

**VALORISATION DES DIGESTATS DE BIOMÉTHANISATION ET DE
RÉSIDUS AGRICOLES PRÉTRAITÉS PAR LES LARVES DE MOUCHE
SOLDAT NOIRE (*HERMETIA ILLUCENS*)**

Par
Daphné Brodeur

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Jean-François Blais Professeur, INRS-ETE, Université du Québec
Examineur externe	Louis Tessier Professeur- Chercheur Cégep de Shawinigan, Québec
Directeur de recherche	Kokou Adjallé Professeur, INRS-ETE, Université du Québec
Codirectrice de recherche	Céline Vaneekhaute Professeur, Université Laval

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier le professeur Kokou Adjallé pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans ses laboratoires. La confiance qu'il m'a accordée et son enthousiasme vis-à-vis le projet m'ont permis de compléter ma maîtrise avec succès.

Je tiens aussi à remercier Pr Marie-Hélène Deschamps et Pr Grant Vandenberg de m'avoir accueilli dans leur groupe de recherche et leur laboratoire. Merci pour vos multiples conseils et pour les échanges constructifs qui m'ont permis de développer ma vision globale de la recherche. Votre disponibilité et votre bonne humeur ont été indispensables à la réalisation de ce travail.

Je veux également remercier Marc-André Déry pour son soutien inégalé dans la réalisation de mes expériences. Tu as été un formateur exceptionnel et je suis extrêmement reconnaissante pour toutes les discussions fructueuses que nous avons eues sur le projet ... et sur d'autres sujets !

Merci à Adama Ndao pour ton aide au laboratoire et pour avoir répondu à mes diverses questions. Je te remercie pour toutes les réflexions qui ont permis de faire progresser le projet, ce fut très agréable de travailler avec toi.

Merci à Pr Simon Barnabé et Pr Céline Vaneeckhaute pour leurs conseils constructifs quant aux résultats obtenus et à la rédaction de ce rapport.

En terminant, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont supporté tout au long de mes études.

RÉSUMÉ

Au Québec, la production de déchets organiques (urbains, agro-alimentaires et agro-industriels) est estimée à environ 13 millions de tonnes par année. Afin de récupérer ces résidus organiques, différentes méthodes de valorisation sont disponibles, comme la biométhanisation. L'implantation croissante de nouvelles usines de biométhanisation entraîne une augmentation importante de la production de digestat qui doit être valorisé. Ce projet de recherche vise à développer une nouvelle voie de valorisation des digestats de biométhanisation qui est à la fois une solution pour réduire le coût du régime alimentaire utilisé dans l'élevage d'insectes comestibles, en l'occurrence les larves de mouche soldat noire (MSN). Tout d'abord, une étude préliminaire a été menée afin d'analyser le potentiel nutritif du digestat pour les larves de MSN. Des hydrolyses enzymatiques ont été appliquées sur le digestat afin de dégrader les fibres en sucres réducteurs et améliorer l'assimilation du substrat par les larves. L'application de ce prétraitement a permis d'améliorer le gain de masse et le taux de bioconversion. Cependant, la croissance des larves sur le digestat prétraité reste faible par rapport à la diète standard et des travaux supplémentaires sont nécessaires pour optimiser le procédé.

Dans un deuxième temps, l'intégration de résidus agricoles prétraités dans les digestats pour améliorer les performances des larves de MSN élevées sur du digestat a été testée. Des prétraitements, soit une hydrolyse thermique et/ou une hydrolyse enzymatique, ont été appliqués à des résidus de maïs et à de la luzerne afin d'améliorer la biodisponibilité des nutriments. Par la suite, différents régimes alimentaires ont été développés en mélangeant le digestat avec les résidus de maïs et la luzerne prétraités. Des analyses de caractérisation et de performance de bioconversion par les larves de MSN ont été effectuées pour les différentes diètes. L'application du prétraitement sur les résidus de maïs et la luzerne a permis aux larves d'obtenir un gain de masse plus élevé en comparaison avec les résidus de maïs et la luzerne non traités. Cependant, une fois que les substrats agricoles prétraités ont été mélangés au digestat, la performance a diminué. En effet, la croissance des larves élevées sur une diète à base de digestat a été très faible par rapport au régime standard. Une différence significative a été trouvée entre le gain de longueur des deux digestats étudiés, indiquant que certains digestats sont plus appropriés que d'autres pour la culture des larves de MSN. Selon les résultats de cette étude, le traitement du digestat par les larves de MSN n'est pas efficace. Des recherches additionnelles sont nécessaires pour parvenir à une croissance performante des larves de MSN et permettre la valorisation du digestat.

