic carbon is converted to biogas containing methane, following four major steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. With the increase of oil and natural gas prices and the increasing doubts on advantages of biofuel produced from energy crops, biogas more and more appears as a real valuable energy source to be developed (Tilche and Galatola, 2008).

Biological processes are developed as the main process to improve efficiently the quality of the effluent in municipal wastewater treatment plants. Waste activated sludge, as a by-product, are generated in large and increasing quantities. Since the development of the biogas sector in France, following the July 2006 publication of new sufficiently attractive prices, WAS is more and more considered as renewable energy source and becomes an interesting substrate to anaerobic digestion. However, WAS anaerobic digestion is more difficult than for primary sludge and, with usual technologies nowadays available, only approximately 20-30 % of the sludge organic matter are mineralised (Rulkens, 2008).

Biogas production from sewage sludge depends on the composition and availability of organic compounds. Waste activated sludge is composed of more or less stabilised and slowly biodegradable organic matter with a low biodegradability. Thus, hydrolysis is a slow step and is considered as the rate-limiting step of the overall process in the case of sludge degradation (Pavlostathis and Gossett, 1986). Thermophilic anaerobic digestion allows one to enhance anaerobic degradation rates, hence to reduce the sludge retention time and increasing the methane production (Dohanyos *et al.*, 2004).

#### **4.1.1.2 The pretreatment effects on anaerobic digestion**

Over the last two years, pretreatment steps, such as physical treatment with bead mill, sonication or high-pressure homogeniser, biological treatment with enzymatic hydrolysis, chemical treatment with alkaline addition were applied to improve hydrolysis of particulate organic matter and substantially biodegradability of sludge. Thermal treatment has been widely combined to anaerobic digestion performed in the mesophilic range and this resulted in an increase of biogas production and of the kinetic rates (Li and Noike, 1992) and energy costs can be covered by biogas production (Kepp *et al.*, 2000; Bougrier *et al.*, 2007). Climent *et al.* (2007), Bougrier *et al.* (2008) and Jeong *et al.* (2007) underlined the impact of solubilisation of particulate organic matter on the biogas production enhancement during anaerobic digestion. However, very few studies deal with the combination of thermal pretreatment and thermophilic anaerobic digestion of sludge (Gavala *et al.*, 2003; Skiadas *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2008b).

### 4.1.2 Objectives

The objective of this work was to carefully analyse the impact of thermal pretreatment on thermophilic anaerobic digestion of WAS. Efficiency of thermal pretreatment was evaluated by solubilisation of COD and VS. Methane production and kinetics of VFAs and soluble COD were measured during batch anaerobic biodegradation in order to investigate in details the hydrolysis of pretreated and untreated organic matter. Moreover, electric and steam modes for thermal pretreatment at 165°C were compared. Indeed, electric mode is generally used at laboratory scale whereas steam mode is used in industrial plants (Chauzy *et al.*, 2005).

## 4.2 Methodology

### 4.2.1.1 Waste activated sludge samples

Sludge samples were taken from a wastewater treatment plant (France), treating urban wastewaters and working with high load aerobic process at a sludge retention time of 0.4 d. Characteristics of WAS or raw sludge were: Total solids (TS):  $46.6 \pm 2.3 \text{ g.L}^{-1}$ , volatile solids (VS):  $36.6 \pm 1.8 \text{ g.L}^{-1}$ , total suspended solids (TSS):  $40.5 \pm 2.0 \text{ g.L}^{-1}$  (87 %TS), volatile suspended solids (VSS):  $31.5 \pm 1.6 \text{ g.L}^{-1}$  (86 %VS), COD:  $64.0 \pm 9.6 \text{ g}_{\text{COD}}.\text{L}^{-1}$  and soluble COD ( $< 0.45 \mu\text{m}$ ):  $5.6 \pm 0.3 \text{ g}_{\text{COD}}.\text{L}^{-1}$ .

### 4.2.1.2 Thermal hydrolysis

The procedure of thermal pretreatment is presented in Chapter 2 (Section 2.2). The autoclave and the operating conditions are described in this section. The effect of thermal pretreatment are evaluated from the solubilisation of COD, VS, proteins and carbohydrates, which are presented in Chapter 2 (Section 2.4.1).

The solubilisation of lipids was not determined because the difference between lipid concentrations in total and particulate fractions was very low and did not show a significant solubilisation. This is because lipids are not soluble in water and they should remain adsorbed onto organic solid fraction after thermal treatment (Bougrier *et al.* 2008).

### 4.2.1.3 Procedure of anaerobic degradation tests

The measurement of methane potential of WAS samples was carried out in reactor in order to check the main degradation steps. The method was based from Buffière *et al.* (2006). The detailed procedure is presented in chapter 2 (Section 2.3.2). Six reactors were monitored: one was used with no feed to quantify the endogenous activity of the inoculum and others reactors were fed with untreated sludge and with sludge treated at 110°C, 165°C (electric and steam modes) and 220°C. For each condition, four successive 22 days batch experiments were carried out in a same reactor to observe adaptation effects and to minimise the effect of the inoculum and two successive batch experiments were separated by two days. During each batch anaerobic digestion, total and soluble COD, VFA, biogas composition were regularly monitored in order to follow the formation of by-products, involved in the biological reactions.

It has to note that endogenous activity decreased from batch 1 to 2. It represented about 12% of cumulated methane production from raw sludge in batch 1, 6% in batch 2, 3% in batch 3 and 5% in batch 4.

The degradation performances were evaluated from the calculated parameters presented in Chapter 2 (Sections 2.4.2 and 2.4.3).

Newman-Keuls tests, with a confidence interval at 90 %, were realised to compare biodegradability values of each treated sludge and raw sludge and to estimate the significant differences between each biodegradability values.

The maximum accumulation rates of propionate, acetate and the maximum production rate of methane can be used to evaluate the impact of thermal pretreatment on the steps of acetogenesis and methanogenesis. Propionate and acetate accumulation rates ( $K_{\text{propionate}}$  and  $K_{\text{acetate}}$ ) were calculated from the variation of propionate and acetate concentrations versus time during the accumulation phases.  $K_{\text{propionate}}$  and  $K_{\text{acetate}}$  were determined by the slope of the linear regression line between day 0 and the day corresponding to the maximal accumulation. These parameters were expressed in  $\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Accumulation of each compound is the result of production minus consumption. For example, acetate accumulation is the result of acetate production minus acetate conversion into methane and carbon dioxide. For the methane production rate, the methane volume was converted to gram of COD and  $K_{\text{CH}_4}$ , expressed in  $\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{COD}_{\text{intro}}}\cdot\text{d}^{-1}$ , was determined from the maximum value of the methane specific production rate, which was obtained by the derivative of the methane specific production.

#### 4.2.1.4 Analysis

The chemical characterization was performed on the untreated and pretreated WAS samples. All the analyses were performed in triplicate. The particulate fraction was separated by centrifugation at 50 000 g, 15 min and 5°C. Supernatant was then filtered through a cellulose acetate membrane with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  to obtain the soluble fraction. For the lipids determination, samples were freeze-dried and sieved with a 1 mm grid. Analyses were performed according the macroscopic and biochemical characterisations. The realised measurements were: total and soluble COD; TS, VS, TSS and VSS; protein, carbohydrate and lipid concentrations in total and soluble fractions; VFA concentrations.

Analytical methods are detailed in Chapter 2 (Section 2.5).

## 4.3 Results and discussion

### 4.3.1 Impact of thermal pretreatment on sludge solubilisation and biodegradability

Solubilisation of COD and VS are often used to evaluate the impact of pretreatment on the sludge maximal biodegradability. Results are summarised in Table 4.1. As already shown Climent *et al.* (2007) and Bougrier *et al.* (2008), the values of COD and VS solubilisation

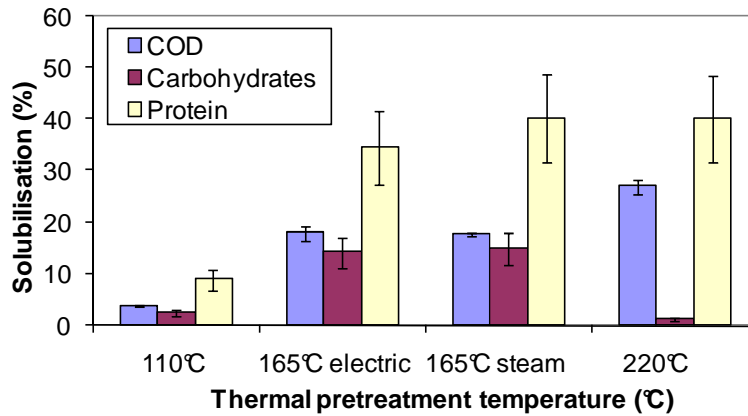
increased with temperature until 220°C, from 3.8 to 27% and from 1.9 to 24 %, respectively. The thermal pretreatment led to a transfer of particulate organic matter into the soluble phase, lower than 0.45 µm and could be assimilated to a thermal hydrolysis. Thus, the application of thermal pretreatment on a largely particulate raw sludge (86 %VS) should make more available organic components to the anaerobic microorganisms and could allow an increase of degradation rates and of produced biogas volume.

Conditions	Solubilisation	Solubilisation	BMP	Biodegradability
	of COD %	of VS %	$\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{in}}}^{-1}$	%
Untreated			165 ± 17	47
110°C	3.8 ± 0.2	1.9 ± 0,2	186 ± 10	53
165°C electric	18.0 ± 1.0	16.0 ± 2.0	195 ± 9	56
165°C steam	17.8 ± 0.4	14.0 ± 1.0	215 ± 7	61
220°C	27.0 ± 1.0	24.0 ± 2.0	142 ± 22	41

**Table 4.1:** COD and VS solubilisation, methane potential and biodegradability of untreated and pretreated WAS at different conditions.

Nevertheless, the values of biodegradability (Table 4.1) showed a threshold value in the increase of methane production. Indeed, it increased with thermal pretreatment until a temperature of 165°C, from 165  $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{in}}}^{-1}$  for untreated sludge to 215  $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{in}}}^{-1}$  for sludge pretreated at 165°C in steam mode. Thus, among the tested temperatures, the optimum was 165°C. It is worth noting that an identical optimal temperature pretreatment was found for anaerobic digestion under mesophilic condition (Bougrier *et al.*, 2008).

Moreover at 220°C, although a large solubilisation of particulate organic matter occurred, sludge biodegradability was lowered to raw sludge biodegradability with 142  $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{in}}}^{-1}$ . This may be explained by the composition of solubilised organic matter (Figure 4.1). At 220°C, protein solubilisation was similar to the one obtained at 165°C in steam mode, i.e. 40.1 % and carbohydrates solubilisation strongly decreased from 15% at 165°C to 1.2 %. However COD solubilisation increased from 18 % to 27 %. Thus, at 220°C, carbohydrates in the soluble phase reacted with other components to form products slowly or hardly biodegradable. These results are in agreement with those of Bougrier *et al.* (2007), Müller (2001) and Stuckey and McCarty (1984). They suggested that the presence of “burnt sugar” reactions and Maillard reactions for high pretreatment temperatures. The brown color of the soluble phase of sludge treated at 220°C confirmed the presence of new compounds, like Amadori compounds and melanoidins which are recalcitrant to anaerobic degradation.



**Figure 4.1:** Impact of treatment temperature on solubilisation of WAS.

An objective of this study was to assess the impact of heating modes on solubilisation and biodegradation results. Solubilisation of COD, VS and carbohydrates, obtained at 165°C in both modes, did not show significant differences: it reached around 18, 15 and 15 %, respectively with both modes. On the other hand, protein solubilisation was slightly higher for sludge treated with steam (40.2 % against 34.5 % in electric mode). Moreover, the Newman-Keuls test showed that the difference of BMP between treatments at 165°C (in electric and steam modes) were not significant with a 90 % confidence interval (Table 4.2). Thus, it can be concluded that laboratory thermal hydrolysis carried out in electric mode properly represents industrial thermal hydrolysis carried out with steam injection.

Newman-Keuls test also showed that the improvement of sludge thermophilic anaerobic biodegradability was not significant after the 110°C pretreatment and confirmed the reduction of sludge biodegradability after 220°C treatment.

Thermal pretreatment temperature °C	BMP mL <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·gCOD introduced <sup>-1</sup>	Homogeneous groups Confidence level of 90 %	
220	142 ± 22	X	
No treatment	165 ± 17		X
110	186 ± 10	X	X
165 electric mode	195 ± 9		X X
165 steam mode	215 ± 7		X

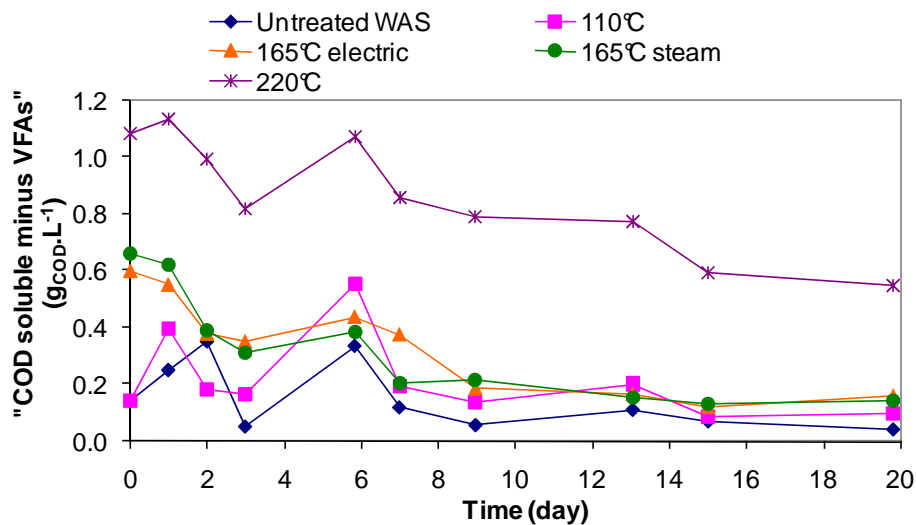
**Table 4.2:** Comparison of each methane production obtained with different thermal pretreatment conditions (mean values of 4 successive batch experiments).

Solubilisation values and methane production values, representing initial and final conditions of the anaerobic digestion, are not sufficient to obtain a full understanding of anaerobic digestion mechanisms. Kinetics of intermediate products (VFAs and soluble COD) and final products of anaerobic digestion (CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>) are indeed interesting to explain biodegradability differences, involved by thermal pretreatment and to observe the potential degradation limits.

### 4.3.2 Kinetics of batch anaerobic digestion

The batch anaerobic digestion experiments of the five sludge samples were realised in five reactors, which were used in parallel. As in Buffière *et al.* (2006), four successive batch experiments were carried out in a same reactor for each substrate in order to evaluate the inoculum adaptation. The experiments were monitored during 22 days.

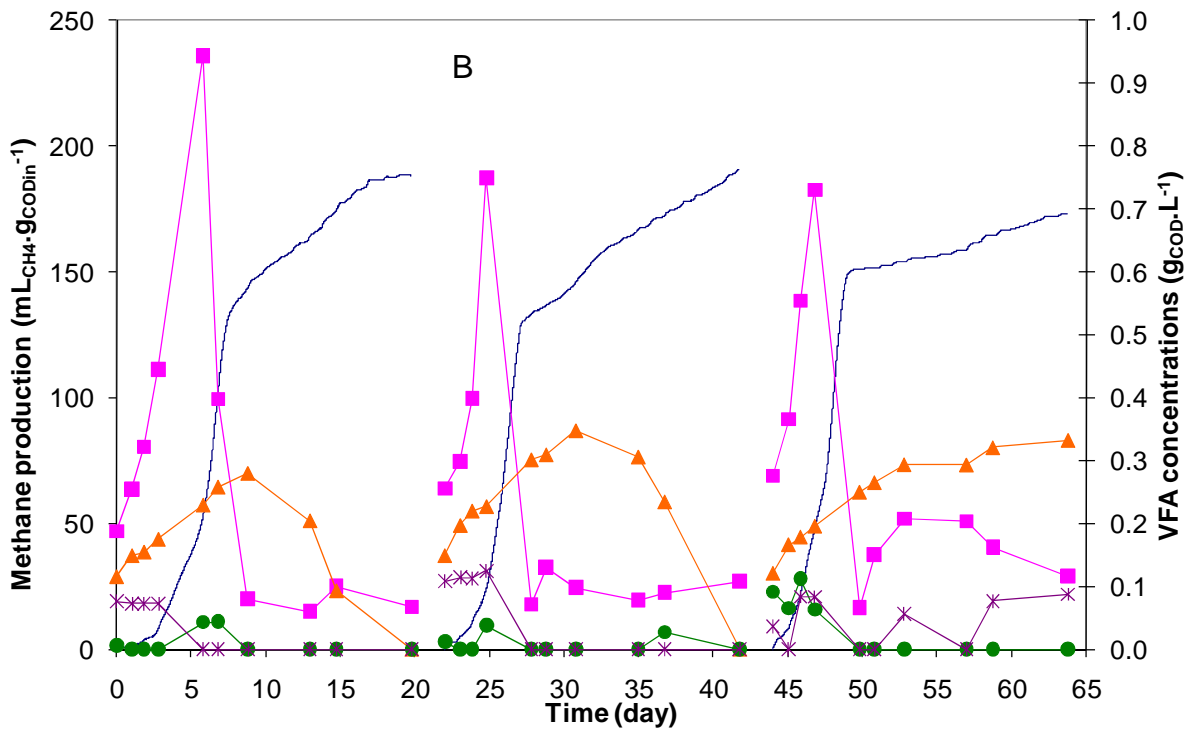
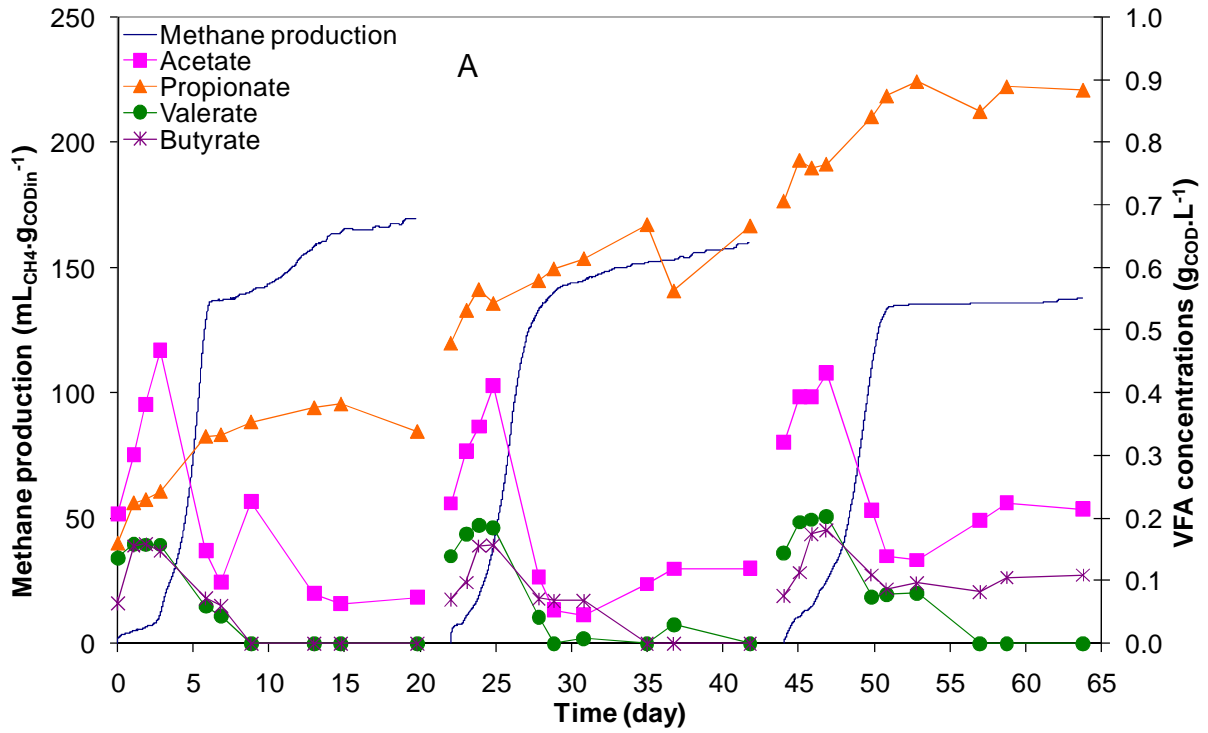
Figure 4.2 represents the measured  $COD_{soluble}$  minus VFAs in batch 4. It can represent the transfer of compounds from the particulate phase to the soluble phase, i.e., the behavior of hydrolysis, thus the production of soluble compounds ( $< 0.45\mu m$ ), before their degradation by acidogenesis.

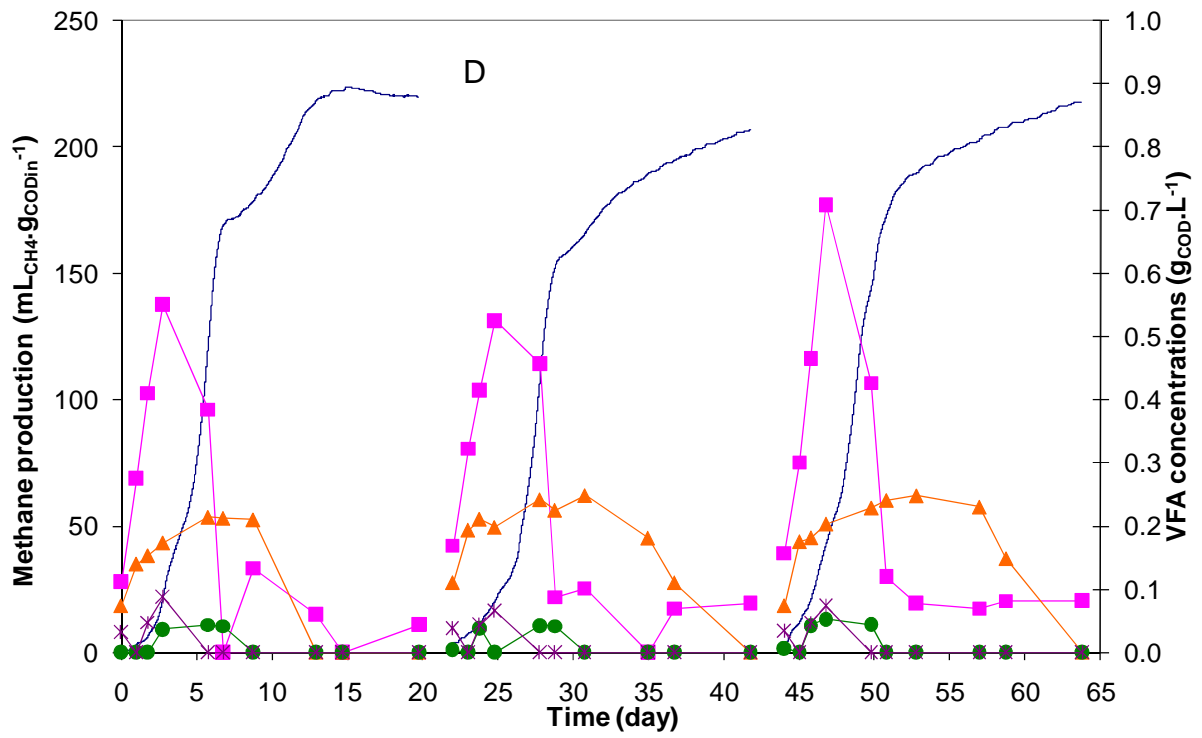
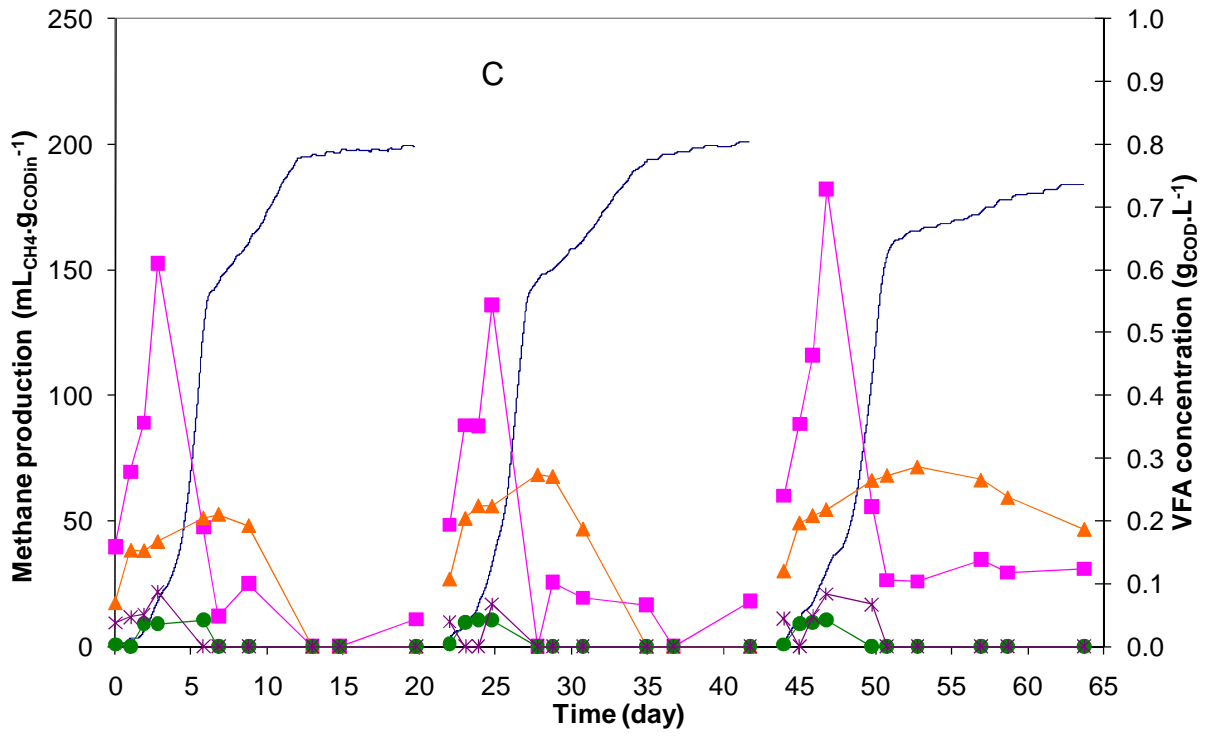


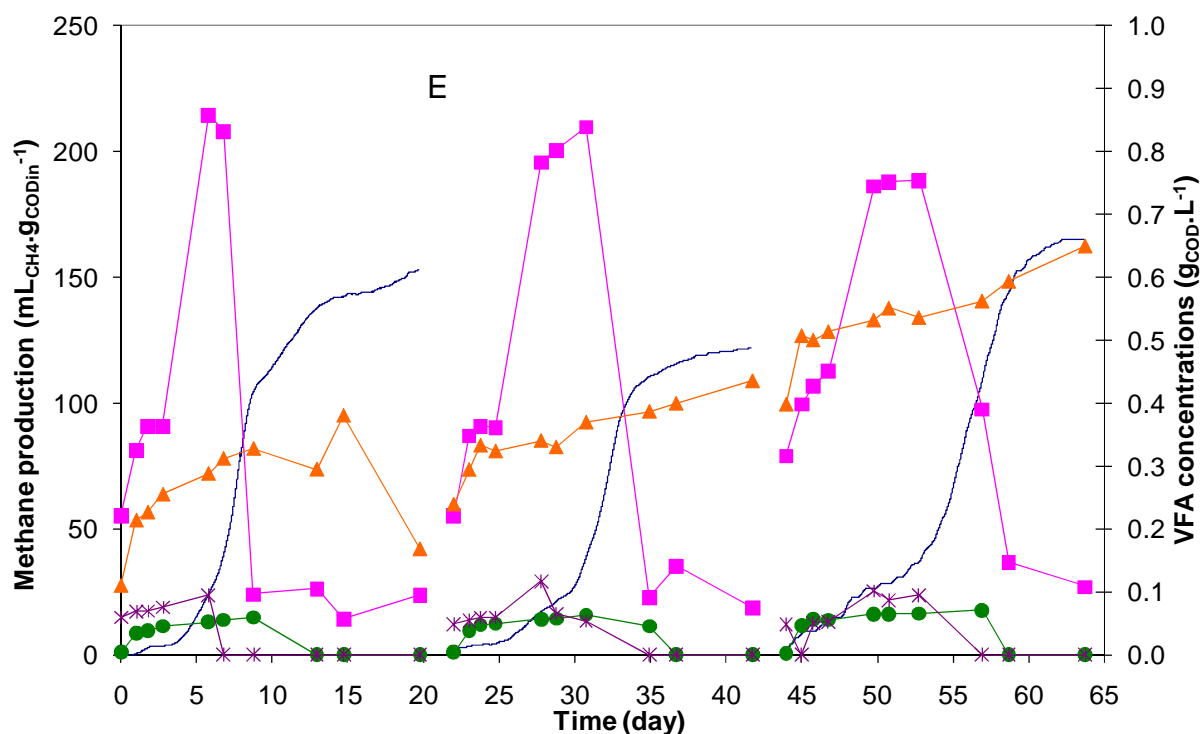
**Figure 4.2:** Soluble compound concentrations during batch anaerobic digestion of each sludge (batch 4).

Figure 4.3 represents methane production and VFA concentrations for batch 2, 3 and 4 for raw sludge and sludge treated at 110, 165°C and 220°C. VFA concentrations were not monitored for batch 1. It is important to define the VFA concentration variations monitored during experiments; they result from the VFA production by acidogenesis and from the VFA uptake by acetogenesis and acetoclastic methanogenesis. For example, an accumulation of acetate can be due to the step of acetate production faster than the step of acetate uptake. These values can bring interesting information into the understanding of mechanisms involved in the methane production.









**Figure 4.3:** Methane production and VFA concentrations during batch anaerobic digestions of (A) untreated WAS, (B) pretreated at 110°C, (C) pretreated at 165°C in electric mode, (D) pretreated at 165°C in steam mode and (E) pretreated at 220°C.

#### 4.3.2.1 Soluble compound concentration kinetics

The soluble COD concentration variations (Figure 4.2) of sludge pretreated in optimal conditions (165°C) showed a direct degradation of soluble organic matter and no significant accumulation of soluble COD. Thus, pretreatment allowed a better accessibility of organic matter, which was directly available for the biological steps, and could minimise the limiting effect of biological hydrolysis.

For the sludge pretreated at 220°C, despite a large solubilisation of COD (27 %), soluble compound concentration at the end of experiment was high and decreased very slowly. It seems to indicate that compounds, formed at 220°C (e.g. Melanoidins and Amadori compounds) were hardly biodegradable.

In the case of raw sludge and pretreated at 110°C, a first phase of degradation of particulate organic matter from day 0 to day 3 and a second phase of degradation from day 3 to day 6 were observed. The significant accumulation of soluble components seems to lead to the conclusion that two types of particulate matter constitute the sewage sludge: one fraction is quickly hydrolysed whereas the second fraction is more slowly hydrolysed. These two fractions are less significant on the soluble COD concentration variations of sludge pretreated at 165°C. But they can be clearly observed for all sludge samples in Figure 4.2.

#### 4.3.2.2 VFA concentration and methane production kinetics

Methane production curves showed two phases (Figure 4.3). A first one, with a fast production corresponding to the degradation of readily accessible organic matter, like monomers and dimers compounds or exopolymers, lasted from day 2 to day 6. It is also characterised by the production and the accumulation of VFAs (from day 0 to day 4). The second phase, with a slower production, corresponding to the degradation of hardly accessible organic matter, like particulate macromolecules strongly linked in sludge structure or compounds located inside the cells lasted from day 6 to day 12-14. Finally, methane production was null or very low from day 14 to 22.

The variations of acetate and propionate concentrations could be associated to the first and the second phases of methane production, respectively. Batch experiment 2 with sludge treated at 165°C in electric mode (Figure 4.3.C) could confirm this hypothesis. It observed that the first phase of methane production was mainly associated to the acetate uptake, from the day 0 to day 6. During this phase, the highest methane volume was produced and the acetate concentration decreased strongly. The second phase of methane production was associated to the propionate uptake. Indeed the start-up of the second methane production phase with the uptake of propionate at day 7 could be observed and a plateau was reached at day 12 when the VFA uptake was complete. According to Vavilin *et al.* (2008b), the acetogenesis and methanogenesis can be the rate-limiting steps in anaerobic digestion of a complex substrate at a high organic loading. These observations seem to show that the acetate and propionate degradation steps can also be considered as a limiting step like hydrolysis step during for the anaerobic digestion of a complex substrate (WAS) with an organic loading of 0.5 g<sub>COD</sub> per g<sub>VS</sub> of inoculum like .

As discussed above, total methane production increased with thermal pretreatment temperature. However, a significant decrease of methane production for raw sludge was observed through successive batch experiments (Figure 4.3.A). This seems to be linked to the propionate accumulation. Thus successive thermophilic digestion batches of raw sludge may lead to an accumulation of propionate as already observed by Speece *et al.* (2006).

In the case of sludge treated at 220°C, the first phase of methane production, which was from day 0 to day 6 for the batch 2, had a tendency to increase in time through consecutive batch experiments, and while a small methane production and a slow degradation rate of acetate were observed. This seems to indicate that the hardly biodegradable components produced at 220°C are slowly biodegradable. Thus the results can confirm that the Melanoidins and Amadori compounds are hardly and slowly biodegradable. The enhancement of methane production observed during batch 4 could arise from an overestimation of produced volume (resulting from very slowly biodegradable compounds from previous experiments) and not from an adaptation of inoculum.

#### 4.3.2.3 The calculation of propionate and acetate accumulation and methane production specific maximum rates

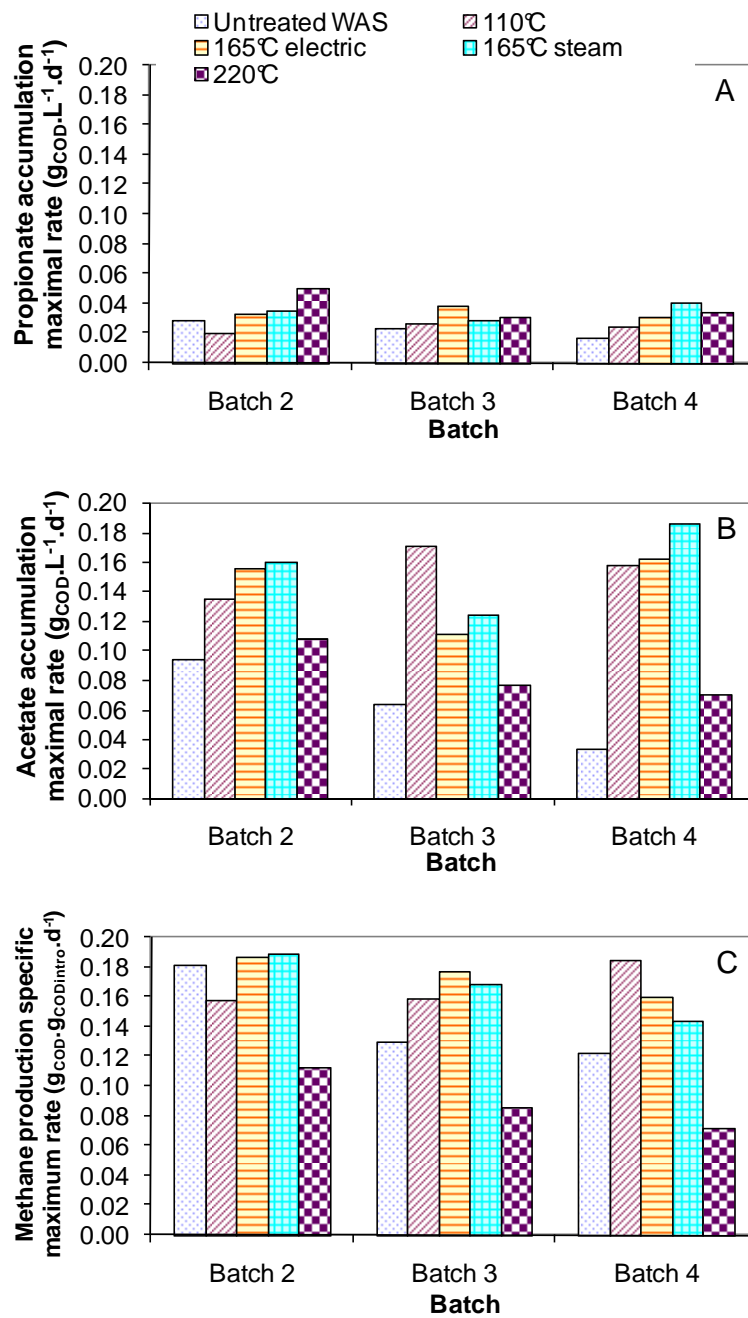
The values of propionate and acetate accumulation maximum rates,  $K$  expressed in  $\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , can be used to accurately evaluate the impact of thermal pretreatment on the mechanisms of acetogenesis and methanogenesis steps (Figures 4.4.A and 4.4.B). This parameter was determined from the slope of the linear regression line associated to the accumulation phase of propionate and acetate from day 0 to the day corresponding to the maximal accumulation of each batch experiment.

The values of  $K_{\text{propionate}}$  did not show statistically significant differences (Figure 4.4.A). However, important differences were observed between the variations of propionate concentrations of each sludge with an accumulation of propionate in the case of the raw sludge and the sludge pretreated at  $220^{\circ}\text{C}$  (Figure 4.3.A and 4.3.E), which could be correlated to the values of  $K_{\text{acetate}}$ . Indeed, these propionate accumulations were associated to a low acetate accumulation maximum rate which may be associated to a low acetate production rate (Figure 4.4.B). The values of  $K_{\text{acetate}}$  were below  $0.10 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  when the propionate accumulation took place. Thus, propionate accumulations involved a partial inhibition of acetogenesis.

Figure 4.4.C presents the maximum methane specific production of each sludge through consecutive batch experiments,  $K_{\text{CH}_4}$  being expressed in  $\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{g}_{\text{CODintro}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . This was determined from the maximum methane production specific rate throughout with experiment time.

If we consider raw sludge,  $K_{\text{CH}_4}$  decreased which was followed by the decrease of final methane volume through consecutive batch experiments (Figure 4.3.A). This was associated to a strong propionate accumulation and a decrease of  $K_{\text{acetate}}$ . This comment could confirm that a high propionate concentration can involve a partial inhibition of acetogenesis and methanogenesis steps. This was already underlined by Hyun *et al* 1998 who observed an inhibition of acetate degradation by a high propionate concentration ( $1 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$ ) during the anaerobic digestion of propionate-enriched mixed cultures at  $35^{\circ}\text{C}$ .

The values of  $K_{\text{acetate}}$  through consecutive batches for the sludge treated at  $220^{\circ}\text{C}$  were low with a value lower than  $0.10 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , and a large production of acetate was observed with a slow degradation of acetate, which was associated to a low  $K_{\text{CH}_4}$ . Thus the produced compounds (Melanoidins and Amadori compounds) had a negative effect on acetate degradation and methane production. These results confirmed that a fraction of solubilised organic matter were hardly and slowly biodegradable.



**Figure 4.4:** Acetate (A), propionate (B) accumulation maximum rates and methane (C) production specific maximum rates with different conditions of pretreatment through batch experiments.

For the sludge samples pretreated at 110°C and 165°C (both modes),  $K_{\text{acetate}}$  values were not significantly different and were stable. However, they showed important and statistically significant higher values than for raw sludge. For example in batch 2,  $K_{\text{acetate}}$  was equal to  $0.0939 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and  $0.1593 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  in the case of digestion of raw sludge and sludge pretreated at 165°C in steam mode, respectively. This enhancement was observed in each batch experiment. Moreover, the propionate accumulations were less important than in the case of raw sludge and sludge pretreated at 220°C. Thus, the solubilisation induced by the

thermal pretreatment has an important impact on the step of acetate production from propionate and soluble components. The Figure 4.2 showed that the thermal pretreatment allowed a decrease of the limiting effect of the anaerobic digestion hydrolysis step by solubilising a large part of organic matter, which is more available by the anaerobic microorganisms, in particular in the case of sludge pretreated at 165°C in both modes. The solubilised organic matter was directly degraded, allowing higher acetate and methane production rates, no or low propionate accumulation and a higher quantity of degraded organic matter.

The thermal hydrolysis enhanced the availability of organic matter. Thus, the solubilisation allowed to bring an available substrate in high quantity and it could allow maximising intracellular reactions by a better development of degraders and no propionate accumulations.

### 4.3.3 Conclusions

The degradation kinetics of untreated and thermally pretreated WAS were carried out in batch reactor in order to evaluate the effect of available organic matter on the main degradation steps and on the potential methane. The effects of thermal pretreatment conditions were determined by characterising the organic matter at the input and output thermal process. From this work, the following conclusions can be drawn:

- Optimal conditions of thermal pretreatment were obtained at 165°C, involving a COD and VS solubilisation of 18 and 15 % and a biodegradability increase from 47 to 61 %. At 220°C, although a large solubilisation of particulate organic matter occurred, sludge biodegradability was lowered than other sludge samples (42%). Thus, a too high temperature treatment leads to the production of slowly and hardly biodegradable compounds, like Amadori compounds and melanoidins,
- The Newman-Keuls test showed that the difference of BMP between treatments at 165°C (in electric and steam modes) was not significant. Thus, the laboratory thermal hydrolysis carried out in electric mode represents properly industrial thermal hydrolysis carried out with steam injection,
- For all untreated and pretreated WAS samples, successive thermophilic batch digestion tests were not necessary to evaluate maximal methane production, as an adapted inoculum was used and VFA accumulations occurred through successive batches. One batch test, monitored until VFA concentrations reaches zero, seems sufficient to measure the maximal methane production of WAS,
- Methane production kinetics were strongly linked to the acetate and propionate kinetics. The results showed that the degradation of propionate and acetate had a limiting effect on the methane production. The acetate degradation was associated to the first methane production phase and the propionate degradation was associated to the second methane production phase,

- The thermal hydrolysis could minimise the limiting effect of hydrolysis due to a large solubilisation of organic matter, thus improved the availability of particulate organic matter and enhanced the acetogenesis step, inducing a better conversion of propionate to acetate that avoided propionate accumulation.

## 4.4 Discussion

La biodisponibilité de la matière organique est un paramètre influençant fortement les performances de dégradation anaérobie des boues. Il a été défini dans le chapitre précédent comme un indicateur pertinent dans la détermination du potentiel méthane. En effet, la solubilisation favorise la disponibilité initiale de la matière organique et par conséquent améliore généralement les vitesses de dégradation et les taux de conversion à une échelle de temps donnée. Ainsi, plusieurs types de procédés de prétraitement ont été élaborés afin de solubiliser des composés particuliers tels que les boues d'épuration. Le prétraitement thermique présente de nombreux avantages et notamment plusieurs applications à l'échelle industrielle via le procédé BIOTHELYS<sup>®</sup>. Ainsi l'étude de l'influence de plusieurs états de disponibilité initiale de la matière sur les cinétiques de digestion anaérobie a été intéressante pour mieux comprendre l'action du prétraitement et de la disponibilité sur les mécanismes de digestion.

Le suivi de cinq réacteurs batch fonctionnant en régime thermophile et alimentés avec une boue secondaire non traitée et prétraitée à différentes températures, a permis d'apporter des connaissances sur l'impact de l'état de la matière sur les cinétiques de dégradation anaérobie. En effet, il a été mis en évidence que la solubilisation des composés particuliers présents dans les boues secondaires permet de minimiser l'effet limitant de l'étape d'hydrolyse en augmentant nettement les performances de dégradation sur la boue traitée à 165°C. De plus, dans ces conditions, l'accumulation de propionate a été minimisée à travers les quatre alimentations successives. En effet, cela permettrait d'accroître et de conserver des vitesses de dégradation élevées pour l'étape de dégradation à travers les quatre alimentations successives et donc d'éviter une accumulation de propionate.

Cependant, la détermination des vitesses d'accumulation présente un inconvénient puisqu'elles ne permettent pas d'observer les mécanismes réels de dégradation. En effet, les vitesses ont été calculées à partir des variations des concentrations en propionate et en acétate. Les variations observées sont étroitement dépendantes des vitesses de production et de consommation. Ainsi, les valeurs des vitesses d'accumulation peuvent avoir différentes explications. Par exemple, une vitesse d'accumulation faible peut être due à des vitesses de production et de consommation faibles ou bien élevées. La conclusion ne sera pas la même dans les deux cas : pour le premier cas, l'étape réactionnelle sera lente et donc limitante et pour le second cas, l'étape réactionnelle sera rapide et ne présentera pas d'effet limitant dans le processus de dégradation.