Mots-clés : Digestat, Digestion anaérobie, Économie circulaire, *Hermetia illucens*, Hydrolyse enzymatique, Hydrolyse thermique, Mouche soldat noire, Résidus agricoles

ABSTRACT

In Quebec, the production of organic waste (urban, agri-food and agro-industrial) is estimated at about 13 million tons per year. In order to recycle these organic residues, various recovery methods are available, such as anaerobic digestion. Increasing implementation of new biogas plants leads to a significant rise in the production of digestate that must be valorized. This research project aims to develop a new valorization pathway for biogas digestates that is also a solution to reduce the cost of the diet used in the rearing of edible insects, in this case the black soldier fly larvae (BSFL). First, a preliminary study was conducted to analyze the nutritive potential of digestate for BSFL. Enzymatic hydrolysis was applied to the digestate in order to degrade fibers into reducing sugars and improve the assimilation of the substrate by the larvae. The application of this pretreatment resulted in improved mass gain and bioconversion rate. However, the growth of BSFL on pretreated digestate remains low compared to the standard diet and further work is needed to optimize the process.

In a second step, the integration of pre-treated agricultural residues to improve the performance of BSFL reared on digestate was tested. Pretreatments, either thermal hydrolysis and/or enzymatic hydrolysis, were applied to maize residues and alfalfa to improve nutrient bioavailability. Subsequently, different diets were developed by mixing the digestate with the pre-treated maize residue and alfalfa. Substrate characterization and bioconversion performance analyses by BSFL were performed. Application of the pretreatment to the agricultural crops resulted in higher mass gain by the larvae compared to the untreated maize residue and alfalfa. However, once pretreated agricultural substrates were mixed with digestate, performance decreased. Indeed, the growth of larvae reared on a digestate-based diet was very poor compared to the standard diet. A significant difference was found between the length gain of the two digestates, indicating that some digestates are more suitable than others for growing BSFL. Based on the results of this study, treatment of digestate with BSFL was not effective. Additional research is needed to achieve efficient growth of BSFL and to enable digestate valorization.

Keywords : Agricultural crops, Anaerobic digestion, Black soldier fly, Circular economy, Digestate,, Enzymatic hydrolysis, *Hermetia illucens*, Thermal hydrolysis

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
1 INTRODUCTION	1
1.1 MISE EN CONTEXTE	1
1.2 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF	3
1.3 REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.3.1 <i>La biométhanisation</i>	4
1.3.2 <i>Digestats de biométhanisation</i>	5
1.3.3 <i>L'entomoculture et la gestion des résidus organiques</i>	9
1.3.4 <i>La mouche soldat noire</i>	11
1.3.5 <i>Traitement du digestat par les larves de MSN</i>	15
1.4 STRUCTURE DU MEMOIRE	21
2 VALORIZATION OF PRETREATED BIOGAS DIGESTATE WITH BLACK SOLDIER FLY (HERMETIA ILLUCENS, L; DIPTERA: STRATIOMYIDAE) LARVAE	23
HIGHLIGHTS	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUCTION	26
2 MATERIALS AND METHODS	28
2.1 <i>Experimental diets</i>	28
2.2 <i>Rearing and feeding trials</i>	29
2.3 <i>Growth performance and diet conversion efficiency</i>	30
2.4 <i>Chemical composition of the diets and frass</i>	30
2.5 <i>Statistical analysis</i>	31
3 RESULTS	31
3.1 <i>Visual observations</i>	31
3.2 <i>Chemical composition of diets and frass</i>	32
3.3 <i>Larval growth performance</i>	34
4 DISCUSSION	36
4.1 <i>Digestate as a food source for BSF larvae</i>	36