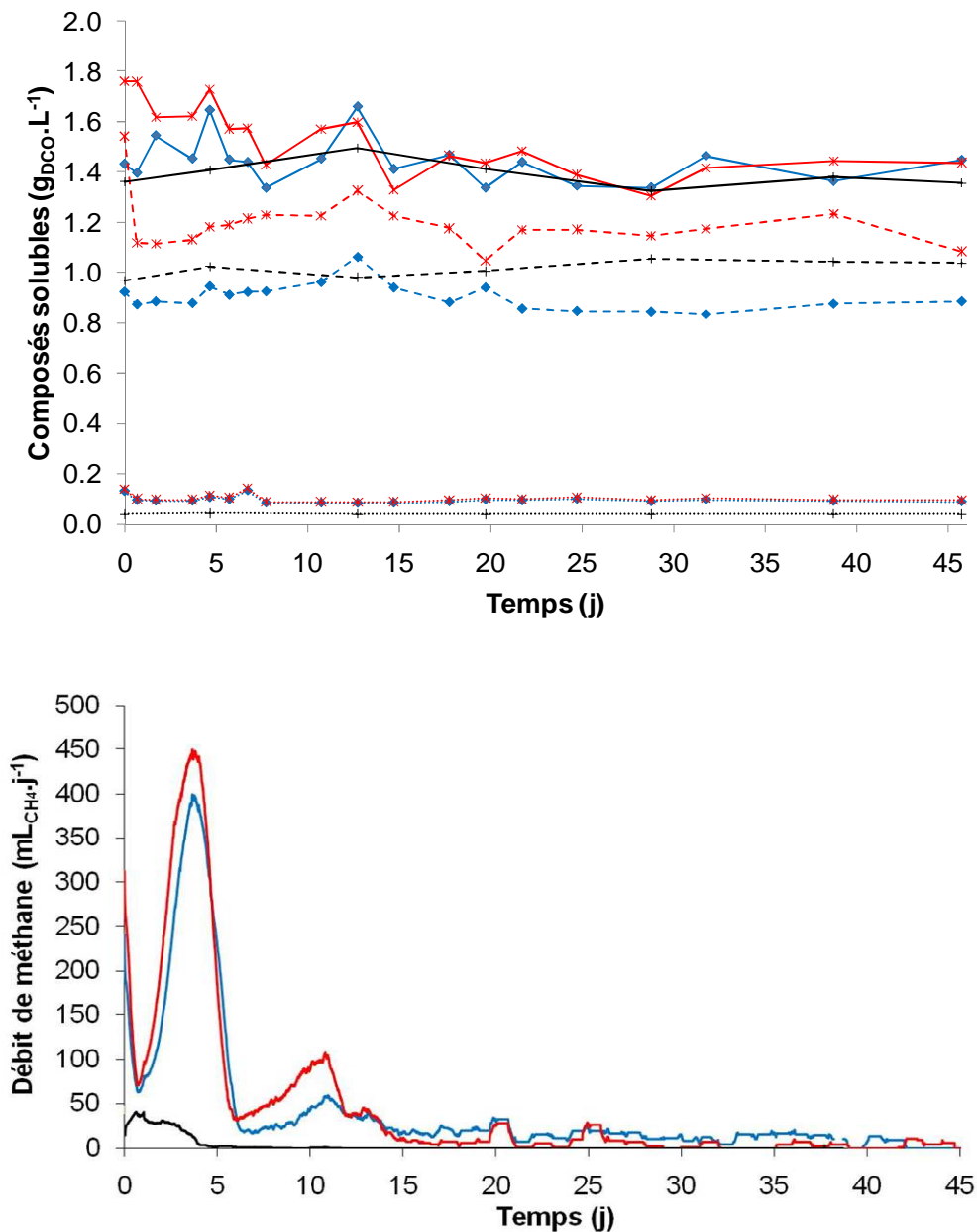
La non accumulation de propionate dans le cas de la boue prétraitée dans des conditions optimales peut être également être expliquée par la présence d'éléments-traces métalliques. En effet, Kim *et al.* (2002), Speece *et al.* (2006) et Zitomer *et al.* (2008) ont montré que l'ajout



d'éléments-traces métalliques, tels que le cobalt (Co), le fer (Fe) ou le nickel (Ni), a un effet positif sur la dégradation du propionate et de l'acétate. Zitomer *et al* (2008) ont obtenu une augmentation statistiquement significative de la dégradation du propionate et de l'acétate par l'ajout soit de nickel, de cobalt ou de fer, pour 77 % des échantillons de biomasses thermophiles testées. Les vitesses de dégradation du propionate en condition thermophile sont généralement plus sujettes à augmenter grâce à l'ajout de nutriment par rapport aux vitesses de dégradation de l'acétate. Dans les boues d'épuration, la concentration totale en éléments-traces métalliques n'est généralement pas limitante. Cependant, les composés peuvent ne pas être accessibles par les microorganismes épurateurs à cause de l'agencement complexe de la matière des boues. Ainsi, une étape de prétraitement permet de désintégrer la structure des boues, ce qui pourrait rendre disponible et plus accessible les éléments-traces métalliques par la biomasse anaérobie, améliorant donc la dégradation du propionate. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée puisque les mesures des concentrations en éléments-traces métalliques n'ont pas été réalisées.

Les suivis complémentaires des composés solubles majoritaires (protéines et glucides) au cours de la digestion anaérobie d'une boue secondaire non traitée et prétraitée à 165°C ont permis d'apporter des informations sur l'étape d'acidogénèse. Le protocole expérimental utilisé est identique au protocole mis en place pour le suivi des cinétiques de dégradation présenté dans ce chapitre. Les concentrations en DCO, en protéines et en glucides solubles ont été mesurées à partir de prélèvements réalisés environ 3 fois par semaine au cours des différentes dégradations. Une fois prélevé, l'échantillon a été centrifugé puis filtré à 0,45 µm afin d'obtenir la phase soluble, sur laquelle les analyses ont été effectuées (Paragraphe 2.5.6 et 2.5.7). Le volume total de prélèvement a représenté environ un tiers de la matrice réactionnelle pour chaque réacteur. L'importance des volumes prélevés a pu entraîner un artefact sur la détermination des productions cumulées de méthane, ainsi les productions cumulées de méthane n'ont pas été présentées et seules les variations des concentrations en composés solubles et des débits de méthane ont été étudiées.

La Figure 4.5 présente les variations des concentrations en DCO, en protéines et en glucides solubles, ainsi que les débits de méthane, au cours de la digestion anaérobie thermophile en condition batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée à 165°C. Un réacteur contenant l'inoculum seul, c'est-à-dire sans ajout de substrat, a été suivi afin de mettre en évidence l'absence de processus de dégradation de l'inoculum. Les variations ont été suivies sur une période de 46 jours pour vérifier la présence ou non de processus de dégradation lents. Dans un premier temps, il est important de rappeler que les mesures de concentrations en composés solubles ne sont que le résultat de mesure à l'instant  $t$  des différentielles de production et de consommation.



◆ Boue non traitée \* Boue prétraitée à 165 C + Inoculum seul

**Figure 4.5 :** Variation des concentrations en composés solubles et débit de méthane au cours de la digestion anaérobie thermophile en condition batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée à 165°C (trait plein : concentration en DCO soluble moins la concentration en AGV totaux ; trait discontinu : concentration en protéines solubles ; trait en pointillé : concentration en glucides solubles).

Les variations en DCO soluble obtenues lors de la dégradation des deux boues étudiées ont montré des comportements similaires à celles présentées dans la « Figure 4.2 » (Paragraphe 4.3.2). Dans le cas de la boue non traitée, une accumulation de DCO soluble a été observée durant les 6 premiers jours de dégradation car la production de composés solubles est majoritaire par rapport à leur consommation. Une seconde accumulation est observée entre le

jour 9 et le jour 15. Cette observation est confirmée par l'allure de la courbe de production de méthane obtenue dans la « *Figure 4.3* » (Paragraphe 4.3.2) mais également par les débits de méthane correspondants (*Figure 4.5*). Ainsi, deux phases distinctes sont observées : une première phase correspondant à la dégradation de composés particuliers facilement accessibles entre le jour 0 et le jour 6 ; et une seconde phase correspondant à la dégradation de composés particuliers difficilement accessibles entre le jour 9 et le jour 15. Ensuite, les variations sont peu significatives. Pour la boue traitée à 165°C, il semblerait que la consommation des composés solubles soit dominante durant les 6 premiers jours de dégradation. Cela peut être expliqué par un plus grand apport de composés solubles disponibles ou facilement accessibles grâce au prétraitement thermique. Ainsi, l'effet limitant de l'étape d'hydrolyse est minimisé grâce à l'apport du traitement thermique. La seconde accumulation de DCO soluble n'a pas été observée sur la « *Figure 4.2* » (Paragraphe 4.3.2). En effet, aucune mesure n'a été réalisée entre le jour 9 et le jour 14, correspondant à l'intervalle de temps où la variation a été observée sur la *Figure 4.5*.

Le suivi de la dégradation a donc été approfondi en réalisant les mesures des concentrations en protéines et en glucides solubles (*Figure 4.5*). Les résultats ont montré que les composés protéiques sont majoritaires dans la phase soluble par rapport aux composés glucidiques. Une grande partie des composés protéiques mesurés en phase soluble et donc disponibles sont non dégradés. Ainsi, la nature des composés est également un facteur dans la dégradation. Le réacteur, contenant l'inoculum seul, présente également une concentration élevée en protéines solubles. Ainsi, une partie des protéines mesurées en phase soluble peut correspondre à la biomasse anaérobie mais aussi à des composés plus complexes tels que les substances humiques. Les glucides en phase soluble sont très faibles (concentration d'environ  $0,15 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ce qui confirme que ces composés sont relativement bien dégradés. Lors de la dégradation des deux types de boues, les variations des concentrations en protéines solubles ont montré une légère accumulation durant les 13 premiers jours d'expérience puis une diminution jusqu'à la fin de l'expérience. Les protéines contribueraient aux phases d'accumulation de la DCO soluble durant cette période. Cela pourrait indiquer que l'hydrolyse des protéines particulières s'effectue sur une longue durée, due à la faible accessibilité des composés au sein de la structure des boues secondaires. Le prétraitement thermique améliore cette accessibilité en rendant une partie des protéines particulières disponibles puisque la grande quantité de protéines solubilisées apportée initialement est rapidement dégradée. Les variations des concentrations en glucides solubles n'ont pas été significatives, ce qui indique qu'à chaque instant  $t$  de mesure, les vitesses de production sont quasi-équivalentes aux vitesses de consommation. Ainsi, l'étape d'acidogénèse, c'est-à-dire l'étape de dégradation des composés solubles produits par l'hydrolyse des composés particuliers, est très rapide et ne présente donc pas un effet limitant dans le processus global de la digestion anaérobie.

Le réacteur contenant l'inoculum seul n'a pas montré de variations significatives des concentrations en DCO, en protéines et en glucides solubles (*Figure 4.5*). Seule une faible production a été observée durant les 5 premiers jours de dégradation pouvant correspondre à

de la matière organique résiduelle présente dans la boue du digesteur. Les processus de dégradation pour un inoculum seul sont donc minimisés.

Les résultats ont donc mis en évidence que le suivi des composés solubles au cours de la dégradation n'est pas pertinent puisque les variations des concentrations en protéines et en glucides sont peu significatives. Cependant, il semblerait que les variations observées sur les concentrations en DCO soluble et en protéines tentent à confirmer la notion d'accessibilité de la matière organique particulaire.

La suite de l'étude présente le travail de modélisation réalisé dans le but de représenter les données expérimentales de dégradation, afin de mieux comprendre les phénomènes réactionnels de la digestion anaérobie thermophile de boues d'épuration secondaires et notamment ceux liés à la bioaccessibilité de la matière organique particulaire.

Chapitre 5: Modélisation des performances  
de digestion anaérobie thermophile en  
réacteur batch : la cinétique de Contois  
introduite dans le modèle ADM1



# Chapitre 5. Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile en réacteur batch : la cinétique de Contois introduite dans le modèle ADM1

## Résumé

Le chapitre suivant est présenté sous forme d'un article scientifique.

L'étape d'hydrolyse enzymatique de la digestion anaérobie est un processus de dégradation complexe des composés biochimiques, tels que les glucides, les protéines et les lipides, incluant des phases de production d'enzymes, de diffusion, d'adsorption, de réaction et de désactivation d'enzymes. En règle générale, les effets additionnels de ces différents processus composant l'étape d'hydrolyse sont représentés dans le modèle ADM1 par une simple cinétique d'ordre 1. Pour un substrat complexe, tel que les boues secondaires, il est nécessaire de modifier la vitesse de réaction afin de prendre en compte l'impact de l'organisation matière organique et ainsi d'introduire les limitations de transfert de matières dues à des surfaces d'échanges limitées qui sont rencontrées lors de la colonisation de la surface du composé particulaire par la biomasse hydrolytique.

Un modèle mathématique de simulation, basé sur l'ADM1, a été proposé pour représenter les données de la digestion anaérobie en condition thermophile de boues secondaires prétraitées thermiquement. Le modèle présente deux modifications essentielles : l'utilisation du modèle de Contois au lieu d'une réaction d'ordre un pour décrire les étapes de désintégration et d'hydrolyse ; et une fonction de Hill a été préférée à une fonction non compétitive pour représenter l'inhibition de la méthanogénèse acétoclaste par l'ammoniac.

Les données expérimentales du suivi de la digestion anaérobie de la boue secondaire non traitée et prétraitée à 110°C, 165°C et 220°C en mode électrique ont été utilisées pour réaliser la calibration et la validation du modèle. Dans le but de minimiser l'influence de la composition initiale de l'inoculum, seulement les performances de dégradation de la quatrième alimentation ont servi à tester les modifications apportées au modèle. Ainsi, nous avons pu évaluer la capacité du modèle à représenter le comportement des variations des AGV, du pH et la production de méthane pour chaque test de dégradation de la quatrième alimentation en réponse au prétraitement thermique appliqué.

Le modèle intègre donc de nouveaux paramètres : trois paramètres cinétiques pour l'étape de désintégration ( $k_{m,Xc}$ ,  $K_{S,Xc}$  et  $k_{dec,Xc}$ ), neuf paramètres cinétiques pour l'étape d'hydrolyse ( $k_{m,ch}$ ,  $K_{S,ch}$ ,  $k_{dec,ch}$ ,  $k_{m,pr}$ ,  $K_{S,pr}$ ,  $k_{dec,pr}$ ,  $k_{m,li}$ ,  $K_{S,li}$  and  $k_{dec,li}$ ) et quatre paramètres stoechiométriques ( $Y_{Xc}$ ,  $Y_{ch}$ ,  $Y_{pr}$  et  $Y_{li}$ ). Les valeurs des paramètres sont déterminées à partir

d'un ajustement des données simulées sur les données expérimentales du réacteur batch alimenté avec la boue secondaire non traitée (phase de calibration du modèle). Les données expérimentales des réacteurs batch alimentés avec la boue secondaire prétraitée thermiquement à différentes températures ont été utilisées pour valider le modèle.

Les simulations obtenues à partir des paramètres estimés dans la phase de calibration permettent de prédire correctement les tendances des données mesurées sur les différents réacteurs batchs. Ces résultats valident donc l'approche empirique de modélisation et les valeurs estimées des seize nouveaux paramètres du modèle.

Les résultats obtenus à partir de ce modèle sont capables de représenter les variations des concentrations en acétate de chaque réacteur batch. Les variations en acétate sont caractérisées par deux augmentations nettes de la concentration, provenant de vitesses d'hydrolyse différentes de la matière organique particulaire. Les modifications apportées permettent donc de mieux décrire l'hydrolyse enzymatique, qui est l'étape limitante dans la digestion anaérobie de composés complexes. Ce nouveau modèle peut être considéré comme un outil intéressant pour le suivi, l'analyse et l'optimisation des digesteurs.

Basé sur:

**Ramirez I., Mottet A., Carrère H., Déléris S., Vedrenne F., Steyer J.P.** Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated waste activated sludge. *Water Research*. 43(14) : 3479-3492.



## 5.1 Introduction and objectives

### 5.1.1 Introduction

#### 5.1.1.1 Modeling of WAS anaerobic digestion

Mathematical models are widely acknowledged to provide interesting and useful information about phenomena occurring in complex systems. In particular, the IWA Anaerobic Digestion Model n°1 (Batstone *et al.*, 2002) is a powerful tool for predicting and obtaining a better understanding about the behavior of anaerobic digesters treating sewage sludge. This generalised model can indeed take into account chemical and biological interactions between solid, liquid and gas phases. However, ADM1 has also some drawbacks.

##### 5.1.1.1.1 Implementation of initial variables in ADM 1 model

Currently, the integration of complex substrate such as WAS in the input variables of ADM1 is a key issue. Indeed, in the ADM 1 model, a complex organic waste is introduced as a simple variable  $X_c$  which is disintegrated into particulate proteins, carbohydrates and lipids by a first-order reaction. Thus, a detailed characterization of the sludge is required for a correct implementation of ADM1 (Huete *et al.*, 2006). In particular, a precise characterisation of particulate and soluble concentrations of carbohydrates, proteins, lipids and individual VFAs is needed and from a practical point of view, this might be difficult to obtain. Fractionation of the particulate and soluble phases is another difficulty, sludge characterization being generally defined from particulate-soluble fractionation at  $0.45 \mu\text{m}$  (von Münch *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002; Kampas *et al.*, 2007) even though this might not be the limit for physical accessibility of biomass to the substrate.

The inert matter flow from  $X_c$  variable must to be accurately characterise since this yield coefficient leads the digester performances. It could be work out from the inert fraction of WAS. The analytic method to estimate this fraction is an experimental measurement of biodegradability by BMP tests (Angelidaki and Sanders, 2004). Gali *et al.* (2009) used the anaerobic degradation test to measure and implement the inert fraction of each agro-waste in their anaerobic digestion model. These tests are time-consuming since the measured biodegradability is depended on degradation time and generally a long time, from 20 to 30 d, is necessary to obtain the methane maximal potential. However, it is still a good method to determine the inert fraction.

##### 5.1.1.1.2 Representation of ADM1 disintegration and hydrolysis steps

The hydrolysis step of the anaerobic digestion of complex substrate as waste activated sludge is a very complex process. The complex multi-step process of hydrolysis may indeed include multiple enzyme production, diffusion, adsorption, reaction and enzyme deactivation steps. Zavarzin (1986) proposed a description of the hydrolysis process in two steps : the first step is a bacterial colonization, during which the hydrolytic bacteria cover the surface of solids and the second step is the production of enzymes by bacteria on or near the particle surface which allow the production of monomers.

Following the approach of O'Rourke (1968), Pavlostathis and Gossett (1988) and Vavilin *et al.* (1996), disintegration was included in ADM1 mainly to represent the pool of composite organic material and to facilitate the modelling of WAS digestion. The complex particulate pool is also used as a pre-lysis repository of dead biomass. The disintegration step was indeed originally intended to sum up an array of steps such as lysis, non-enzymatic decay, phase separation, and physical breakdown (*e.g.*, shearing). In accordance with Eastman and Ferguson (1981), this extracellular step was assumed to be of first order and was considered as an empirical function reflecting the cumulative effect of this multi-step process. This approach has been chosen in the ADM1 (Batstone *et al.*, 2002).

However, the first-order reaction is the simplest type for a description of the hydrolysis. This function is an empirical expression that reflects the cumulative effects of many processes (Eastman and Ferguson, 1981; Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991). However, the first-order reaction assumes: that the hydrolysis reaction is independent of the growth of bacteria; and the substrate particles and the biomass responsible for producing hydrolysis enzymes are available in excess for immediate and spontaneous contact with each other. This may represent an oversimplification, since biomass might not have direct access to substrate particles and biomass/enzyme bindings are essential for the microbially mediated particulate substrate hydrolysis process to proceed (Rotter *et al.*, 2008).

The hydrolysis step needs a more appropriated equation form to enhance the description of the systems performance. It is essential for the rational design and operation of anaerobic systems to predict the system stability and performances.

In the IAWQ Activated Sludge Model n°2 (Gujer *et al.*, 1995), the Contois model (Contois, 1959) has been selected for a better description of slowly biodegradable organics hydrolysis. This function integrates a ratio of substrate and hydrolytic biomass concentrations and can account to the mass transfer limitations due to the limited surface area of particulate substrates. Fernandez *et al.* (2001) showed that the hydrolysis step might depend on the biomass concentration and activity. Thus, the substrate-microorganism ratio may be a better limiting factor in the hydrolysis of particulate substrate rather than the substrate concentration accounted with the first-order reaction.

In anaerobic digestion, Chen and Hashimoto (1980) already used a modified Contois model for the hydrolysis of dairy wastes and sewage sludge. Vavilin *et al.* (1996) used the Contois function to represent the performances of anaerobic digestion of different substrates, such as sludge, cattle manure, swine waste and cellulose. The results showed a good fit to the experimental data and they concluded that the Contois model is appropriated to describe the hydrolysis mechanisms. Myint and Nirmalakhandan (2006) fitted well the measured data during the anaerobic degradation of cattle manure ( $R^2 = 0.914$ ) and they obtained a better prediction of COD than the other two models. Nopharatana *et al.* (2007) also adequately represented the kinetics of hydrolysis of insoluble fraction of municipal solid waste in a batch digester. However, this function was not yet integrated into ADM1 model.

### **5.1.2 Objectives**

The objectives of this study are to integrate the initial variables in function of the used characterisation method and the Contois model into ADM1 in order to obtain a model able to predict and interpret results from thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated WAS. In the following, an overview of the model structure, assumptions and main model parameters are presented. The dynamics of VFAs, pH and methane production obtained from four different batch thermophilic anaerobic digestion of untreated and thermally pretreated sludge samples are used to calibrate and to validate the proposed model.

## **5.2 Methodology**

### **5.2.1 Experimental approach**

The experimental approach was similar and already described in the Chapter 2 (Sections 2.1.3). The detailed analytic methods are presented in the Chapter 2 (Sections 2.3.2, 2.4 and 2.5).

In each case, only the fourth batch experiment was used to calibrate and validate the model in order to minimise the influence of the initial inoculum composition. The thermal pretreatment condition at 165°C in steam mode was not used to this work.

### **5.2.2 Modeling Approach**

#### **5.2.2.1 Model Structure**

##### *5.2.2.1.1 Contois model*

Although the hydrolysis of particulate organic material has been traditionally also modeled according to first-order kinetics and is usually considered as the rate-limiting step in anaerobic digestion (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991), some authors (Bryers, 1985 and Mata-Alvarez, 1989) have pointed out that the mechanisms, stoichiometry, kinetics and modeling of biological particulate hydrolysis have not yet been adequately studied. Indeed, the hydrolysis of particulate substrate is a complex multi-step process.

Consequently, the first order kinetics appears to be not applicable under all circumstances and an in-depth better understanding of the different processes involved is needed to accurately describe the disintegration and hydrolysis steps. Furthermore, it has been shown that models in which disintegration/hydrolysis is coupled to the growth of disintegration/hydrolytic bacteria and to substrate heterogeneity work well even at high or fluctuant organic loading (Vavilin *et al.*, 2008a). In particular, the Contois model has been demonstrated to be well adapted to represent different experimental data sets from a wide range of organic wastes (Vavilin *et al.*, 1996; Sotemann *et al.*, 2006; Nopharatana *et al.*, 2007). The Contois model that uses a single parameter to represent saturation of both substrate and biomass can be written as:

$$\rho_{process} = k_{m,process} X \frac{S}{K_{S,process} X + S} = k_{m,process} X \frac{S/X}{K_{S,process} + S/X}$$

Where:

$\rho_{process}$  is the process rate ( $\text{kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ),

$k_{m,process}$  is the maximum specific uptake rate of the process ( $\text{d}^{-1}$ ),

$K_{S,process}$  is the half-saturation coefficient for the ratio  $S/X$  ( $\text{kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$X$  is the hydrolytic (disintegration) biomass concentration ( $\text{kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$S$  is the particulate compound concentration ( $\text{kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}^{-3}$ ).

The Contois model has two particular cases with extreme values:

- First-order kinetic for biomass:

$$S/X \gggg K_{S,process} \quad \rho_{process} \approx k_{m,process} X$$

- First-order kinetics for substrate:

$$S/X \lllll K_{S,process} \quad \rho_{process} \approx k_{m,process} X \frac{S/X}{K_{S,process}} \approx k_{m,process} \frac{S}{K_{S,process}}$$

The remaining reactions (*i.e.*, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis) are strictly equivalent to those present in the standard ADM1.

To summarise, this modified ADM1 involves few additional parameters: three disintegration kinetic parameters of composites  $X_c$  (*i.e.*,  $k_{m,Xc}$ ,  $K_{S,Xc}$  and  $k_{dec,Xc}$ ), nine hydrolysis kinetic parameters for carbohydrates, proteins and lipids (*i.e.*,  $k_{m,ch}$ ,  $K_{S,ch}$ ,  $k_{dec,ch}$ ,  $k_{m,pr}$ ,  $K_{S,pr}$ ,  $k_{dec,pr}$ ,  $k_{m,li}$ ,  $K_{S,li}$  and  $k_{dec,li}$  respectively) and four stoichiometric parameters ( $Y_{Xc}$ ,  $Y_{ch}$ ,  $Y_{pr}$  and  $Y_{li}$ ). Their tuning was performed by trial and error using the experimental data set obtained from the batch reactor fed with untreated WAS while the other three experimental data sets (*i.e.*, those obtained from batch reactors fed with WAS thermally pretreated at 110, 165 and 220°C) were used to validate the obtained values (*i.e.*, the modified ADM1 was then simulated using the model parameter values determined from the untreated WAS experiment).

#### 5.2.2.1.2 Hill function for modeling free ammonia inhibition of aceticlastic methanogens

In addition, the anaerobic biodegradation of WAS produces a large quantity of ammonia which is the main cause of inhibition since, as already pointed out, it is freely cell membrane permeable. Inhibition is usually indicated by a decrease of the methane production and an accumulation of VFAs (Kroeker *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 2008). Free ammonia inhibition is included in ADM1 for aceticlastic methanogens using non-competitive functions, however, our experiments of pretreated WAS, acetate was not completely degraded and, in some cases,

a second phase of acetate production was observed. This phenomenon cannot be explained with the non-competitive function included in ADM1 for modeling free ammonia inhibition of acetoclastic methanogens and the following Hill function (Hill and Barth, 1977) was used instead:

$$I_{NH_3} = b * \left[ 1 - \frac{S_{NH_3}^\alpha}{K * S_{NH_3}^\alpha + S_{NH_3,lim}^\alpha} \right]$$

Where:

$I_{NH_3}$  is free ammonia inhibition factor of acetoclastic methanogens,

$b$  is the maximum desired value for ammonia inhibition,

$S_{NH_3}$  is the free ammonia concentration ( $\text{kmole}_N \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$S_{NH_3,lim}$  is the mean free ammonia threshold concentration ( $\text{kmole}_N \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$K$  is a tuning parameter,

$\alpha$  is the Hill coefficient that defines the slope of the drop in the inhibition function.

#### 5.2.2.1.3 Liquid/gas transfer coefficients

The liquid/gas transfers are described from Henry's law, which can describe the equilibrium between liquid and gas phases for  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$ . The dynamic gas transfer rates ( $r_i$ ) are expressed as:

$$r_i = k_L a_i (S_{liq,i} - K_{H,i} p_{gas,i})$$

Where:

$k_L a_i$  is the overall transfer coefficient multiplied by specific transfer area of gas  $i$  ( $\text{d}^{-1}$ ),

$S_{liq,i}$  is liquid concentration of gas  $i$  ( $\text{kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$K_{H,i}$  is Henry's law coefficient of gas  $i$  ( $\text{M} \cdot \text{bar}^{-1}$ ),

$p_{gas,i}$  is partial pressure of gas  $i$  (bar).

In ADM1, the liquid-gas transfer coefficient values are identical for all gas. However,  $k_L a$  varies widely depending on reactor size, dimensions, turbulence, liquid flow, gas flow and diffusivity values. In order to take into account these differences, three kinetic coefficients were used, one for each gas:  $k_{LA\text{CH}_4}$ ,  $k_{LA\text{CO}_2}$  and  $k_{LA\text{H}_2}$  for methane, carbon dioxide and hydrogen respectively.  $k_{LA\text{CO}_2}$  was estimated for each batch reactor by fitting the  $\text{CO}_2$  produced in the gas phase. Then, as recommended by Pauss *et al.* (1990),  $k_{LA\text{CH}_4}$  and  $k_{LA\text{H}_2}$

were estimated from the carbon-dioxide gas transfer coefficient and diffusivity coefficients, using the following equation:

$$k_L a_{,i} = k_L a_{CO_2} \left( \frac{D_i}{D_{CO_2}} \right)^{1/2}$$

Where  $D_i$  is the diffusivity of gas  $i$  ( $m^2.s^{-1}$ ).

### 5.2.2.2 Model implementation and initial conditions

The modified ADM1 was implemented using MatLab/Simulink (Rosen and Jeppsson, 2002). The applied solving algorithm in the simulation system is ODE 15 s: a variable-step, variable-order solver based on the numerical differentiation formulas.

Values for initial conditions of most of the model variables were directly obtained from the experimental measurements on the WAS samples. The characterization of WAS samples was presented in the Table 5.1.

It was assumed that the substrate particulate COD was mainly present into  $X_c$  and little into  $X_{ch}$ ,  $X_{pr}$  and  $X_{li}$  because, unlike other wastes such as food wastes, carbohydrates, proteins and lipids are embedded into the flocs of the WAS. The initial value of  $X_I$  was the sum of particulate COD concentrations from the reactor before feeding and the substrate. Initial values of  $S_{su}$  and  $S_{aa}$  were taken equal to the measured sugar and amino acids concentrations at time  $t = 0$ . The initial values for the different VFAs (*i.e.*,  $S_{ac}$ ,  $S_{pro}$ ,  $S_{bu}$  and  $S_{va}$ ) were also obtained from the measurements performed just after feeding the reactor. The pH was calculated from the ionised forms of VFAs, bicarbonate, ammonia and cation/anion concentrations. Ammonia ( $S_{IN}$ ) and bicarbonate ( $S_{IC}$ ) were measured by Kjeldahl method and TOCmeter, respectively. Anion concentration ( $S_{an}$ ) was taken equal to  $S_{IN}$  according to Rosen and Jeppsson (2002) and cation concentration ( $S_{cat}$ ) was adjusted in each case according with experimental pH. Initial values of the different biomass concentrations were determined to fit to the VFAs curves obtained from each batch reactor.

Yield of product on substrate $\text{kgCOD}\cdot\text{kgCOD}^{-1}$	ADM1 Default	Untreated WAS	WAS pretreated at 110°C	WAS pretreated at 165°C	WAS pretreated at 220°C
$f_{Si\_Xc}$	0.10	0	0	0	0
$f_{Xi\_Xc}$	0.25	0.606	0.506	0.475	0.528
$f_{ch\_Xc}$	0.20	0.096	0.134	0.135	0.107
$f_{pr\_Xc}$	0.20	0.160	0.164	0.149	0.113
$f_{li\_Xc}$	0.25	0.138	0.196	0.242	0.252
Dynamic states variables	Units	Initial conditions values <sup>2</sup>			
$X_c$		2.89	3.14	2.71	1.72
$X_{ch}$		0.1	0.1	0.1	0.1
$X_{pr}$		0.1	0.1	0.1	0.1
$X_{li}$		0.1	0.1	0.1	0.1
$X_i$		12.0	12.0	11.4	11.3
$S_i$		0	0	0	0
$S_{su}$	$\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$	0.010	0.017	0.025	0.035
$S_{aa}$		0.010	0.003	0.401	0.347
$S_{fa}$		0	0	0	0
$S_{va}$		0.079	0.037	0.043	0.049
$S_{bu}$		0.144	0.092	0.034	0.002
$S_{pro}$		0.707	0.121	0.120	0.399
$S_{ac}$		0.321	0.257	0.240	0.317
$S_{IC}$	$\text{kg-mole}_C\cdot\text{m}^{-3}$	0.0142	0.0159	0.0159	0.0151
$S_{IN}$	$\text{kg-mole}_N\cdot\text{m}^{-3}$	0.0588	0.0580	0.0568	0.0591

<sup>1</sup>Standard ADM1 values are those recommended in Batstone *et al.* (2002).

<sup>2</sup>Initial conditions values are determined from experimental data obtained in this study.

**Table 5.1:** COD flux for each sludge composite particulate material during the disintegration process and initial condition values of model variables.

### 5.2.2.3 Model Calibration

COD fractionation into particulate proteins, carbohydrates, lipids and inerts of the sludge composite particulate material is one of the most critical steps when calibrating ADM1 for complex particulate substrates such as WAS. These stoichiometric coefficients are strongly correlated to the waste composition and intrinsic characteristics and, as a consequence, they have to be specified for each sludge. In the present study, particulate inerts from composites fraction,  $f_{Xi\_Xc}$ , was determined from the final measured biodegradability (*BD*) of each batch test. The remaining COD or inert fraction is *1-BD*. Since it is difficult to clearly distinguish between particulate and soluble inerts and since our objective is to analyze the dynamics of non-inert materials, it was decided for simplicity to set all inert material to the particulate variable and  $f_{Si\_Xc}$  was then taken equal to 0. The other stoichiometric coefficients (*i.e.*,  $f_{ch\_Xc}$ ,  $f_{pr\_Xc}$  and  $f_{li\_Xc}$ ) were determined from the measured carbohydrate, protein and lipid contents of the WAS. These concentrations were expressed as COD and the stoichiometric coefficients were directly determined from the ratio of the COD of each component over the total COD particulate concentration. The fractionation results are presented in the Table 5.1.

Another important critical step is well-define the values of initial conditions of the model variables. As already said, the values of initial dynamic state variables were directly obtained from the characterization of WAS. Table 5.1 presents the substrate characterization used to simulate each WAS digestion.

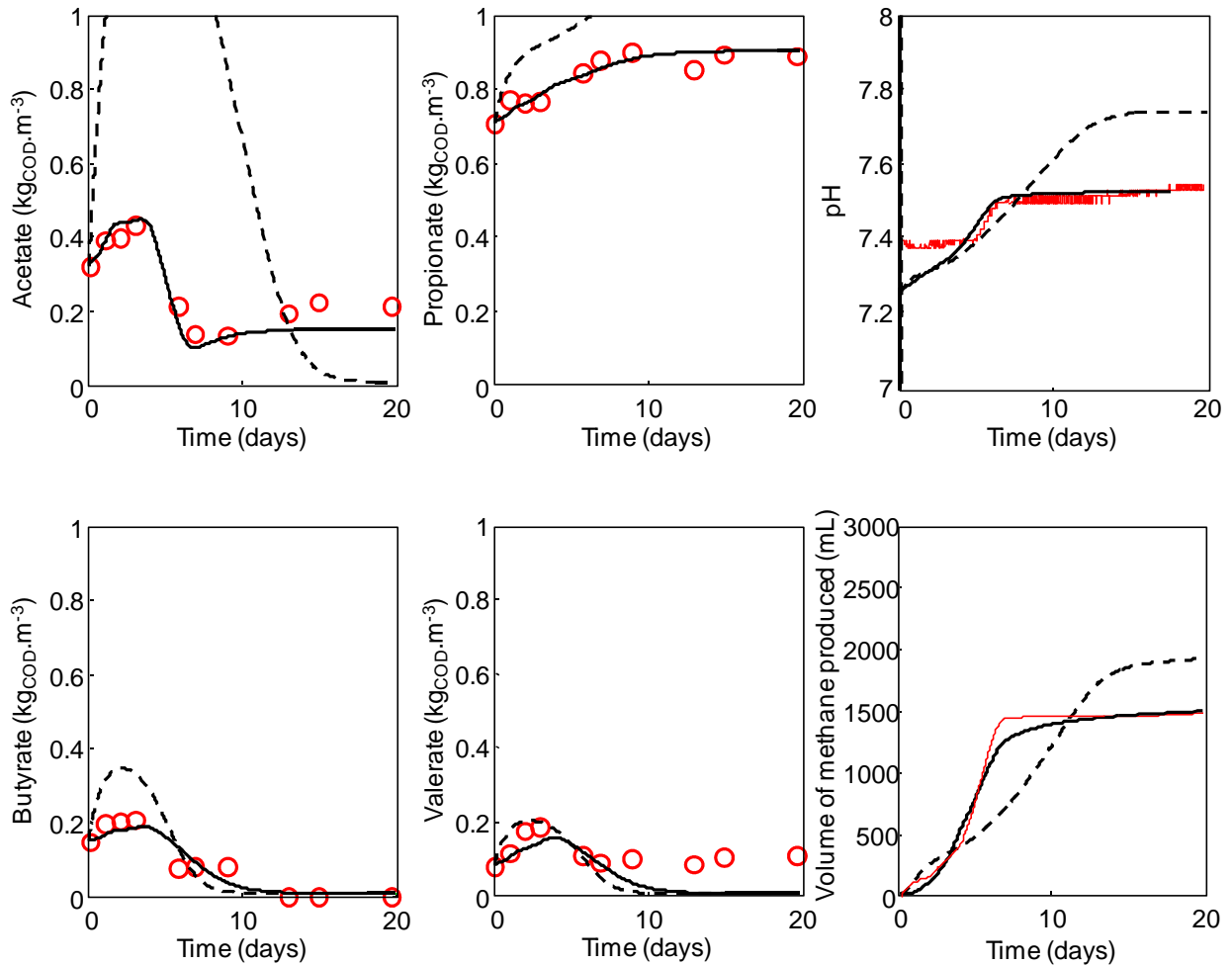
Total and individual VFAs, pH, cumulative methane and carbon dioxide production experimentally obtained using the untreated WAS were used to calibrate the model. Most parameters values were kept identical as those proposed originally by Batstone *et al.* (2002) except the stoichiometric coefficients of butyrate and valerate from amino acids (*i.e.*,  $f_{bu,aa}$  and  $f_{va,aa}$ ) that were respectively taken equal to 0.16 and 0.33 instead of 0.26 and 0.23. The decay rates (*i.e.*,  $k_{dec}$ ) of the different microorganisms were also modified from 0.04 to 0.01. Finally, the ammonia inhibition coefficients of the Hill function were the following:  $b = 1$ ,  $\alpha = 100$ ,  $K = 1.015$ ,  $S_{NH3,lim} = 6 \cdot 10^{-3}$ . The biochemical parameters and yield of biomass on substrate of the new process rates related to disintegration and hydrolysis were obtained by trial and error and are presented in Table 5.2.

Parameters	Composites	Carbohydrates	Proteins	Lipids
$k_m$	1.75	10	10	10
$K_S$	0.3	0.5	0.5	0.5
$k_{dec}$	0.01	0.01	0.01	0.01
$Y$	0.4	0.1	0.1	0.1

**Table 5.2:** Biochemical parameters and yield of biomass on substrate of the new process rates related to disintegration and hydrolysis.

As can be seen in Figure 5.1, modified ADM1 model simulations closely follow the dynamic evolutions of the different variables and they are improved when compared to standard ADM1 model simulations. The initial conditions were the same for both models and are indicated in Table 5.1 which were determined from experimental data obtained in this study.





**Figure 5.1:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for untreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1)

## 5.3 Results and discussion

### 5.3.1 Impact of thermal pretreatment on sludge solubilisation and biodegradability

A detailed description of the thermal pretreatment effects was presented in Chapter 4.

The main conclusions were that the optimal conditions of thermal pretreatment were obtained at 165°C. COD and VS solubilisations of 18 and 15 % and a biodegradability increase from 47 to 61 % were obtained. At 220°C, the production of slowly and hardly biodegradable compounds, like Amadori compounds and melanoidins, was observed which inducing a lower biodegradability than other sludge samples (42 %). The thermal hydrolysis at optimal conditions could minimise the limiting effect of hydrolysis due to a large solubilisation of organic matter, thus improved the availability of particulate organic matter and improved the

acetate production rate, inducing a better conversion of propionate to acetate that avoided propionate accumulation. Moreover, the study of degradation steps showed that the acetate and propionate were the most important intermediate products. Therefore, the proposed model has to well simulate by-product kinetics.

### **5.3.2 Model Application**

The behavior of the modified anaerobic digestion model has been compared to the one of the standard ADM1 (with the disintegration standard yield coefficients and initial conditions indicated in Table 5.1 which were determined from experimental data obtained in this study) and to experimental results in simulating the behavior of a batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated WAS. The calibration and the application of the model were only realised on the fourth successive batch experiment. Thus, an adaptation of the inoculum toward the substrate was performed. This adaptation was represented in the model by variations of the biomass concentrations between each WAS digestion.

#### **5.3.2.1 Availability of organic matter**

In order to represent the difference in availability of organic matter between untreated and pretreated WAS, initial concentration values for disintegration biomass used in the Contois model were lower in the untreated WAS than in the pretreated ones. For the raw sludge, a low concentration of disintegration biomass (i.e.,  $X_{xc} = 0.12$ ) was applied because a large quantity was in a particulate form leading to a slow acetate kinetic and a low quantity of acetate being produced. For the pretreated sludge at 110°C and 165 °C, the limiting effect of organic matter availability was less important, thus the concentrations of disintegration biomass was arbitrarily increased to 0.5. On the other hand, in order to account for the negative effects of further increase of temperature, the initial value of the disintegration biomass was set equal to 0.1 for the WAS pretreated at 200 °C.

#### **5.3.2.2 Representation of the incomplete degradation of acetate**

The ammonia inhibition function was also modified to account for the influence of temperature pretreatment:  $S_{NH_3,lim}$  was increased to  $4.5 \cdot 10^{-3}$  at 110 °C,  $5 \cdot 10^{-3}$  at 165 °C and  $5.2 \cdot 10^{-3}$  at 220 °C and, if  $b$  was kept equal to 1 for 110 and 165 °C pretreatment, it was decreased to 0.6 at 220 °C. Of course, this last value is not fully correct since it would mean that even at null ammonia concentration, inhibition is present. It thus account for the influence of other compounds (e.g., Amadori compounds and melanoidins) and should be here only considered as a way to keep the model as simple as possible, not trying to represent components that were not measured.

Concerning acetate evolution Schnürer and Nordberg (2008) showed that a shift, from the aceticlastic mechanism to the syntrophic pathway, occurs when the  $NH_4-N$  concentration increases above 3 g.L<sup>-1</sup>. In our case, this dual acetate-degrading population should not be present since ammonium concentration was around 500 mg.L<sup>-1</sup>. Acetate oxidation could also contribute to the total aceticlastic methanogenesis (Petersen and Ahring, 1991) but this pathway is usually considered as minor compared to aceticlastic methanogenesis and we

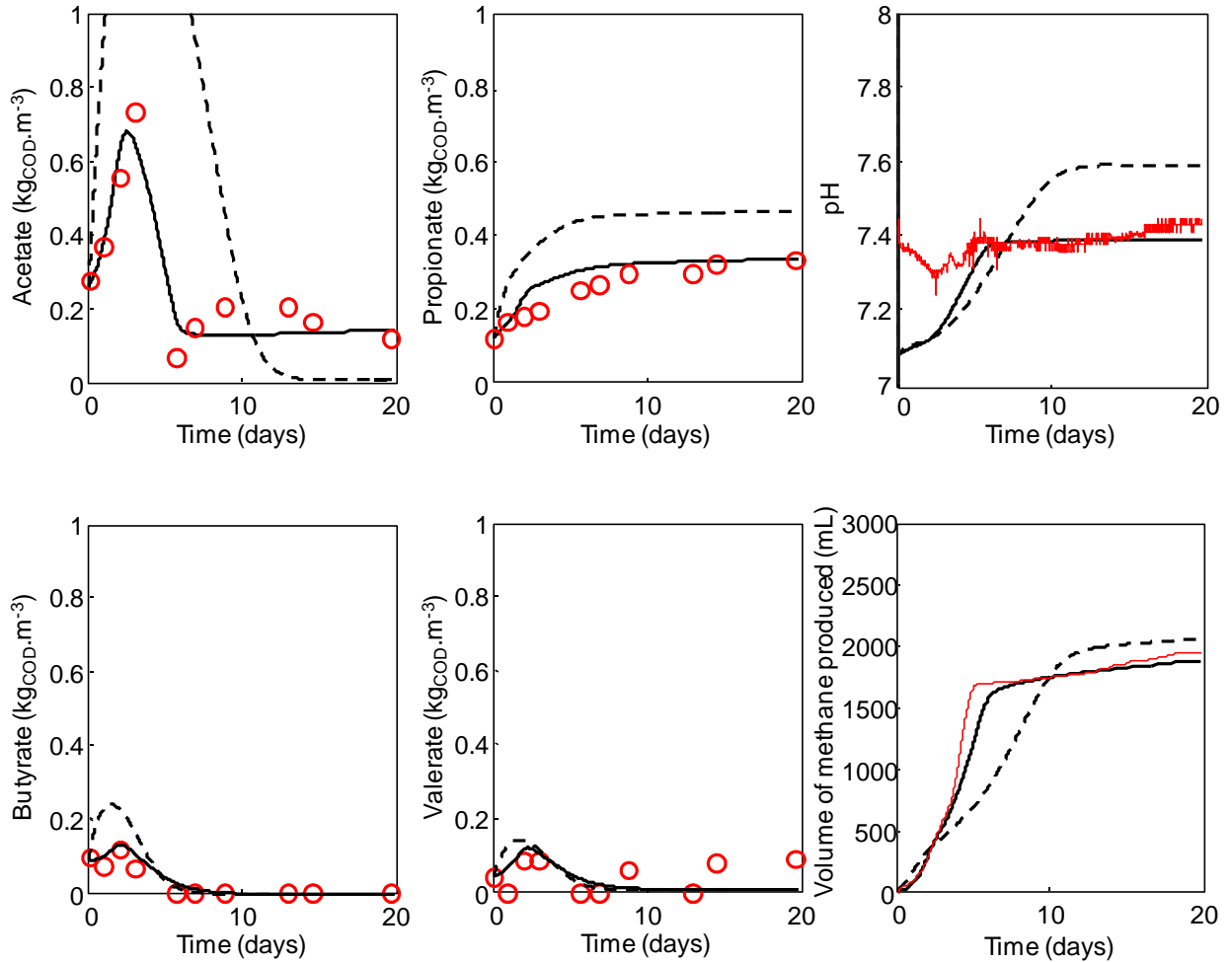
decided to ignore it, as done in ADM1. Finally, the homoacetogenesis may be significant under psychrophilic conditions (Rebac *et al.*, 1995) and so it was not considered in our study. As a consequence, the incomplete degradation of acetate and in some cases the second phase of acetate production was represented taking into account the free ammonia inhibition of aceticlastic methanogens. The Hill function was chosen this inhibition.

### **5.3.2.3 Modeling of experimental data**

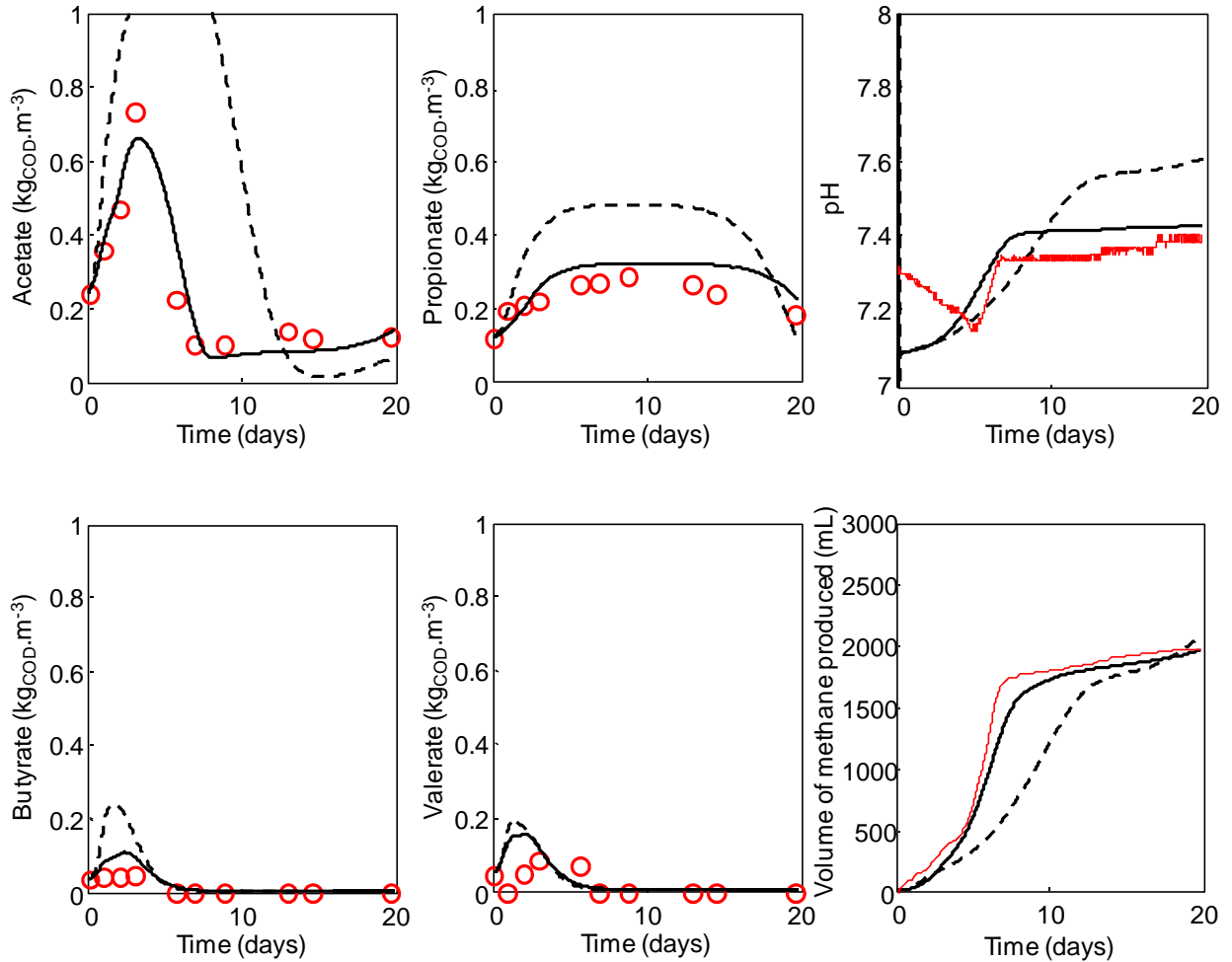
Besides these very few changes, all other parameters were strictly equivalent to those used to simulate the untreated WAS. Figures 5.2 to 5.4 display the simulated (with both models) and experimental results for the 110°C, 165°C and 220°C pretreated WAS. As can be seen, model simulations closely follow the dynamic evolutions of the main variables, in the liquid and but in the gas phases. The model predicts well the dynamics of the biogas production rate as a response of the pretreatment imposed. Small deviations in predicting the cumulative biogas production have been found. It appeared that the rate at which acetate is converted into methane is somewhat underestimated. This may have resulted from either underestimation of the substrate consumption coefficients for aceticlastic methanogenesis or from an overestimation of the inhibition of this activity by ammonia.

#### *5.3.2.3.1 pH*

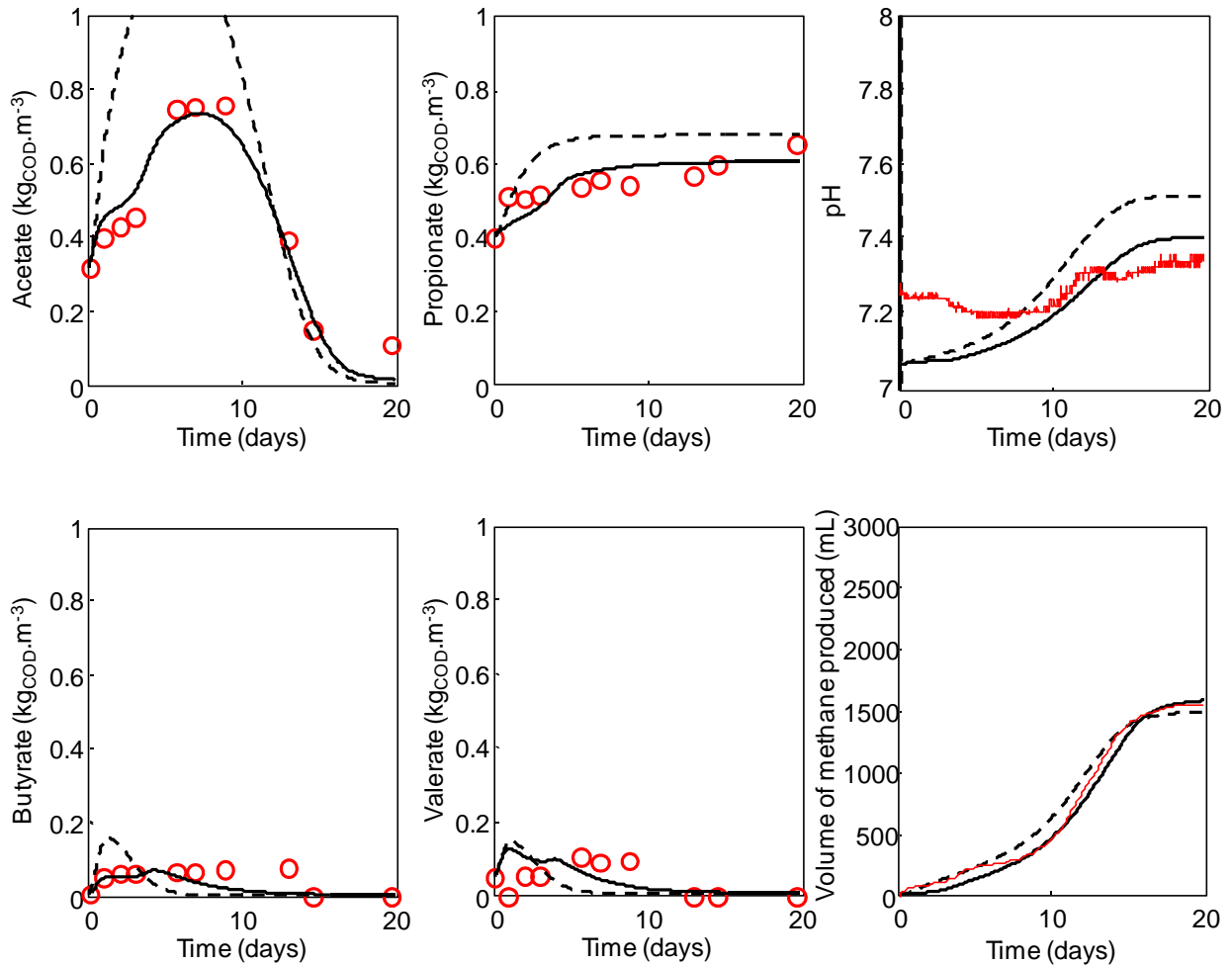
The pH model simulation was able to reflect the trends that were observed in experimental data. The pH prediction is closely related to the cation and anion concentrations in the reactor, and actually, the difference between the two concentrations. Since the input ion concentrations were not measured, it was calculated using the initial pH value and taking into account the initial concentrations of ammonia, alkalinity and ionised VFAs, in the reactor. The value of the input cation minus the input anion concentration from the reactor was arbitrarily increased in the model, so that the initial pH values were calibrated. For both untreated and pretreated WAS. The pH was in general in a range of 7.18-7.59, with the low values corresponding to periods where VFAs accumulate in the thermophilic batch reactors. In all cases, pH varies within c.a 0.3 units, even when the process was inhibited and the VFA accumulated. The relatively large resistance against pH changes was probably due to the reactor buffering capacity.



**Figure 5.2:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for 110°C pretreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1).



**Figure 5.3:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for 165°C pretreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1).



**Figure 5.4:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for 220°C pretreated WAS. Comparison of the proposed disintegration/hydrolysis model with standard ADM1 (red circles and thin plain line: experimental data points, black dashed thin line: standard ADM1, black thick plain line: modified ADM1).

#### 5.3.2.3.2 Propionate variations

The propionate accumulation reflected for both simulated and experimental data are in agreement with other investigations (Speece *et al.*, 2006). They showed that an accumulation of propionate is often present under thermophilic conditions in anaerobic digesters. From Figures 5.2 to 5.4, it is clear that until a temperature of 165°C, the propionate degradation is improved by the pretreatment. In fact, the thermal pretreatment reduced the limiting effect of the hydrolysis step by solubilising a large part of organic matter, which is then more available to the anaerobic microorganisms (Jolis, 2008). In the case of sludge pretreated at 165°C (Figure 5.3), the solubilised organic matter was directly degraded, allowing higher acetate and methane specific production rates, lower propionate accumulation and a higher quantity of degraded organic matter. As already said, in the 220°C pretreated WAS case, carbohydrates present in the soluble phase react with other components to form products slowly or hardly

biodegradable. It is interesting to note that propionate accumulation limited the final accumulated methane volume.

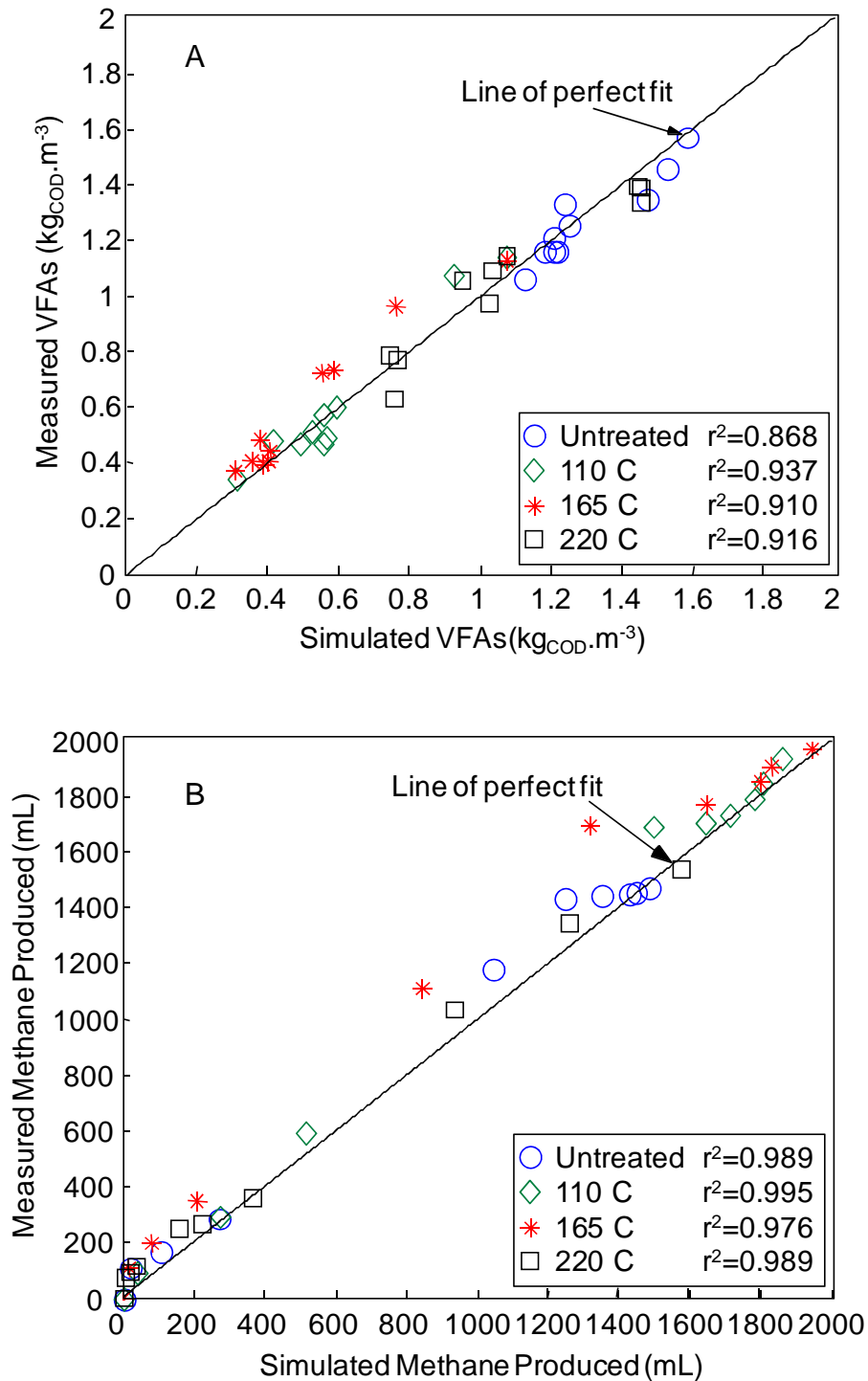
The acetate and propionate accumulations were due to an important limiting effect of the hydrolysis step. VFAs of higher molecular weights are degradation products of sugars and amino acids respectively and remain at low levels in all cases, meaning that they are rapidly consumed by acetogens bacteria. The individual VFAs and methane production experimentally observed were another sign showing the limitation of hydrolysis step because the maximal methane production and maximal acetate production were reached between day 4 and day 13. The modified model was also able to explain the dynamics of acetate accumulation obtained in the untreated and 110°C pretreated WAS, which was characterised by two peaks of acetate concentration and may be due to different hydrolysis rates for composites.

#### *5.3.2.3.3 Methane productions*

Total methane production increased with thermal pretreatment temperature. Nevertheless, no influence could be clearly observed on the kinetics of methane production for the different thermal pretreatment conditions. This can be explained by the conditions of BMP tests (notably low organic load) which are favorable to anaerobic digestion. For the sludge pretreated at 165°C, a low methane production was observed after day 10, arising from the slow degradation of propionate.

#### *5.3.2.3.4 Experimental data vs simulated data*

Figure 5.5 shows the agreement between the VFAs concentration and methane produced predicted by the modified ADM1 model and the measured VFAs concentration and measured methane produced respectively, from the untreated and pretreated WAS. The agreement between the predicted and measured values was statistically significant in both cases ( $\alpha \leq 0.005$ ), for each of the four WAS with correlation coefficients indicated as legends in Figure 5.5. If the overall data points are considered,  $r^2$  of 0.9431 and 0.9915 (at the same significance level) are obtained for VFAs concentration and methane produced respectively. This agreement contributes to validate the modeling approach as well as the sixteen model parameters established in this study.



**Figure 5.5:** Comparison between (A) measured VFA concentrations and simulated VFA concentrations (B) measured methane produced and simulated methane produced, for untreated and pretreated WAS. The simulation data come from modified ADM1 model.

#### 5.3.2.4 Discussion

In order to achieve accurate model predictions, it is important to define the properties of the sludge stream entering the digester. For organic substances, the ADM1 model defines these



inputs in terms of soluble and particulate COD. For sewage sludge, the main part of the organic loading is associated with the particulate COD. The particulate COD entering the digester is defined in terms of biodegradable ( $X_c$ ) and non-biodegradable components. Estimation of these parameters is often challenging for many data sets as in many cases the sludge COD is not reported and in almost all cases, the biodegradable fraction is not independently measured. Moreover, the value of  $X_c$  as such is not sufficient to precisely predict the amount of methane that will be produced. In our experiments, for example,  $X_c$  was equal to  $3.19 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  for the untreated sludge and to 3.44, 3.01 and  $2.01 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  for the thermally pretreated sludge at 110, 165 and 220 °C respectively whereas the maximum methane production was observed for the pretreatment at 165 °C. It is thus clear that the content of the composites in terms of carbohydrates, proteins and lipids – together with the availability of these substrates to the microorganisms – is at least as important as the concentration of composites in itself. As a consequence, if the model is to be used as an analysis and design tool, it would largely benefit from more careful characterization of these parameters. A standardised protocol for determining the anaerobically biodegradable fraction of the sludge COD would assist in this regard. The ammonia and total nitrogen concentrations present in both the feed and the inoculum also need to be precisely characterised because of their impact on pH buffering and inhibition functions.

Overall the modified ADM1 model (Contois kinetic) fitted the measured data better than standard ADM1 model (first-order kinetic) as shown in Figures 5.1 to 5.4. The trend and the goodness of fit of the modified ADM1 model were consistent throughout the full range of the tests. This finding supports the contention that the substrate-microorganism ratio ( $S_i/X_i$ ) may be a better limiting factor in the hydrolysis of particulate substrate, rather than the substrate concentration ( $S_i$ ) as modeled by the first-order reaction model. The results are in agreement with other studies that had used Contois model to describe anaerobic hydrolysis of particulate wastes. As an example Myint and Nirmalakhandan (2006) evaluated three of the more common hydrolysis models—the first-order model; the second-order model; and the surface-limiting reaction model (also known as Contois kinetic model), for their suitability in describing hydrolysis-acidogenesis of cattle manure residues. They found that the surface-limiting reaction model followed the trend of the measured data more closely and fitted the measured data slightly better than the other two models.

### 5.3.3 Conclusions

A slightly modified IWA ADM1 model for thermophilic anaerobic digestion of pretreated WAS was calibrated and validated using batch experimental data sets. From this work, the following conclusions can be drawn:

- The model was based on the following hypothesis: the disintegration and hydrolysis processes are described according to Contois model; the ammonia inhibition for acetoclastic methanogens can be represented according to the general Hill function,
- A parameter set of three disintegration biochemical parameters, nine hydrolytic biochemical parameters and four stoichiometric parameter values was included in this

modified model. Predictions by the model using the parameters established in this study agreed well with the data measured under different pretreatment conditions,

- The resulting model was able to explain the dynamics of acetate and propionate accumulations, pH variations and methane productions obtained in some batch experiments,
- Since hydrolysis has been recognized as the rate-limiting step in the anaerobic digestion of complex particulate substrates. Indeed, the effect of limiting-surface reaction involved by the Contois model allowed to well simulate all the experimental measurements. These findings can be of value in designing, monitoring, analyzing, and optimizing the WAS anaerobic digestion.

## 5.4 Discussion

Le modèle IWA Anaerobic Digestion Model n°1 (Batstone *et al.*, 2002) est un modèle mathématique performant, qui possède le grand avantage d'intégrer les interactions biophysico-chimiques se produisant entre les phases particulaire, liquide et gazeuse lors de la digestion anaérobie. Cependant, l'application de ce modèle à la digestion de composés organiques complexes tels que les boues d'épuration municipales fait apparaître deux limites : la détermination des variables initiales et des fractions de matières lors de l'étape de désintégration de la variable  $X_c$  et la vitesse de réaction utilisée pour représenter les étapes de désintégration et d'hydrolyse dans le modèle.

Grâce aux données expérimentales de dégradation anaérobie thermophile en condition batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée thermiquement à différentes températures, nous avons réussi à élaborer un modèle de simulation basé sur l'ADM1 capable de représenter le comportement des réacteurs. Tout en conservant, les processus réactionnels du modèle ADM1 de base, nous avons proposé une méthodologie pour implémenter les variables initiales et les rendements de désintégration et nous avons également modifié la réaction d'ordre un des étapes de désintégration et d'hydrolyse par une fonction de Contois pour une meilleure représentation de l'effet limitant de l'hydrolyse. Les nouveaux paramètres ont été calibrés grâce aux données expérimentales du suivi de la dégradation de la boue non traitée et ont été validés avec les données de dégradation des autres boues.

Les variables initiales du modèle nécessitent d'être correctement définies pour obtenir une représentation précise des performances des réacteurs. Le modèle modifié présente 28 variables initiales dont les valeurs correspondant à la caractérisation de la boue d'entrée sont présentées dans « *Table 5.1* » (Paragraphe 5.2.2.2). Elles permettent de définir le substrat en termes de concentrations en composés particuliers et solubles. La détermination des concentrations initiales s'est donc basée sur la caractérisation chimique et biochimique effectuée sur les échantillons de boues étudiées. Un fractionnement par centrifugation puis filtration à 0,45  $\mu\text{m}$  a été utilisé pour séparer les phases particulaire et soluble. Ensuite, des analyses biochimiques ont été effectuées sur chaque phase. Pour les boues étudiées, la matière organique est principalement sous forme particulaire. Ainsi, la variable  $X_c$  a été définie à

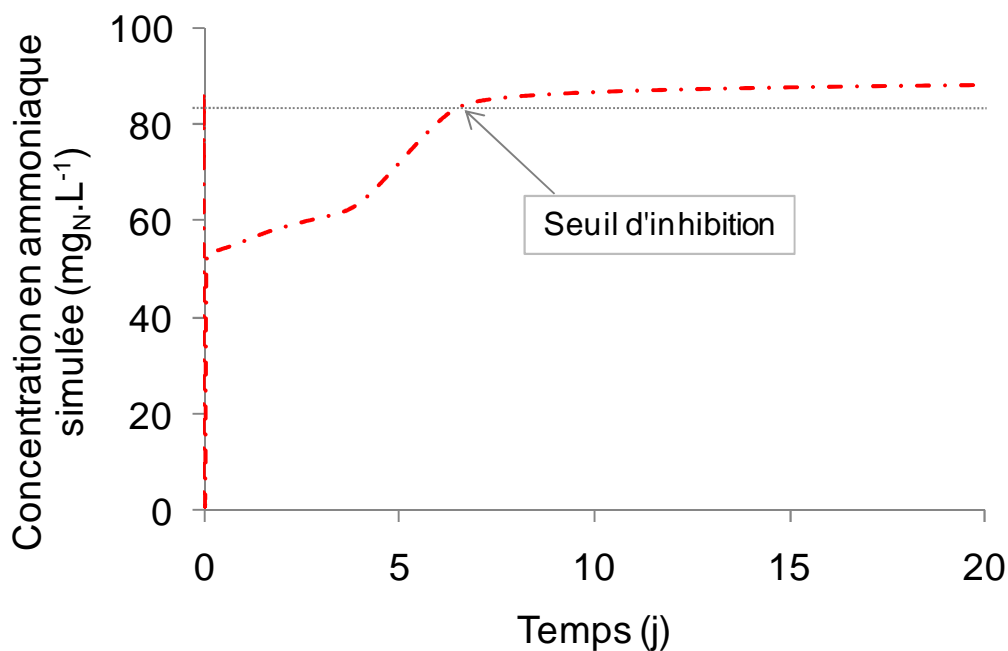
partir de la concentration en DCO particulaire mesurée dans l'échantillon. Cependant, les seules valeurs de  $X_c$  ne permettent pas d'expliquer les différences de performances observées sur chaque boue. En effet, les valeurs de  $X_c$  sont de 3,19, 3,44, 3,01 et 2,01  $\text{kg}_{\text{DCO}}\cdot\text{m}^{-3}$  pour la boue non traitée et prétraitée à 110°C, 165°C et 220°C respectivement, alors que la production spécifique maximale de méthane a été observée pour la boue prétraitée à 165°C. Cette matière particulaire est donc divisée en une fraction de matières biodégradables et en une fraction de matières non biodégradables. La définition de ces deux fractions dicte les résultats de simulation. Nous nous sommes basés sur les résultats des tests de dégradation anaérobie en condition batch pour déterminer la fraction de matière inerte soit  $f_{Xi\_Xc}$ . Les teneurs des différents composés biochimiques en phase particulaire sont également importants afin de déterminer les fractions de chaque composé. Ainsi, nous avons calculé  $f_{ch\_Xc}$ ,  $f_{pr\_Xc}$  et  $f_{li\_Xc}$  à partir de la mesure de la concentration en DCO de chaque composé biochimique sur la concentration en DCO particulaire. Les valeurs des fractions biochimiques se basent donc sur les caractéristiques intrinsèques du substrat, contrairement aux travaux actuels de modélisation qui se basent généralement sur les valeurs standards du rapport de l'IWA sur l'ADM1. Les variables initiales, caractérisant la phase soluble, doivent également être définies afin de représenter la solubilisation de la matière, induite par l'action du prétraitement thermique. Le protocole de caractérisation de la matière organique des boues d'épuration présenté dans les travaux de cette thèse permet donc de définir les variables initiales du modèle.

La nécessité de bien définir le substrat à traiter montre que la qualité de la matière organique à dégrader est un paramètre important à définir afin de représenter les performances de dégradation anaérobie. En effet, les composés présents n'ont pas les mêmes vitesses de dégradation et la même dégradabilité suivant leur disponibilité (soluble ou particulaire) et leur nature. Il n'est donc pas possible de représenter les performances à partir de la seule valeur de matière organique ou de DCO. La qualité de la matière organique est donc un indicateur pertinent des performances de dégradation anaérobie. Cependant, pour des composés complexes tels que les boues secondaires, l'organisation de la matière fait intervenir un phénomène d'accessibilité de la matière particulaire qui est mal représenté par la vitesse de réaction utilisée dans le modèle ADM1 standard au niveau des étapes de désintégration et d'hydrolyse.

Ainsi, nous avons modifié la vitesse de réaction d'ordre un pour les étapes de désintégration et d'hydrolyse par une fonction de Contois. L'introduction du rapport substrat sur biomasse ( $S_i/X_i$ ) permet de créer une notion de surface d'échange entre les microorganismes hydrolytiques et le substrat particulaire à dégrader. Les résultats présentés dans les « *Figures 5.1 à 5.4* » (Paragraphe 5.2.2.3 et 5.3.2.3) montrent que le modèle ainsi modifié représente mieux le comportement des différentes cinétiques de dégradation mesurées. Le rapport ( $S_i/X_i$ ) est un meilleur facteur limitant pour représenter l'hydrolyse de composés particuliers par rapport à une vitesse de réaction d'ordre un.

Lors de la simulation des dégradations anaérobies d'une boue secondaire non traitée et prétraitée thermiquement présentées dans ce chapitre, la fonction de Hill a été utilisée à la

place de la fonction non compétitive habituelle dans le but de représenter la dégradation incomplète de l'acétate. La Figure 5.6 présente l'évolution de la concentration en ammoniacque simulée par le modèle modifiée dans le cas de la boue non traitée thermiquement. Une augmentation de la concentration en ammoniacque de  $50 \text{ mg}_N.L^{-1}$  à  $88 \text{ mg}_N.L^{-1}$  au cours de la dégradation de cette boue est observée. Grâce à la fonction de Hill et à l'ajustement des données simulées avec les données expérimentales sur la dégradation de l'acétate, nous avons évalué le seuil limite de la concentration en ammoniacque à partir duquel l'inhibition sur la dégradation de l'acétate apparaît. La valeur était égale à  $6.10^{-3} \text{ kmol.m}^{-3}$  soit  $84 \text{ mg}_N.L^{-1}$ . Cependant, cette valeur d'inhibition par l'ammoniacque est faible. De plus, une concentration en ammoniacque inférieure à  $200 \text{ mg}_N.L^{-1}$  est généralement considérée comme bénéfique puisque l'azote est un nutriment essentiel aux microorganismes épurateurs (Liu et Sung, 2002). Chen *et al.* (2008) ont effectué une synthèse des seuils d'inhibition rencontrés dans les procédés de digestion anaérobie. Le seuil est compris entre  $1,7$  et  $14 \text{ g}_N.L^{-1}$ . Cette différence est expliquée par l'effet d'adaptation de la biomasse à des seuils élevés en ammoniacque. Ainsi, l'utilisation de la fonction de Hill semble ne pas être justifiée dans notre cas d'étude. Un suivi de la dégradation anaérobie thermophile en réacteur batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée à  $165^\circ\text{C}$  sur 45 j, a été effectué postérieurement aux données présentées dans l'article précédent afin de vérifier cette hypothèse. Les résultats ont ainsi confirmé une amélioration possible du modèle proposé.

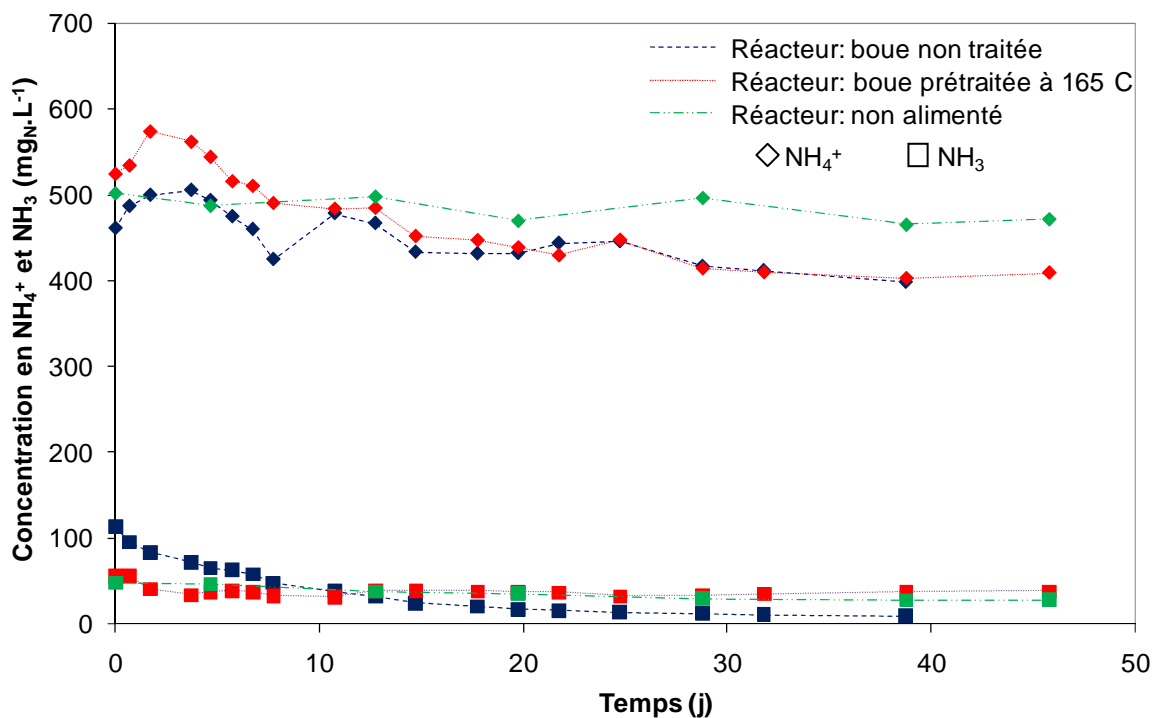


**Figure 5.6 :** Concentration en ammoniacque simulée par le modèle modifié ADM1 lors de la dégradation de la boue non traitée thermiquement.

En effet, lors des tests supplémentaires de dégradation, effectués sur 45 j, les concentrations en azote inorganique sous forme  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NH}_3$  ont été mesurées afin de vérifier l'hypothèse de l'utilisation de la fonction de Hill (Figure 5.7). Ainsi, trois nouveaux réacteurs ont été suivis : deux réacteurs dégradant une boue non traitée et prétraitée à  $165^\circ\text{C}$  et un réacteur témoin non

alimenté en substrat. Les résultats montrent une diminution de la concentration en ammoniacque au cours de la dégradation ce qui ne permet pas de valider une inhibition par l'ammoniacque des méthanogènes acétoclastes via l'utilisation de la fonction de Hill. L'inhibition par l'ammoniacque ne peut donc pas expliquer la dégradation incomplète de l'acétate. Pour la suite, il nous a paru préférable de réintégrer dans le modèle une fonction non compétitive à la place de la fonction de Hill.

Les variations en  $\text{NH}_4^+$  lors de la dégradation de la boue non traitée présentent deux phases distinctes de production puis de consommation. Ces variations sont dues à la production d'ammonium lors de la dégradation des protéines et à la consommation de l'ammonium par les microorganismes pour leur croissance. La première phase est comprise entre le début de l'expérience et le jour 9 puis une seconde phase entre le jour 9 et le jour 15, suivie d'une lente diminution jusqu'à la fin l'expérience. Les phases de production peuvent donc provenir de la dégradation de deux composés protéiques ayant des vitesses d'hydrolyse différentes et les phases de consommation correspondraient à la consommation de l'ammonium par les bactéries acidogènes, acétogènes et méthanogènes pour leur croissance. Dans le cas de la boue prétraitée à  $165^\circ\text{C}$ , la concentration initiale en  $\text{NH}_4^+$  est plus élevée ce qui est dû à l'étape de prétraitement thermique qui entraîne une désamination des acides aminés.



**Figure 5.7 :** Suivi des concentrations en  $\text{NH}_4^+$  et en  $\text{NH}_3$  sur 45 j dans deux réacteurs dégradant une boue secondaire non traitée et prétraitée à  $165^\circ\text{C}$  et un réacteur non alimenté en substrat.

La première phase semble montrer une vitesse de production en  $\text{NH}_4^+$  plus rapide par rapport à la boue non traitée et la deuxième phase ne montre pas d'accumulation, laissant supposer que la vitesse de production est égale à la vitesse de consommation. Le prétraitement thermique, qui permet de rendre la matière organique plus accessible, induit une quantité de matière dégradée plus importante lors de la première phase. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que la production de  $\text{NH}_4^+$  a été plus faible lors de la deuxième phase, expliquant donc qu'aucune accumulation de  $\text{NH}_4^+$  n'est observée. Ces observations confirment les résultats du Chapitre 4 (Paragraphe 4.3.2.2) qui ont porté sur l'étude des cinétiques de dégradation en condition batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée à 110°C, 165°C (selon deux modes) et 220°C. En effet, les variations en  $\text{NH}_4^+$  et des productions de méthane mettent en avant l'existence de deux flux de matières issues de la dégradation de composés particuliers ayant des vitesses d'hydrolyse différentes. La dégradation de la matière organique des boues secondaires est donc limitée par l'accessibilité de la matière particulaire.

Ainsi, le modèle proposé dans ce chapitre utilise une hypothèse incorrecte (basée sur l'inhibition par l'ammoniaque de la méthanogénèse acétoclaste) pour représenter la dégradation incomplète de l'acétate. Pour représenter les phénomènes d'accessibilité de la matière et améliorer la simulation des cinétiques de dégradation des boues secondaires, l'utilisation d'une simple variable  $X_c$  est une hypothèse trop simple. Une solution serait de représenter le substrat particulaire avec différentes fractions de matières organiques plus ou moins hydrolysables. La bioaccessibilité de la matière organique, imbriquée dans la structure complexe des boues secondaires, pourra ainsi être mieux représentée. Yasui *et al.* (2008) ont récemment montré que la dégradation anaérobie en condition batch de boues primaires présente deux pics distincts de production de méthane. Ils ont associé le premier pic à la dégradation de composés facilement hydrolysables et le second pic à la dégradation de composés plus difficilement hydrolysables. Cependant, leur modèle ne permet pas de simuler l'ensemble des données disponibles avec l'ADM1 comme par exemple, les AGV ou encore la biomasse. Nous allons donc proposer, dans le chapitre suivant, un modèle basé sur l'ADM1 intégrant deux fractions de composés ayant des vitesses d'hydrolyse différentes : une fraction facilement hydrolysable ( $X_{cr}$ ) et une fraction difficilement hydrolysable ( $X_{cs}$ ).

Chapitre 6: Modélisation des performances  
de digestion anaérobie thermophile :  
introduction de la bioaccessibilité de la  
matière particulaire dans un modèle  
ADM1 modifié





## Chapitre 6. Modélisation des performances de digestion anaérobie thermophile : introduction de la bioaccessibilité de la matière particulaire dans un modèle ADM1 modifié

### Résumé

La structure de la matière organique des boues secondaires, agencée en couches successives, introduit la notion de bioaccessibilité de la matière particulaire. Ce paramètre influe grandement sur les performances de la dégradation anaérobie des boues. Les études de caractérisation et de dégradation des boues secondaires ont confirmé la présence de fractions de matière plus ou moins accessibles. Or dans le modèle ADM1, le composé particulaire initial est considéré comme un substrat homogène avec la même vitesse de désintégration. Afin d'améliorer la représentation de la dégradation anaérobie des boues secondaires, nous avons introduit la notion de bioaccessibilité en intégrant deux variables, permettant de représenter une fraction de matière organique particulaire rapidement hydrolysable  $X_{cr}$  et une fraction de matière organique particulaire lentement hydrolysable  $X_{cs}$ . Le modèle de Contois pour représenter les étapes de désintégration et d'hydrolyse a été conservé afin d'introduire les limitations de transfert de matières dues à des surfaces d'échanges limitées qui sont rencontrées lors de la colonisation de la surface du composé particulaire par la biomasse hydrolytique.

Une nouvelle structure du modèle mathématique ADM1 a donc été proposée. Elle intègre les deux variables supplémentaires :  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$ . La fonction non-compétitive a été réintroduite dans le modèle à la place de la fonction de Hill. En effet, des mesures expérimentales supplémentaires ont montré que l'hypothèse proposée dans le Chapitre 5, basée sur l'apparition d'une inhibition par l'ammoniac de la méthanogénèse acétoclaste au cours de la dégradation, était inappropriée.

La phase de calibration des paramètres cinétiques de ce nouveau modèle a été réalisée sur les quatre tests successifs de digestion anaérobie thermophile en condition batch de la boue secondaire non traitée. La stratégie de modélisation s'est basée sur la définition des variables initiales à partir de la caractérisation du substrat, sur l'évolution des concentrations en biomasse prédites par le modèle au cours des tests successifs et sur une légère modification des paramètres cinétiques entre chaque test.

La phase de validation réalisée sur les données expérimentales des quatre batch successifs de dégradation anaérobie de la boue secondaire prétraitée thermiquement à 110°C, 165°C (selon les deux modes) et 220°C a permis de valider la nouvelle structure du modèle et l'approche de

modélisation. A partir de ces résultats, le modèle a été utilisé comme un outil de compréhension afin d'étudier les vitesses de dégradation des principales étapes de conversion de la matière.

Un digesteur pilote thermophile en condition continue, installé sur un site industriel de Veolia Eau, a permis de réaliser un suivi des performances sur une trentaine de jours afin de tester le modèle et les paramètres cinétiques estimés. Les simulations obtenues ont permis de représenter le comportement de différents paramètres du digesteur en réponse à la variation du débit d'alimentation. Les résultats ont également confirmé l'importance de représenter la bioaccessibilité de la matière grâce à l'introduction de variables d'entrée définissant la fraction composite en deux fractions ayant des vitesses de dégradation différentes.

Basé sur:

**Mottet A., Jimenez J., Ramirez I., Carrère H., Déléris S., Vedrenne F., Steyer J.P.** Two Distinct Organic Matter Fractions for Waste Activated Sludge Applied in a Modified ADM1 Disintegration/Hydrolysis Structures. (En préparation).

## 6.1 Introduction and objectives

### 6.1.1 Introduction

#### 6.1.1.1 A new implementation of WAS particulate fraction in ADM1 model

The waste activated sludge (WAS) is an embedded structure that includes several types of organic and inorganic compounds, such as extracellular polymeric substances (EPS), bacteria, multivalent cations (Nielsen *et al.*, 2004). Jorand *et al.* (1995) proposed a floc model where the structure is composed of three levels of microflocs linked by EPS. They obtained this result by using optimised sonication to disintegrate the flocs. Initially, 44 % of the particle size in raw sludge varied between 68.3 and 183  $\mu\text{m}$ . The main particle size in raw sludge was 125  $\mu\text{m}$ . The first organic matter fraction is readily extractable by a sonication treatment of 30 s and is composed of proteins, carbohydrates, that could suggest that this matter is readily accessible by the anaerobic biomass. After 30 s sonication, the particle size strongly decreased to main sizes of 13 and 2.5  $\mu\text{m}$ . Then, few system changes were observed after 90-120 s sonication. Finally, after 240 s sonication, the population with 13  $\mu\text{m}$  particle size decreased, accompanied by a further increase in the population with 2.5  $\mu\text{m}$  particle size. The three levels of microflocs were 2.5, 13 and 125  $\mu\text{m}$ . Thus, Jorand *et al.* (1995) succeeded to show that the organic matter which constitutes WAS is organised in several levels inducing notion of particulate matter bioaccessibility.

Moreover, this structure which brings the matter more or less accessible to anaerobic microorganisms, impacts the anaerobic degradation performances. Siegrist *et al.* (2002) observed, after stopping sewage sludge feed of a continuously fed laboratory digester, two gas production profiles: a first gas production within hours from a readily degradable form and a second gas production from a slowly degradable form. Thus the complex structure of the organic matter of WAS involves different degradation rates in function of the matter accessibility.

Myint and Nirmalakhandan (2006) already incorporated similar fractions in their model for the anaerobic hydrolysis of cattle manure and they based this feature on the same observations. Indeed, they observed that the COD solubilization curve consisted of two distinct segments. Moreover in a study of digestion of primary sludge Yasui *et al.* (2008) found that anaerobic batch degradation of fresh primary sludge showed a complex MPR curve marked with two well-defined temporal peaks. The first immediate peak was associated with the degradation of relatively readily hydrolysable substrates, while the second delayed peak was associated with the degradation of large-sized particles. However they simplified ADM1 model structure with respect to soluble components and active biomass, so from their model we cannot obtain neither individual VFAs nor total VFAs nor individual biomass for example.

### 6.1.2 Objectives

As suggested by Yasui *et al.* (2008), the particulate matter of sludge sample can be divided into two substrates: a readily hydrolysable and a large-sized slowly hydrolysable. The aim of

this study is therefore to propose a fractionation of particulate in WAS and to use it as input variable of ADM1 in order to better represent the bioaccessibility notion. The modified model presented in Chapter 5 was used for developing this new feature. Thus, the Contois model was kept for describing the disintegration and the hydrolysis steps. However, the Hill function for the acetate inhibition by ammonia was replaced by a non-competitive function. The dynamics of VFAs, pH and methane production obtained from five different batch thermophilic anaerobic digestion of untreated and thermally pretreated WAS through four successive feeds were used to calibrate and to validate the proposed model. A model validation was also carried out in continuous condition from thermophilic pilot scale digester.

## **6.2 Methodology**

### **6.2.1 Experimental approach**

#### **6.2.1.1 Thermal pretreatments and batch anaerobic digestion**

The experimental data used in this Chapter to calibrate and to validate the proposed model were similar to the data presented in Chapter 4 (Sections 4.3). The detailed analytic methods are presented in the Chapter 2 (Sections 2.3.2, 2.4 and 2.5).

Contrary to the model calibration used in Chapter 5, the four batch experiments carried out on untreated WAS samples were used. Only, the fourth one was used in the previous model. The other four successive batch tests run for pretreated WAS at 110, 165 (electric and steam modes) and 220°C were used to validate model calibration.

#### **6.2.1.2 Pilot scale continuous digestion**

A pilot scale anaerobic digester of 8 m<sup>3</sup> running in thermophilic condition with a standard SRT of 8 days was also used for model validation. The digester was continuously fed with the same untreated WAS which was used during the study of degradation batch kinetics of untreated and thermal pretreated sludge samples. For the study, the digester was precisely monitored during 30 days. The input WAS was characterized three times per week in accordance to the characterization procedure used in model calibration in Chapter 5. The measured parameters were: concentrations of soluble and total COD, proteins, carbohydrates, particulate lipids, individual VFAs and inorganic carbon and nitrogen. For the output parameters, the biogas production and quality (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>), pH, individual VFAs and total COD were monitored and recorded. Initially, the SRT was 8 days and was maintained at this value until 12 days of experiment. Then, it was changed in the range of 4 and 16 days in order to observe the model dynamic behavior to a system perturbation and test the robustness of the model.

## 6.2.2 Model development

### 6.2.2.1 Model structure

#### 6.2.2.1.1 Structure based on modified ADM1 model

The model structure used in this work was based on the modified model presented in Chapter 5. This model was elaborated from the ADM1 model (Batstone *et al.*, 2002).

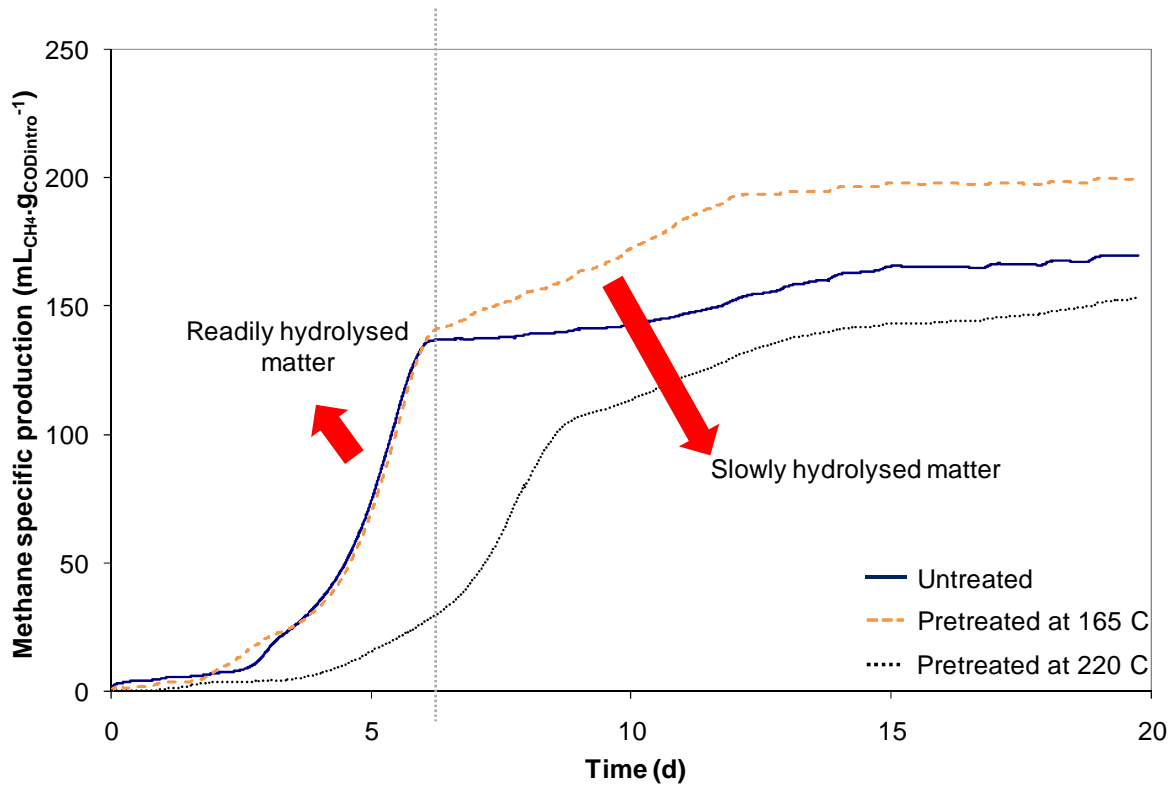
The reactions such as hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis are identical to those present in the model proposed in Chapter 5. In order to better represent the hydrolysis limiting effect of WAS anaerobic digestion, we integrated the Contois model to represent the disintegration and hydrolysis steps as described in detail in Chapter 5 (Section 5.2.2.1.1).