4.2	<i>BSF treatment as a solution for digestate processing</i>	38
5	CONCLUSION	39
	ACKNOWLEDGEMENTS	39
3	INTEGRATION OF PRETREATED CROP RESIDUES TO IMPROVE THE VALORIZATION OF BIOGAS DIGESTATE BY THE BLACK SOLDIER FLY (<i>HERMETIA ILLUCENS</i>, L; DIPTERA: STRATIOMYIDAE) LARVAE	41
	HIGHLIGHTS	42
	ABSTRACT	43
1	INTRODUCTION	44
2	MATERIAL AND METHODS	46
2.1	<i>Feeding substrates</i>	46
2.2	<i>Feeding trials</i>	48
2.3	<i>Sampling</i>	48
2.4	<i>Chemical composition of the diets</i>	49
2.5	<i>Growth performance and diet conversion efficiency</i>	49
2.6	<i>Statistical analysis</i>	50
3	RESULTS	50
3.1	<i>Chemical composition of diets</i>	50
3.2	<i>Visual observations, pH and temperature</i>	54
3.3	<i>Growth performance of the diets</i>	57
4	DISCUSSION	59
5	CONCLUSION	61
4	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	63
5	BIBLIOGRAPHIE	67

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1. CYCLE DE VIE DE LA MOUCHE SOLDAT NOIRE (MODIFIE DE DE SMET ET AL. (2018)).....	12
FIGURE 1-2. ÉTAPES DU PROCEDE DE TRAITEMENT PAR LES LARVES DE MSN	13
FIGURE 2-1. CHANGES IN (A) TEMPERATURE AND (B) PH OF THE DIETS DURING BSF LARVAL FEEDING TRIALS. STD = STANDARD DIET; D = NON-PROCESSED DIGESTATE; DIWE = DIGESTATE INCUBATED WITH ENZYMES AND DWAE = DIGESTATE WITH ADDED ENZYMES. ABC VALUES WITHIN DAYS WITH SAME LETTER ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT (P>0.05).	32
FIGURE 2-2. MEAN LENGTH OF THE BSF LARVAE AFTER 13 DAYS WHEN FED ON A) RAW DIGESTATE, B) DIGESTATE INCUBATED WITH ENZYMES (DIWE) OR WITH ADDED ENZYMES (DWAE) AND, C) STANDARD DIET (STD).	35
FIGURE 3-1. AVERAGE LENGTH OF LARVAE AT THE END OF ALL EXPERIMENTS (STD = STANDARD DIET; D1 = SOLID DIGESTATE 1; D2 = SOLID DIGESTATE 2; MAIZE _R = MAIZE RESIDUE; ALF= ALFALFA; MAIZE _{R,EH} = MAIZE RESIDUE ENZYMATICALLY PRETREATED; MAIZE _{R,TH+EH} = MAIZE RESIDUE THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF <sub,eh< sub=""> = ALFALFA ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF<sub,th+eh< sub=""> = ALFALFA THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; F1= D1/MAIZE_{R,HE}; F2= D1/ALF_{HE}; F3= D2/MAIZE_{R,HE}; F4= D2/ALF_{HE}; F5= D1/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}; F6=D2/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE})</sub,th+eh<></sub,eh<>	54