However, we showed that the Hill function for modeling the aceticlastic methanogenesis inhibition by ammonia was not appropriated since experimental data of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NH}_3$  did not validate this approach. Moreover, the inhibition threshold varied from  $4.5 \cdot 10^{-3}$  to  $6 \cdot 10^{-3} \text{ kmole}_N \cdot \text{m}^{-3}$ . These values were very low and were not in agreement with the literature (Chen *et al.*, 2008). The Hill function was thus changed by the standard non-competitive form.

In the modified model, three coefficients of liquid/gas transfers were used, one for each gas:  $k_{La_{\text{CH}_4}}$ ,  $k_{La_{\text{CO}_2}}$  and  $k_{La_{\text{H}_2}}$  for methane, carbon dioxide and hydrogen respectively. This was described in Chapter 5 (Section 5.2.2.1.3).

#### 6.2.2.1.2 Two different hydrolysable fractions of particulate organic matter

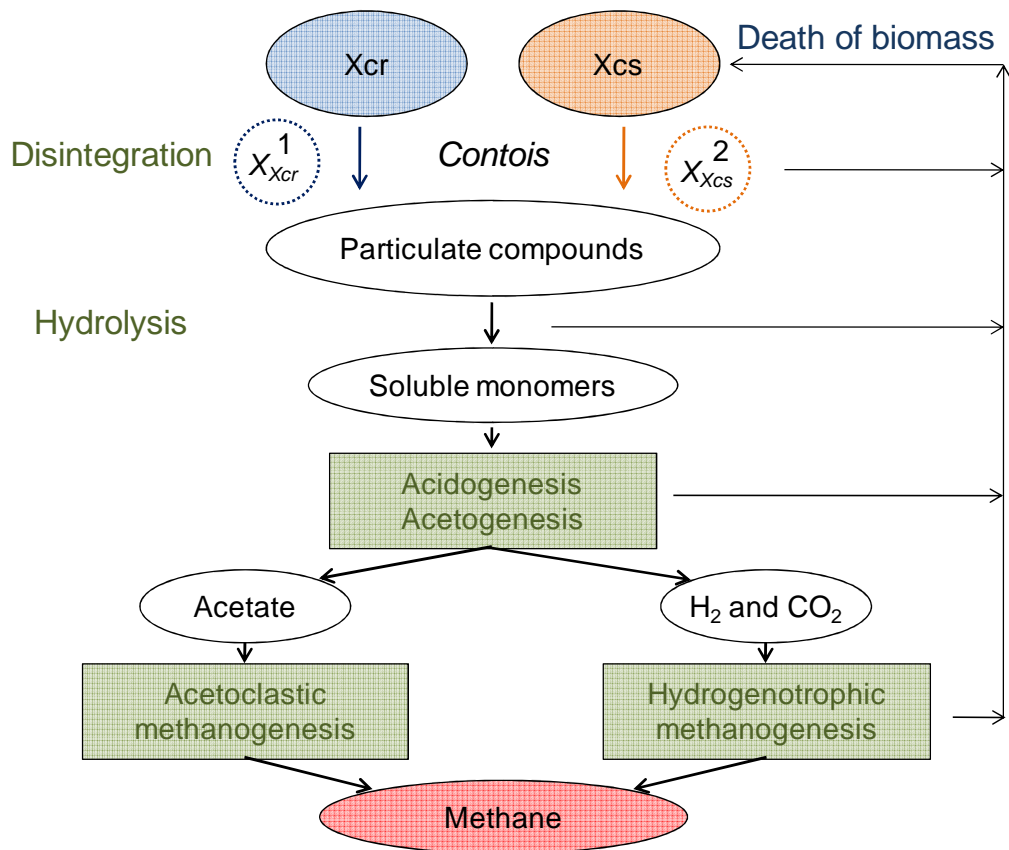
The previous experimental data, presented in Chapter 4 (Section 4.3.2.2) and Chapter 5 (Section 5.4), on the methane and inorganic nitrogen variations, showed two distinct phases of production between around day 0 to day 6-9 and day 6-9 to day 12-15. The Figure 6.1 presents the methane production from WAS untreated and pretreated at 165°C and 220°C monitored during the second feed of batch reactors (data from Chapter 4, section 4.3.2.2). In the case of untreated and pretreated at 165°C WAS, the methane production showed two phases: the first production phase from day 1 to day 6 corresponds to the degradation of readily hydrolysable organic matter, the second production phase from day 6 to day 12 corresponds to the degradation of slowly hydrolysable organic matter. Thanks to the thermal pretreatment, the slowly hydrolysed organic matter concentration was higher and the uptake rate of the slowly hydrolysable organic matter was improved. Indeed, at a standard sludge retention time of around 15 d, usually applied in full scale digester, the methane specific production was equal to  $198 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gCOD}_{\text{intro}}^{-1}$  for the WAS thermally pretreated against  $166 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gCOD}_{\text{intro}}^{-1}$  for the untreated WAS. With the thermal pretreatment, the organic matter therefore became more accessible that improved the uptake rates and decreased the quantity of slowly hydrolysable organic matter. At 220°C, the production of hardly and slowly biodegradable compounds as melanoidins, strongly decreased the uptake rates of the two hydrolysable organic matter fractions. The final methane production was also decreased.



**Figure 6.1:** Methane specific production of WAS untreated and pretreated at 165°C and 220°C during the second feed of batch reactors (data from Chapter 4).

Thus, the WAS structure brings more or less accessible organic matter to the anaerobic biomass. In the proposed model, the initial variable  $X_c$  is divided into two different fractions: a readily hydrolysable fraction  $X_{cr}$  and a slowly hydrolysable fraction  $X_{cs}$ . Then, each fraction is degraded into particulate proteins  $X_{pr}$ , carbohydrates  $X_{ch}$  and lipids  $X_{li}$ , and into particulate and soluble inert fractions. The Contois function is used to represent the disintegration reaction which is associated to hydrolytic biomass:  $X_{X_{cr}}$  for the degradation of readily hydrolysable fraction and  $X_{X_{cs}}$  for the degradation of slowly hydrolysable fraction. The disintegration COD fractions of the proposed model are illustrated in Figure 6.2.

To summarise, the new structure of the disintegration step involves some additional parameters: six disintegration biochemical parameters of  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ :  $k_{m,X_{cr}}$ ,  $K_{S,X_{cr}}$ ,  $k_{dec,X_{cr}}$ ,  $k_{m,X_{cs}}$ ,  $K_{S,X_{cs}}$ ,  $k_{dec,X_{cs}}$  and two stoichiometric parameters:  $Y_{X_{cr}}$ ,  $Y_{X_{cs}}$ . These additional process rates of the modified ADM1 can be found in appendix I, where only disintegration, hydrolysis and decay reactions are described.



<sup>1</sup> Hydrolytic biomass associated to the disintegration step of readily hydrolysable fraction

<sup>2</sup> Hydrolytic biomass associated to the disintegration step of slowly hydrolysable fraction

**Figure 6.2:** COD flows for a particulate substrate in dual-pathway disintegration modified ADM1 model structure.

### 6.2.2.2 Implementation of initial variables

The modeling of anaerobic degradation of the untreated and pretreated sludge samples was carried out on the four successive batch experiments. Initial condition values of the model variables were obtained from the characterization methods applied on WAS samples as already presented in Chapter 5 section 5.2.2.2.

#### 6.2.2.2.1 Fractionation of $X_c$

In our approach, the particulate organic matter was assumed to be initially present in the both fractions of composite  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ . The concentrations of organic matter present in each fraction were determined from the methane production curves. The content of particulate organic matter involved in the readily hydrolysable fraction is calculated from the produced methane volume during the first phase divided by the produced total methane volume. Then, the content of particulate organic matter involved in the slowly hydrolysable fraction was similarly determined from the produced methane volume during the second phase.

For instance, in the case of the second batch test with the untreated sludge (Figure 6.1), the first phase of methane production represented 78 % of total produced methane and the second

phase production represented 22 % of total produced methane. The fed particulate COD which was equal to  $3.9553 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$ , is divided into  $X_{cr}$  equal to  $3.0851 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  and  $X_{cs}$  equal to  $0.8702 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$ .

Then, the COD coming from  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  were fractionated following yield coefficients into proteins, carbohydrates, lipids and inerts. These parameters are strongly correlated to the sludge composition and intrinsic characteristics and, as a consequence, they have to be specified for each sludge. However, it is difficult to clearly determine the COD fractions coming from  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ . We assumed that the  $X_{cr}$  yield coefficients, *i.e.*  $f_{ch\_Xcr}$ ,  $f_{pr\_Xcr}$ ,  $f_{li\_Xcr}$  and the  $X_{cs}$  yield coefficients  $f_{ch\_Xcs}$ ,  $f_{pr\_Xcs}$ ,  $f_{li\_Xcs}$ , were equal and were calculated from the particulate carbohydrate, proteins and lipids content of the WAS. The yield coefficients were directly worked out from the ratio of the COD concentration of each component over the total COD particulate concentration. The inert composite fractions from  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ , *i.e.*  $f_{Xi\_Xcr}$  and  $f_{Xi\_Xcs}$ , were also assumed to be equal since it was not possible to determine the inert matter in the readily and in the slowly hydrolysable fractions. The particulate inerts yield coefficients were determined from the final measured biodegradability (*BD*) of each batch reactor test. The inert fraction is  $1-BD$ . Since our objective is to analyze the dynamics of non-inert materials, it was decided for simplicity to set all inert material to the particulate variable and  $f_{Si\_Xcr}$  and  $f_{Si\_Xcs}$  were taken equal to 0. The hypothesis was used in Chapter 5. The results are presented in Table 6.1.

Yield of product on substrate ( $\text{kg}_{\text{COD}}\cdot\text{kg}_{\text{COD}}^{-1}$ )	WAS	WAS	WAS	WAS
	Untreated	Untreated	Untreated	Untreated
	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 4
$f_{Si\_Xcr} / f_{Si\_Xcs}$	0.0	0.0	0.0	0.0
$f_{Xi\_Xcr} / f_{Xi\_Xcs}$	0.383	0.486	0.528	0.606
$f_{ch\_Xcr} / f_{ch\_Xcs}$	0.132	0.132	0.119	0.096
$f_{pr\_Xcr} / f_{pr\_Xcs}$	0.314	0.217	0.206	0.160
$f_{li\_Xcr} / f_{li\_Xcs}$	0.171	0.165	0.147	0.138

**Table 6.1:** Yield of product on substrate determined from experimental data through the four successive degradation batch tests with untreated WAS.

#### 6.2.2.2.2 Implementation of soluble initial variables

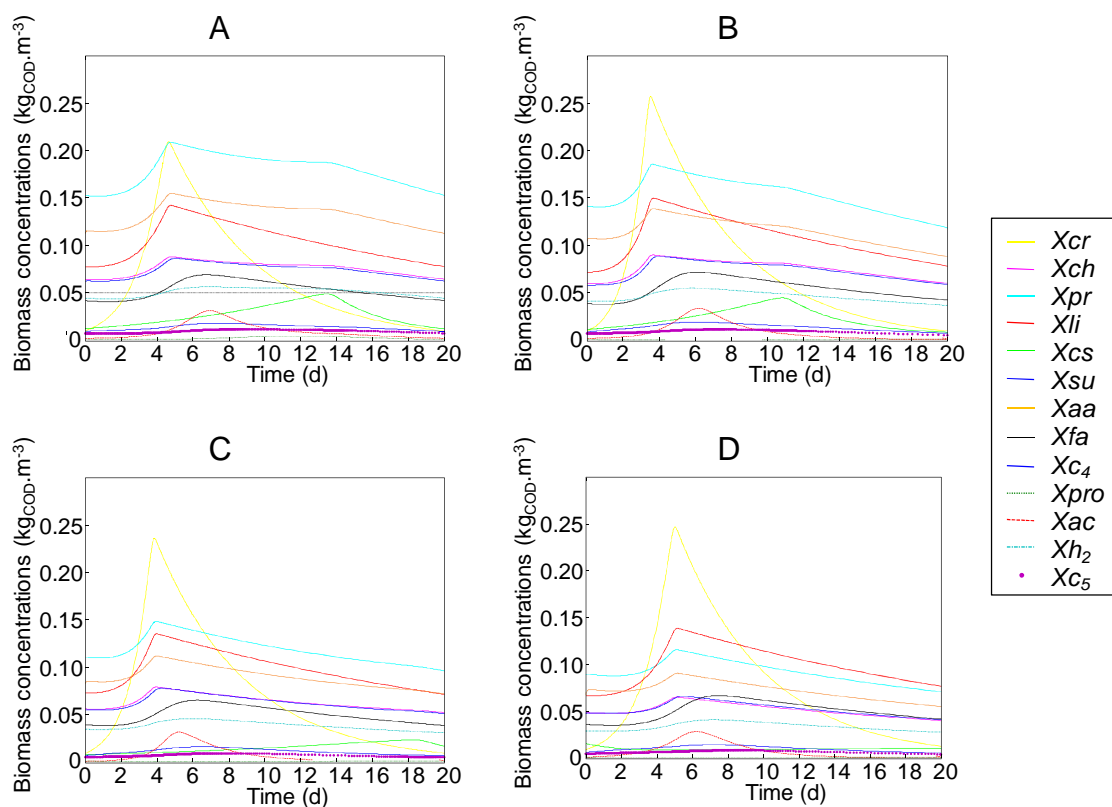
For the soluble fraction, initial values of  $S_{su}$  and  $S_{aa}$  were taken equal to the measured sugar and amino acids concentrations at time  $t = 0$ . The initial values for the different VFAs (*i.e.*,  $S_{acs}$ ,  $S_{pro}$ ,  $S_{bu}$  and  $S_{va}$ ) were also obtained from the measurements performed just after feeding the reactor. The pH was calculated from the ionised forms of VFAs, bicarbonate, ammonia and cation/anion concentrations. Ammonia ( $S_{IN}$ ) and bicarbonate ( $S_{IC}$ ) were measured by Kjeldahl method and TOCmeter, respectively. Anion concentration ( $S_{an}$ ) was taken equal to  $S_{IN}$  according to Rosen and Jeppsson (2002) and cation concentration ( $S_{cat}$ ) was adjusted in each case according with experimental pH. Initial values of the different biomass concentrations were determined to fit to the VFAs curves obtained from each batch reactor.



Thus the initial conditions of the four successive batch tests were based on the characterization of WAS samples and reactor composition.

### 6.2.2.2.3 Implementation of biomass initial variables

The biomass initial variables are key parameters in the implementation of ADM1. In the literature, the determination of biomass initial concentrations is usually not explained. In this work, thirteen anaerobic biomass were present and determined from a strategy which is based on the bacterial growth in batch culture. In batch condition, microorganisms have a typical growth curve which is represented by a latency period, an exponential growth phase, a stationary phase and a death phase. Thus, during the modeling of each batch test, the biomass concentrations variations must have the same growth curve as the bacterial growth.



**Figure 6.3:** Simulated biomass concentrations for untreated WAS through the four successive batch tests (A: batch test 1; B: batch test 2; C: batch test 3; D: batch test 4).

In the first degradation batch of untreated sludge, the biomass initial values were arbitrarily chosen. Several simulations of this first batch were carried out until to obtain a typical bacterial growth and similar values between the initial and final biomass concentrations. Then, the final biomass concentrations of the first batch test were used as initial biomass concentrations for the second batch test. We similarly performed for the next batch tests, i.e. the batch test 3 and 4. Thus, the biomass values through the modeling of each batch test were predicted by the model. Their variations were dependent on the operating conditions and substrate composition. The behavior of biomass concentrations for untreated WAS through the four successive batch test are illustrated in Figure 6.3.

## 6.3 Model calibration

### 6.3.1 Procedure

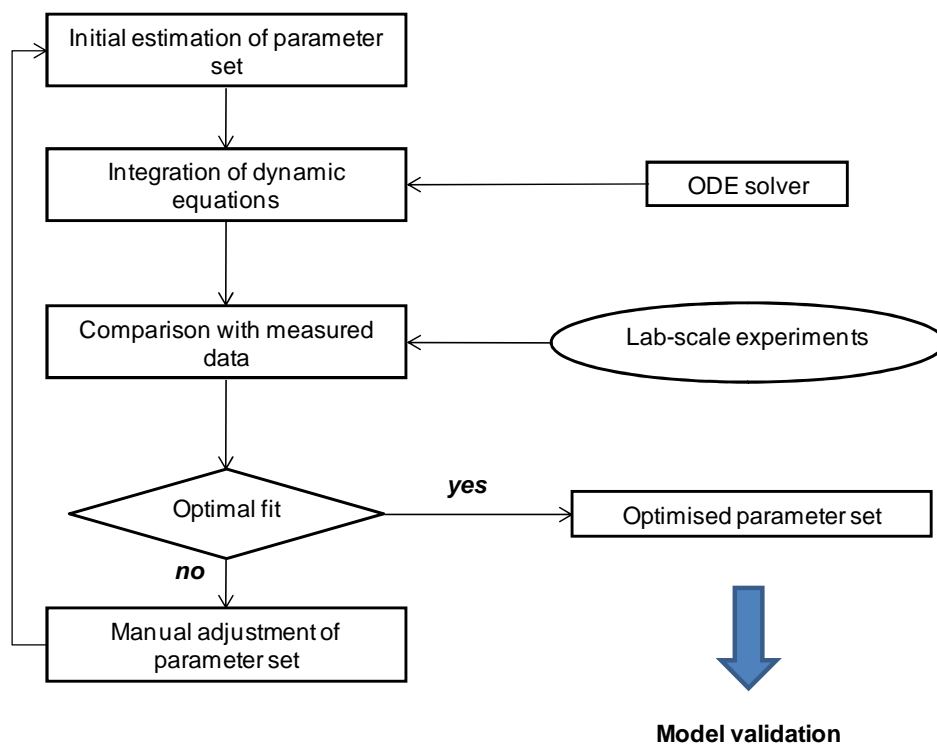
The model calibration was carried out with the experimental data of the four degradation batch tests of untreated sludge. The data of individual VFAs, pH, cumulative methane production were used.

The disintegration yield coefficients were calculated from the characterisation of WAS samples. Initially, most kinetics parameters were taken from those obtained from the modified model proposed in Chapter 5 which was based on the IWA Scientific and Technical Rapport (STR) standard values.

#### 6.3.1.1 Heuristic method for model calibration

Twenty one new kinetic parameters were introduced in this proposed model compared with the standard ADM1 model and eight new parameters compared with the model proposed in Chapter 5 (Table 6.2). Initially, the parameter values were in agreement with those proposed in Chapter 5.

According to Blumensaat and Keller (2005), a heuristic method procedure was applied to optimise the parameters values of the modified model (Figure 6.4). The values of kinetic parameters were reevaluated by fitting the simulated data with the measured data.



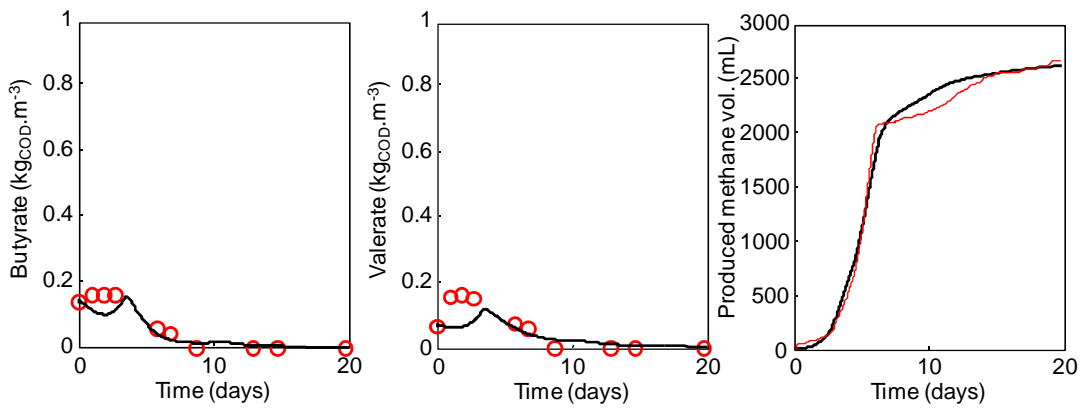
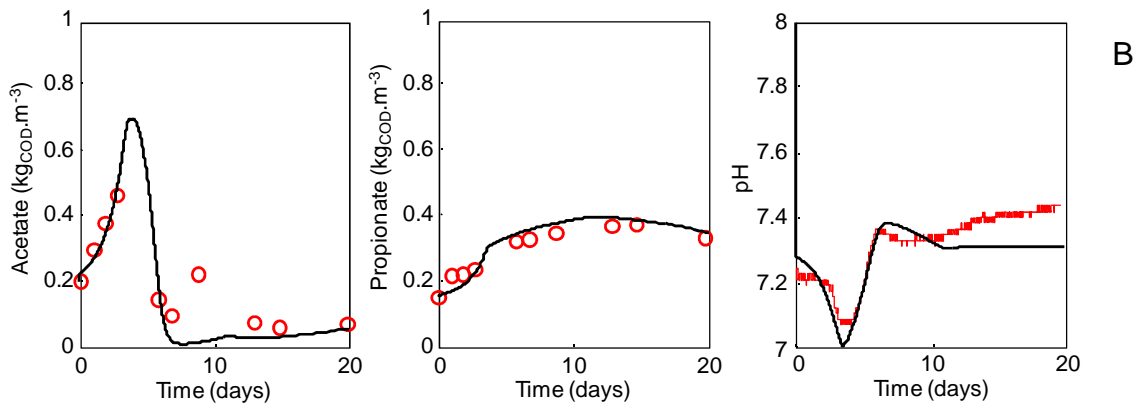
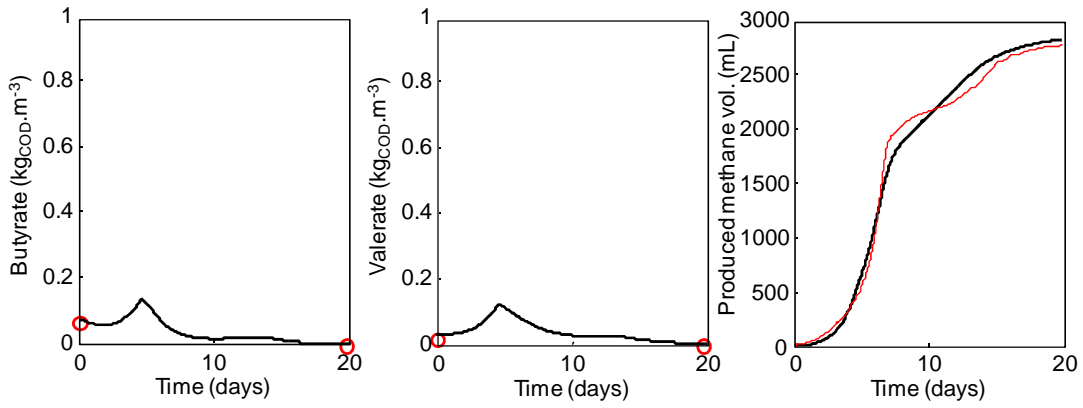
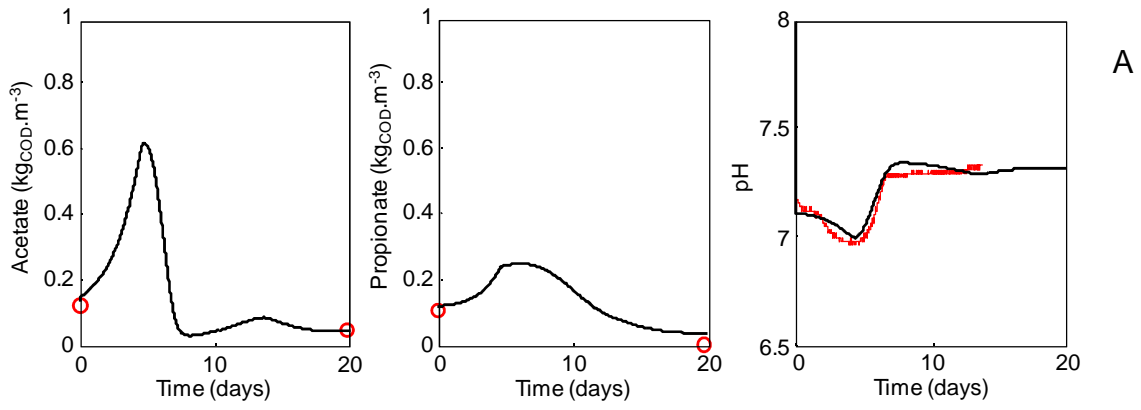
**Figure 6.4:** Chart of heuristic method procedure for optimising the model parameter values.

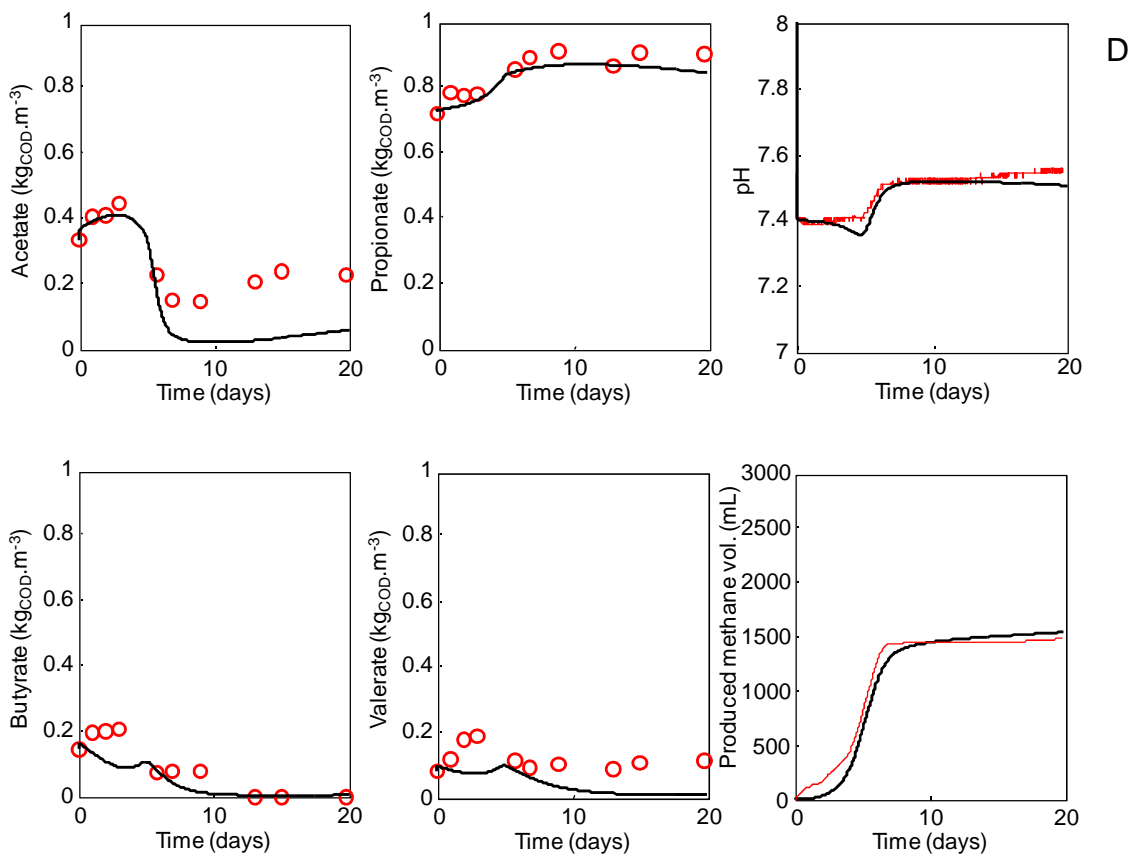
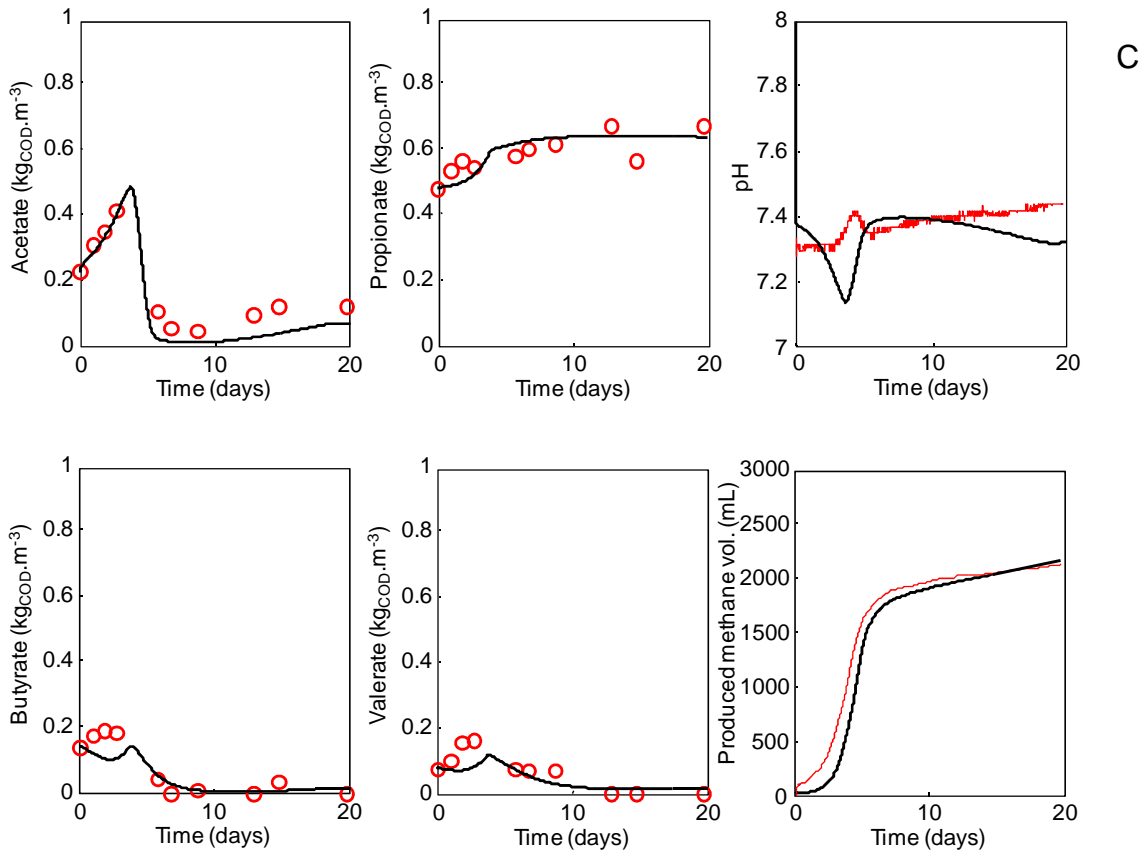
For the first batch test, degrading the untreated sludge, the data fit was only performed with methane production and pH variation since during this batch test, the individual VFA concentrations were not measured. When an optimal fit of methane production and pH variations was obtained, the second batch test modeling could be performed. The optimised kinetic parameters and the simulated biomass concentrations of the batch test 1 were used to carry out the modeling of the second batch test. The kinetic parameters were reevaluated until to obtain an optimal fit of experimental data. Then, we processed for the batch tests 3 and 4. The Figure 6.5 shows that the simulated data through the four successive batch tests follow very closely the performances of WAS thermophilic anaerobic digestion.

The aim of the calibration procedure was to have minimal changes of the parameter set between each batch simulation of the untreated WAS for modeling the measured data. However, we had to modify some kinetic parameters in the batch tests 2, 3 and 4 in order to obtain a good fit of the experimental data, *i.e.* the individual VFAs, the pH and the volume of methane produced. The variations of kinetic parameters, *i.e.*  $k_{m,Xcr}$ ,  $k_{m,Xcs}$ ,  $k_{m,pro}$  and  $k_{m,ac}$ , will be discussed in detail in Section 6.4.3.

<b>Kinetic parameters and rates</b>	<b>Units</b>	<b>ADM1 Default values</b>	<b>WAS Untreated Batch 1</b>	<b>WAS Untreated Batch 2</b>	<b>WAS Untreated Batch 3</b>	<b>WAS Untreated Batch 4</b>
$Y_{Xcr}$		ND	0.1	0.1	0.1	0.1
$Y_{Xcs}$	$\text{kgCOD}_X \cdot \text{kgCOD}_S^{-1}$	ND	0.09	0.09	0.09	0.09
$Y_{ch}$		ND	0.1	0.1	0.1	0.1
$Y_{pr}$		ND	0.1	0.1	0.1	0.1
$Y_{li}$		ND	0.1	0.1	0.1	0.1
$k_{m,Xcr}$		ND	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>9</b>
$k_{m,Xcs}$	ND	<b>5.7</b>	<b>6.0</b>	<b>5.2</b>	<b>4.7</b>	
$k_{m,ch}$	$\text{kgCOD}_S \cdot \text{kgCOD}_X^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	ND	10	10	10	10
$k_{m,pr}$		ND	10	10	10	10
$k_{m,li}$		ND	10	10	10	10
$k_{m,c4}$		30	20	20	20	20
$k_{m,pro}$		20	<b>40</b>	<b>21</b>	<b>15</b>	<b>2</b>
$k_{m,ac}$		16	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>50</b>	<b>42</b>
$K_{S,Xcr}$		ND	0.4	0.4	0.4	0.4
$K_{S,Xcs}$	$\text{kgCOD}_S \cdot \text{m}^{-3}$	ND	0.3	0.3	0.3	0.3
$K_{S,ch}$		ND	0.5	0.5	0.5	0.5
$K_{S,pr}$		ND	0.5	0.5	0.5	0.5
$K_{S,li}$		ND	0.5	0.5	0.5	0.5
$k_{dec,Xcr}$		ND	<b>0.20</b>	<b>0.20</b>	<b>0.20</b>	<b>0.20</b>
$k_{dec,Xcs}$	ND	<b>0.40</b>	<b>0.40</b>	<b>0.40</b>	<b>0.40</b>	
$k_{dec,ch}$	$\text{d}^{-1}$	ND	0.04	0.04	0.04	0.04
$k_{dec,pr}$		ND	0.04	0.04	0.04	0.04
$k_{dec,li}$		ND	0.04	0.04	0.04	0.04
$k_{dec,c4}$		0.04	0.10	0.10	0.10	0.10
$k_{dec,pro}$		0.04	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>
$k_{dec,ac}$		0.04	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>

**Table 6.2:** Main changes of kinetic parameters through the four successive degradation batch tests of untreated WAS. Comparison of the values with standard ADM1.

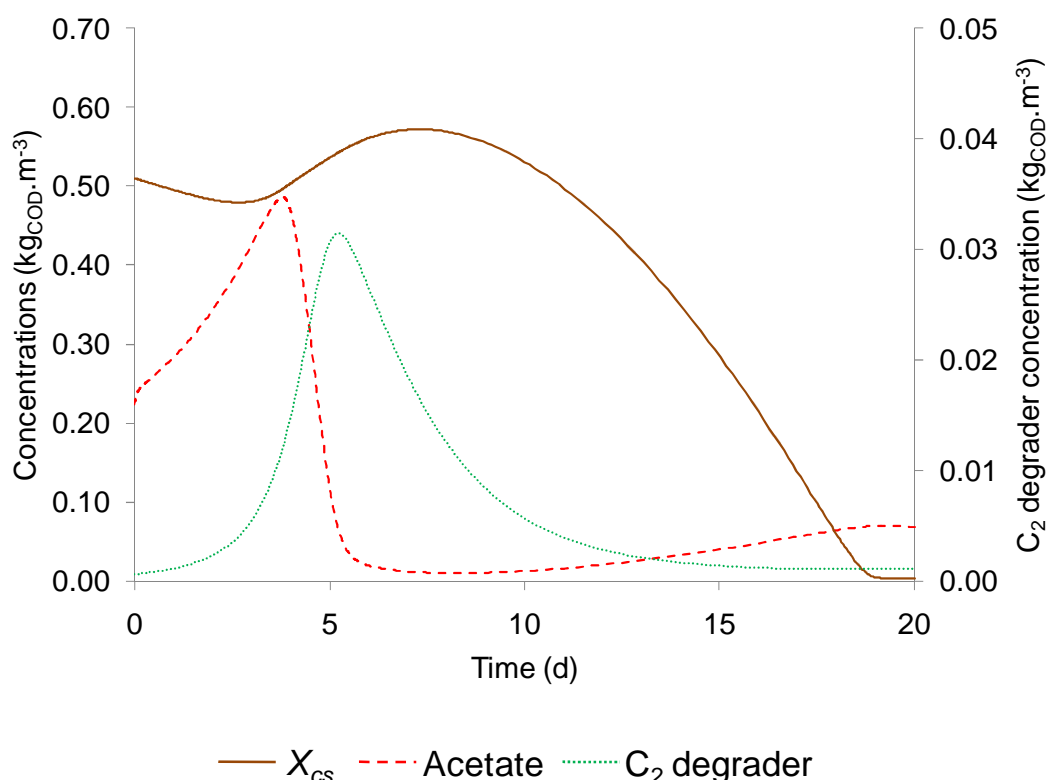




**Figure 6.5:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for untreated WAS (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions).

The decay rates of valerate, butyrate, propionate and acetate degraders were increased from 0.04 to 0.10 for the both former and 0.50 for the both latter compared with the values of standard ADM1 and model proposed in Chapter 5 (Table 6.2). During the calibration procedure, if decay rates were modified, the new values were integrated in the parameter set of the batch test 1 and simulations and notably biomass concentrations were reevaluated.

A bacterial growth for the simulated biomass is obtained as illustrated in Figure 6.3. Thus, the biomass concentrations strongly decreased at the end of batch degradation. This behavior is confirmed by the results of the third degradation test (chosen as example) in Figure 6.6. When the substrate becomes limiting, the high decay rate of acetate implies a decrease of  $C_2$  degrader that results in a low biomass activity. For the  $X_{cs}$  fraction, kinetic parameters were calibrated to represent a slow hydrolysis. In Figure 6.6, an increase of  $X_{cs}$  was observed between day 5 and day 9 since the decay biomass fed the  $X_{cs}$  fraction. Then,  $X_{cs}$  was slowly degraded that created a second COD flow from day 10 to day 19. We assumed that the biomass activity decrease and the degradation of the organic matter slowly hydrolysable from day 10 to day 20 were the two phenomena that explain the second acetate increase in batch test 2 and 3 (Figure 6.5.B and 6.5.C). Therefore, the simulated acetate concentrations showed a second variation after day 10 of experiment. It appeared that the accumulated acetate was underestimated that could be explained by an underestimation of the  $X_{cs}$  or an overestimation of the acetate conversion rate.



**Figure 6.6:** Simulated  $X_{cs}$ , acetate and  $C_2$  degrader concentrations for the third batch test fed with untreated WAS.

However, in the case of the batch test 4 (Figure 6.5.D), the measured acetate increase was very high and can be considered as an inhibition since no methane production was observed. This could be due to a high propionate concentration equal to  $0.9 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$ . This was already underlined by Hyun *et al* (1998) who observed an inhibition of acetate degradation by a high propionate concentration ( $1 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$ ) during the anaerobic digestion of propionate-enriched mixed cultures at  $35^{\circ}\text{C}$ . The model is not able to represent this accumulation since the inhibitor parameter was not integrated in the model structure.

### 6.3.1.2 Modeling results

The correlation coefficients between measured and simulated VFA concentrations and produced methane for untreated WAS in the four successive batch tests are presented in Table 6.3. In the case of methane production from the untreated sludge, the values of  $r^2$  range from 0.964 to 0.993. For VFA concentrations, the regression coefficient between measured and simulated data varies from 0.650 to 0.828. The second acetate increase was not well fitted which involved lower correlation coefficients. However, the agreement between simulated and measured VFA concentrations and methane production for untreated WAS through the four successive batch tests were statistically significant ( $\alpha \leq 0.005$ ). Moreover, some deviations were also observed in butyrate and valerate dynamic predictions. Of course, it could be said that a better fit could have been obtained but the main goal of this study was not to perfectly fit these data but to evaluate the ability of the model with two hydrolysable composite fractions to adequately predict the behavior of the WAS thermophilic anaerobic digestion through consecutive batch tests.

The results confirm that the proposed model with: (i) input variables determined from the substrate characterization, (ii) biomass concentrations predicted by the model through the four successive batch tests and (iii) few changes between parameter sets of each batch test, led to a good representation of the behavior of thermophilic anaerobic digestion of an untreated WAS through consecutive batch tests.

Regression coefficient		Untreated	110°C	165°C	165°C	220°C
$r^2$				electric mode	steam mode	
Batch1	Methane produced	0.990	0.977	0.988	0.995	0.991
Batch2	VFA concentrations	0.650	0.920	0.890	0.926	0.885
	Methane produced	0.993	0.990	0.971	0.991	0.997
Batch 3	VFA concentrations	0.828	0.953	0.960	0.908	0.994
	Methane produced	0.976	0.992	0.992	0.997	0.895
Batch 4	VFA concentrations	0.671	0.819	0.878	0.875	0.903
	Methane produced	0.964	0.973	0.984	0.988	0.988

**Table 6.3:** Regression coefficients between measured VFA concentrations and simulated VFA concentrations, measured methane produced and simulated methane produced, for untreated and pretreated WAS in four successive batch tests.



Finally, the parameters that were modified to obtain a good prediction of the whole experimental data through consecutive batch test were  $k_{m,Xcr}$ ,  $k_{m,Xcs}$ ,  $k_{m,pro}$ ,  $k_{m,ac}$  (Table 6.2). A sensitivity analysis will be performed with these parameters in order to determine their variability effects.

### 6.3.2 Sensitivity analysis

$k_{m,Xcr}$ ,  $k_{m,Xcs}$ ,  $k_{m,pro}$ ,  $k_{m,ac}$  could be considered as the most sensitive parameters since they were main modified parameters for fitting well the experimental data of untreated WAS degradation. Thus, a sensitivity analysis was carried out to determine effects of these parameter variations on the acetate and propionate kinetics and on the methane production kinetic. The sensitivity of decay rates of these biomass were also studied since the initial values were modified compared with the standard ADM1. The batch test 2 data were arbitrarily chosen to perform the sensitivity analysis. Thus, eight parameters ( $k_{m,Xcr}$ ,  $k_{m,Xcs}$ ,  $k_{m,pro}$ ,  $k_{m,ac}$ ,  $k_{dec,Xcr}$ ,  $k_{dec,Xcs}$ ,  $k_{dec,pro}$ ,  $k_{dec,ac}$ ) were changed with a variation of  $\pm 50\%$  compared with the initial value. The model parameters were independent and they were investigated individually. Twenty seven simulations were run at each of those values to generate new acetate, propionate and methane profiles. The results are presented from Figure 6.7 to Figure 6.10. Sensitivity coefficients,  $\sigma_{+\Delta p}$  and  $\sigma_{-\Delta p}$ , were determined for each parameter changes in order to evaluate the deviation involved by a change of  $\pm 50\%$ . The calculation was in agreement with the expression of the variance as following:

$$\sigma_{\pm\Delta p} = \frac{1}{n} \int_0^{t_f} (X_{simulation\ with\ \pm 50\%} - X_{initial\ concentration})$$

Where,

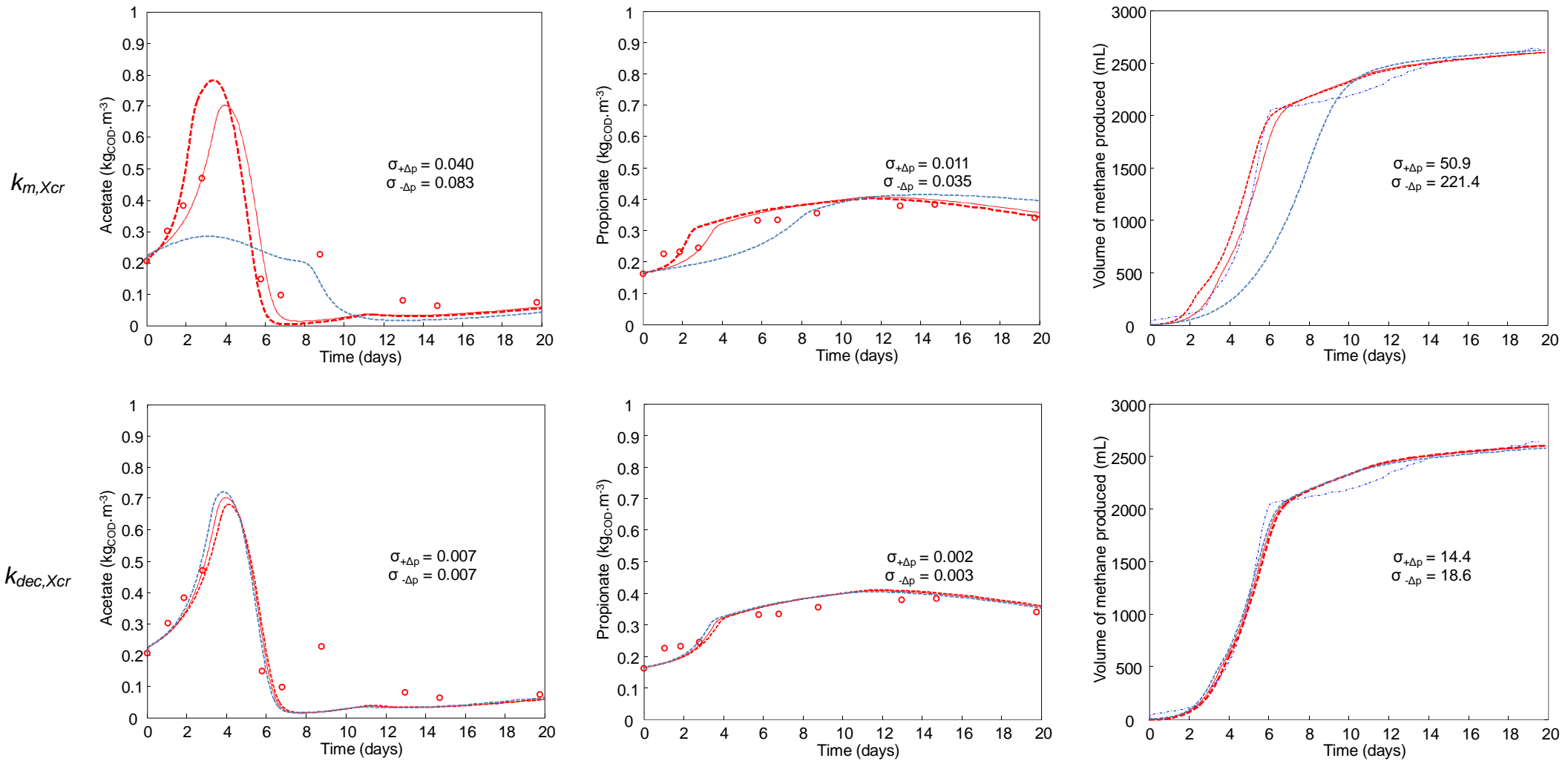
$\sigma_{\pm\Delta p}$  is the sensitivity coefficient for a positive or a negative variation of 50 % of model parameters,

$X$  is the simulated variable with initial parameter or when the parameter was changed by a variation of  $\pm 50\%$ ,

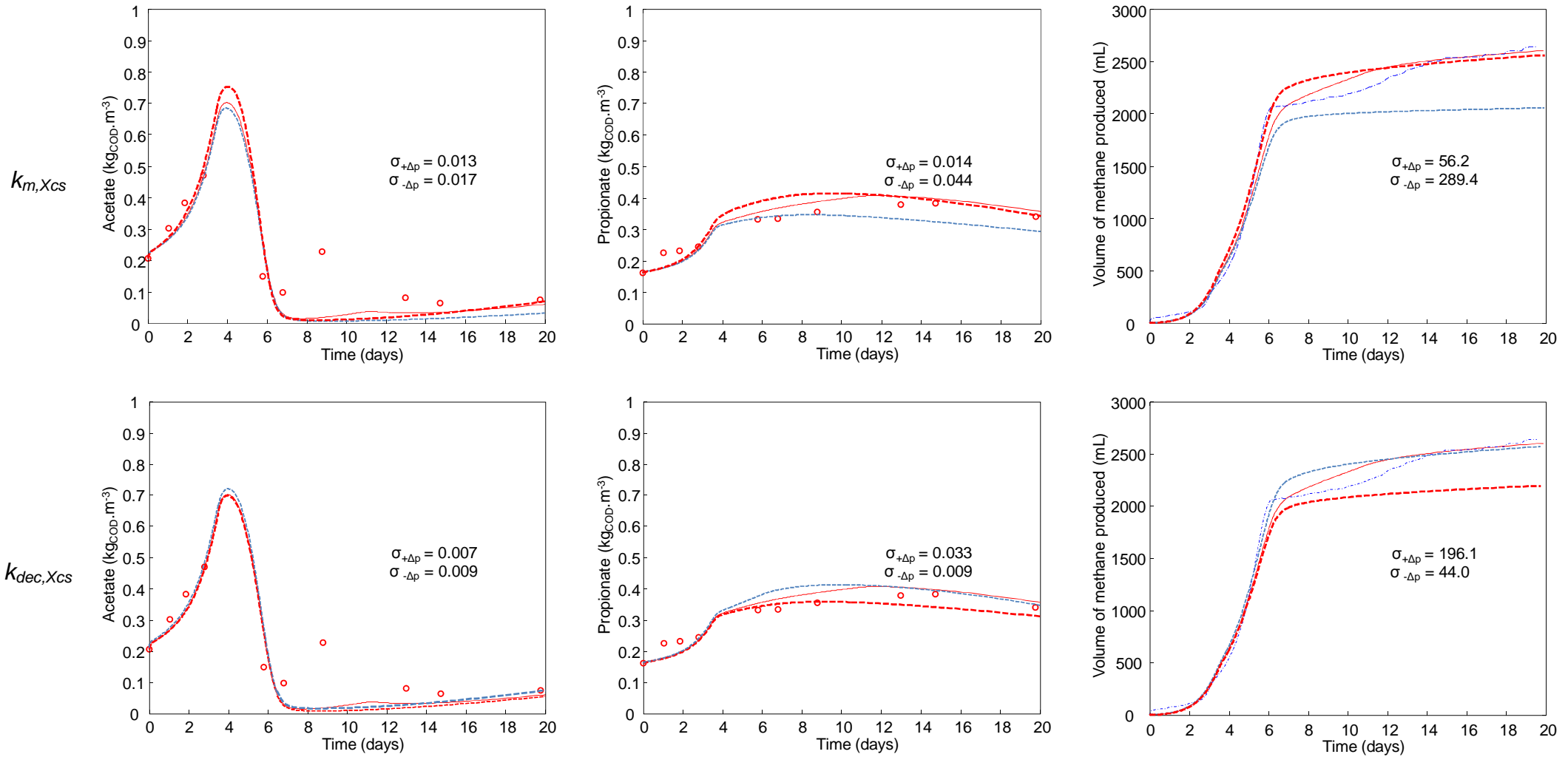
$n$  is the sample size,

$t_f$  is the experiment duration.

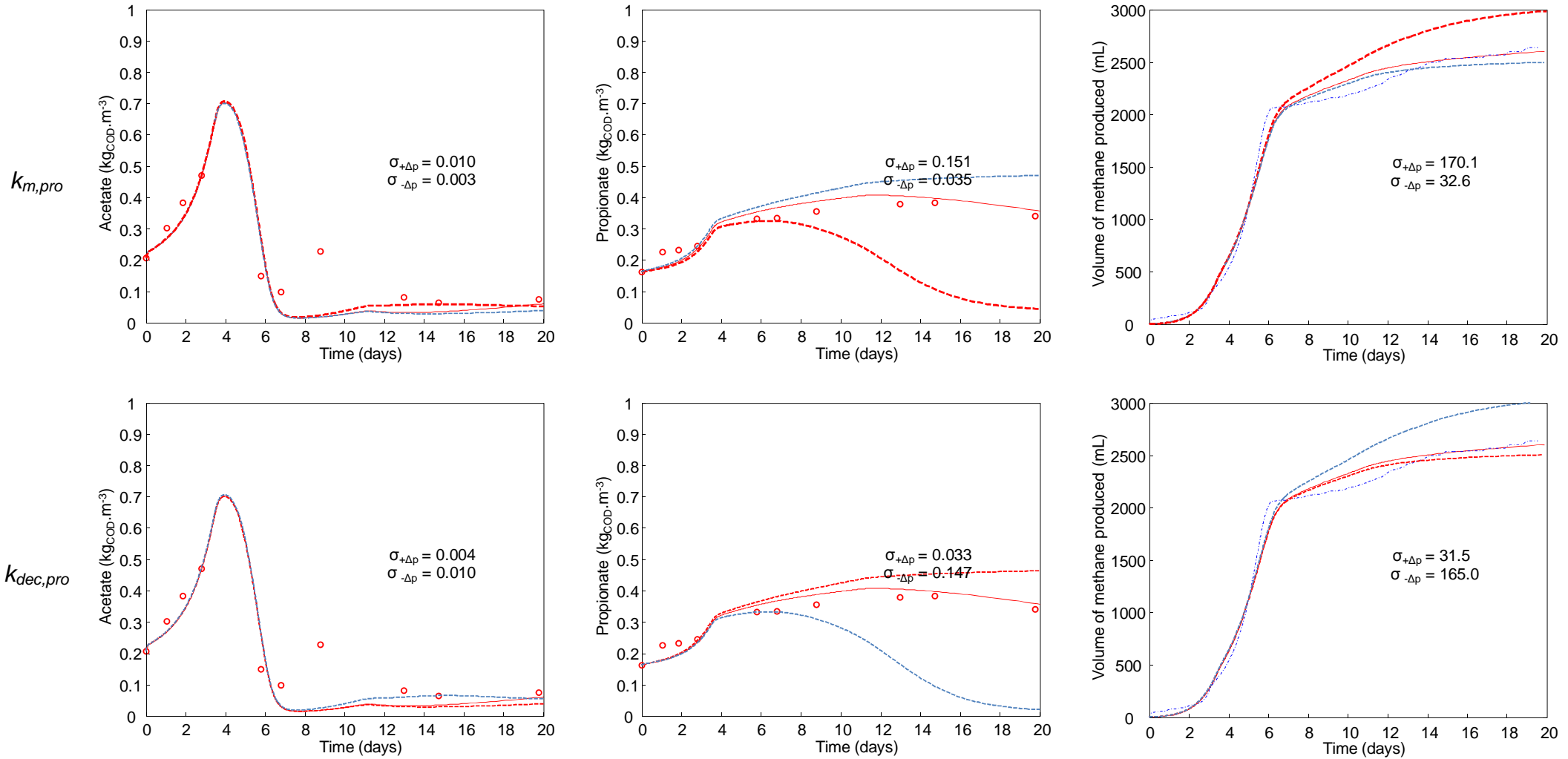
The sensitivity coefficient is expressed in  $\text{kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  for acetate and propionate concentration variations and in mL for the methane productions. The effect of the parameter change is significant when an important deviation is observed between the simulation with initial values and the simulation with a variation of  $\pm 50\%$ . The threshold is therefore arbitrarily chosen.



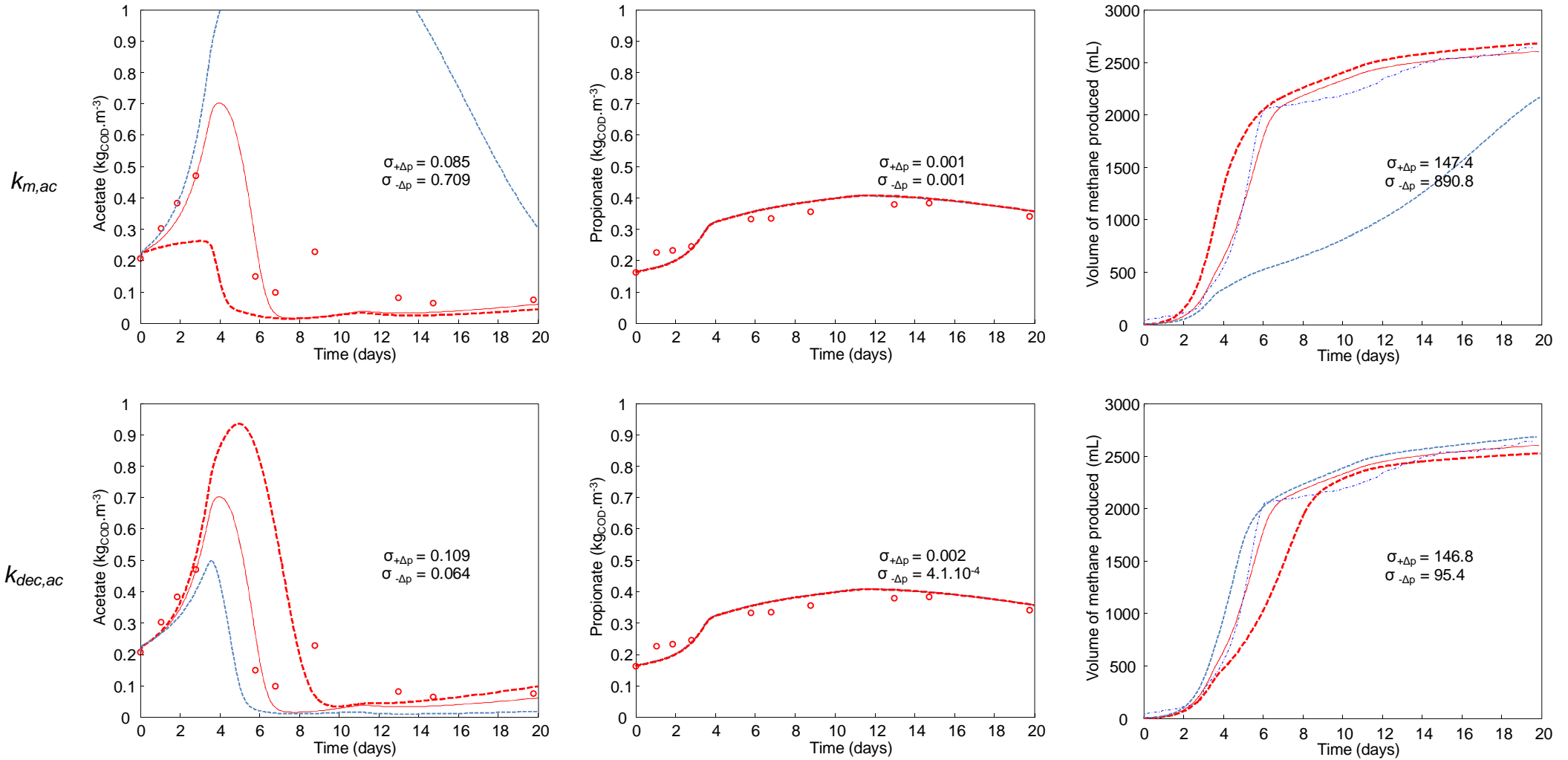
**Figure 6.7:** Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to  $X_{cr}$  disintegration parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).



**Figure 6.8:** Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to  $X_{CS}$  disintegration parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).



**Figure 6.9:** Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to propionate degradation parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).



**Figure 6.10:** Sensitivity of acetate, propionate concentrations and methane production in batch test 2 to acetate degradation parameters. (red circles and blue thin dotted line: experimental data points; red thin plain line: simulation with initial values; red thick wide dotted line: simulation with an increment of +50 % on model parameter values; blue thick small dotted line: simulation with a variation of -50 % on model parameter values).

### 6.3.2.1 Acetate concentration variation

The most sensitive parameters on the predicted acetate concentration are  $k_{m,X_{cr}}$ ,  $k_{m,ac}$ , and  $k_{dec,ac}$ . The effect of the parameter change is very significant when the sensitivity coefficient value is higher than  $0.06 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$ . No significant effects are observed when the sensitivity coefficient value is inferior to  $0.01 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$ . A  $\pm 50 \%$  change of acetate degrader kinetic parameters strongly modified the dynamic of acetate concentration (Figure 6.10). It is coherent since these parameters drive the degradation rates of acetate. The kinetic parameter of readily hydrolysable fraction degraders ( $k_{m,X_{cr}}$ ) has also an effect on the acetate degradation rate (Figure 6.7). Indeed, as acetate is the main intermediate coming from the degradation of  $X_{cr}$ , a decrease of 50 % of this parameter reduced the degradation rate of  $X_{cr}$  and the acetate production. As the acetate degradation rate remained similar, a low acetate increase was observed. Thus, the parameter  $k_{m,X_{cr}}$  must be well defined for representing the behavior of acetate kinetic. The decay rates for  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  are not sensitive (Figures 6.7 and 6.8).

### 6.3.2.2 Propionate concentration variation

From the results of the sensitivity analysis on propionate dynamic, a value of sensitivity coefficient inferior to  $0.015 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  can be considered as non significant whereas a value superior to  $0.04 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  indicated a very important effect. The kinetic parameter of the slowly hydrolysable fraction degraders ( $k_{m,X_{cs}}$ ) has a significant effect on the propionate variation since a decrease of this parameter leads to a sensitivity coefficient equal to  $0.044 \text{ kg}_{\text{COD}}\cdot\text{m}^{-3}$  (Figure 6.8). We observed a lower propionate accumulation since a low  $k_{m,X_{cs}}$  did not allow a complete degradation of  $X_{cs}$ . This confirms that the implementation of  $X_{cs}$  is a good strategy to represent a COD flow that corresponds to a degradation of slowly hydrolysable organic matter between day 10 to day 20. The propionate dynamic is strongly dependent on kinetic parameters,  $k_{m,pro}$ , and  $k_{dec,pro}$ , as can be observed in Figure 6.9.

### 6.3.2.3 Methane production variation

The  $\pm 50 \%$  variations of parameters on predicted methane productions showed that the parameters can be considered as significant when the sensitivity coefficient is superior to  $150 \text{ mL}_{\text{CH}_4}$ . In this way, the maximum specific uptake rates of each variable have an effect on the methane production dynamic.  $k_{m,X_{cr}}$  drives the degradation of the main organic matter fraction. The decrease of  $k_{m,X_{cr}}$  involved a slower degradation rate of the readily hydrolysable fraction which indicates that the limiting effect of hydrolysis is amplified. Indeed the methane production shows a delay since the higher methane production rate is reached at day 8. The variation of  $k_{m,X_{cs}}$  and  $k_{dec,X_{cs}}$  impacted the final value of predicted methane volume. A decrease of  $k_{m,X_{cs}}$  or an increase of  $k_{dec,X_{cs}}$  reduced the activity of  $X_{cs}$  degraders and thus the fraction  $X_{cs}$  was not degraded which involves that the second phase of methane production was not observed (Figure 6.8). Thus the implementation of a slowly hydrolysable fraction  $X_{cs}$  in order to represent the second phase of methane production is succeeded. The kinetic parameter changes of acetate and propionate degraders showed that the propionate degradation is slow and mainly impacts the second phase of methane production and the acetate degradation is fast and mainly impacts the first phase of methane production (Figures 6.9 and 6.10). This confirms the results described in section 4.3.2.2.

Table 6.4 summarises the significant effect of kinetic parameter changes on the variations of acetate, propionate and methane production. These results showed that the simulated methane production kinetic strongly depends on  $k_{m,Xcr}$ ,  $k_{m,Xcs}$ ,  $k_{m,pro}$ ,  $k_{m,ac}$ ,  $k_{dec,Xcs}$ ,  $k_{dec,pro}$ . It confirms that the particulate organic matter disintegration and propionate and acetate degradation are important conversion steps during the WAS anaerobic digestion.

Kinetic parameters	Units	WAS Untreated Batch 2	Sensitive analysis		
			Acetate variation	Propionate variation	Methane production
$k_{m,Xcr}$		12	+++ (-50%) <sup>1</sup>	0	+++ (-50%) <sup>1</sup>
$k_{m,Xcs}$	$\text{kgCOD}_S \cdot \text{kgCOD}_X^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	6	0	+++ (-50%) <sup>1</sup>	+++ (-50%) <sup>1</sup>
$k_{m,pro}$		21	0	+++ (+50%) <sup>1</sup>	+++ (+50%) <sup>1</sup>
$k_{m,ac}$		35	+++ ( $\pm 50\%$ ) <sup>1</sup>	0	+++ (-50%) <sup>1</sup>
$k_{dec,Xcr}$		0.20	0	0	0
$k_{dec,Xcs}$	$\text{d}^{-1}$	0.40	0	0	+++ (+50%) <sup>1</sup>
$k_{dec,pro}$		0.50	0	+++ (-50%) <sup>1</sup>	+++ (-50%) <sup>1</sup>
$k_{dec,ac}$		0.50	+++ ( $\pm 50\%$ ) <sup>1</sup>	0	0

<sup>1</sup> Value in parenthesis is the variation applied on the kinetic parameter

+++ : significant effect

0 : no significant effect

**Table 6.4:** Significant effect of kinetic parameter changes on the dynamic evolution of acetate, propionate and methane production.

## 6.4 Results and discussions

### 6.4.1 Degradation batch test performances

The impact of thermal pretreatment at different temperatures was evaluated in terms of COD, protein and carbohydrate solubilisation and biodegradability. Four successive batch tests were carried out on untreated and pretreated sludge samples in order to evaluate the availability of organic matter and the inoculum adaptation. An accurate description of the results was presented in Chapter 4.

### 6.4.2 Model validation on batch degradation tests

The four successive batch tests on pretreated sludge samples, *i.e.* 110°C, 165°C, 220°C in electric mode and 165°C in steam mode, were used to test the model parameter set of the model which was calibrated with the performances of untreated sludge degradation.

Initially, the inoculum used to perform the degradation test was similar for each reactor since it was taken from the same digester. Thus, the modeling of the first batch tests for pretreated

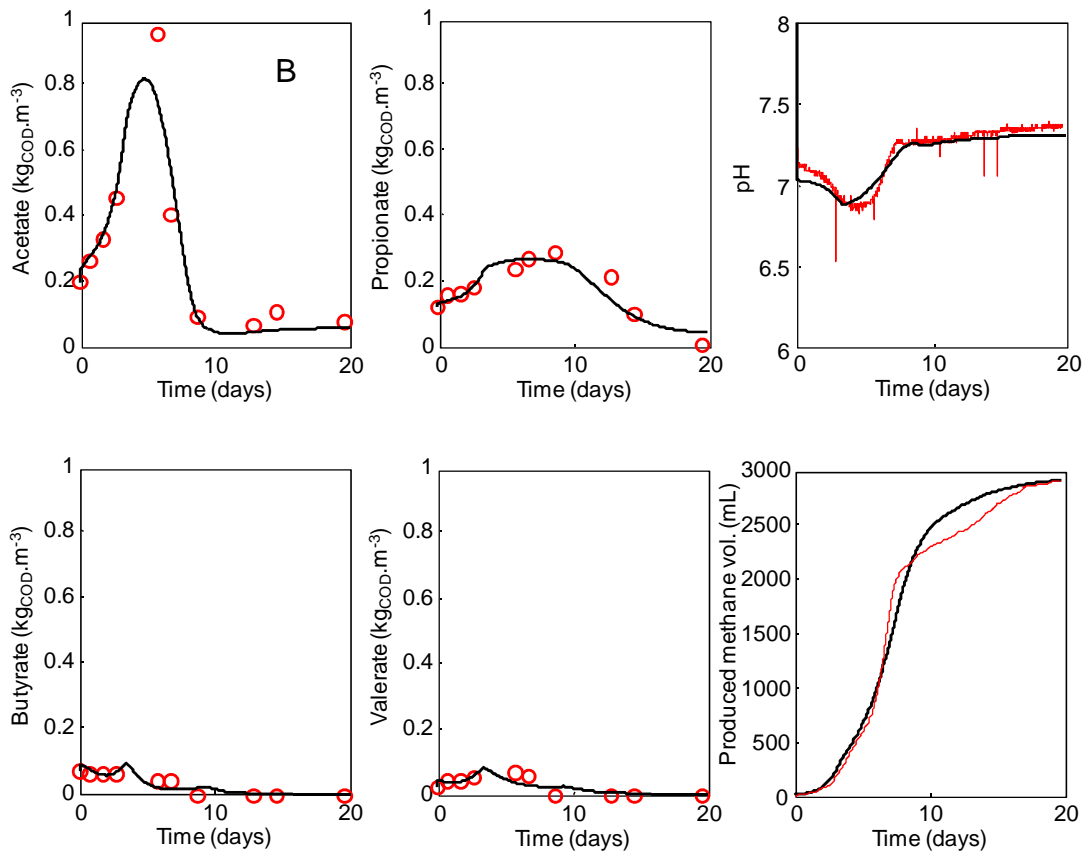
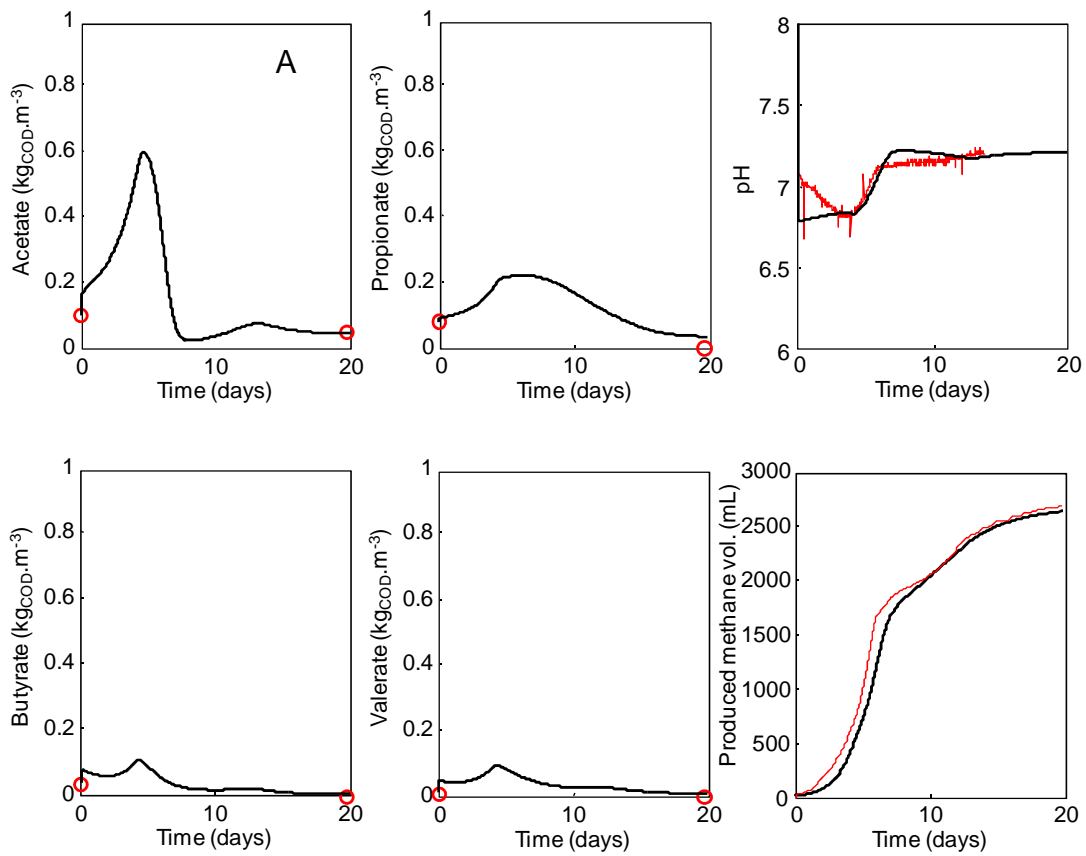
sludge samples were carried out by taking the optimised kinetic parameters and the optimised initial biomass concentrations of the first batch test for untreated sludge. Then, the inoculum composition varied in function of operating conditions through the four successive batch tests. The initial variables were determined from the characterization of pretreated WAS samples, and the content of particulate COD in  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  and the inert fraction were determined from the methane production profiles.

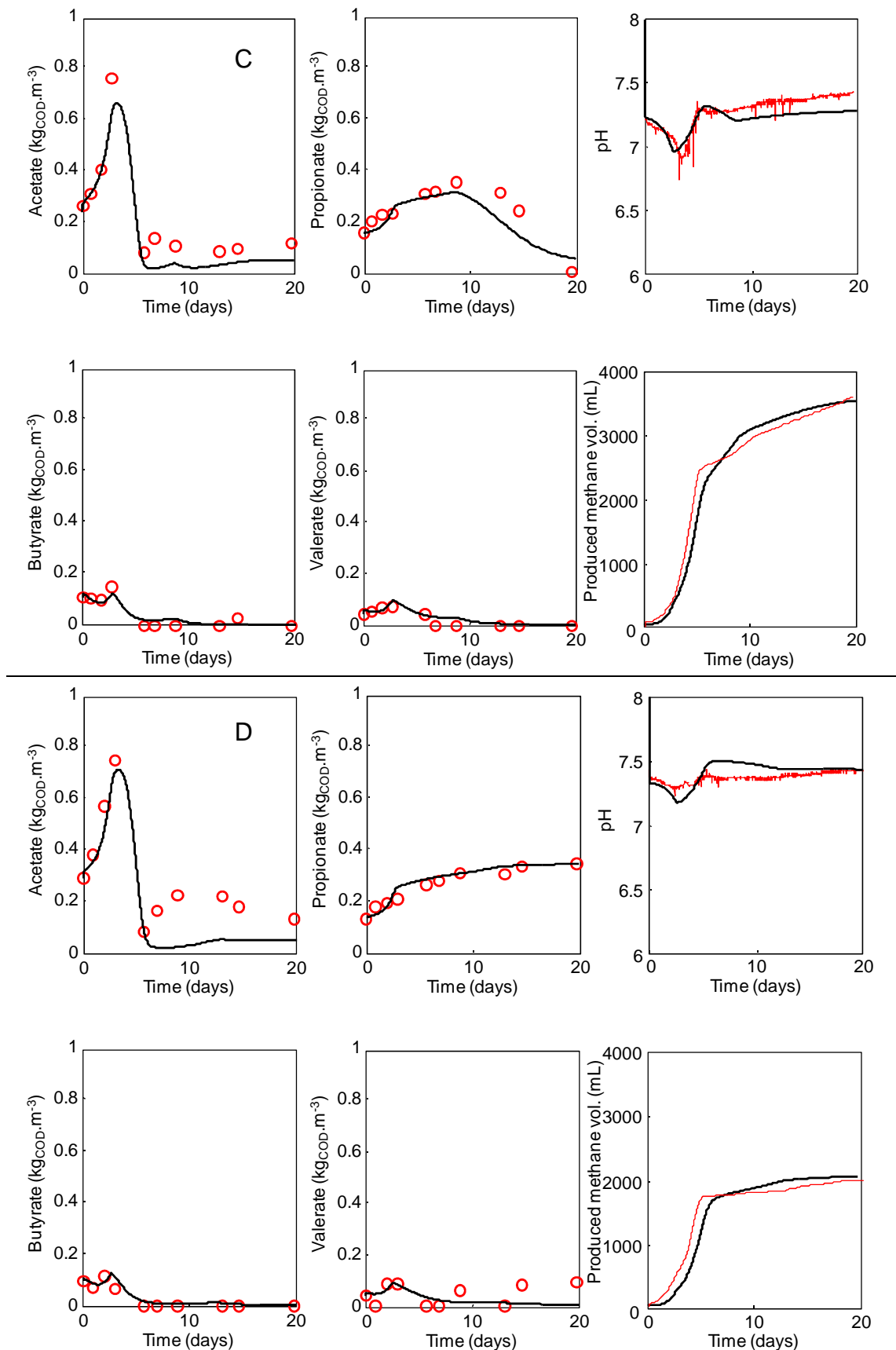
#### **6.4.2.1 Modeling results**

Figures 6.11 to 6.14 show that the model with two hydrolysable composite fractions represents well the behavior of methane productions in the four batch tests for each sludge. Moreover, the predicted VFAs profiles are coherent with the experimental data and the simulated dynamic variation of pH is a response of VFAs variations. Table 6.3 shows the correlation between measured and simulated total VFA concentrations and produced methane for each batch test and each sludge sample. The  $r^2$  correlation coefficients indicate an agreement statistically significant ( $\alpha \leq 0.005$ ) between the measured and the simulated data in all cases. Indeed, for the predicted total VFA concentrations, the coefficient ranges from 0.819 to 0.994 and for the predicted methane volume, it ranges from 0.895 to 0.997 (Table 6.3). This agreement contributes to validate the modeling approach as well as the changes proposed in this study.

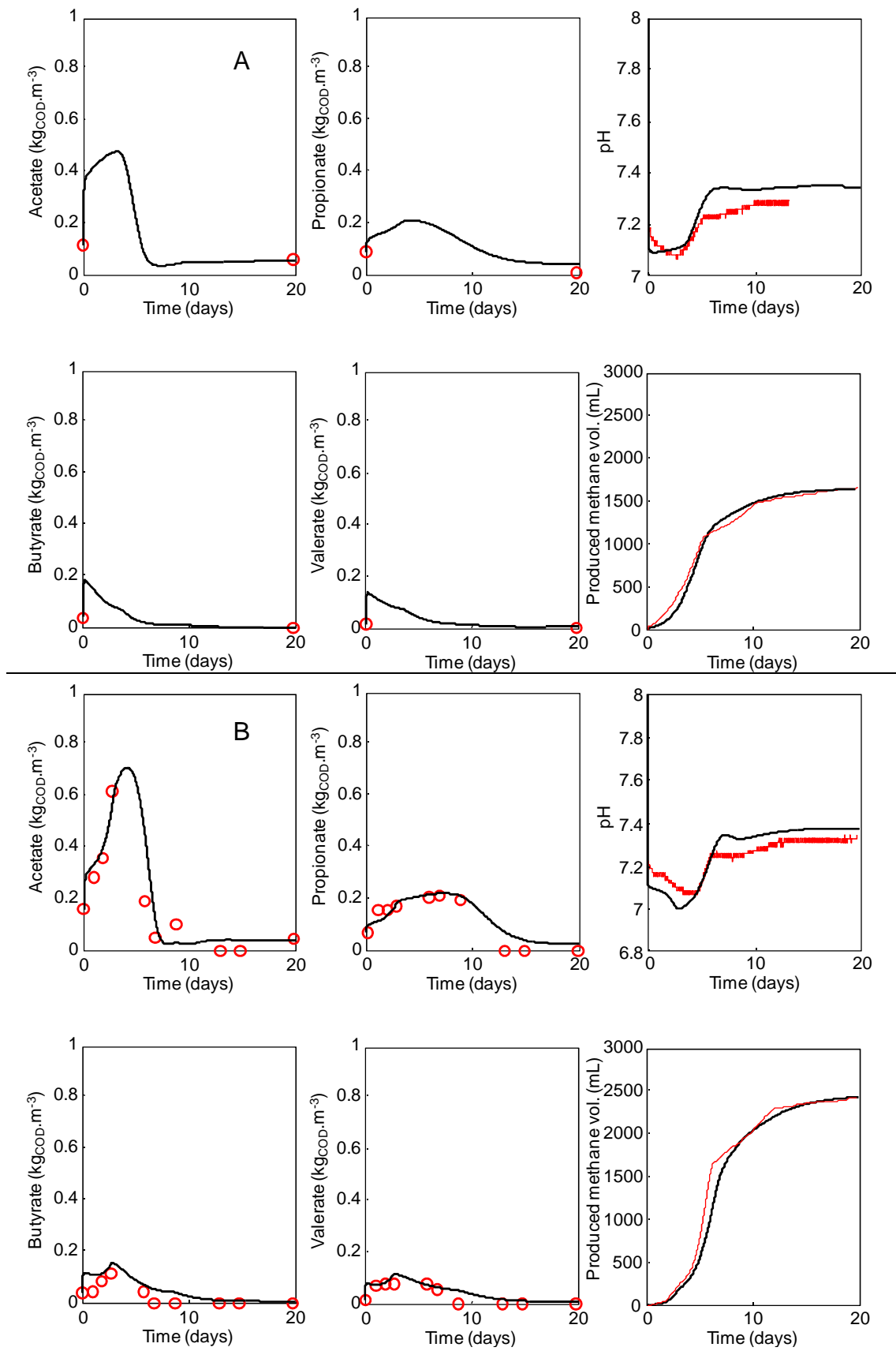
The biomass concentrations during the simulation process of each batch test were based on the values which were predicted by the model. The four successive batch tests for each sludge sample were simulated with minimal changes of the kinetic parameters. The changes were performed on  $k_{m,X_{cr}}$ ,  $k_{m,X_{cs}}$ ,  $k_{m,c4}$ ,  $k_{m,pro}$ ,  $k_{m,ac}$ . The model could be used to obtain a better understanding of the WAS anaerobic digestion mechanisms. The kinetic parameter changes through successive batch tests for each sludge sample seem to be coherent with the degradation performances. This could be evaluated from the degradation rates.

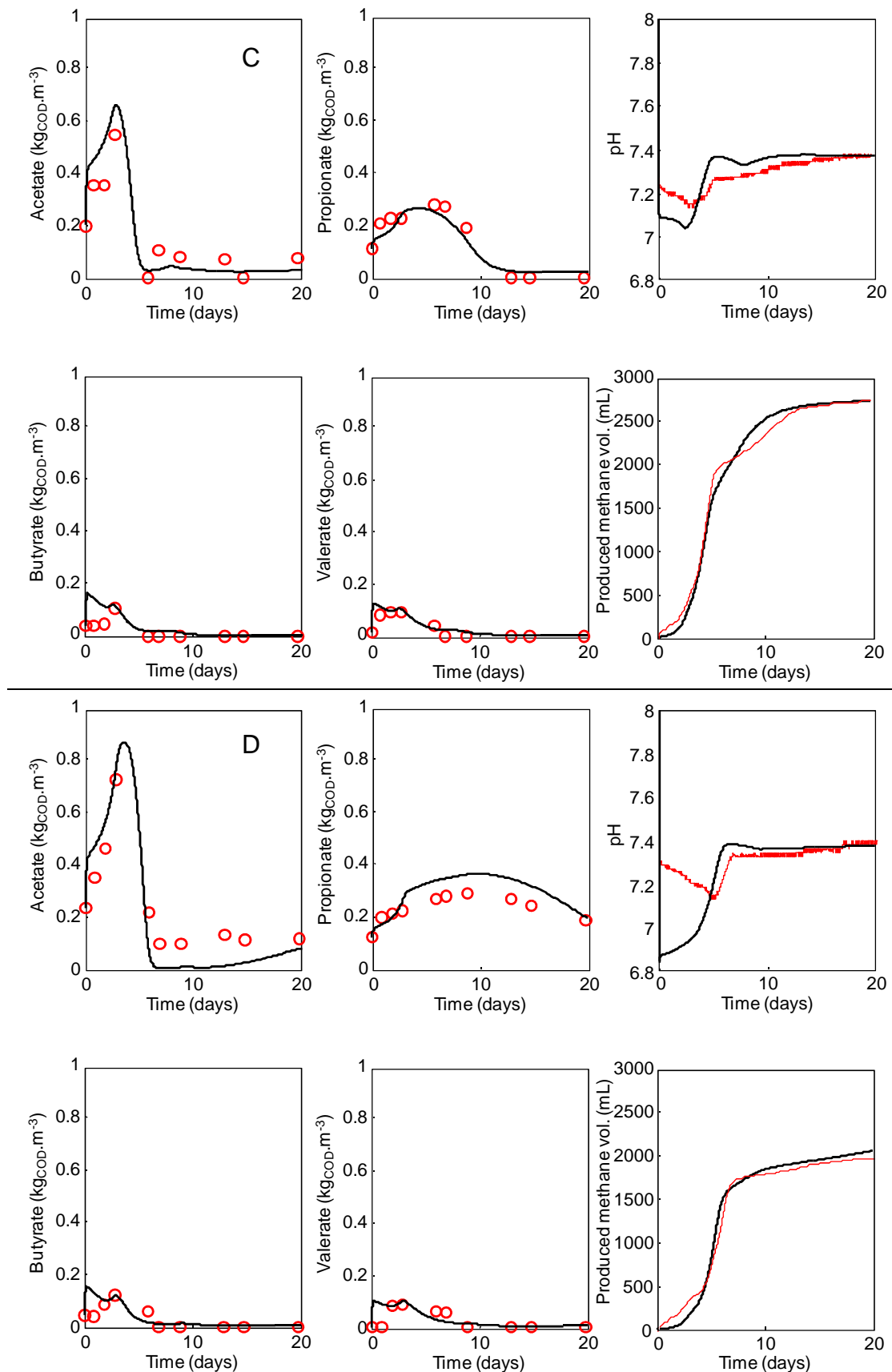




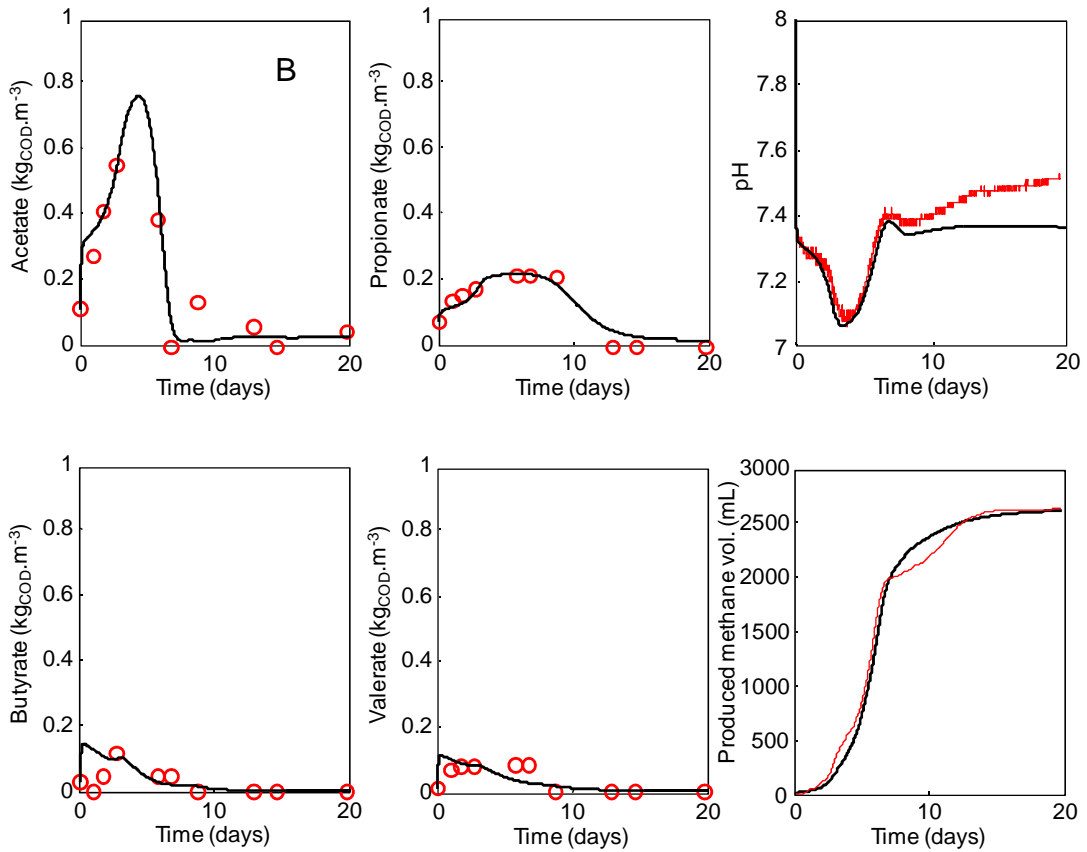
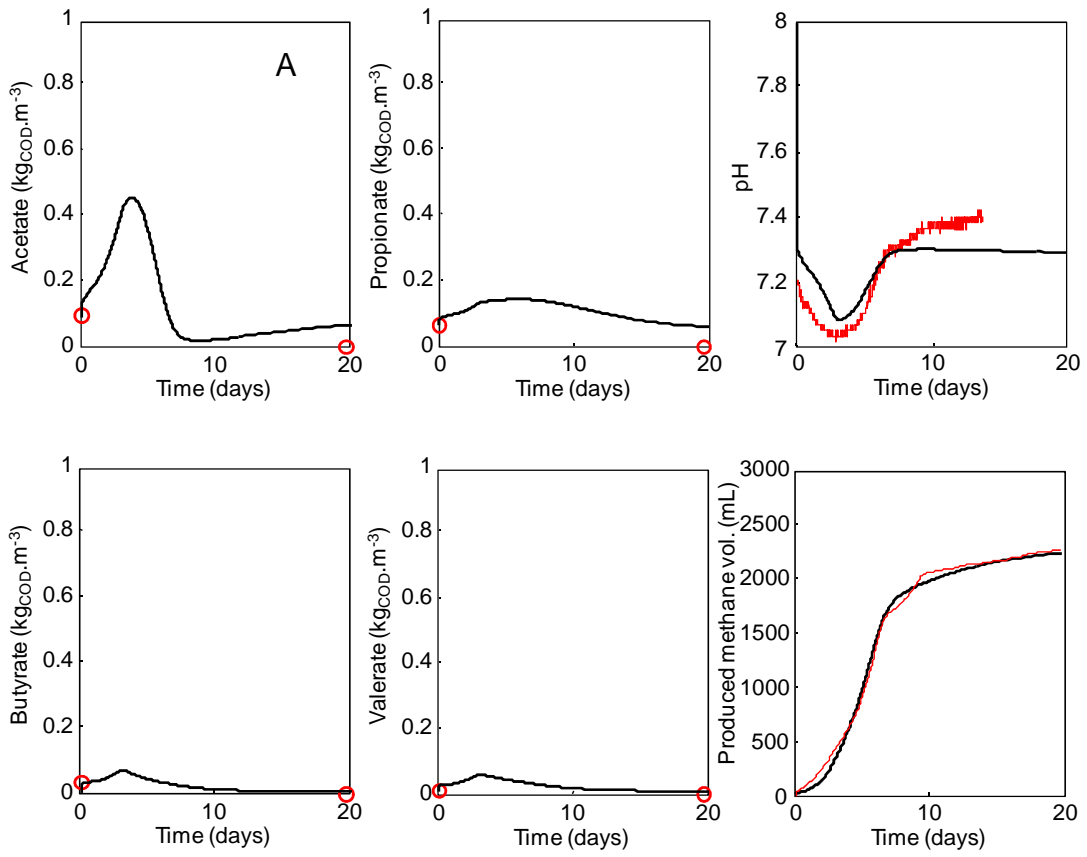


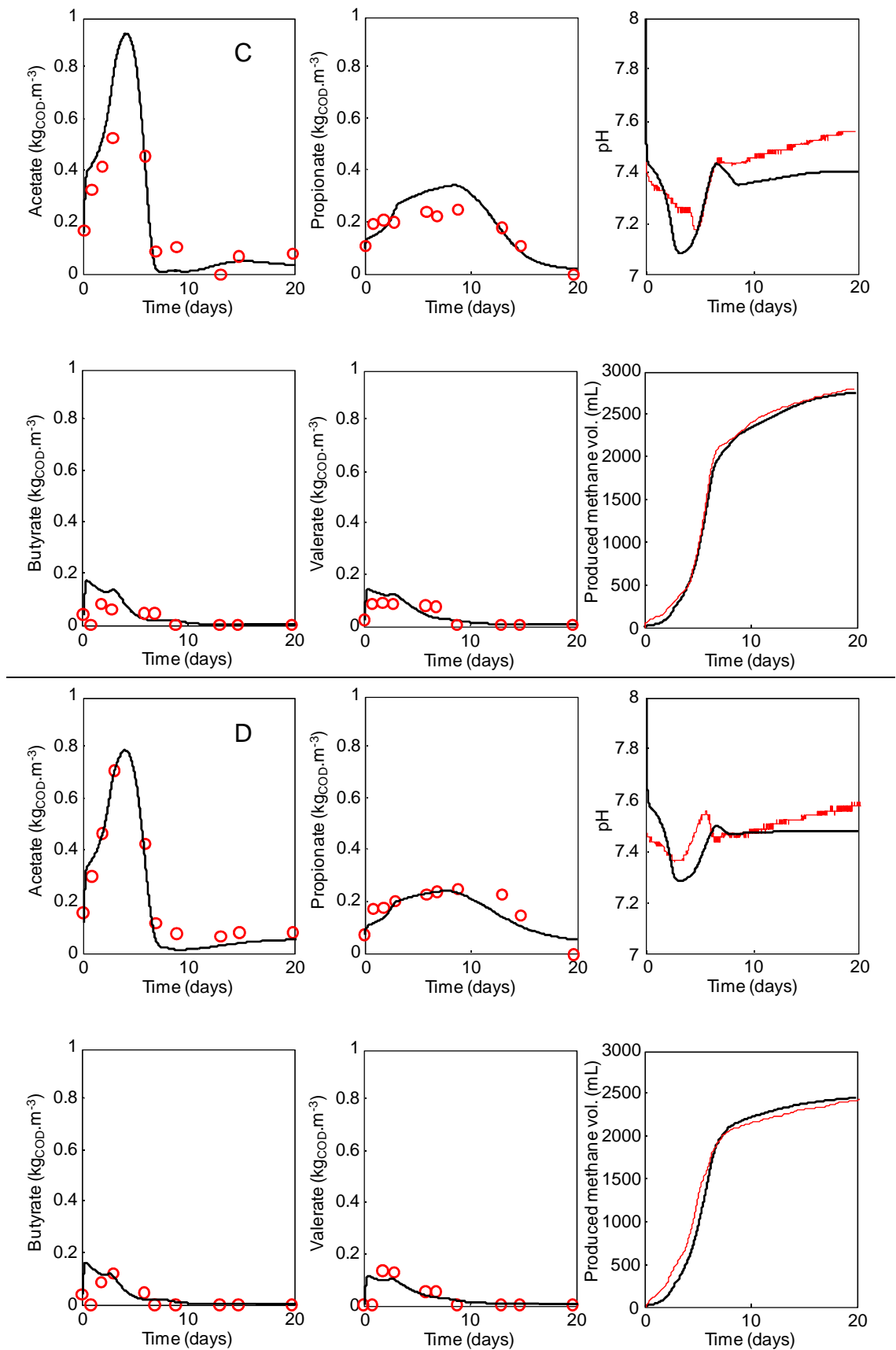
**Figure 6.11:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative CH<sub>4</sub> production vs experimental data for WAS pretreated at 110°C (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions).