FIGURE 3-2. TEMPERATURE OVER TIME FOR EXPERIMENT 1 (A), EXPERIMENT 2 (B) AND EXPERIMENT 3 (C) (STD = STANDARD DIET; D1 = SOLID DIGESTATE 1; D2 = SOLID DIGESTATE 2; MAIZE _R = MAIZE RESIDUE; ALF= ALFALFA; MAIZE _{R,EH} = MAIZE RESIDUE ENZYMATICALLY PRETREATED; MAIZE _{R,TH+EH} = MAIZE RESIDUE THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF <sub,eh< sub=""> = ALFALFA ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF<sub,th+eh< sub=""> = ALFALFA THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; F1= D1/MAIZE_{R,HE}; F2= D1/ALF_{HE}; F3= D2/MAIZE_{R,HE}; F4= D2/ALF_{HE}; F5= D1/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}; F6=D2/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}).....</sub,th+eh<></sub,eh<>	56
FIGURE 3-3. PH OVER TIME FOR EXPERIMENT 1 (A), EXPERIMENT 2 (B) AND EXPERIMENT 3 (C) (STD = STANDARD DIET; D1 = SOLID DIGESTATE 1; D2 = SOLID DIGESTATE 2; MAIZE _R = MAIZE RESIDUE; ALF= ALFALFA; MAIZE _{R,EH} = MAIZE RESIDUE ENZYMATICALLY PRETREATED; MAIZE _{R,TH+EH} = MAIZE RESIDUE THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF <sub,eh< sub=""> = ALFALFA ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF<sub,th+eh< sub=""> = ALFALFA THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; F1= D1/MAIZE_{R,HE}; F2= D1/ALF_{HE}; F3= D2/MAIZE_{R,HE}; F4= D2/ALF_{HE}; F5= D1/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}; F6=D2/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}).....</sub,th+eh<></sub,eh<>	56
FIGURE 3-4. WEIGHT GAIN CURVES FOR EXPERIMENT 1 (A), EXPERIMENT 2 (B) AND EXPERIMENT 3 (C) (STD = STANDARD DIET; D1 = SOLID DIGESTATE 1; D2 = SOLID DIGESTATE 2; MAIZE _R = MAIZE RESIDUE; ALF= ALFALFA; MAIZE _{R,EH} = MAIZE RESIDUE ENZYMATICALLY PRETREATED; MAIZE _{R,TH+EH} = MAIZE RESIDUE THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF <sub,eh< sub=""> = ALFALFA ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF<sub,th+eh< sub=""> = ALFALFA THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; F1= D1/MAIZE_{R,HE}; F2= D1/ALF_{HE}; F3= D2/MAIZE_{R,HE}; F4= D2/ALF_{HE}; F5= D1/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}; F6=D2/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}).....</sub,th+eh<></sub,eh<>	58
FIGURE 3-5. LENGTH GAIN CURVES FOR EXPERIMENT 1 (A), EXPERIMENT 2 (B) AND EXPERIMENT 3 (C) (STD = STANDARD DIET; D1 = SOLID DIGESTATE 1; D2 = SOLID DIGESTATE 2; MAIZE _R = MAIZE RESIDUE; ALF= ALFALFA; MAIZE _{R,EH} = MAIZE RESIDUE ENZYMATICALLY PRETREATED; MAIZE _{R,TH+EH} = MAIZE RESIDUE THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF <sub,eh< sub=""> = ALFALFA ENZYMATICALLY PRETREATED; ALF<sub,th+eh< sub=""> = ALFALFA THERMALLY AND ENZYMATICALLY PRETREATED; F1= D1/MAIZE_{R,HE}; F2= D1/ALF_{HE}; F3= D2/MAIZE_{R,HE}; F4= D2/ALF_{HE}; F5= D1/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}; F6=D2/MAIZE_{R,HE} /ALF_{HE}).....</sub,th+eh<></sub,eh<>	59