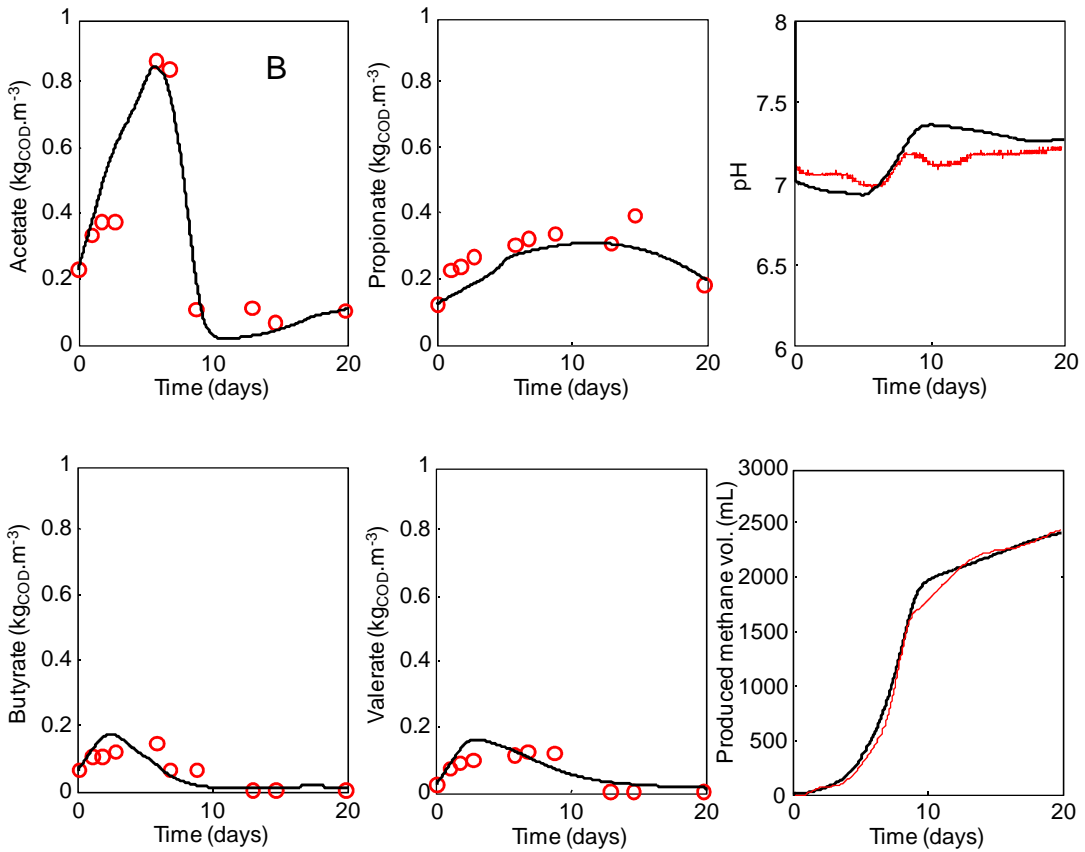
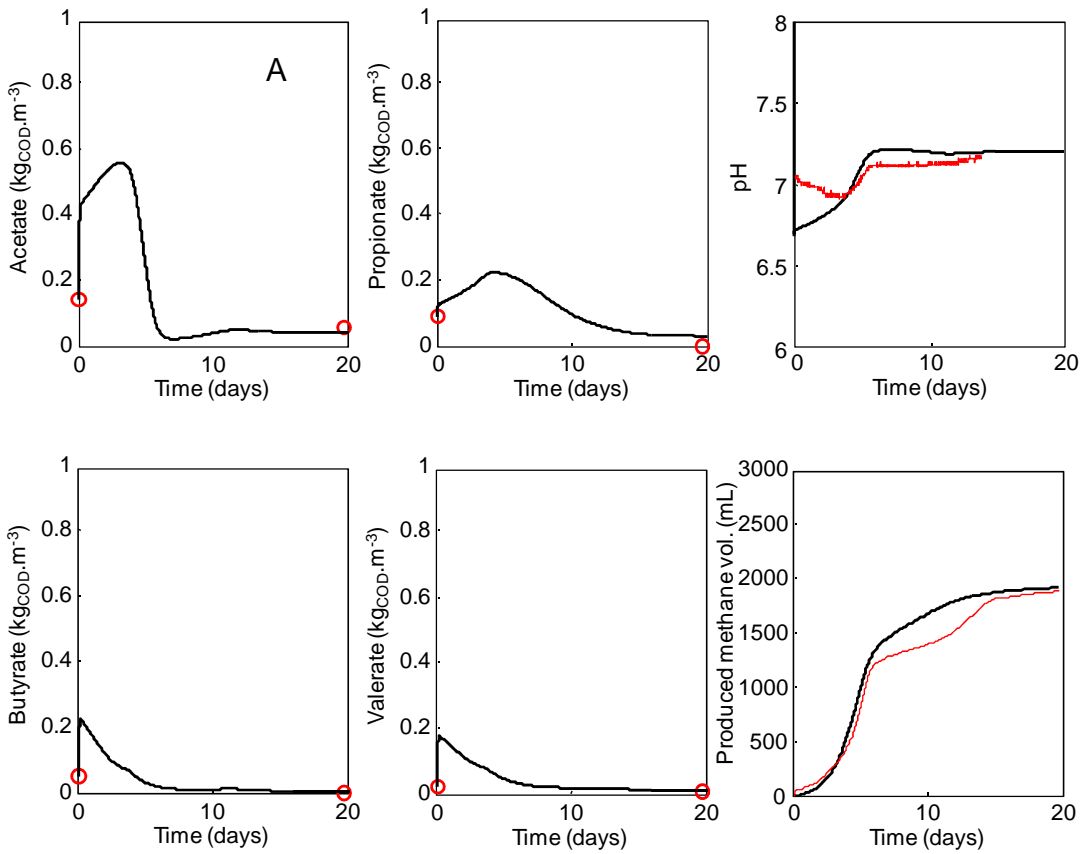


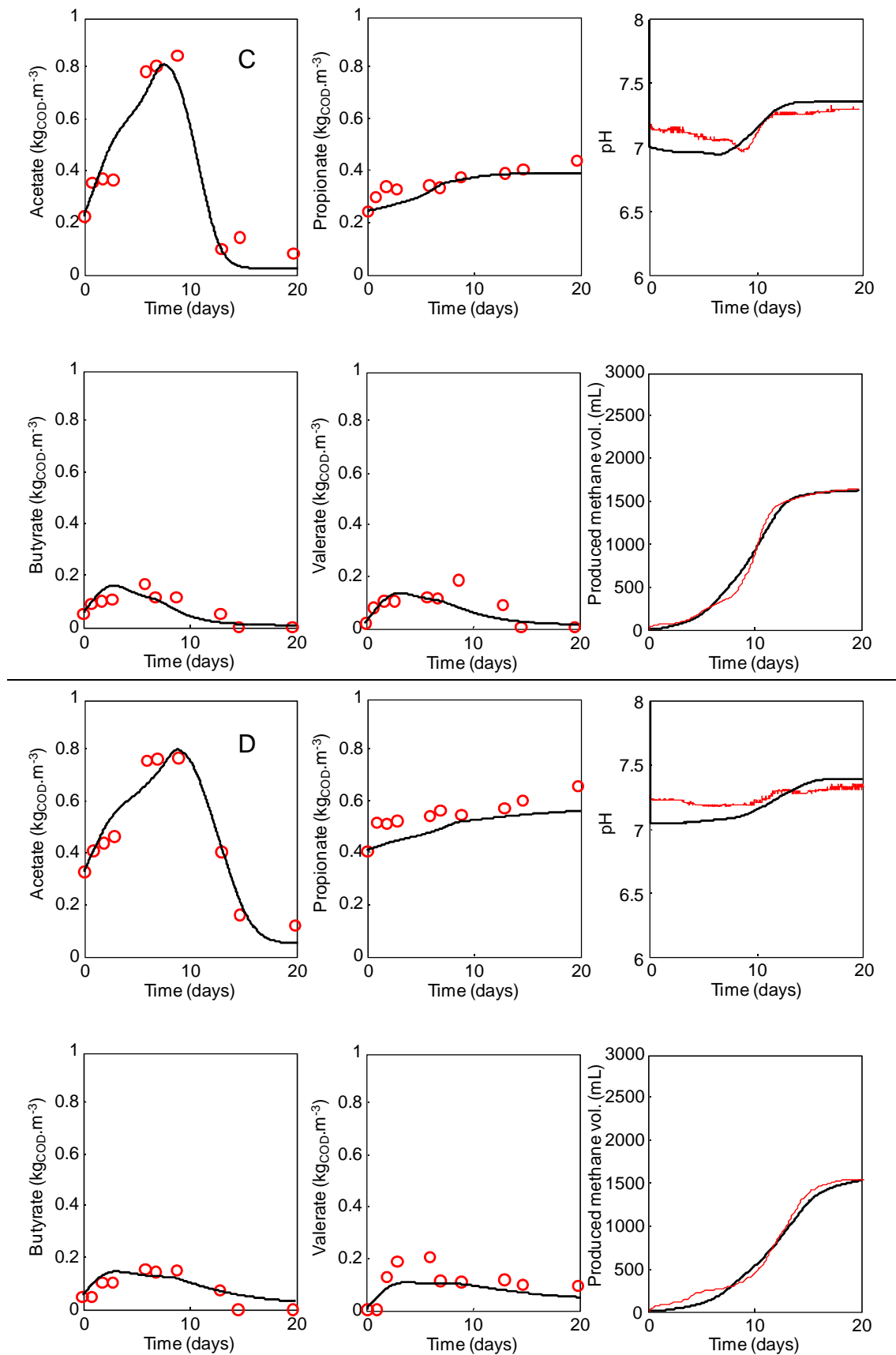
**Figure 6.12:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative  $\text{CH}_4$  production vs experimental data for WAS pretreated at  $165^\circ\text{C}$  in electric mode (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions).





**Figure 6.13:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative  $\text{CH}_4$  production vs experimental data for WAS pretreated at  $165^\circ\text{C}$  in steam mode (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions).





**Figure 6.14:** Simulated individual VFAs, pH and cumulative  $\text{CH}_4$  production vs experimental data for WAS pretreated at  $220^\circ\text{C}$  (A: batch 1; B: batch 2; C: batch 3 and D: batch 4). (red circles and red thin plain line: experimental data; black thick plain line: modified ADM1 with two hydrolysable composite fractions).



### 6.4.3 Calculation of degradation rates

A strategy based on the degradation rate could be performed to explain the observed differences on performances as a response of thermal pretreatment. Thanks to the model, it is possible to work out the degradation rate of the main substrates  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  and main intermediate products  $S_{pro}$  and  $S_{ac}$ . The calculation was done from the rate of the selected variable where only the degradation term was kept. For instance, the disintegration process of  $X_{cs}$  is:

$$\rho_{X_{cs}} = -\frac{k_{m,X_{cs}}}{(K_{S,X_{cs}} * X_{X_{cs}} + X_{cs})} * X_{cs} * X_{X_{cs}} + \sum_i^{all\ biomass} k_{dec,X_i} X_{X_i}$$

The first reaction term is the degradation of  $X_{cs}$  and the second reaction term is the hydrolysis of dead biomass. Thus the degradation rate is calculated from the first term:

$$Degradation\ rate\ of\ X_{cs} = -\frac{k_{m,X_{cs}}}{(K_{S,X_{cs}} * X_{X_{cs}} + X_{cs})} * X_{cs} * X_{X_{cs}}$$

The degradation rate is expressed in  $kg_{COD}.m^{-3}.d^{-1}$ .

Previously, we showed that the model is able to simulate well the four successive degradation batch tests for each WAS samples. The degradation rates were thus calculated to have a better understanding of the thermal pretreatment impact on the main conversion steps. Only the fourth degradation batch test was studied since an inoculum adaptation to the thermally pretreated WAS degradation was obtained. Figure 6.15 presents the degradation rate dynamics of untreated and pretreated WAS samples for the fourth degradation batch test.

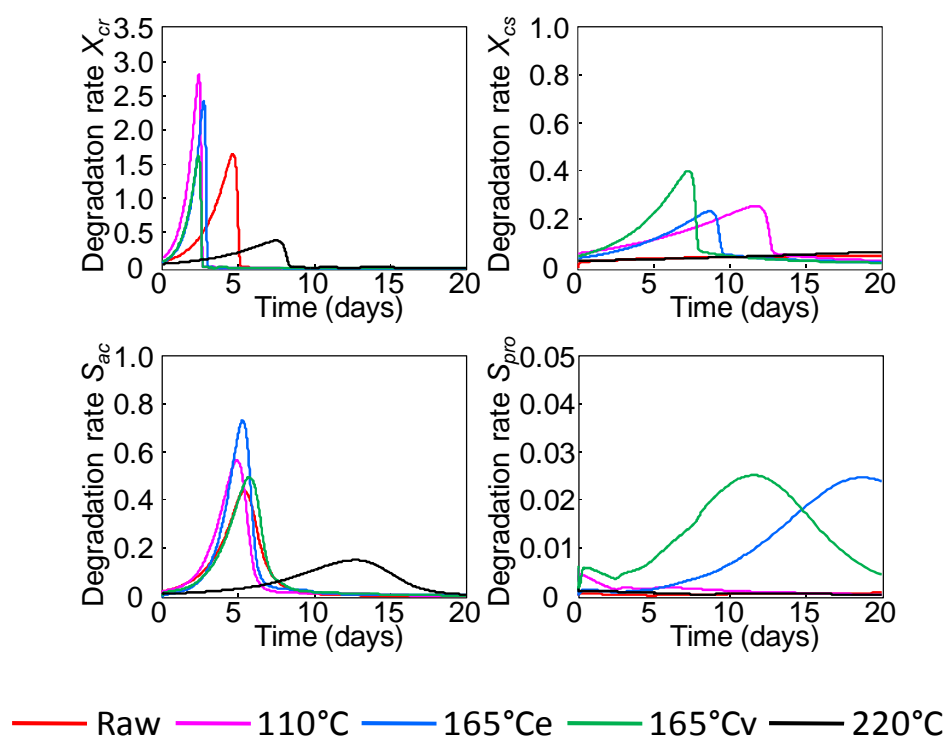
The  $X_{cr}$  fraction presents values of maximum degradation rate higher than the  $X_{cs}$  fraction, ranges from 0.39 to 2.81  $kg_{COD}.m^{-3}.d^{-1}$  against 0.05 to 0.40  $kg_{COD}.m^{-3}.d^{-1}$ . Moreover, the  $X_{cr}$  fraction is totally degraded between day 3 and day 5 of experiment whereas the maximum degradation rates of  $X_{cs}$  fraction are reached after 8 days of experiment. This confirms that the fraction  $X_{cr}$  is actually readily hydrolysable fraction and  $X_{cs}$  is a slowly hydrolysable fraction.

The increases of acetate degradation rates were observed when the  $X_{cr}$  fraction is degraded. Therefore the main COD fraction comes from the particulate organic matter that confirms the key impact of the hydrolysis step and its limiting effect on the WAS anaerobic digestion. However the degradation rate values of propionate are low and range from 0.001 to 0.025  $kg_{COD}.m^{-3}.d^{-1}$ . Moreover the propionate degradation dynamics are very slow. Thus, the propionate acetogenesis seem to be a limiting step like hydrolysis step during anaerobic digestion of WAS that is in agreement with Vavilin *et al.* (2008b).

The thermal pretreatment had an important effect on the degradation steps of  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  fractions. Indeed the sludge samples pretreated at 110°C and 165°C in the both mode show a faster degradation of  $X_{cr}$  fraction and higher maximum degradation rate values than the

untreated sludge. However, differences between the sludge samples pretreated at 110°C and at 165°C in the both mode were observed on the  $X_{cs}$  and propionate variations. The optimal thermal pretreatment at 165°C enhances the  $X_{cs}$  fraction degradation since it is totally degraded between day 8 and day 10 of experiment. For a sludge pretreated at 110°C, the  $X_{cs}$  fraction degradation runs until day 13 of experiment. The  $X_{cs}$  fraction degradation rates are very low for the untreated and pretreated at 220°C sludge samples. This could be explained by an increase of biodegradable fraction since the pretreatment improved the organic matter accessibility. Moreover the propionate degradation rates are improved for the sludge pretreated at 165°C. For the other sludge samples, the low degradation rates are linked to propionate accumulation (Figure 6.5.D, 6.11.D and 6.14.D). The propionate degrader activity increase could be linked to the enhancement of the  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  fraction degradation. The feed with an optimal pretreated sludge sample allows to maintain an increased flow of carbon into methane like it was reflected by the improved reactor performance.

At 220°C, the degradation rates decreases and the degradation of each fraction is delayed. Indeed the applied high temperature involved the formation of recalcitrant compounds as Melanoidins and Amadori compounds (Müller, 2001 and Bougrier *et al.*, 2007) which decreased the conversion rate of particulate organic matter fractions, acetate and propionate.



**Figure 6.15:** Degradation rate dynamics for the fourth degradation batch test of untreated and pretreated WAS samples (rates are expressed in  $\text{kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

To sum up, the model can be used in order to bring more informations and more understanding on the conversion pathways of the main intermediate products. Thus, the optimal thermal pretreatment insures higher degradation rates for  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  fractions

allowing an increased flow of carbon into methane. Indeed, the thermal pretreatment makes the organic matter more accessible and thus improves the activity of anaerobic biomass. At 220°C, the activity of anaerobic biomass was strongly inhibited by the production of recalcitrant compounds since the degradation rates are delayed.

#### **6.4.4 Model validation: application on continuous pilot scale digester**

To assess the quality of the optimised parameter sets and their applicability in full scale process modeling, a second validation study was carried out on a continuous pilot scale digester.

##### **6.4.4.1 Modeling approach**

The pilot scale digester was described in Section 6.2.1.2. The digested sludge of this reactor was the inoculum source used to perform the study of degradation batch kinetics of untreated and thermal pretreated WAS through the four successive batch tests. Moreover, the untreated WAS was the same sludge sample that fed the pilot scale digester and that was used in the study of degradation batch kinetics. Therefore, the modeling was carried out by keeping the same kinetic parameter set and the biodegradability value determined for the untreated sludge in batch test 1 (Table 6.2). The initial variables were determined from the characterization performed on the sludge entering in the continuous digester. Finally, the biomass concentrations were adapted from the initial biomass concentrations of the batch test 1 fed with the untreated sludge. The adaptation was performed by simulating several times during 28 days the process with a steady state SRT equal to 8 days, until that the concentrations values were constant.

##### **6.4.4.2 Performances of pilot scale digester**

During the studied period, *i.e.* at steady flow and variable flow periods, the WAS characteristics showed a total COD concentration equal to  $49.0 \pm 5.1 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$  and the soluble COD content equal to  $9.0 \pm 2.3 \%$  (Table 6.5). Thus, the organic matter was mainly present in the particulate fraction. We also observed that the amplitude of total and soluble COD concentration variation were high from 39.5 to 60.1  $\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$  and from 1.0 to 12.2  $\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The main biochemical compound in particulate fraction was proteins with a content equal to  $23.9 \pm 2.8 \%$ . The particulate content of carbohydrates and lipids were  $7.9 \pm 3.9 \%$  and  $8.1 \pm 2.3 \%$ , respectively. We also observed some variations in the biochemical composition. This could be due to the wastewater composition which was not constant inducing variability in the sludge quality and to the standard error of analytic method equal to 10-15 %.

The COD balance showed a difference between input and output COD equal to 2.5 % during the studied period. Moreover, the methane specific production was  $325 \text{ mL}_{\text{CH}_4}\cdot\text{g}_{\text{CODremoved}}^{-1}$  that represents a low variation of 7 % against the theoretical value ( $350 \text{ mL}_{\text{CH}_4}\cdot\text{g}_{\text{CODremoved}}^{-1}$ ).

Days	Flow	Influent characteristics					Effluent characteristics	
		Influent CODt	CODs	Proteins	Carbohydrates	Lipids	Effluent CODt	Methane yield
d	m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup>	g <sub>COD</sub> .L <sup>-1</sup>	% <sub>CODt</sub>	% <sub>CODp</sub>	% <sub>CODp</sub>	% <sub>CODp</sub>	g <sub>COD</sub> .L <sup>-1</sup>	L <sub>CH<sub>4</sub></sub> .g <sub>CODintro</sub> <sup>-1</sup>
0-12	Steady flow	52.2 ± 3.4	9.9 ± 1.1	23.8 ± 4.0	7.4 ± 5.7	9.1 ± 2.9	35.6 ± 2.3	117.4 ± 3.8
	1.01 ± 0.02 [0.98-1.04] <sup>1</sup>	[49.2-60.1] <sup>1</sup>	[7.5-11.8] <sup>1</sup>	[29.8-14.2] <sup>1</sup>	[2.5-20.9] <sup>1</sup>	[4.4-12.3] <sup>1</sup>	[31.7-40.4] <sup>1</sup>	[109.7-122.1] <sup>1</sup>
13-28	Variable flow	46.5 ± 4.9	8.3 ± 2.7	24.0 ± 1.4	8.3 ± 1.6	7.2 ± 1.1	28.5 ± 4.1	116.0 ± 32.2
	0.97 ± 0.41 [0.50-1.91] <sup>1</sup>	[39.5-52.9] <sup>1</sup>	[1.0-12.2] <sup>1</sup>	[22.5-26.8] <sup>1</sup>	[5.5-11.3] <sup>1</sup>	[5.3-9.1] <sup>1</sup>	[23.2-36.4] <sup>1</sup>	[67.2-178.6] <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Values in [ ] are minimal and maximal values

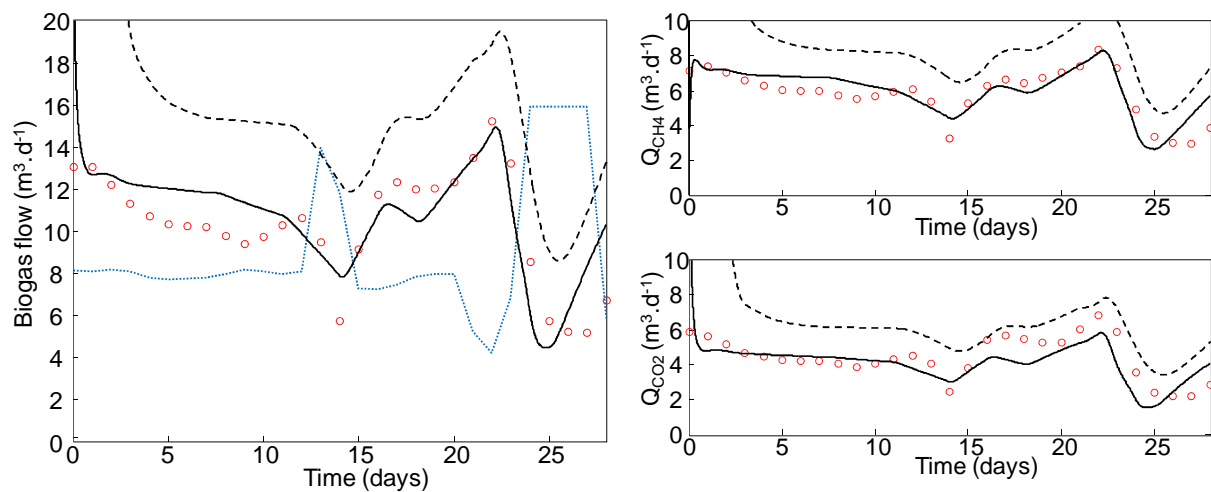
**Table 6.5:** Influent characteristics and performances of continuous pilot scale thermophilic anaerobic digester at different flow.

During the steady flow period ( $1.01 \pm 0.02 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  or a SRT of 8 d), the digester performance was low with a mean methane yield of  $117.4 \pm 3.8 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{intro}}}^{-1}$ . The flow variation led methane yield changes with an increase to  $178.6 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{intro}}}^{-1}$  at a flow of  $1.91 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  (SRT: 4.2 d and organic loading rate:  $8.3 \text{ kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}_{\text{reactor}}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and a decrease to  $67.2 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{intro}}}^{-1}$  at a flow of  $0.68 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  (SRT: 11.8 d and OLR:  $3.1 \text{ kg}_{\text{COD}} \cdot \text{m}_{\text{reactor}}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Thus, the increase of flow could improve the performance since it leads a higher OLR. However, the highest conversion performance into methane remained low with a value of  $179 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{COD}_{\text{intro}}}^{-1}$  that was due to the embedded organic matter structure.

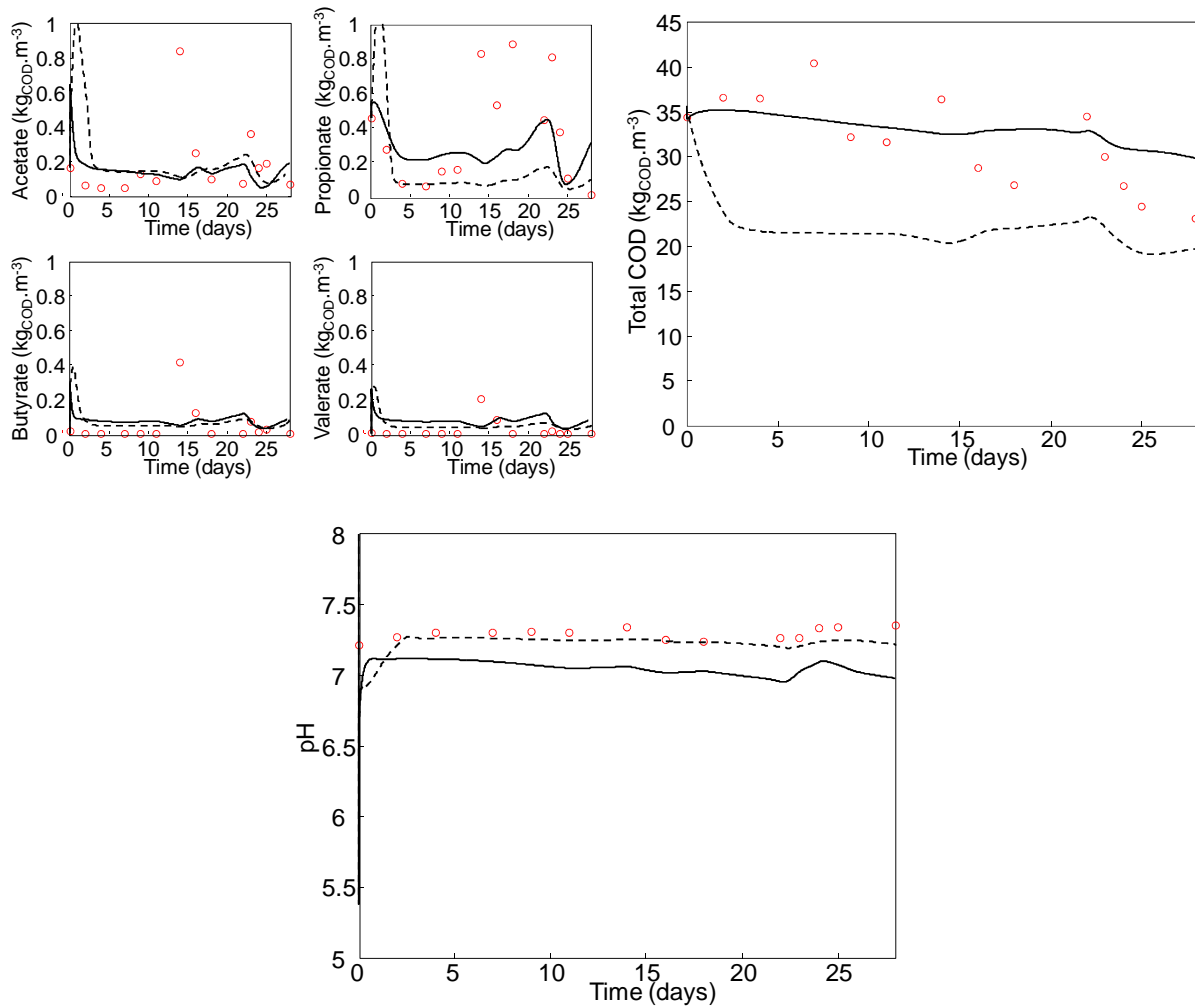
However, the experience was carried out to obtain data in order to observe the model dynamic behavior to a system perturbation and test the robustness model.

#### 6.4.4.3 Model validation

The model with two hydrolysable fractions and the standard ADM 1 model were applied to simulate the behavior of the digester. Figures 6.16 and 6.17 show the experimental data for the studied period and the simulated data for the both model in terms of  $Q_{\text{biogas}}$ ,  $Q_{\text{CH}_4}$ ,  $Q_{\text{CO}_2}$  and individual VFAs, total COD and pH, respectively.



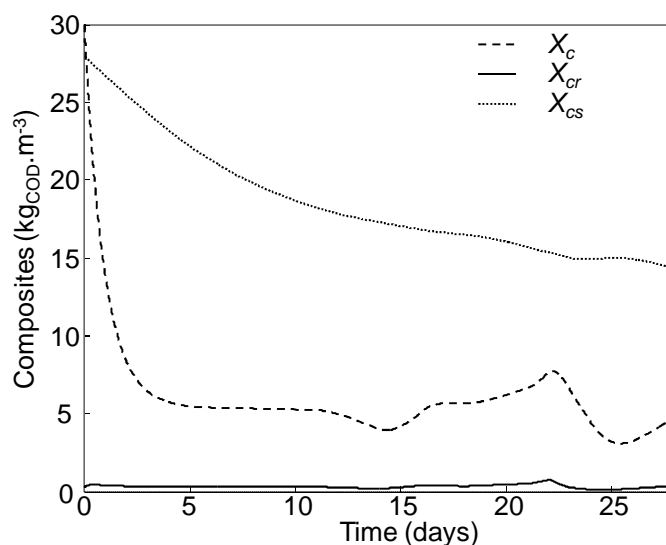
**Figure 6.16:** Simulated vs experimental  $Q_{\text{biogas}}$ ,  $Q_{\text{CH}_4}$  and  $Q_{\text{CO}_2}$  for pilot scale digester in thermophilic condition with SRT changes. Comparison between the proposed model and the ADM1 standard model (red circles: experimental data points, black plain line: modified ADM1, black dashed line: standard ADM1, blue dashed thin line: SRT).



**Figure 6.17:** Simulated vs experimental individual VFAs, total COD and pH for pilot scale digester in thermophilic condition with SRT changes. Comparison between the proposed model and the ADM1 standard model (red circles: experimental data points, black plain line: modified ADM1, black dashed line: standard ADM1).

The results show that the proposed model can simulate nicely the dynamic behavior of the main variables, in the liquid and in the gas phases. The model predicted well the dynamics of the biogas flow as a response of the sludge composition and the imposed flow. Small deviations in predicting the biogas production have been found. The differences can be explained with the non optimisation of parameters since the applied kinetic parameters came from the degradation batch test of untreated sludge. The pH was underestimated since the simulated VFAs concentrations were high. The model was able to reflect the pH behavior as a response of the simulated VFAs variations. However, the experimental pH did not change since the digester had a strong buffering capacity. pH prediction is closely related to the cation and anion concentrations in the digester and actually, these concentrations were worked out from the inorganic carbon and nitrogen, according to Rosen and Jeppsson (2002), that can explain the difference between simulated and measured pH. During the steady flow period, the model over-predicted VFAs concentrations (mainly propionate) and then during the

variable flow period, the simulated VFAs concentrations were underestimated (Figure 6.17). This may result from either underestimation of the uptake coefficients for propionate degraders or an underestimation of uptake coefficients for soluble compounds, butyrate and valerate degraders. Nevertheless, the simulated dynamic of VFAs concentration was similar to the experimental data and was a response of the imposed flow. Finally, the dynamic behavior of experimental output COD concentration was well predicted. Figure 6.18 illustrates the simulated composite fraction behavior for the model with two hydrolysable fractions ( $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ ) and the standard ADM1 model ( $X_c$ ). Thanks to the implementation of a fraction slowly hydrolysable  $X_{cs}$ , a part of COD was remained in the digester since this fraction was not degraded under the operating condition.



**Figure 6.18:** Simulated dynamic behavior of composite fractions for standard ADM1 model ( $X_c$ ) and model with two hydrolysable fractions ( $X_{cr}$  and  $X_{cs}$ ).

Figures 6.16 and 6.17 also show the difference between simulated data by the standard ADM1 and the model with two hydrolysable fractions. The former overestimated the biogas production since the COD degradation was higher and overestimated the propionate degradation. This standard model was less sensitive than the proposed model as a response of the imposed flow. Indeed, the simulated data by two hydrolysable fraction model showed quicker response, when the flow changes, than the standard model. This confirms that our structure and parameter values proposed in this work were well appropriated for modeling a thermophilic continuous pilot scale digester.

## 6.4.5 Conclusions

A new structure with two hydrolysable composite fractions for the ADM1 model was proposed. It was calibrated on four successive batch tests with untreated WAS and validated with thermal pretreated WAS samples through four successive feeds. Moreover, the kinetic parameters set and the modeling procedure were evaluated on continuous pilot scale thermophilic digester. From this work, the following conclusions can be drawn:

- The representation of the particulate organic matter bioaccessibility in the model ADM1 was enhanced by the implementation of two compartments of matter with a readily hydrolysable fraction  $X_{cr}$  and a slowly hydrolysable fraction  $X_{cs}$  and a model: Contois model to represent the disintegration and the hydrolysis steps. Indeed, the results showed that the proposed model can simulate nicely the dynamic behavior of the main variables, in the liquid and in the gas phases,
- A good representation of the behavior of thermophilic anaerobic digestion of untreated and pretreated WAS through successive batch tests was obtained from (i) input variables determined from the substrate characterization, (ii) biomass concentrations predicted by the model through the four successive batch tests and (iii) few changes between parameter sets of each sludge. Indeed, for the simulated vs experimental VFAs concentrations and produced methane volume, the correlation coefficient ( $r^2$ ) was 0.819 to 0.994 and 0.895 to 0.997, respectively. It indicated an agreement statistically significant ( $\alpha \leq 0.005$ ) between the measured and the simulated data in all cases. Thus the initial composition is an important parameter to represent the degradation kinetics and the thermal pretreatment impacts the degradation rates,
- The model was used to work out the degradation rates of the  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  fractions and intermediate products  $S_{pro}$  and  $S_{ac}$  in order to explain the observed differences on performances as a response of thermal pretreatment. The optimal thermal pretreatment insured a higher biodegradable fraction that led to obtain the best performances of anaerobic degradation and higher degradation rates. The thermal pretreatment makes the organic matter more available that decreases the mass transfer limitations and maintains an increased flow of carbon into methane and thus improves the activity of anaerobic biomass. At 220°C, the activity of anaerobic biomass was strongly inhibited by the production of recalcitrant compounds since the degradation rates decreased are delayed. Therefore, the model can be used in order to bring more informations and more understanding on the conversion pathways of the main intermediate products,
- The structure and parameter values proposed by this work were valuable since a validation of a thermophilic continuous pilot scale digester was succeeded.

## 6.5 Discussions

La nouvelle structure du modèle, intégrant une vitesse de réaction de Contois pour les étapes de désintégration et d'hydrolyse et deux fractions de matière organiques particulières rapidement et lentement hydrolysables, a permis de représenter les données expérimentales de la dégradation en condition batch de la boue non traitée et prétraitée à différentes températures. De plus, les paramètres cinétiques et les coefficients de rendement (notamment les paramètres cinétiques de désintégration de  $X_{cr}$  and  $X_{cs}$  et la fraction inerte  $f_{Xi_{Xc}}$ ) évalués à partir des tests de dégradation en condition batch ont été transposables pour la modélisation en condition continue des performances d'un digesteur pilote thermophile.



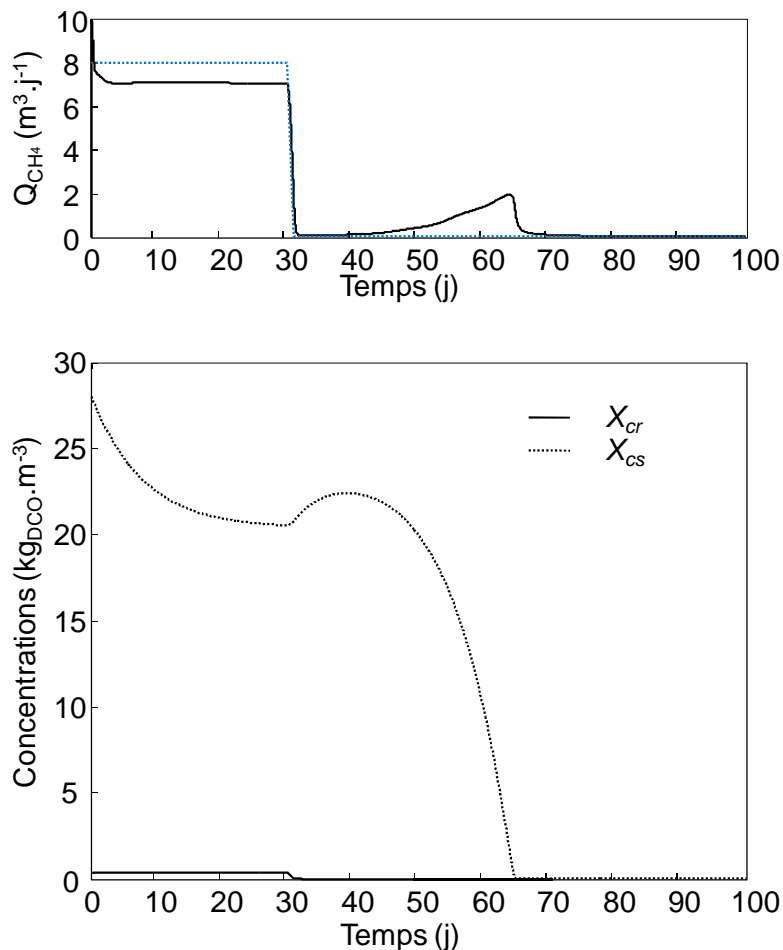
Les résultats concernant la fraction inerte sont en accord avec Batstone *et al.* (2009) qui ont montré que les paramètres  $f_{X_i_{X_c}}$ , estimés en condition batch et en condition continu, sont similaires et peuvent ainsi être appliqués pour la simulation en condition continue de digesteurs anaérobies. Pour les paramètres cinétiques de désintégration, la littérature présente des valeurs comprise entre 0,1 et 0,5  $j^{-1}$  lors de la dégradation de boues secondaires (Batstone *et al.*, 2002; Pavlostathis et Giraldo-Gomez, 1991), qui sont généralement déterminées à partir de tests batch. Batstone *et al.* (2009) ont montré que les constantes d'hydrolyse doivent être plus élevées, de l'ordre de 5  $j^{-1}$ , afin de simuler correctement les variations observées dans un digesteur en condition continue. Ainsi, ils en ont conclu que les paramètres cinétiques de désintégration et d'hydrolyse, déterminés en condition batch, ne peuvent pas être applicables pour la modélisation d'un procédé continu. Pour expliquer les différences entre les paramètres cinétiques, estimés à partir des données en condition batch et en condition continu, ils ont avancé plusieurs explications et notamment le fait que le modèle ADM1 standard soit basé sur une vitesse de réaction d'ordre un pour décrire la dégradation de  $X_c$  et que ce dernier soit considéré comme un substrat homogène.

Or un substrat tel que les boues secondaires n'est pas un composé homogène. Il a été démontré au cours des travaux de la thèse que ce type de boues possède une structure complexe, introduisant une notion d'accessibilité de la matière. Cela fait donc intervenir des propriétés de dégradation différentes pour les compartiments de matière considérés. Ainsi, le modèle ADM1 standard ne réussit pas à représenter les différentes propriétés de dégradation d'un composé particulaire.

Pour améliorer la modélisation de la digestion anaérobie de boues secondaires, nous avons proposé une nouvelle structure pour le modèle ADM1, composée : d'une cinétique de Contois afin de mieux représenter l'effet limitant des réactions d'hydrolyse et de deux fractions de matières organiques particulaires,  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$ , qui permettent d'intégrer deux vitesses de dégradation de la matière particulaire. Ces modifications sont en accord avec les variations de productions de biogaz observées dans un digesteur continu. En effet, dans un digesteur continu, la cinétique de production de biogaz est contrôlée par la fraction de matière rapidement hydrolysable. De plus, l'arrêt du débit d'alimentation dans un digesteur continu entraîne une chute brutale du débit de méthane, suivie par une production résiduelle plus lente sur une longue période (Siegrist *et al.*, 2002). Par contre, dans un test de dégradation en condition batch, la production de biogaz est dépendante de l'ensemble de la matière organique constituant le substrat.

Il a donc été intéressant de vérifier le comportement du modèle, intégrant  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$ , lorsque l'alimentation est stoppée sur un digesteur en condition continu. La simulation des performances d'un digesteur thermophile a été réalisée sur une période de 100 jours. Les valeurs des paramètres du modèle et les caractéristiques du substrat sont basées sur la simulation réalisée dans le paragraphe 6.4.4. Afin d'observer uniquement l'effet de l'arrêt du débit d'alimentation sur les performances du digesteur, la composition du substrat d'alimentation est conservée constante tout au long de la simulation. Durant les 30 premiers, le débit est égal à 1  $m^3.j^{-1}$  puis il est stoppé. La Figure 6.19 présente le débit de méthane et les

variations des fractions  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$ . Lors de l'arrêt du débit d'alimentation, une forte diminution de la production de méthane est observée, ainsi qu'une dégradation totale de la fraction rapidement hydrolysable  $X_{cr}$ . Par contre, une augmentation de la fraction  $X_{cs}$  est observée. Cela peut être expliqué par une mortalité de la biomasse lors de l'arrêt du débit due à une limitation en substrat. Après un temps d'adaptation d'une dizaine de jours, la fraction de matière lentement hydrolysable commence à être dégradée. Une production résiduelle de méthane est observée entre le 45<sup>ème</sup> et le 65<sup>ème</sup> jour.



**Figure 6.19:** Variations du débit de méthane simulé et des concentrations en  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$  simulées pour le digesteur pilote en condition thermophile lors de l'arrêt de l'alimentation.