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1. COMPOSITION PROXIMALE DES DIGESTATS BRUTS (KOVAČIĆ ET AL., 2022)	6
TABLEAU 2-1. PROXIMATE COMPOSITION (% , DRY BASIS) OF THE EXPERIMENTAL DIETS.....	34
TABLEAU 2-2. PROXIMATE COMPOSITION (% , DRY BASIS) OF THE FRASS.	34
TABLEAU 2-3. GROWTH PERFORMANCE (MEAN ± S.D., DRY BASIS) AND EFFICIENCY OF CONVERSION (ECD) OF THE LARVAE FED ON THE EXPERIMENTAL DIETS AFTER 10 AND 13 DAYS.	35
TABLEAU 3-1. PROXIMATE COMPOSITION (% , DRY BASIS) OF THE DIETS FOR EACH EXPERIMENT	51
TABLEAU 3-2. METAL CONTENT OF SUBSTRATES (% , DRY BASIS)	52
TABLEAU 3-3. PERFORMANCE PARAMETER RESULTS FOR BIOCONVERSION EXPERIMENTS (MEAN ± S.D., DRY BASIS) ..	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AD	Anaerobic digestion
ADF	Acid detergent fiber
BSF	Black soldier fly
D	Unprocessed digestate diet
DIWE	Digestate incubated with enzymes
DM	Dry matter
DWAE	Digestate with added enzymes
FAO	Food and Agriculture Organization
GRIPHA	Groupe de recherche intégré en physiologie et sciences animales
LARSA	Laboratoire de recherche en sciences aquatiques
MOR	Matière organique résiduelle
MSN	Mouche soldat noire
NDF	Neutral detergent fiber
OM	Organic Matter
PAC	Chlorure de poly aluminium
PAM	Polyacrylamide
PVC	Chlorure de polyvinyle
RH	Relative humidity
STD	Standard diet
TWh	Tera Watt par heure

1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

D'ici 2050, la population mondiale devrait atteindre environ 9,8 milliards d'habitants (United Nations, 2022). Cette augmentation significative générera une demande croissante en nourriture, en aliments pour les animaux et en carburant pour les prochaines années. En parallèle, la croissance démographique engendrera des quantités grandissantes de déchets, en particulier des matières organiques, nécessitant un traitement. Au Québec, les matières organiques constituent environ 60 % des 5.8 millions de tonnes de matières résiduelles éliminées chaque année (MELCC, 2020b; Recyc-Québec, 2018). Afin de réduire ce gaspillage de ressources, il est essentiel d'implanter des systèmes de gestion des matières organiques efficaces.

Ces dernières années, différentes technologies de valorisation des matières organiques ont gagné en popularité dont la biométhanisation (MELCC, 2020a). La biométhanisation, ou digestion anaérobie, consiste en un processus naturel de dégradation de la matière organique qui génère du biogaz et du digestat. Depuis quelques années, cette industrie est en pleine expansion au Québec, notamment en raison de l'intérêt que détient le biogaz comme énergie durable et locale. En effet, la production de ce gaz naturel renouvelable permettrait de convertir le problème actuel des déchets organiques en une opportunité économique (Energir, 2019). Le gouvernement du Québec a donc entrepris de nombreux projets d'usines de biométhanisation dans plusieurs villes et MRC (Québec, Montréal, Laval, Sainte-Catherine, MRC de la Vallée-du-Richelieu, etc.) (MELCC, 2021). Évidemment, l'établissement de ce bon nombre d'usines génère une grande quantité de digestat qui doit être récupéré et valorisé.

De manière générale, le digestat subit une séparation liquide-solide à sa sortie du digesteur. La fraction liquide, riche en nutriments et en minéraux solubles, possède un potentiel de valorisation élevé tandis que la fraction solide, riche en matière organique récalcitrante, offre peu de possibilités de récupérer les nutriments (Vaneckhaute et al., 2017). En ce qui concerne la fraction solide, elle est particulièrement réputée pour son utilisation comme amendement de sol ou compost (Tambone et al., 2015; Zeng et al., 2016). Bien que le digestat de biométhanisation détient des propriétés agronomiques intéressantes, l'épandage de la fraction solide de ce produit représente des coûts de gestion élevés et plusieurs contraintes (Nkoa, 2014; Sfetsas et al., 2022; Vaneckhaute et al., 2017). Ainsi, en raison de la croissance inévitable de l'industrie de la biométhanisation qui génèrera de grandes quantités de digestat, il est primordial d'envisager différentes alternatives d'application à ce produit (Gaj & Cichuta, 2022). Dans ce sens, le digestat est perçu comme étant une source de nutriments bon marché pour l'élevage d'insectes décomposeurs comestibles (Spranghers et al., 2017).

Depuis 2015, l'intérêt académique envers les insectes, notamment la mouche soldat noire (MSN), comme source d'alimentation pour l'homme et les animaux est en augmentation de manière exponentielle. En effet, les insectes comestibles consistent en une option viable pour l'alimentation humaine et animale, et ce, à travers le monde (Van Huis, 2020). Parmi les différentes espèces d'insectes comestibles, la MSN suscite beaucoup d'intérêt. De plus en plus d'études portent sur les larves de MSN et démontrent leur grande efficacité à convertir différents résidus organiques en aliments de haute qualité (protéines et lipides) et en amendements de sol (frass; c.-à-d. le résidu obtenu lors de l'élevage d'insectes composé de leurs déjections, leurs mues et des restes de leur alimentation) (Lim et al., 2022; Van Huis, 2022; Yang-Jie et al., 2023). Cet insecte se démarque particulièrement par le fait qu'il possède l'avantage de se développer sur une multitude de substrats organiques différents, allant des déchets de table aux fumiers d'animaux (Nguyen et al., 2015; Van Huis, 2020). De plus, les larves de MSN permettent d'obtenir des taux de réduction élevés pour différentes matières organiques, pouvant atteindre 50 % pour du fumier (Gold et al., 2018).

Composés principalement de matières lignocellulosiques (cellulose, hémicellulose et lignine) et d'azote organique, les digestats solides ont déjà été étudiés pour l'élevage de larves de MSN (Pas et al., 2022; Spranghers et al., 2017; Veldkamp et al., 2021). Bien que les larves puissent se développer sur le digestat, leur biomasse totale est souvent inférieure à celle des larves élevées sur d'autres substrats. Une des raisons de ce faible rendement est le manque de sucre simple, particulièrement le glucose, le sucrose et le fructose, dans le digestat solide. En effet, le digestat est généralement riche en lignocellulose difficilement assimilable par les larves, ce qui réduit leur développement (Manurung et al., 2016; Pas et al., 2022; Spranghers et al., 2017). Certains types de sucre, comme le galactose et le xylose, peuvent même avoir une influence négative sur l'efficacité de la bioconversion des larves de MSN (Cohn et al., 2022). Néanmoins, en fonction des intrants utilisés lors de la digestion anaérobie et selon la configuration du digesteur (conditions opératoires, stabilité du pH, température, etc.), la croissance des larves peut être supérieure. En effet, un digesteur anaérobie opéré de manière à obtenir un digestat stable est susceptible d'être plus adapté pour les larves de MSN (Elsayed et al., 2020). Par ailleurs, afin d'améliorer la performance des larves élevées sur le digestat, différents traitements physiques et chimiques (traitement thermique, traitement au peroxyde alcalin, hydrolyse enzymatique, etc.) ont été proposés pour éliminer la lignine et décomposer la cellulose en sucres digestibles (Liu et al., 2021; Pas et al., 2022; Rahmani et al., 2023). Une autre option consiste à mélanger le digestat avec différents substrats plus riches en nutriments, tels que des résidus alimentaires ou agricoles, afin d'augmenter la teneur en nutriments et améliorer la bioconversion et les performances de croissance des larves de MSN.

Au Canada, et particulièrement au Québec et en Ontario, la culture du maïs-grain est très présente avec une production annuelle moyenne au Québec d'environ 3.7 millions de tonnes (MAPAQ, 2019; Statistics Canada, 2022). La production de maïs génère de grandes quantités de résidus, principalement des tiges et

des épis, qui peuvent être récupérés et valorisés (OFA, 2012). D'autre part, la luzerne est une culture durable disponible en grande quantité qui pourrait améliorer la teneur en nutriments, notamment en protéines, lorsqu'elle est mélangée au digestat (Childers & Aasen, 2007). Cependant, les résidus de maïs et la luzerne possèdent une teneur élevée en matière lignocellulosique et il est donc nécessaire d'appliquer un prétraitement sur ces biomasses afin d'obtenir un taux de bioconversion efficace par les larves de MSN (Bakala et al., 2023).