Le modèle, intégrant la notion de bioaccessibilité grâce aux fractions  $X_{cr}$  et  $X_{cs}$ , est donc capable de représenter correctement les variations induites par les compartiments de matières rapidement et lentement hydrolysables, observées dans un digesteur en condition continu ou dans un réacteur en condition batch. Cela peut ainsi expliquer que les paramètres cinétiques calibrés et validés en condition batch ont été transposables en condition continu.

## Chapitre 7: Conclusions générales et perspectives



## Chapitre 7. Conclusions générales et perspectives

La composition et l'organisation de la matière au sein des boues sont présentées comme des facteurs importants pour les performances de dégradation observées. Mais peu de travaux scientifiques ont tenté de mettre en relation ces paramètres avec la biodégradation anaérobie. Dans ce cadre, l'étude du lien entre la caractérisation chimique et biochimique de la matière organique de boues secondaires d'épuration et les performances de digestion anaérobie thermophile était l'objectif principal de la thèse. Ainsi, des méthodes de caractérisation macroscopiques, biochimiques et de fractionnement de la matière organique de boues secondaires, relativement simples à mettre en application à l'échelle industrielle, ont été testées et reliées à leur potentiel méthane. Les principales voies réactionnelles de la dégradation anaérobie thermophile en condition batch d'une boue secondaire non traitée et prétraitée thermiquement ont été suivies ce qui a permis de déterminer l'effet de l'état du substrat initial et de l'adaptation de l'inoculum. Enfin, le modèle mathématique proposé a contribué à une meilleure compréhension de l'impact de la composition des boues secondaires d'épuration sur les voies réactionnelles de la digestion anaérobie thermophile.

L'étude sur la caractérisation de boues d'épuration en entrée et en sortie de digesteurs industriels a permis de définir la composition initiale et finale de la matière organique lors de la digestion anaérobie. La **matière organique** des boues d'entrée est principalement sous forme **particulaire** (85,3 %<sub>MS</sub> à 97,5 %<sub>MS</sub>). Les **protéines** sont apparues comme le compartiment biochimique **majoritaire** (0,34 à 0,47 g<sub>SAB</sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>) de la matière organique, également composée de **glucides** (0,12 à 0,30 g<sub>Glu</sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>) et de **lipides et d'AGV** (0,05 g·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>). Cependant, les conditions opératoires n'étant pas similaires sur les digesteurs industriels étudiés, il était impossible de comparer les rendements d'abattement mesurés. Ainsi, la caractérisation initiale des boues étudiées a été reliée à leur potentiel méthane thermophile évalué en laboratoire. Il est à noter que les fractionnements de la matière organique utilisés au cours de la thèse sont habituellement peu employés pour développer des indicateurs initiaux de la biodégradabilité des boues d'épuration. Or ils se sont avérés intéressants pour apporter des indicateurs définissant la biodisponibilité et la biodégradabilité de la matière.

Une étude statistique par PLS, basée sur la caractérisation biochimique et des paramètres macroscopiques (carbone organique soluble et degré d'oxydation), a permis d'élaborer un modèle du potentiel méthane des boues étudiées. Ce modèle a été validé sur quatre échantillons (une boue secondaire prétraitée thermiquement, une boue secondaire non traitée, une boue secondaire digérée et de la cellulose) non intégrés à la construction du modèle. Les **indicateurs de la composition initiale** des boues secondaires d'épuration, inclus dans le modèle, sont donc **pertinents**. Ils permettent d'apporter des **informations sur la biodégradabilité de la matière, l'état d'oxydation** et sur la **concentration des différents composés biochimiques** de la matière organique. Des informations sont également apportées sur la **biodisponibilité de la matière**, c'est-à-dire sur la matière initialement disponible pour

les microorganismes épurateurs à travers la mesure du **carbone organique soluble**. Ainsi, l'ensemble de ces paramètres permettent de définir le potentiel méthane thermophile des boues étudiées.

Le potentiel méthane des boues secondaires d'épuration peut être augmenté par la solubilisation de la matière organique. Le prétraitement thermique est l'une des principales solutions utilisées au niveau industriel pour accroître la quantité de matière soluble initiale (ou la biodisponibilité de la matière). L'objectif du second chapitre a donc été d'étudier l'impact de l'état initial d'une boue secondaire non traitée et prétraitée thermiquement sur les performances et les voies réactionnelles de la digestion anaérobie thermophile en réacteur batch dans le but d'élaborer un modèle mathématique de type bilan matière. Un protocole expérimental a été proposé permettant d'évaluer le potentiel méthane des échantillons étudiés et de suivre les étapes réactionnelles intermédiaires prépondérantes.

La **phase de méthanogénèse** est étroitement **reliée à l'étape d'hydrolyse qui joue un rôle limitant**. En effet, une phase de latence sur la production de méthane est observée, ainsi qu'une production importante d'acétate lors des premiers jours de la dégradation. Le suivi de la concentration des composés solubles, définie par la concentration en DCO soluble moins la concentration en AGV totaux, tend à montrer **l'existence de deux phases distinctes d'hydrolyse des composés particuliers** au cours de la dégradation. Cela confirme que la notion de bioaccessibilité de la matière due à une organisation complexe des boues secondaires. Le suivi des AGV individuels a également montré que **la méthanogénèse acétoclaste** ainsi que **l'acétogénèse du propionate** sont **deux étapes limitantes** dans la production de méthane. En effet, nous avons montré que la dégradation de l'acétate est fortement reliée à une première phase de production de méthane rapide et que la dégradation du propionate est reliée à une deuxième phase de production de méthane plus lente. Ainsi en condition batch, la production de méthane est régie par la dégradation de l'ensemble de la matière potentiellement dégradable de la boue étudiée, laquelle, due à une structure complexe, dicte les deux étapes distinctes observées.

Les résultats ont confirmé les **conditions optimales de prétraitement thermique aux alentours de 165°C** déterminées pour la digestion anaérobie mésophile dans la littérature scientifique. De plus, une montée de température par l'action de colliers chauffants (méthode généralement utilisée sur les procédés de traitement thermique en laboratoire) induit des rendements de solubilisation et une amélioration de la production de méthane similaires à l'injection de vapeur utilisée sur les procédés industriels. Le prétraitement thermique permet de **minimiser l'effet limitant de l'hydrolyse** en solubilisant une partie des composés particuliers. Par l'action de la chaleur, **deux mécanismes** ont lieu : **augmentation de la quantité de composés initialement disponibles** et **amélioration de l'accessibilité de la matière organique particulière**. Cela a été confirmé par le suivi de la variation des concentrations en composés solubles au cours de la dégradation de la boue secondaire traitée à différentes températures. Dans le cas de conditions optimales de traitement thermique, la quantité initiale de composés solubles (matière biodisponible) est augmentée. De plus, ils ont été directement dégradés indiquant que l'étape d'hydrolyse fut minimisée. Le **potentiel**

**méthane pour la boue secondaire traitée à 165°C** a en effet augmenté de **47 à 61 %** par rapport à la boue non traitée.

Une **inhibition** et une **plus faible vitesse de réaction de l'acétogénèse du propionate** ont été observées sur les cinétiques de dégradation de la boue non traitée et prétraitée thermiquement à 110°C, respectivement. La **dégradation du propionate** a été **améliorée** et maintenue au cours des alimentations successives grâce à un prétraitement thermique optimal. Les **vitesse d'accumulation maximales d'acétate**, qui sont les plus élevées lors de la dégradation de cette boue, permettent de confirmer cette hypothèse. Ainsi, le fait d'apporter une plus grande quantité de matière rapidement dégradable aux étapes de réactions intracellulaires, grâce au prétraitement, peut être une explication à l'amélioration des performances de l'étape d'acétogénèse.

Nous pouvons également dire qu'une **haute température de traitement thermique (220°C) dégrade le potentiel méthane** de la boue et **diminue fortement les vitesses de réactions de la méthanogénèse acétoclaste** et **inhibe l'acétogénèse du propionate**. La production de composés réfractaires, tels que **les mélanoidines et les composés d'Amadori**, sont responsables de la diminution des performances de dégradation.

L'objectif principal de l'utilisation du modèle de digestion anaérobie ADM1 a été de mieux comprendre l'impact de la composition initiale des boues d'épuration sur les performances de dégradation sous condition thermophile. Dans cette optique, la structure du modèle standard a été modifiée afin de proposer des solutions pour répondre aux deux principales limites qui sont : les vitesses de réaction des étapes de désintégration et d'hydrolyse et la détermination des variables initiales et des flux de matières lors de l'étape de désintégration de la variable  $X_c$ .

L'organisation complexe de la matière organique des boues secondaires fait intervenir une notion de bioaccessibilité qui est représentée de façon incorrecte dans le modèle standard par une vitesse de réaction d'ordre un. De plus, les courbes de production de méthane, complétées par celles des composés solubles, montrent deux phases distinctes de méthanogénèse. Ainsi, la démarche, utilisée pour modifier la structure du modèle standard, a été d'introduire une **vitesse de réaction de Contois** pour les étapes de désintégration et d'hydrolyse et deux variables d'entrée, **une fraction facilement hydrolysable  $X_{cr}$**  et **une fraction lentement hydrolysable  $X_{cs}$** , pour représenter le composite  $X_c$ .

Le modèle proposé **a été calé** sur les quatre cinétiques successives de dégradation réalisées sur la boue non traitée **et validé** sur les quatre cinétiques successives de dégradation de la boue prétraitée thermiquement à différentes températures. Nous avons montré que **l'implémentation des variables d'entrée**, ainsi que les **flux de matières** des compartiments de matières complexes vers les compartiments biochimiques ( $f_{ch\_X_{cr}}$ ,  $f_{pr\_X_{cr}}$ ,  $f_{li\_X_{cr}}$  **et**  $f_{ch\_X_{cs}}$ ,  $f_{pr\_X_{cs}}$ ,  $f_{li\_X_{cs}}$ ) peuvent être déterminés à partir des **méthodes analytiques utilisées** dans les travaux de thèse. La **détermination du potentiel méthane** reste une donnée expérimentale importante pour simuler les performances de dégradation de chaque boue. Ainsi, le nouveau modèle a permis de représenter correctement les variables mesurées en phase liquide et en

phase gazeuse lors du suivi des différentes cinétiques de dégradation pour chaque boue grâce à une **détermination des variables d'entrée basée sur la caractérisation des boues, des concentrations en biomasses prédites par le modèle** et donc dépendantes du substrat dégradé, et de **peu de modifications sur les paramètres cinétiques** du modèle.

Le modèle a été utilisé comme un **outil d'étude** ainsi nous avons déterminé les vitesses de dégradation des compartiments de matières particulaires complexes ( $X_{cr}$  et  $X_{cs}$ ), des produits intermédiaires ( $S_{pro}$  et  $S_{ac}$ ). Cela a permis d'évaluer l'évolution des paramètres cinétiques, des concentrations en biomasses et la caractérisation initiale des boues et d'expliquer les différences observées sur les performances de dégradation en réponse au prétraitement thermique. Dans le cas de la boue secondaire traitée à la température optimale, l'accessibilité de la matière est améliorée **diminuant ainsi les limitations de transferts de matière**, les **vitesses de dégradation sont donc augmentées et la dégradation est plus rapide**, ce qui permet de maintenir une **conversion importante du carbone en méthane**.

**L'application** du modèle et du jeu de paramètres cinétiques de la boue non traitée sur un **digesteur anaérobie continu en condition thermophile** a permis de confirmer l'avantage d'introduire deux fractions de matière organique particulaire ayant des vitesses d'hydrolyse différentes. Le modèle ADM1 standard considère en effet le substrat comme homogène dont la dégradation est décrite par un simple paramètre cinétique. Cependant, la composition et la structure de la boue secondaire engendrent une accessibilité plus ou moins importante de la matière et les performances d'un digesteur industriel sont généralement contrôlées par la fraction de matière rapidement dégradable. Par contre, en condition batch, nous avons montré que les **performances de dégradation** sont contrôlées par **l'ensemble de la matière** et montrent généralement des **vitesses différentes de production de méthane** au cours du temps. Ainsi, l'introduction d'une **fraction de matière rapidement hydrolysable**, d'une **fraction de matière lentement hydrolysable** et d'une vitesse de réaction mieux adaptée (**modèle de Contois**) permet de **mieux représenter le phénomène d'accessibilité de la matière organique qui limite la production de méthane**. Cela permet donc d'expliquer le fait que **les paramètres cinétiques déterminés en condition batch sont transposables au procédé continu**.

Grâce à une approche pluridisciplinaire, les données recueillies lors de cette thèse contribuent à une meilleure compréhension des phénomènes biologiques mis en jeu lors de la digestion anaérobie thermophile de boues secondaires d'épuration. Sur le plan applicatif, l'étude du lien entre la caractérisation initiale des boues et leur potentiel méthane a permis de déterminer des indicateurs initiaux pertinents qui fournissent des informations sur la biodégradabilité et la biodisponibilité initiale de la matière. La modélisation a permis une meilleure représentation des phénomènes réactionnels ainsi que la mise en place de variables d'entrée plus adaptées aux caractéristiques du substrat, ce qui a amélioré l'intégration de la notion de l'accessibilité de la matière dans le modèle.



## Perspectives

Durant les travaux de la thèse, de nombreuses pistes de recherches ont été identifiées et exigent d'être exploitées afin de développer des méthodes de caractérisation des boues d'épuration plus fines, d'intégrer en détail la bioaccessibilité de la matière dans le modèle de digestion anaérobie et d'optimiser les performances de dégradation. Les perspectives proposées sont listées ci-dessous :

- L'analyse par spectrofluorimétrie 3D s'est d'ores et déjà révélée pertinente pour identifier et différencier les composés protéiques et les substances humiques dans la phase soluble des boues étudiées. Cependant, la phase soluble ne représente qu'un faible pourcentage de la matière organique des boues d'épuration. Ainsi, l'application de la spectrofluorimétrie en phase solide (SPF) pourrait constituer un moyen rapide et économique pour fournir des informations précises sur la composition de la fraction particulaire des boues d'épuration et ainsi développer des indicateurs initiaux nécessitant un temps d'analyse réduit. Cette analyse pourrait également être appliquée au suivi de procédés industriels de digestion anaérobie afin d'identifier les composés protéiques non dégradés et au suivi des procédés de prétraitement thermique dans le but de minimiser la production de composés réfractaires. Un projet post doctoral est en cours de réalisation et a déjà montré des résultats intéressants sur l'application de la SPF à des matrices de déchets solides.
- En règle générale, les méthodes d'extractions utilisées sur les boues d'épuration visent une classe biochimique ou un compartiment particulier de la matière, tels que les substances polymériques extracellulaires des boues. A l'heure actuelle, aucune étude n'a proposé un fractionnement complet de la matière organique totale des boues. Il serait donc intéressant d'appliquer des méthodes d'extractions optimisées sur la matière des boues en associant des méthodes analytiques telles que la spectrofluorimétrie 3D en phase soluble ou une caractérisation biochimique, afin de définir un fractionnement par compartiment de matière plus ou moins extractible. Cette méthode de caractérisation permettrait de définir de façon détaillée la bioaccessibilité globale de la matière des boues, qui reste un verrou pour une prédiction précise du potentiel méthane des boues. Les travaux du post doctorat, évoqué ci-dessus, ont également pour objectif de définir un fractionnement adapté de la matière organique des boues d'épuration.
- La capacité du modèle à représenter des données expérimentales reste basée sur la détermination du potentiel méthane via des tests de dégradation batch coûteux en temps et en matériel. Il serait possible d'effectuer le lien entre la biodégradabilité prédite par une analyse statistique, basée sur les caractéristiques initiales du déchet, et la fraction inerte nécessaire à la calibration du modèle. En effet, la biodégradabilité prédite permet d'avoir accès à la fraction inerte, laquelle permet de déterminer le coefficient de rendement  $f_{Xi_{Xc}}$  du modèle. Cependant, la détermination de la biodégradabilité d'un déchet à partir d'une relation linéaire de plusieurs paramètres

issus de la caractérisation initiale présente une limite qui est le caractère « déchet dépendant ». Une solution serait de réaliser une étude portant sur le développement d'un modèle statistique entre la caractérisation d'un large panel de déchets (boues d'épuration, lisiers, compost, déchets solides...) et leur potentiel méthane. Ainsi, il serait possible d'obtenir un modèle généraliste qui intégrerait les paramètres pertinents de chaque déchet (structure, composition, composés inhibiteurs) et donnerait accès rapidement à leur biodégradabilité. L'inconvénient principal est de déterminer les méthodes analytiques de caractérisation pouvant être commune à un large panel de déchets. Pour cela, un traitement préliminaire des déchets est possible, tel qu'une lyophilisation suivie d'un broyage, qui va permettre d'homogénéiser les déchets, sur lesquelles les méthodes analytiques seront appliquées. Cependant, la biodégradabilité obtenue ne sera pas la valeur réelle puisque la structure, et notamment la bioaccessibilité de la matière organique, est complètement modifiée. Mais cela peut être un compromis afin d'obtenir rapidement une valeur de biodégradabilité d'un déchet. Des travaux de thèse, tentant de prédire la biodégradabilité de déchets grâce à des analyses en spectroscopie UV/NIR/MIR de la matière organique, sont en cours au LBE de Narbonne. Ils s'intéressent grâce à des mesures spectrales de déchets à déterminer soit de façon directe la biodégradabilité et la cinétique de production de méthane soit de façon indirecte via la détermination de la composition de la matière organique qui sera ensuite reliée aux performances de dégradation. Les résultats pourront contribuer au couplage entre une méthode rapide de détermination du potentiel méthane et un modèle dynamique.

- Une autre méthode pour définir la fraction de matière dégradable dans le modèle serait d'implémenter les variables d'entrée, définissant le déchet, en se basant sur un fractionnement détaillé par compartiment de matière plus ou moins extractible qui permettrait de définir les fractions non ou très difficilement accessibles, ainsi que la matière inerte. Cependant, le fractionnement resterait dépendant du déchet étudié mais la bioaccessibilité de la matière composant le déchet serait ainsi correctement représentée dans le modèle et chaque fraction définie pourrait être associée à une constante d'hydrolyse plus ou moins élevée suivant la force nécessaire pour l'extraction. Ces travaux seront réalisés au cours d'un projet de thèse faisant suite à celle-ci. De plus, il serait intéressant d'étudier la biodégradabilité des compartiments extraits pour affiner le choix de la vitesse de réaction associée à leur dégradation. Mais cela peut se révéler difficile lorsque des solvants sont utilisés pour les phases d'extraction. Ces perspectives pourront permettre d'éviter l'utilisation des tests de dégradation batch pour prédire le potentiel méthane d'une boue.
- Une accumulation de propionate a été observée lors de la dégradation de la boue secondaire non traitée. Le prétraitement thermique a permis d'améliorer les performances de dégradation et de maintenir une conversion normale du propionate en acétate. L'ajout d'éléments traces métalliques a également un effet bénéfique sur la dégradation du propionate et de l'acétate. Ainsi, l'association d'un prétraitement

optimal, qui entraîne une fraction biodégradable plus importante, à un ajout optimisé d'éléments traces métalliques pourrait permettre l'amélioration des performances de digestion anaérobie des boues d'épuration. Cependant, il serait nécessaire d'évaluer les teneurs ainsi que la disponibilité et l'accessibilité de ces composés au sein des boues d'épuration. La dégradation en condition thermophile du propionate est également très sensible à la pression partielle en hydrogène, ainsi l'installation d'une sonde permettant la mesure de la concentration en phase liquide de l'hydrogène pourrait s'avérer intéressante pour obtenir un suivi plus détaillé et mieux comprendre la présence de certaines inhibitions.

- La méthanisation est constituée d'une chaîne trophique de plusieurs espèces microbiennes. La diversité microbienne semble également être un paramètre majeur pour la conduite d'un procédé de digestion anaérobie. De plus, les nouveaux outils moléculaires permettent une caractérisation de la diversité phylogénétique des communautés microbiennes et d'étudier leurs dynamiques dans des procédés biologiques. La Microbiologie est ainsi devenue une discipline prédictive et non plus purement descriptive. Jusqu'à présent, la diversité microbienne a été peu étudiée au cours des réactions de conversion des substrats. Grâce aux travaux de Ramirez (2008), la relation entre la biodiversité, la dynamique des populations et les performances de digestion de boues d'épuration non traitées et prétraitées thermiquement, présentées dans cette thèse, a été étudiée via un modèle mathématique, nommé ADM1\_10, qui intègre la diversité microbienne. Un article scientifique est en préparation. Les principales conclusions sont : les caractéristiques initiales de l'inoculum et la disponibilité du substrat semblent avoir une influence sur la composition microbienne au cours de la dégradation en termes de populations bactériennes et *Archaea*. Cependant, une validation des résultats par des mesures expérimentales est nécessaire pour confirmer les prédictions du modèle. La synergie entre le Génie des Procédés, la Microbiologie et la Modélisation résultera sur une compréhension globale et détaillée de l'influence des conditions opératoires et de la composition du substrat sur le comportement de l'écosystème et donc de ces performances. Des réponses pourront également être apportées à l'importance du choix de l'inoculum, qui déterminera la nature des espèces microbiennes présentes en fonction de la composition du substrat afin d'optimiser les vitesses et les taux de dégradation. Enfin, l'utilisation de techniques d'investigation *in situ* (FISH et microscopie confocale) pourront révéler l'organisation spatiale de la colonisation du substrat par les différentes communautés microbiennes. Ces analyses seront intéressantes pour mieux comprendre et définir les phénomènes de diffusion et de bioaccessibilité du substrat.



## Références



- Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G. and Novak, P. J. (2007).** Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(9): 2905-2910.
- Andrews, J. F. (1969).** Dynamic model of the anaerobic digestion process. *Journal of the Sanitary Engineering Division, ASCE*. **95**: 95-106.
- Andrews, J. F. and Graef, S. P. (1971).** Dynamic modelling and simulation of the anaerobic digestion process. *In Advances in Chemistry Series*. **105**: 126-162.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. and van Lier, J. B. (2009).** Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. **59**(5): 927-934.
- Angelidaki, I., Chen, X. X., Cui, J. B., Kaparaju, P. and Ellegaard, L. (2006).** Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: Start-up procedure for continuously stirred tank reactor. *Water Research*. **40**(14): 2621-2628.
- Angelidaki, I. and Sanders, W. (2004).** Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. **3**(2): 117-129.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J. and Dewil, R. (2008).** Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. **34**(6): 755-781.
- Aquino, S. F., Chernicharo, C. A. L., Soares, H., Takemoto, S. Y. and Vazoller, R. F. (2008).** Methodologies for determining the bioavailability and biodegradability of sludges. *Environmental Technology*. **29**(8): 855-862.
- Araujo, L. D., Catunda, P. F. C. and van Haandel, A. C. (1998).** Biological sludge stabilisation Part 2: Influence of the composition of waste activated sludge on anaerobic stabilisation. *Water SA*. **24**(3): 231-236.
- Archer, D. B. and Kirsop, B. H. (1990).** The microbiology and control of anaerobic digestion. *In: Wheatley A. Anaerobic Digestion: a Waste Treatment Technology, Critical Reports an Applied Chemistry. Elsevier Applied Science for SCI, London and New York*. 43-92.
- Ardic, I. and Taner, F. (2005).** Effects of thermal, chemical and thermochemical pretreatments to increase biogas production yield of chicken manure. *Fresenius Environmental Bulletin*. **14**(5): 373-380.
- Arnaiz, C., Gutierrez, J. C. and Lebrato, J. (2006).** Biomass stabilization in the anaerobic digestion of wastewater sludges. *Bioresource Technology*. **97**(10): 1179-1184.
- Austermann-Haun, U., Meyer, H., Seyfried, C. F. and Rosenwinkel, K. H. (1999).** Full scale experiences with anaerobic/aerobic treatment plants in the food and beverage industry. *Water Science and Technology*. **40**(1): 305-312.
- Baker, A. and Spencer, R. G. M. (2004).** Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment*. **333**(1-3): 217-232.
- Baker, S. K. (1999).** Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. *Australian Journal Of Agricultural Research*. **50**(8): 1293-1298.
- Barbusinski, K. and Koscielniak, H. (1997).** Activated sludge floc structure during aerobic digestion. *Water Science and Technology*. **36**(11): 107-114.
- Barjenbruch, M. and Kopplow, O. (2003).** Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Advances in Environmental Research*. **7**(3): 715-720.

- Barret, M., Patureau, D., Latrille, E. and Carrère, H. (2009).** A Three-Compartment Model for Micropollutants Sorption in Sludge: Methodological Approach and Insights. *Water Research (In Press, Accepted Manuscript)*.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H. and Vavilin, V. A. (2002).** Anaerobic Digestion Model No1 (ADM1), IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes. London: IWA Publishing.
- Batstone, D. J., Keller, J. and Steyer, J. P. (2006).** A review of ADM1 extensions, applications, and analysis: 2002-2005. *Water Science and Technology*. **54**(4): 1-10.
- Batstone, D. J., Tait, S. and Starrenburg, D. (2009).** Estimation of Hydrolysis Parameters in Full-Scale Anaerobic Digesters. *Biotechnology and Bioengineering*. **102**(5): 1513-1520.
- Battimelli, A., Millet, C., Delgenes, J. P. and Moletta, R. (2003).** Anaerobic digestion of waste activated sludge combined with ozone post-treatment and recycling. *Water Science and Technology*. **48**(4): 61-68.
- Benabdallah El-Hadj, T., Dosta, J., Marquez-Serrano, R. and Mata-Alvarez, J. (2007).** Effect of ultrasound pretreatment in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion with emphasis on naphthalene and pyrene removal. *Water Research*. **41**(1): 87-94.
- Bengraïne, K. and Marhaba, T. F. (2004).** Predicting organic loading in natural water using spectral fluorescent signatures. *Journal of Hazardous Materials*. **108**(3): 207-211.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A. and Welander, T. (2008).** Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*. **40**(3): 492-499.
- Blumensaat, F. and Keller, J. (2005).** Modelling of two-stage anaerobic digestion using the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1). *Water Research*. **39**(1): 171-183.
- Bonjoch, X. and Blanch, A. R. (2009).** Resistance of Faecal Coliforms and Enterococci Populations in Sludge and Biosolids to Different Hygienisation Treatments. *Microbial Ecology*. **57**(3): 478-483.
- Bonmati, A., Flotats, X., Mateu, L. and Campos, E. (2001).** Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Water Science and Technology*. **44**(4): 109-116.
- Bougrier, C., Albasi, C., Delgenès, J. P. and Carrère, H. (2006).** Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing*. **45**(8): 711-718.
- Bougrier, C., Delgenes, J. P. and Carrere, H. (2007).** Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal*. **34**(1): 20-27.
- Bougrier, C., Delgenes, J. P. and Carrere, H. (2008).** Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. *Chemical Engineering Journal*. **139**(2): 236-244.
- Bryers, J. D. (1985).** Structured modeling of the anaerobic digestion of biomass particulates. *Biotechnology and Bioengineering*. **27**(5): 638-649.
- Buffière, P., Loisel, D., Bernet, N. and Delgenes, J. P. (2006).** Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology*. **53**(8): 233-241.
- Buffiere, P., Mirquez, L. D., Steyer, J. P., Bernet, N. and Delgenes, J. P. (2008).** Anaerobic digestion of solid wastes needs research to face an increasing industrial success. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. **6**.



- Campos, J. L., Otero, L., Franco, A., Mosquera-Corral, A. and Roca, E. (2009).** Ozonation strategies to reduce sludge production of a seafood industry WWTP. *Bioresource Technology*. **100**(3): 1069-1073.
- Carrère, H., Bougrier, C., Castets, D. and Delgenes, J. P. (2008).** Impact of initial biodegradability on sludge anaerobic digestion enhancement by thermal pretreatment. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. **43**(13): 1551-1555.
- Carrère, H., Sialve, B. and Bernet, N. (2009).** Improving pig manure conversion into biogas by thermal and thermo-chemical pretreatments. *Bioresource Technology-Second International Conference on Engineering for Waste Valorisation (WasteEng2008)*. **100**(15): 3690-3694.
- Chauzy, J., Graja, S., Gerardin, F., Cretenot, D., Patria, L. and Fernandes, P. (2005).** Minimisation of excess sludge production in a WWTP by coupling thermal hydrolysis and rapid anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **52**(10-11): 255-263.
- Chen, Y., Cheng, J. J. and Creamer, K. S. (2008).** Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. **99**(10): 4044-4064.
- Chen, Y. G., Jiang, S., Yuan, H. Y., Zhou, Q. and Gu, G. W. (2007).** Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*. **41**(3): 683-689.
- Chen, Y. R. and Hashimoto, A. G. (1980).** Substrate Utilization Kinetic-Model for Biological Treatment Processes. *Biotechnology and Bioengineering*. **22**(10): 2081-2095.
- Chu, C. P., Lee, D. J. and Peng, X. F. (2004).** Structure of conditioned sludge flocs. *Water Research*. **38**(8): 2125-2134.
- Cirne, D. G., Paloumet, X., Bjornsson, L., Alves, M. M. and Mattiasson, B. (2007).** Anaerobic digestion of lipid-rich waste - Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*. **32**(6): 965-975.
- Climent, M., Ferrer, I., Baeza, M. d. M., Artola, A., Vazquez, F. and Font, X. (2007).** Effects of thermal and mechanical pretreatments of secondary sludge on biogas production under thermophilic conditions. *Chemical Engineering Journal*. **133**(1-3): 335-342.
- Conrad, A., Kontro, M., Keinanen, M. M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L. and Block, J. C. (2003).** Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*. **38**(10): 1093-1105.
- Contois, D. E. (1959).** Kinetics of bacterial growth: Relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *Journal of General Microbiology*. **21**: 40-50.
- Copp, J. B., Jeppsson, U. and Rosen, C. (2003).** Towards an ASM1-ADM1 State Variable Interface for Plant-Wide Wastewater Treatment Modeling. *WEFTEC 2003, Oct 12-15, Los Angeles, California, USA*.
- Davidsson, A., Wawrzynczyk, J., Norrlov, O. and Jansen, J. L. (2007).** Strategies for enzyme dosing to enhance anaerobic digestion of sewage sludge. *Journal of Residuals Science & Technology*. **4**(1): 1-7.
- Degrémont (2005).** Mémento technique de l'eau, 10ème édition, Tome 1 et 2. *Editions Lavoisier, Paris*.
- Deleris, S., Geaugey, V., Camacho, P., Debellefontaine, H. and Paul, E. (2002).** Minimization of sludge production in biological processes: an alternative solution for the problem of sludge disposal. *Water Science and Technology*. **46**(10): 63-70.

- Demirel, B. and Yenigun, O. (2006).** Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource Technology*. **97**(10): 1201-1208.
- Dignac, M. F., Houot, S., Francou, C. and Derenne, S. (2005).** Pyrolytic study of compost and waste organic matter. *Organic Geochemistry*. **36**(7): 1054-1071.
- Dogan, I. and Sanin, F. D. (2009).** Alkaline solubilization and microwave irradiation as a combined sludge disintegration and minimization method. *Water Research*. **43**(8): 2139-2148.
- Dohanyos, M., Zabranska, J., Kutil, J. and Jenicek, P. (2004).** Improvement of anaerobic digestion of sludge. *Water Science and Technology*. **49**(10): 89-96.
- Dreywood, R. (1946).** Qualitative test for carbohydrates material. *Industrial & Engineering Chemistry, Analytical Edition*. **18**: 499-504.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A. and Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and relate substances. *Analytical Biochemistry*. **28**: 350-352.
- Durand, J. F., Roman, S. and Vivien, M. (1998).** Guide d'utilisation de la régression Partial Least Squares Linéaire sous S-Plus. *Rapport de recherche 98-06; ENSAM-INRA-UM II*.
- Dwyer, J., Starrenbury, D., Tait, S., Barr, K., Batstone, D. J. and Lant, P. (2008).** Decreasing activated sludge thermal hydrolysis temperature reduces product colour, without decreasing degradability. *Water Research*. **42**(18): 4699-4709.
- Eastman, J. A. and Ferguson, J. F. (1981).** Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. **53**: 352-366.
- Ekama, G. A. and Marais, G. V. R. (1979).** Dynamic Behavior of the Activated-Sludge Process. *Journal Water Pollution Control Federation*. **51**(3): 534-556.
- Ekama, G. A., Sotemann, S. W. and Wentzel, M. C. (2007).** Biodegradability of activated sludge organics under anaerobic conditions. *Water Research*. **41**(1): 244-252.
- Eskicioglu, C., Kennedy, K. J. and Droste, R. L. (2008).** Initial examination of microwave pretreatment on primary, secondary and mixed sludges before and after anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **57**(3): 311-317.
- Esparza-Soto, M. and Westerhoff, P. K. (2001).** Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass. *Water Science and Technology*. **43**(6): 87-95.
- Fdz-Polanco, F., Velazquez, R., Perez-Elvira, S. I., Casas, C., del Barrio, D., Cantero, F. J., Fdz-Polanco, M., Rodriguez, P., Panizo, L., Serrat, J. and Rouge, P. (2008).** Continuous thermal hydrolysis and energy integration in sludge anaerobic digestion plants. *Water Science and Technology*. **57**(8): 1221-1226.
- Fernandez, B., Porrier, P. and Chamy, R. (2001).** Effect of inoculum-substrate ratio on the start-up of solid waste anaerobic digesters. *Water Science and Technology*. **44**(4): 103-108.
- Ferrer, I. (2008a).** Study of the effect of process parameters on the thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge, evaluation of a thermal sludge pre-treatment and overall energetic assessment. *Ph.D. thesis in Chemical Engineering, Barcelona University, Spain*.
- Ferrer, I., Ponsá, S., Vázquez, F. and Font, X. (2008b).** Increasing biogas production by thermal (70 °C) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. *Biochemical Engineering Journal*. **42**(2): 186-192.

- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001).** Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*. **43**(6): 1-8.
- Forster, C. F. (1983).** Bound Water in Sewage Sludges and Its Relationship to Sludge Surfaces and Sludge Viscosities. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology B-Biotechnology*. **33**(1): 76-84.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P. H. (1996).** Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*. **30**(8): 1749-1758.
- Gali, A., Benabdallah, T., Astals, S. and Mata-Alvarez, J. (2009).** Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresource Technology*. **100**(11): 2783-2790.
- Gavala, H. N., Yenal, U., Skiadas, I. V., Westermann, P. and Ahring, B. K. (2003).** Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Research*. **37**(19): 4561-4572.
- Gilmour, J. T. and Skinner, V. (1999).** Predicting plant available nitrogen in land-applied biosolids. *Journal of Environmental Quality*. **28**(4): 1122-1126.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. and Moletta, R. (1997).** Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science and Technology*. **36**(6-7): 49-55.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M. C. and Vonmarais, G. (1995).** The Activated-Sludge Model No-2 - Biological Phosphorus Removal. *Water Science and Technology*. **31**(2): 1-11.
- Gujer, W. and Zehender, A. J. B. (1983).** Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **15**(8-9): 127-167.
- Hansen, K. H., Angelidaki, I. and Ahring, B. K. (1998).** Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *Water Research*. **32**(1): 5-12.
- Hansen, K. H., Angelidaki, I. and Ahring, B. K. (1999).** Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research*. **33**(8): 1805-1810.
- Hansen, T. L., Schmidt, J. E., Angelidaki, I., Marca, E., Jansen, J. C., Mosbaek, H. and Christensen, T. H. (2004).** Measurement of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*. **24**(4): 393-400.
- Harper, S. R. and Pohland, F. G. (1986).** Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**: 585-602.
- Hartmann, A. and Ahring, B. K. (2006).** Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview. *Water Science and Technology*. **53**(8): 7-22.
- Hattori, H. and Mukai, S. (1986).** Decomposition of sewage sludges in soil as affected by their organic matter composition. *Soil Science and Plant Nutrition*. **32**(3): 421-432.
- Hill, D. T. and Barth, C. L. (1977).** A dynamic model for simulation of animal waste digestion. *Journal of Water Pollution Control Federation*. **49**(10): 2129-2143.
- Huete, E., de Gracia, M., Ayesa, E. and Garcia-Heras, J. L. (2006).** ADM1-based methodology for the characterisation of the influent sludge in anaerobic reactors. *Water Science and Technology*. **54**(4): 157-166.
- Hyun, S. H., Young, J. C. and Kim, I. S. (1998).** Inhibition kinetics for propionate degradation using propionate-enriched mixed cultures. *Water Science and Technology*. **38**(8-9): 443-451.

- Jeong, T. Y., Cha, G. C., Choi, S. S. and Jeon, C. (2007).** Evaluation of methane production by the thermal pretreatment of waste activated sludge in an anaerobic digester. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **13**(5): 856-863.
- Jeong, T. Y., Cha, G. C., Seo, Y. C., Jeon, C. and Choi, S. S. (2008).** Effect of COD/sulfate ratios on batch anaerobic digestion using waste activated sludge. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **14**(5): 693-697.
- Jolis, D. (2008).** High-Solids Anaerobic Digestion of Municipal Sludge Pretreated by Thermal Hydrolysis. *Water Environment Research*. **80**(7): 654-662.
- Jones, R., Parker, W., Khan, Z., Murthy, S. and Rupke, M. (2008).** Characterization of sludges for predicting anaerobic digester performance. *Water Science and Technology*. **57**(5): 721-726.
- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J. C., Bottero, J. Y., Villemin, G., Urbain, V. and Manem, J. (1995).** Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research (Oxford)*. **29**(7): 1639-1647.
- Kampas, P., Parsons, S. A., Pearce, P., Ledoux, S., Vale, P., Churchley, J. and Cartmell, E. (2007).** Mechanical sludge disintegration for the production of carbon source for biological nutrient removal. *Water Research*. **41**(8): 1734-1742.
- Kaparaju, P., Buendia, I., Ellegaard, L. and Angelidakia, I. (2008).** Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*. **99**(11): 4919-4928.
- Kara, F., Gurakan, G. C. and Sanin, F. D. (2008).** Monovalent cations and their influence on activated sludge floc chemistry, structure, and physical characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. **100**(2): 231-239.
- Karayildirim, T., Yanik, J., Yuksel, M. and Bockhorn, H. (2006).** Characterisation of products from pyrolysis of waste sludges. *Fuel*. **85**(10-11): 1498-1508.
- Katsiris, N. and Kouzelikatsiri, A. (1987).** Bound Water-Content of Biological Sludges in Relation to Filtration and Dewatering. *Water Research*. **21**(11): 1319-1327.
- Kepp, U., Machenbach, I., Weisz, N. and Solheim, O. E. (2000).** Enhanced stabilisation of sewage sludge through thermal hydrolysis - three years of experience with full scale plant. *Water Science and Technology*. **42**(9): 89-96.
- Kim, J., Park, C., Kim, T. H., Lee, M., Kim, S., Kim, S. W. and Lee, J. (2003).** Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **95**(3): 271-275.
- Kim, M., Ahn, Y. H. and Speece, R. E. (2002).** Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Research*. **36**(17): 4369-4385.
- Kim, M., Bae, B. and Speece, R. E. (2004).** Improved anaerobic process efficiency using mesophilic and thermophilic elutriated phased treatment. *Journal of Environmental Engineering*. **130**(11): 960-966.
- Kim, Y. and Lee, J. (2005).** Effect of ultrasound on methanogenic activity of anaerobic granules. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Brief Communications & Review Papers*. **44**(11): 8259-8261.
- Klausen, M. M. (2001).** Reflocculation potential of activated sludge flocs by combined aeration and substrate addition. *MSc thesis, Department of Environmental Engineering, Aalborg University, Denmark*.
- Klausen, M. M., Thomsen, T. R., Nielsen, J. L., Mikkelsen, L. H. and Nielsen, P. H. (2004).** Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. *Fems Microbiology Ecology*. **50**(2): 123-132.

- Koehler, L. H. (1952).** Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Analytical Chemistry*. **24**(1576-1579).
- Kosobucki, P., Buszewski, B. and Gorski, L. (2008).** The influence of temperature on the process of dynamic methane fermentation of sewage sludge. *Polish Journal of Environmental Studies*. **17**(3): 369-375.
- Kroeker, E. J., Schulte, D. D., Sparling, A. B. and Lapp, H. M. (1979).** Anaerobic treatment process stability. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. **51**(4): 718-727.
- Laspidou, C. S. and Rittmann, B. E. (2002).** A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*. **36**(11): 2711-2720.
- Lee, H. and Shoda, M. (2008a).** Stimulation of anaerobic digestion of thickened sewage sludge by iron-rich sludge produced by the Fenton method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **106**(1): 107-110.
- Lee, M. Y., Cheon, J. H., Hidaka, T. and Tsuno, H. (2008b).** The performance and microbial diversity of temperature-phased hyperthermophilic and thermophilic anaerobic digestion system fed with organic waste. *Water Science and Technology*. **57**(2): 283-289.
- Lee, N., Jansen, J. L., Aspegren, H., Henze, M., Nielsen, P. H. and Wagner, M. (2002).** Population dynamics in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Water Science and Technology*. **46**(1-2): 163-170.
- Li, D. H. and Ganczarczyk, J. (1989).** Fractal Geometry of Particle Aggregates Generated in Water and Waste-Water Treatment Processes. *Environmental Science & Technology*. **23**(11): 1385-1389.
- Li, Y. Y. and Noike, T. (1992).** Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. *Water Science and Technology*. **26**(3-4): 857-866.
- Liao, B. Q., Droppo, I. G., Leppard, G. G. and Liss, S. N. (2006).** Effect of solids retention time on structure and characteristics of sludge flocs in sequencing batch reactors. *Water Research*. **40**(13): 2583-2591.
- Liss, S. N., Liao, B. Q., Droppo, I. G., Allen, D. G. and Leppard, G. G. (2002).** Effect of solids retention time on floc structure. *Water Science and Technology*. **46**(1-2): 431-438.
- Liu, H. and Fang, H. H. P. (2002).** Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*. **95**(3): 249-256.
- Liu, T. and Sung, S. (2002).** Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Science and Technology*. **45**(10): 113-120.
- Liu, X. L., Liu, H., Chen, J. H., Du, G. C. and Chen, J. (2008).** Enhancement of solubilization and acidification of waste activated sludge by pretreatment. *Waste Management*. **28**(12): 2614-2622.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fau, A. L. and Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**: 265-275.
- Luostarinen, S., Luste, S. and Sillanpaa, M. (2009).** Increased biogas production at wastewater treatment plants through co-digestion of sewage sludge with grease trap sludge from a meat processing plant. *Bioresource Technology*. **100**(1): 79-85.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003).** *Biology of Microorganisms*. 3rd edn, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1019.

- Marhaba, T. F. and Lippincott, R. L. (2000).** Application of fluorescence technique for rapid identification of DOM fractions in source waters. *Journal of Environmental Engineering-Asce.* **126**(11): 1039-1044.
- Mariot, M., Dudal, Y., Furian, S., Sakamoto, A., Valles, V., Fort, M. and Barbiero, L. (2007).** Dissolved organic matter fluorescence as a water-flow tracer in the tropical wetland of Pantanal of Nhecolandia, Brazil. *Science of the Total Environment.* **388**(1-3): 184-193.
- Martins, A. M. P., Heijnen, J. J. and van Loosdrecht, M. C. M. (2004).** Bulking sludge in biological nutrient removal systems. *Biotechnology and Bioengineering.* **86**(2): 125-135.
- Massé, D. I. and Droste, R. L. (2000).** Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water and Research.* **34**(12): 3087-3106.
- Mata-Alvarez, J. (1989).** A simulation study of a continuous two-phase dry digestion system. *Biotechnology and Bioengineering.* **34**(5): 609-616.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S. and Llabrés, P. (2000).** Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology.* **74**(1): 3-16.
- McInerney, J. O., Wilkinson, M., Patching, J. W., Embley, T. M. and Powell, R. (1995).** Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(4): 1646-1648.
- McInerney, M. J., Bryant, M. P. and Stafford, D. A. (1981).** Metabolic stages and energetics of microbial anaerobic digestion. In *Anaerobic Digestion, Proceedings of the first International Symposium on Anaerobic Digestion, University College, Cardiff, Wales.* 91-98.
- McSwain, B. S., Irvine, R. L., Hausner, M. and Wilderer, P. A. (2005).** Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**(2): 1051-1057.
- Metcalf & Eddy, I. (1991).** Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse. *3rd edition McGraw-Hill Publishing Company, New York.*
- Mikkelsen, L. H. and Keiding, K. (2002).** Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. *Water Research.* **36**(10): 2451-2462.
- Millot, N. (1986).** Les lixiviats de décharges contrôlées. Caractérisation analytique et études des filières de traitement. *Thèse de doctorat, INSA Lyon.*
- Miron, Y., Zeeman, G., Van Lier, J. B. and Lettinga, G. (2000).** The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Research.* **34**(5): 1705-1713.
- Moletta, M. (2008).** La méthanisation. *Editions TEC&DOC, Paris.*
- Moletta, R., Escoffier, Y., Ehlinger, F., Coudert, J. P. and Leyris, J. P. (1994).** Online Automatic-Control System for Monitoring an Anaerobic Fluidized-Bed Reactor - Response to Organic Overload. *Water Science and Technology.* **30**(12): 11-20.
- Montusiewicz, A. (2008).** Environmental factors affecting the biomethanization process. *Archives of Environmental Protection.* **34**(3): 265-279.
- Mosey, F. E. (1983).** Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanism for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science and Technology.* **15**: 209-232.
- Muller, E., Kriebitzsch, K., Wilderer, P. A. and Wuertz, S. (2002).** Community structure of micro- and macroflocs in pin-point sludge and the influence of sludge age and

- potassium addition on microfloc formation. *Water Science and Technology*. **46**(1-2): 405-412.
- Müller, J. A. (2001)**. Prospects and problems of sludge pre-treatment processes. *Water Science and Technology*. **44**(10): 121-128.
- Muller, W., Frommert, I. and Jörg, R. (2004)**. Standardized methods for anaerobic biodegradability testing. *Review Environmental Science Biotechnology*. **3**(2): 141-158.
- Murthy, S. N. and Novak, J. T. (1998)**. Effects of potassium ion on sludge settling, dewatering and effluent properties. *Water Science and Technology*. **37**(4-5): 317-324.
- Myint, M. and Nirmalakhandan, N. (2006)**. Evaluation of first-order, second-order, and surface-limiting reactions in anaerobic hydrolysis of cattle manure. *Environmental Engineering Science*. **23**(6): 970-980.
- Neves, L., Goncalo, E., Oliveira, R. and Alves, M. M. (2008)**. Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures. *Waste Management*. **28**(6): 965-972.
- Neyens, E. and Baeyens, J. (2003)**. A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability. *Journal of Hazardous Materials*. **98**(1-3): 51-67.
- Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R. and De heyder, B. (2004)**. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *Journal of Hazardous materials*. **106**(2-3).
- Nickel, K. and Neis, U. (2007)**. Ultrasonic disintegration of biosolids for improved biodegradation. *Ultrasonics Sonochemistry*. **14**(4): 450-455.
- Nielsen, P. H. (2002)**. The activated sludge floc. In: *En cyclopedia in Environmental Microbiology*. G. Bitton (ed.), Chichester, England, Wiley.
- Nielsen, P. H., Thomsen, T. R. and Nielsen, J. L. (2004)**. Bacterial composition of activated sludge - importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology*. **49**(10): 51-58.
- Nopens, I., Batstone, D. J., Copp, J. B., Jeppsson, U., Volcke, E., Alex, J. and Vanrolleghem, P. A. (2009)**. An ASM/ADM model interface for dynamic plant-wide simulation. *Water Research*. **43**(7): 1913-1923.
- Nopharatana, A., Pullammanappalli, P. C. and Clarke, W. P. (2007)**. Kinetics and dynamic modelling of batch anaerobic digestion of municipal solid waste in a stirred reactor. *Waste Management*. **27**(5): 595-603.
- Novak, J. T., Sadler, M. E. and Murthy, S. N. (2003)**. Mechanisms of floc destruction during anaerobic and aerobic digestion and the effect on conditioning and dewatering of biosolids. *Water Research*. **37**(13): 3136-3144.
- O'Rourke, M. (1968)**. Kinetics of anaerobic treatment at reduced temperature. *PhD thesis, Stanford University, Stanford, USA*.
- Owen, W. F., Stuckey, D. C., Healy, J. B., Young, L. Y. and McCarty, P. L. (1979)**. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*. **13**: 485-492.
- Owens, J. M. and Chynoweth, D. P. (1993)**. Biochemical Methane Potential of Municipal Solid-Waste (Msw) Components. *Water Science and Technology*. **27**(2): 1-14.
- Park, C., Abu-Orf, M. M. and Novak, J. T. (2006)**. The digestibility of waste activated sludges. *Water Environment Research*. **78**(1): 59-68.
- Parnaudeau, V., Nicolardot, B. and Pages, J. (2004)**. Relevance of organic matter fractions as predictors of wastewater sludge mineralization in soil. *Journal of Environmental Quality*. **33**(5): 1885-1894.

- Parravicini, V., Smidt, E., Svardal, K. and Kroiss, H. (2006).** Evaluating the stabilisation degree of digested sewage sludge: investigations at four municipal wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*. **53**(8): 81-90.
- Paul, E., Camacho, P., Sperandio, M. and Ginestet, P. (2006).** Technical and economical evaluation of a thermal, and two oxidative techniques for the reduction of excess sludge production. *Process Safety and Environmental Protection*. **84**(B4): 247-252.
- Pauss, A., Andre, G., Perrier, M. and Guiot, S. R. (1990).** Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(6): 1636-1644.
- Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gomez, E. (1991).** Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology*. **24**(8): 35-59.
- Pavlostathis, S. G. and Gossett, J. M. (1986).** A kinetic model for anaerobic digestion of biological sludge. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**(10): 1519-1530.
- Pavlostathis, S. G. and Gossett, J. M. (1988).** Preliminary conversion mechanisms in anaerobic digestion of biological sludges. *Journal of Environmental Engineering*. **114**(3): 575-592.
- Perez-Elvira, S. I., Fernandez-Polanco, F., Fernandez-Polanco, M., Rodriguez, P. and Rouge, P. (2008).** Hydrothermal multivariable approach. Full-scale feasibility study. *Electronic Journal of Biotechnology*. **11**(4).
- Perez-Elvira, S. I., Nieto-Diez, P. and Fdz-Polanco, F. (2006).** Sludge minimization technologies. *Review Environmental Science Biotechnology*. **5**: 375-398.
- Perot, C. (1989).** Optimisation de la digestion anaérobie en deux étapes des boues de stations d'épuration: Etude de l'étape d'hydrolyse de la matière organique. *Thèse de doctorat de l'Université de Clermont-Ferrand II*.
- Petersen, S. P. and Ahring, B. K. (1991).** Acetate oxidation in a thermophilic anaerobic sewage-sludge digester: the importance of non-aceticlastic methanogenesis from acetate. *FEMS Microbiology Ecology*. **86**(2): 149-158.
- Phothilangka, P., Schoen, M. A., Huber, M., Luchetta, P., Winkler, T. and Wett, B. (2008).** Prediction of thermal hydrolysis pretreatment on anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Science and Technology*. **58**(7): 1467-1473.
- Ramirez, I. and Steyer, J. P. (2008).** Modeling microbial diversity in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **57**(2): 265-270.
- Ramsay, I. R. and Pullammanappallil, P. C. (2001).** Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*. **12**(4): 247-257.
- Ras, M. (2008a).** Extraction exhaustive et analyse biochimique des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS) des agrégats microbiens issus des procédés de traitement des eaux. *Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France*.
- Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Sperandio, M. and Lefebvre, D. (2008b).** Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Research*. **42**(8-9): 1867-1878.
- Raszka, A., Chorvatova, M. and Wanner, J. (2006).** The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*. **34**(5): 411-424.
- Rebac, S., Ruskova, J., Gerbens, S., Lier, J. B. v., Stams, A. J. M. and Lettinga, G. (1995).** High-rate anaerobic treatment of wastewater under psychrophilic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **80**(5): 203-210.
- Rosen, C. and Jeppsson, U. (2002).** Anaerobic COST benchmark model description. *Dept of Industrial Electrical Engineering and Automation, Lund University, Lund, Sweden*.



- Rotter, B. E., Barry, D. A., Gerhard, J. I. and Small, J. S. (2008).** Parameter and process significance in mechanistic modeling of cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*. **99**(13): 5738-5748.
- Rulkens, W. (2008).** Sewage sludge as a biomass resource for the production of energy: Overview and assessment of the various options. *Energy & Fuels*. **22**(1): 9-15.
- Schievano, A., Pognani, M., D'Imporzano, G. and Adani, F. (2008).** Predicting anaerobic biogasification potential of ingestates and digestates of a full-scale biogas plant using chemical and biological parameters. *Bioresource Technology*. **99**(17): 8112-8117.
- Schmid, M., Thill, A., Purkhold, U., Walcher, M., Bottero, J. Y., Ginestet, P., Nielsen, P. H., Wuertz, S. and Wagner, M. (2003).** Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Water Research*. **37**(9): 2043-2052.
- Schnurer, A. and Nordberg, A. (2008).** Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Science and Technology*. **57**(5): 735-740.
- Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A. and Harms, H. (2004).** Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology*. **38**(12): 228A-231A.
- Senthilnathan, P. R. and Sigler, R. G. (1993).** Improved Sludge Dewatering by Dual Polymer Conditioning. *Water Science and Technology*. **28**(1): 53-57.
- Sheng, G. P., Zhang, M. L. and Yu, H. Q. (2008).** Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. **62**(1): 83-90.
- Siegrist, H., Vogt, D., Garcia-Heras, J. L. and Gujer, W. (2002).** Mathematical model for meso- and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Environmental Science & Technology*. **36**(5): 1113-1123.
- Skiadas, I. V., Gavala, H. N., Lu, J. and Ahring, B. K. (2005).** Thermal pre-treatment of primary and secondary sludge at 70 degrees C prior to anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **52**(1-2): 161-166.
- Smidt, E. and Parravicini, V. (2009).** Effect of sewage sludge treatment and additional aerobic post-stabilization revealed by infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Bioresource Technology*. **100**(5): 1775-1780.
- Sotemann, S. W., van Rensburg, P., Ristow, N. E., Wentzel, M. C., Loewenthal, R. E. and Ekama, G. A. (2006).** Integrated chemical, physical and biological processes modelling of anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Science and Technology*. **54**(5): 109-117.
- Speece, R. E., Boonyakitsombut, S., Kim, M., Azbar, N. and Ursillo, P. (2006).** Overview of anaerobic treatment: Thermophilic and propionate implications. *Water Environment Research*. **78**(5): 460-473.
- Stowa (2006).** Anaerobic Stabilisation Thermophilic Mesophilic. *Oswald Schulze GmbH & Co KG*.
- Stuckey, D. C. and McCarty, P. L. (1984).** The effect of thermal pretreatment on the anaerobic biodegradability and toxicity of waste activated sludge. *Water Research*. **18**(1): 1343-1353.
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Kamiyama, K. I. and Bildan, L. N. S. (1997).** Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Science and Technology*. **35**(8): 209-215.
- Thauer, R. P., Jungermann, K. and Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*. **41**(1): 100-180.

- Tilche, A. and Galatola, M. (2008).** The potential of bio-methane as bio-fuel/bio-energy for reducing greenhouse gas emissions: a qualitative assessment for Europe in a life cycle perspective. *Water Science and Technology*. **57**(11): 1683-1692.
- Tsai, B. N., Chang, C. H. and Lee, D. J. (2008).** Fractionation of Soluble Microbial Products (Smp) and Soluble Extracellular Polymeric Substances (Eps) from Wastewater Sludge. *Environmental Technology*. **29**(10): 1127-1138.
- Urbain, V., Block, J. C. and Manem, J. (1993).** Bioflocculation in Activated-Sludge - an Analytic Approach. *Water Research*. **27**(5): 829-838.
- Valo, A., Carrere, H. and Delgenes, J. P. (2004).** Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **79**(11): 1197-1203.
- Van Soest, P. J. (1963).** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*. **46**: 825-835.
- Vanrolleghem, P. A., Rosen, C., Zaher, U., Copp, J., Benedetti, L., Ayesa, E. and Jeppsson, U. (2005).** Continuity-based interfacing of models for wastewater systems described by Petersen matrices. *Water Science and Technology*. **52**(1-2): 493-500.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J. and Flotats, X. (2008a).** Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*. **28**(6): 941-953.
- Vavilin, V. A., Qu, X., Mazeas, L., Lemunier, M., Duquennoi, C., He, P. J. and Bouchez, T. (2008b).** Methanosarcina as the dominant acetoclastic methanogens during mesophilic anaerobic digestion of putrescible waste. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. **94**(4): 593-605.
- Vavilin, V. A., Rytov, S. V. and Lokshina, L. Y. (1996).** A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*. **56**(2/3): 229-237.
- Vesilind, P. A. (1994).** The role of water in sludge dewatering. *Water Environment Research*. **66**(1): 4-10.
- von Munch, E., Keller, J., Lant, P. and Newell, R. (1999).** Mathematical modelling of perfermenters - I. Model development and verification. *Water Research*. **33**(12): 2757-2768.
- Wang, H., Lehtomaki, A., Tolvanen, K., Puhakka, J. and Rintala, J. (2009).** Impact of crop species on bacterial community structure during anaerobic co-digestion of crops and cow manure. *Bioresource Technology*. **100**(7): 2311-2315.
- Weemaes, M., Grootaerd, H., Simoens, F., Huysmans, A. and Verstraete, W. (2000).** Ozonation of sewage sludge prior to anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **42**(9): 175-178.
- Wilén, B. M. and Balmer, P. (1999).** The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*. **33**(2): 391-400.
- Wilén, B. M., Onuki, M., Hermansson, M., Lumley, D. and Mino, T. (2008).** Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Research*. **42**(8-9): 2300-2308.
- Yasui, H., Goel, R., Li, Y. Y. and Noike, T. (2008).** Modified ADM1 structure for modelling municipal primary sludge hydrolysis. *Water Research*. **42**(1-2): 249-259.
- Yasui, H., Sugimoto, M., Komatsu, K., Goel, R., Li, Y. Y. and Noike, T. (2006).** An approach for substrate mapping between ASM and ADM1 for sludge digestion. *Water Science and Technology*. **54**(4): 83-92.

- Zaher, U. (2005).** Modelling and monitoring the anaerobic digestion process in view of optimisation and smooth operations of WWTP's. *Ph.D. thesis in Applied Biological Sciences: Environmental Technology, Gent University.*
- Zaher, U., Grau, P., Benedetti, L., Ayesa, E. and Vanrolleghem, P. A. (2007).** Transformers for interfacing anaerobic digestion models to pre- and post-treatment processes in a plant-wide modelling context. *Environmental Modelling & Software.* **22**(1): 40-58.
- Zavarzin, G. A. (1986).** Trophic relationships in methanogenic consortium. *Izvestia AN SSSR, Serie Biology.* **3**: 341-360.
- Zhou, L. X., Liang, J. R., Zhan, X. H. and Wong, J. W. C. (2001).** Fractionation and characterization of sludge bacterial extracellular polymers by FT-IR, C-13-NMR, H-1-NMR. *Water Science and Technology.* **44**(10): 71-78.
- Zitomer, D. H., Johnson, C. C. and Speece, R. E. (2008).** Metal stimulation and municipal digester thermophilic/mesophilic activity. *Journal of Environmental Engineering-Asce.* **134**(1): 42-47.
- Zupancic, G. D., Uranjek-Zevart, N. and Ros, M. (2008).** Full-scale anaerobic co-digestion of organic waste and municipal sludge. *Biomass & Bioenergy.* **32**(2): 162-167.



# Annexes



## Annexes

### I. Petersen matrix

**Petersen matrix modified with biochemical rate coefficients and kinetic rate equations for soluble compounds (i=1-3,12,j=1-5)**

Component		i	1	2	3	12	Rate ( $\rho_j, \text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ )
j	Process		Ssu	Saa	Sfa	S <sub>1</sub>	
1	Disintegration of $X_{cr}$					$(1-Y_{Xcr}) * f_{sI,Xcr}$	$k_{m,Xcr} \frac{X_{cr}}{K_{S,Xcr} X_{Xcr} + X_{cr}} X_{Xcr}$
2	Disintegration of $X_{cs}$					$(1-Y_{Xcs}) * f_{sI,Xcs}$	$k_{m,Xcs} \frac{X_{cs}}{K_{S,Xcs} X_{Xcs} + X_{cs}} X_{Xcs}$
3	Hydrolysis Carbohydrates		$1-Y_{ch}$				$k_{m,ch} \frac{X_{ch}}{K_{S,ch} X_{Xch} + X_{ch}} X_{Xch}$
4	Hydrolysis of Proteins			$1-Y_{pr}$			$k_{m,pr} \frac{X_{pr}}{K_{S,pr} X_{Xpr} + X_{pr}} X_{Xpr}$
5	Hydrolysis of Lipids		$(1-Y_{li}) * (1-f_{fa,li})$		$(1-Y_{li}) * f_{fa,li}$		$k_{m,li} \frac{X_{li}}{K_{S,li} X_{Xli} + X_{li}} X_{Xli}$
			Monosaccharides ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Amino acids ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Long chain fatty acids ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )		Soluble inerts ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )

**Petersen matrix modified with biochemical rate coefficients and kinetic rate equations for particulate compounds  
(i=13-17,25-30,j=1-5,21-25)**

Component		i	13	14	15	16	17	25	26	27	28	29	30	Rate ( $\rho_j, \text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ )
j	Process		$X_{cr}$	$X_{cs}$	$X_{ch}$	$X_{pr}$	$X_{li}$	$X_{Xcr}$	$X_{Xcs}$	$X_{Xch}$	$X_{Xpr}$	$X_{Xli}$	$X_I$	
1	Disintegration of $X_{cr}$		-1	-1	$(1-Y_{Xcr})\cdot f_{ch,Xcr}$	$(1-Y_{Xcr})\cdot f_{pr,Xcr}$	$(1-Y_{Xcr})\cdot f_{li,Xcr}$	$Y_{Xcr}$					$(1-Y_{Xcr})\cdot f_{xl,Xcr}$	$k_{m,Xcr} \frac{X_{cr}}{K_{S,Xcr} X_{Xcr} + X_{cr}} X_{Xcr}$
2	Disintegration of $X_{cs}$		-1	-1	$(1-Y_{Xcs})\cdot f_{ch,Xcs}$	$(1-Y_{Xcs})\cdot f_{pr,Xcs}$	$(1-Y_{Xcs})\cdot f_{li,Xcs}$		$Y_{Xcs}$				$(1-Y_{Xcs})\cdot f_{xl,Xcs}$	$k_{m,Xcs} \frac{X_{cs}}{K_{S,Xcs} X_{Xcs} + X_{cs}} X_{Xcs}$
3	Hydrolysis Carbohydrates			-1	-1					$Y_{ch}$				$k_{m,ch} \frac{X_{ch}}{K_{S,ch} X_{Xch} + X_{ch}} X_{Xch}$
4	Hydrolysis of Proteins					-1					$Y_{pr}$			$k_{m,pr} \frac{X_{pr}}{K_{S,pr} X_{Xpr} + X_{pr}} X_{Xpr}$
5	Hydrolysis of Lipids						-1					$Y_{li}$		$k_{m,li} \frac{X_{li}}{K_{S,li} X_{Xli} + X_{li}} X_{Xli}$
21	Decay of $X_{Xcr}$		1					-1						$k_{dec,Xcr} X_{Xcr}$
22	Decay of $X_{Xcs}$		1						-1					$k_{dec,Xcs} X_{Xcs}$
23	Decay of $X_{Xch}$		1							-1				$k_{dec,ch} X_{Xch}$
24	Decay of $X_{Xpr}$		1								-1			$k_{dec,pr} X_{Xpr}$
25	Decay of $X_{Xli}$		1									-1		$k_{dec,li} X_{Xli}$
			Readily hydrolysable composites ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Slowly hydrolysable composites ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Carbohydrates ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Proteins ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Lipids ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	$X_{Xcr}$ degraders ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	$X_{Xcs}$ degraders ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Carbohydrate degraders ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Protein degraders ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Lipid degraders ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Particulate inerts ( $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}$ )	



## II. Fluorescence emission analysis on soluble fractions of WAS samples

Mottet A., François E., Muller M., Dudal Y., Déléris S., Carrère H, Steyer J.P.

### 1. Introduction

#### 1.1 Fluorescence emission analysis

Fluorescence spectroscopy is an optical technology and a flexible, rapid, sensitive, non-destructive and portable diagnostic tool. In water sciences, this analytical method has been used to characterise dissolved organic matter and to understand organic transformations of various components in a wide range of aquatic environments (Marhaba and Lippincott, 2000; Baker and Spencer, 2004; Bengraïne and Marhaba, 2004, Mariot *et al.*, 2007).

Fluorescence studies give a 3D plot of fluorescence excitation wavelength/emission wavelength and intensity that allows the visualisation of a range of fluorophores in a given sample. Humic and fulvic substances and amino acids in proteins and peptides were the most commonly studied fluorophores:

- aromatic organic compounds provide good subjects due to the energy sharing unpaired electron structure of the carbon ring,
- three fluorescent amino acids (tryptophan, tyrosine and phenylalanine) are indicative of proteins and peptides, due to the presence of an indole group or some other aromatic ring structures.

In a complex sample, it is difficult to definitively identify individual fluorescent compounds. Thus, these fluorophore groups are commonly named humic-like and protein-like because their fluorescence occurs in the same area of optical space as standards compounds.

Several studies have proved that the 3D fluorescence is a qualitative analysis: Cammack *et al.* (2004) and Elliott *et al.* (2006) showed that tryptophan-like fluorescence (Ex/Em = 280nm/340nm) can be directly related to the activity of a viable bacterial community; Galapate *et al.* (1998) and Reynolds (2003) showed that tryptophan-like fluorescence can be used as a tracer and relied on anthropogenic material in natural waters; Ahmad and Reynolds (1999) have determined that a decrease in fluorescence intensity of tryptophan-like peak from influent to effluent across a treatment process. However, to become more attractive, this analysis method has to be quantitative. Different data treatments can be applied in order to predict concentrations of compounds: a calibration of fluorescence intensity against TOC (Baker, 2004); the use of statistical techniques as analysis of variance (ANOVA), parallel factor analysis (PARAFAC), partial least squares (PLS). Morel *et al.* (2004) examined the use of multi-wavelength fluorometry for on-line monitoring of an

anaerobic digester fed with either synthetic or agricultural (cheese factory) wastewater. They have predicted several parameters of anaerobic digester effluent composition, as VSS and VFA measurements, from fluorescence-based predictions. After a comparison of several regression models, they showed that PLS is the most robust technique for predicting process parameters.

The aim of this work was to observe the changes of soluble protein matter during anaerobic digestion of sludge samples. Moreover, it allows to identify refractory or slowly or/and hardly degradable compounds, as humic components.

## 2. Methodology

Fluorescence spectra were determined on soluble fractions ( $<0.45 \mu\text{m}$ ) of input and output WAS samples from full scale digesters. Excitation-emission matrices (EEM) were measured with a Perkin-Elmer LS 55 luminescence spectrometer. Prior to analysis, the concentrations of each input and output sludge were adjusted to avoid auto-quenching and to ensure linearity between carbon concentration and fluorescence intensities. EEM spectra were obtained by subsequently scanning the emission spectra from 200 to 600 nm by incrementing the excitation wavelength by 20 nm from 200 to 450 nm and the scan speed was set at  $1\ 200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ . The data was processed with the FL WinLab software (Perkin-Elmer) at the laboratory of INRA UMR BSR (Montpellier, France).

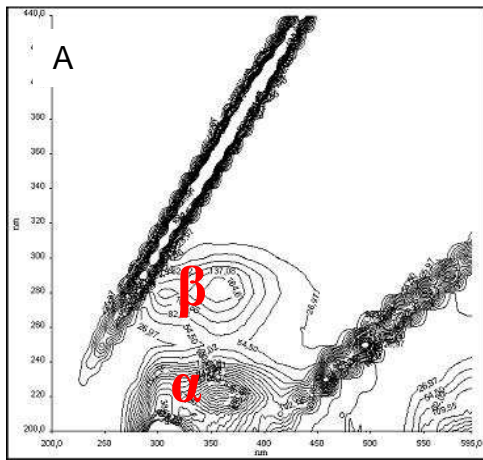
## 3. Results and discussion

The fluorescence analysis was used as a method to accurately characterise the changes of dissolved organic matter through full scale digesters. Figure 1 shows excitation-emission fluorescence spectra of soluble fractions of input and output sludge WAS samples. The results showed similar signatures for each input sludge sample. The main fluorophore group presents in the input sludge was in the same area of protein-like components. Two distinct fluorophores were appeared as peaks or shoulders. The first fluorophore “ $\alpha$ ” had excitation/emission wavelength at maximal intensity fluorescence around 220/289-394 nm (Figure 1.A). In the majority of case, this fluorophore appeared as a peak with a large base but in the case of the sludge A, it presented two peaks: 220/305 nm and 220/355 nm. The second peak “ $\beta$ ” ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 305\text{-}371 \text{ nm}$ ) showed the same form as a large peak or a shoulder (Figure 1.B). Thus the protein component fluorescence in these areas was due to the compounding of tyrosine and tryptophane “like” components. These EEM fingerprints showed that protein components are the only ones fluorophore components in the soluble fraction of input WAS samples, we did not observe aromatic compounds as humic substances.

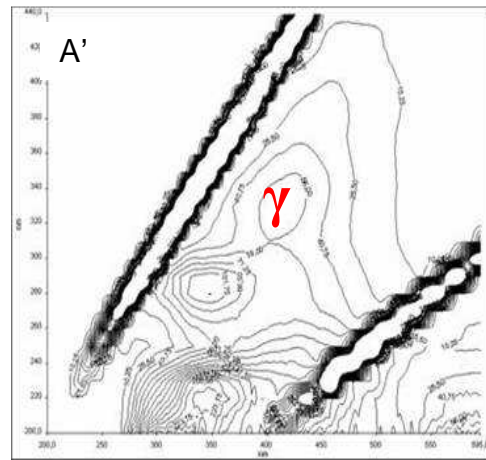
The fluorescence patterns obtained for each output WAS samples showed an appearance of a peak “ $\gamma$ ” with excitation/emission wavelength around 330/371-455 nm (Figure 1.A’). Indeed, the Figure 3 that represents the fluorescence intensity (normalised by soluble organic carbon) against emission wavelength for an excitation wavelength of 330 nm showed an increase of intensity with the occurrence of a shoulder between emission wavelengths of 371 nm and 455 nm. The peak fluorescence was in the same area of the aromatic organic components as it

was described in Coble (1996), Parlanti *et al.* (2000), Marhaba *et al.* (2000) and Hudson *et al.* (2007).

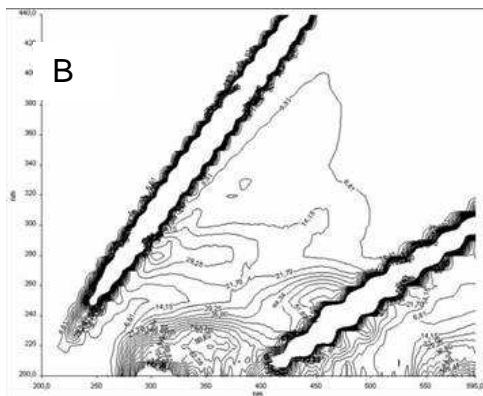
WWTP A input SolOC<sup>1</sup> = 8,4



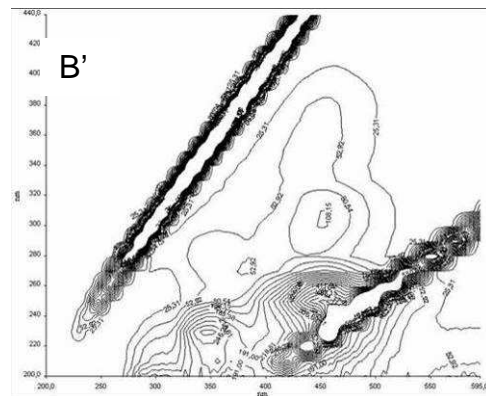
WWTP A output SolOC = 6,7



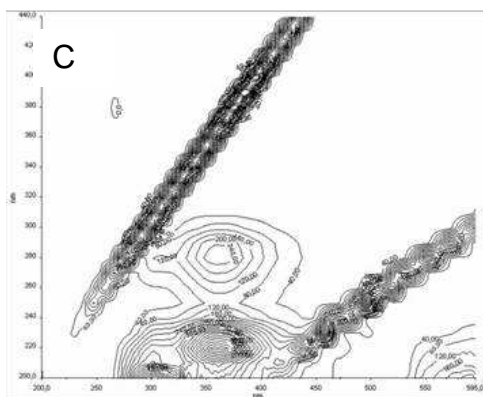
WWTP B input SolOC = 17,2



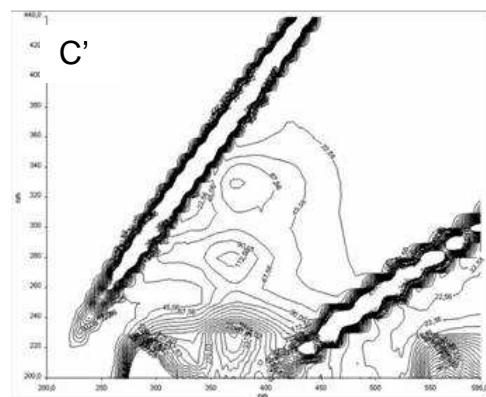
WWTP B output SolOC = 2,9



WWTP C input SolOC = 63,5



WWTP C output SolOC = 9,34

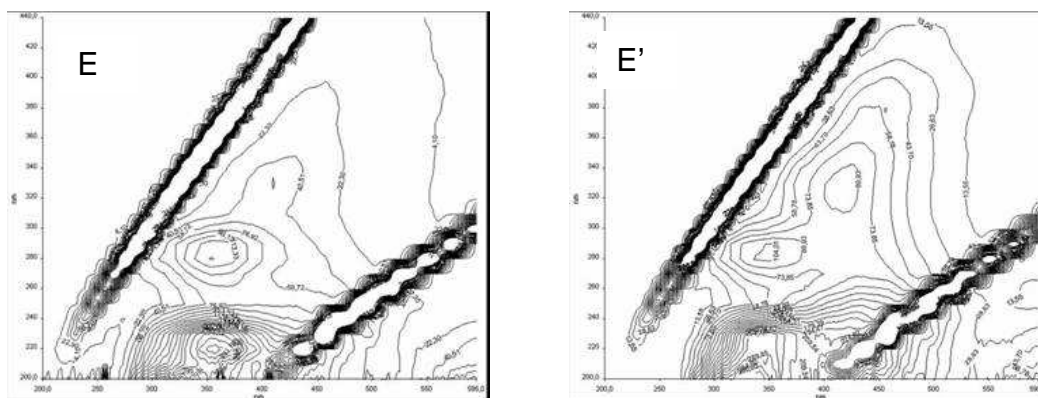


WWTP E input SolOC = 14,2



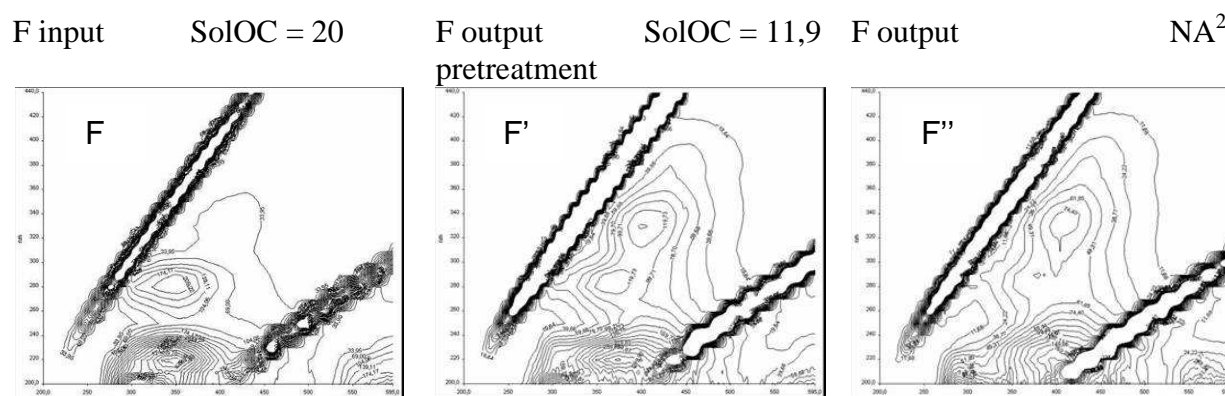
WWTP E output SolOC = 14,9





<sup>1</sup> SolOC = Soluble organic carbon concentration expressed in mg.L<sup>-1</sup>

**Figure 1:** Excitation-emission fluorescence spectra of WAS soluble fractions.



<sup>1</sup> SolOC = Soluble organic carbon concentration expressed in mg.L<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> NA = Not available

**Figure 2:** Excitation-emission fluorescence spectra of WAS soluble fraction of WWTP F.

We clearly observed that fluorescence patterns were different between input and output EEM for each sludge. The anaerobic digestion leads to the appearance of humic like components in the soluble fraction. They could arise from the release during the degradation of these complex components from the particulate fraction or from the transformation of organic matter by the microorganism activity. Moreover, the maximal intensity fluorescence shifted to longer emission wavelengths with the increase of the retention time in the digester: for the WWTP C with a SRT of 14 d, the maximal intensity fluorescence was obtained at  $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}/\lambda_{em} = 371 \text{ nm}$ . For the WWTP B with a SRT of 27 d, it was at  $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}/\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$  (Figure 3.b). Similar results were obtained during the compost process (Senesi *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 2007, Huo *et al.*, 2008). The changes of peak locations and fluorescence intensity were ascribed to an increase of molecular size, aromatic polycondensation, level of conjugated chromophores and humification degree of organic matter as the degradation time increases.

However, the temperature range of anaerobic digestion could not be linked with the normalised fluorescence intensity at an excitation wavelength of 330 nm since we did not have enough data to compare thermophilic and mesophilic digestion with the same SRT and at full scale the digester never carry out with the same operating conditions.

The EEM spectra analysis carried out on the WWTP F with a thermal pretreatment clearly showed the occurrence of humic like components (Figure 3). Indeed, the fluorescence intensity strongly increased at an excitation wavelength of 330 nm after the thermal pretreatment (Figure 3.a). This appearance could be due to the thermal effect and could be assimilated to melanoidins because they occurred in the same area of humic like components and some authors have suggested the presence of “burnt sugar” reactions and Maillard reactions for high pretreatment temperatures (Bougrier *et al.*, 2007, Müller, 2001 and Stuckey and McCarty, 1984). The melanoidins produced by thermal pretreatment and humic like components produced during the anaerobic digestion led to peaks in the same area (Figure 2.F' and 2.F''). They could be considered as complex aromatic components and as hardly and slowly degradable.

Thus, the fluorescence analysis allowed to identify the nature of soluble organic matter hardly and slowly degradable and to observe the chemical changes of the soluble organic matter during the anaerobic digestion.

#### **4. Conclusions**

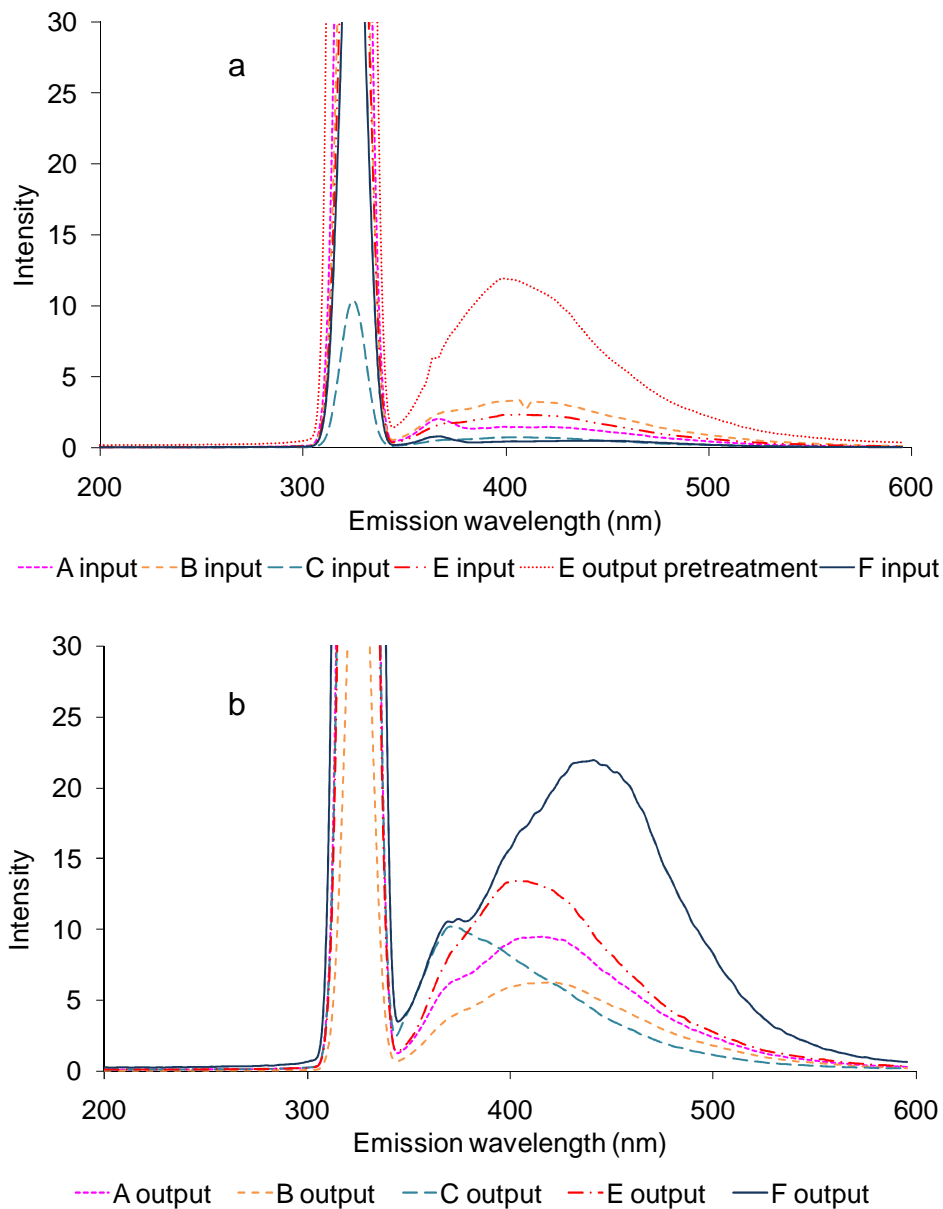
Fluorescence analysis was used to characterise the soluble fractions of input and output WAS samples from full scale digesters. From this work, the following conclusions can be drawn:

- In the input WAS soluble fraction, protein components are the only ones fluorophore components, we did not observe aromatic compounds, such as humic substances,
- The anaerobic digestion leads to appearance of humic like components in the soluble fraction. They could arise from the release during the degradation of these complex components from the particulate fraction or from the transformation of organic matter by the biological activity,
- The melanoidins produced by thermal pretreatment and the humic like components produced during the anaerobic digestion could be considered as hardly and slowly degradable.

This method can be useful for monitoring anaerobic and thermal pretreatment processes. However, future works have to be carried out to develop a quantitative and a predictive fluorescence-based method.

## Acknowledgements

The authors wish to sincerely thank Dr. Yves Dudal from INRA UMR BSR (Montpellier, France), for leading us to carry out fluorescence emission analysis on our samples and for helping us to appreciate the subtleties of this optical technology.



**Figure 3:** Fluorescence intensity (normalized by soluble organic carbon) against emission wavelength for an excitation wavelength of 330 nm for input WAS samples (a) and for output WAS samples (b).

## References

- Baker, A. and Spencer, R. G. M. (2004).** Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment*. **333**(1-3): 217-232.
- Bengraïne, K. and Marhaba, T. F. (2004).** Predicting organic loading in natural water using spectral fluorescent signatures. *Journal of Hazardous Materials*. **108**(3): 207-211.
- Bougrier, C., Delgenes, J. P. and Carrere, H. (2007).** Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal*. **34**(1): 20-27.
- Cammack, W. K. L., Kalff, J., Prairie, Y. T. and Smith, E. M. (2004).** Fluorescent dissolved organic matter in lakes: Relationships with heterotrophic metabolism. *Limnology and Oceanography*. **49**(6): 2034-2045.
- Coble, P. G. (1996).** Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*. **51**(4): 325-346.
- Elliott, S., Lead, J. R. and Baker, A. (2006).** Thermal quenching of fluorescence of freshwater, planktonic bacteria. *Analytica Chimica Acta*. **564**(2): 219-225.
- Galapate, R. P., Baes, A. U., Ito, K., Mukai, T., Shoto, E. and Okada, M. (1998).** Detection of domestic wastes in Kurose River using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research*. **32**(7): 2232-2239.
- Huo, S. L., Xi, B. D., Yu, H. C., Fan, S. L., Jing, S. and Liu, H. L. (2008).** A laboratory simulation of in situ leachate treatment in semi-aerobic bioreactor landfill. *Water Sa*. **34**(1): 133-140.
- Marhaba, T. F., Van, D. and Lippincott, L. (2000).** Rapid identification of dissolved organic matter fractions in water by spectral fluorescent signatures. *Water Research*. **34**(14): 3543-3550.
- Mariot, M., Dudal, Y., Furian, S., Sakamoto, A., Valles, V., Fort, M. and Barbiero, L. (2007).** Dissolved organic matter fluorescence as a water-flow tracer in the tropical wetland of Pantanal of Nhecolandia, Brazil. *Science of the Total Environment*. **388**(1-3): 184-193.
- Morel, E., Santamaria, K., Perrier, M., Guiot, S. R. and Tartakovsky, B. (2004).** Application of multi-wavelength fluorometry for on-line monitoring of an anaerobic digestion process. *Water Research*. **38**(14-15): 3287-3296.
- Müller, J. A. (2001).** Prospects and problems of sludge pre-treatment processes. *Water Science and Technology*. **44**(10): 121-128.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L. and Lamotte, M. (2000).** Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*. **31**(12): 1765-1781.
- Reynolds, D. M. (2003).** Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research*. **37**(13): 3055-3060.
- Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R. and Brunetti, G. (1991).** Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. **152**(4).
- Stuckey, D. C. and McCarty, P. L. (1984).** The effect of thermal pretreatment on the anaerobic biodegradability and toxicity of waste activated sludge. *Water Research*. **18**(1): 1343-1353.
- Wei, Z. M., Xi, B. D., Zhao, Y., Wang, S. P., Liu, H. L. and Jiang, Y. H. (2007).** Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. *Chemosphere*. **68**(2): 368-374.

---

**Recherche d'indicateurs de biodégradabilité anaérobie et modélisation de la digestion anaérobie thermophile :  
Application aux boues secondaires d'épuration non traitées et prétraitées thermiquement**

---

**RESUME**

La gestion des boues d'épuration constitue un réel enjeu économique et environnemental en raison de l'augmentation de leur quantité et des contraintes réglementaires. Toutefois, leur valorisation sous forme de biogaz, énergie renouvelable, répond aux critères de développement durable. Dans un contexte industriel, la mesure de la biodégradabilité anaérobie des boues à traiter est nécessaire afin de mettre en place un système de traitement adapté. Or, outre des essais expérimentaux de longues durées (potentiel méthane) et lourds d'un point de vue analytique, il n'existe actuellement aucun moyen de caractériser cette biodégradabilité. De plus, les modèles de digestion anaérobie, proposés pour représenter les performances, possèdent des lacunes concernant l'étape d'hydrolyse en raison d'une description limitée des mécanismes chimiques et biochimiques de cette étape. Ainsi les travaux de la thèse se sont intéressés à l'étude du lien entre la caractérisation chimique et biochimique de la matière organique et les performances de digestion anaérobie. Une étude statistique par PLS a permis d'élaborer un modèle du potentiel méthane des boues étudiées. La caractérisation biochimique (protéines, glucides et lipides) ainsi que deux paramètres macroscopiques (degré d'oxydation et carbone organique soluble) se sont révélés comme des indicateurs initiaux pertinents de la biodégradabilité. Le suivi de dégradation en réacteur batch d'une boue non traitée et prétraitée thermiquement a montré que la phase de méthanogénèse est étroitement reliée à l'étape d'hydrolyse. En effet, une phase de latence sur la production de méthane est observée, ainsi qu'une production importante d'acétate les premiers jours de la dégradation. De plus, les variations des concentrations en composés solubles ainsi que la cinétique de production de méthane ont mis en évidence l'existence de deux phases distinctes d'hydrolyse des composés particuliers. La bioaccessibilité de la matière particulaire au sein des boues d'épuration est donc un facteur important sur les performances de dégradation. Un modèle de digestion anaérobie, basé sur l'ADM1, a également été proposé afin de représenter l'impact de la composition initiale des boues d'épuration sur les dynamiques de dégradation anaérobie. Deux modifications ont été effectuées afin d'obtenir une meilleure représentation des phénomènes réactionnels, et notamment de l'accessibilité de la matière. Ainsi, une vitesse de réaction de Contois pour les étapes de désintégration et d'hydrolyse et deux variables d'entrée, une fraction facilement hydrolysable  $X_{cr}$  et une fraction lentement hydrolysable  $X_{cs}$ , ont été introduites. Le modèle modifié est capable de représenter les cinétiques de dégradation, obtenues en conditions batch et continue.

---

**Research of anaerobic biodegradability indicators and Modelling of thermophilic anaerobic digestion : Application to waste activated sludge with and without a thermal pretreatment**

---

The sewage sludge management represents economical and environmental issues. However, the sludge valorisation into biogas, renewable energy, contributes to the sustainable development. In an industrial context, the measurement of anaerobic biodegradability is a challenge in order to elaborate an optimised treatment process. Nowadays, aside from experimental anaerobic degradation tests, demanding laboratory work and time-consuming, the biodegradability cannot be characterised. Moreover, the anaerobic digestion models, used to represent the performances, have some limitations for the description of hydrolysis step. Indeed, the first order kinetic equation used to represent the physicochemical and biochemical mechanism is too simple. The aim of thesis was thus to study the relationship between chemical and biochemical characterisation and anaerobic digestion performances. The potential methane of studied sludge samples could be predicted thanks to a partial least square (PLS) regression. The biochemical characterisation (proteins, carbohydrates and lipids) and two macroscopic parameters (oxidation state and soluble organic carbon) seem to be relevant parameters to assess the anaerobic biodegradability of WAS samples. The degradation of untreated and thermally pretreated WAS samples was monitored in batch reactors. The methanogenesis was shown to be driven by the hydrolysis. Indeed a latency period and a high acetate production were observed during the first days of experiment. Moreover, the soluble compound concentration variations and the methane production kinetics showed two distinct hydrolysis phases of particulate matter. The WAS degradation is therefore dependent on the bioaccessibility of particulate organic matter. A modified structure of Anaerobic Digestion Model n°1 (ADM1) was proposed in order to represent the impact of WAS initial composition on the anaerobic degradation dynamics. Two modifications were performed for enhancing the representation of hydrolysis step and the particulate matter accessibility. Thus the Contois model was used to describe disintegration and hydrolysis steps and two particulate organic matter fractions: a readily hydrolysable fraction  $X_{cr}$  and a slowly hydrolysable fraction  $X_{cs}$ , were introduced. The modified model was able to simulate the degradation performances in batch and continuous conditions.

---

**DISCIPLINE :** Génie des Procédés

**MOTS-CLES :** Digestion anaérobie, Boues secondaires d'épuration, Indicateurs de biodégradabilité, Prétraitement thermique, Hydrolyse, Bioaccessibilité, ADM1, Modèle de Contois

**KEYWORDS :** Anaerobic digestion, Waste activated sludge, Biodegradability indicators, Thermal pretreatment, Hydrolysis, Bioaccessibility, ADM1, Contois model

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :** INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

---