L'application de différents prétraitements sur des résidus ou biomasses agricoles pour améliorer la performance des larves de MSN a déjà été testée. En effet, des études portant sur l'utilisation de bases alcalines pour éliminer la lignine et décomposer l'hémicellulose (Liu et al., 2021), des hydrolyses enzymatiques (Lim et al., 2022) ou encore des traitements thermiques qui détruisent les parois celluloses tout en réduisant la présence de microorganismes (Isibika et al., 2019) ont été réalisées. Liu et al. (2021) ont démontré qu'un prétraitement au peroxyde alcalin sur de la paille de riz a permis d'améliorer la digestion du substrat par les larves de MSN. De plus, l'application d'un prétraitement biologique sur des pelures de bananes a permis d'augmenter le taux de conversion des déchets en biomasse larvaire en améliorant l'équilibre nutritionnel et l'absorption de déchets fibreux par les larves de MSN (Isibika et al., 2019). Ces recherches ont démontré que la mise au point d'un prétraitement et d'un régime alimentaire adéquat est essentielle afin de maximiser le développement des larves de MSN.

La production de larves de MSN comme source de protéines alternatives est une opportunité économique, durable et écologique (Van Huis et al., 2013). L'utilisation de cet insecte comme agent de traitement des déchets organiques (comme les digestats de biométhanisation) permet de refermer la boucle du flux de matières organiques résiduelles (MOR) et ainsi donner lieu à un modèle d'économie circulaire efficace (Wang & Shelomi, 2017). L'implantation d'une telle filière est donc pertinente, mais, celle-ci devra faire face à certains défis, notamment l'adaptation aux particularités locales et l'approvisionnement suffisant d'intrants à des prix concurrentiels. Des recherches sont donc requises afin de développer un régime alimentaire efficace et à bas prix pour l'élevage des larves de MSN.

1.2 Problématique et objectif

La problématique concernée par ce projet de recherche comporte deux aspects : la quantité croissante de digestat de biométhanisation produite dans les années à venir et le besoin de plus en plus accru en protéines dans le domaine de l'élevage animal. L'opportunité de joindre ces deux problématiques est possible en combinant la digestion anaérobie et les insectes décomposeurs. Il s'agit donc d'utiliser les digestats de biométhanisation comme base de formulation d'une diète pour l'élevage des larves de MSN riches en protéines pour l'alimentation animale. Ainsi, l'élevage de MSN assurerait une production de protéines simple, peu coûteuse et respectueuse de l'environnement.

L'objectif général de ce projet est de développer une nouvelle voie de valorisation des digestats de biométhanisation, qui apporterait une solution pour réduire le coût du régime d'alimentation utilisé dans l'élevage des larves de MSN. Les objectifs spécifiques pour cette étude consistent à :

- 1) Caractériser la fraction solide de digestat et évaluer le potentiel nutritif pour les larves de MSN en comparaison avec un régime d'alimentation standard
- 2) Appliquer un prétraitement thermique et/ou enzymatique sur des substrats agricoles pour réduire la taille des particules et améliorer la biodisponibilité des nutriments;
- 3) Réaliser une formulation à base de digestat et de substrats agricoles prétraités afin d'améliorer la croissance des larves de MSN;
- 4) Analyser et comparer les performances de croissance des larves de MSN sur les formulations développées;

L'originalité de ce projet réside dans la préparation d'un régime d'alimentation à moindre coût pour l'élevage de larves de MSN dont la composante principale est un digestat solide de biométhanisation. Cette nouvelle approche de gestion des digestats solides par la production d'insectes décomposeurs comestibles s'insère harmonieusement dans le concept d'économie circulaire de plusieurs villes et régions du Québec, et ailleurs dans le monde.

1.3 Revue de littérature

1.3.1 La biométhanisation

La biométhanisation permet de dégrader les matières organiques en absence d'oxygène en produisant du biogaz et du digestat. Il s'agit d'un processus naturel pouvant être observé dans les marécages. Le principe de la biométhanisation consiste à placer les MOR dans un digesteur en conditions contrôlées (température, pH, absence d'oxygène, pression, etc.) (Moletta, 2015). La digestion anaérobie comporte quatre phases de dégradation successives, soit (1) l'hydrolyse, (2) l'acidogénèse, (3) l'acétogénèse et (4) la méthanogénèse. Lors de la première étape, les matières organiques complexes (protéines, lipides, etc.) qui ne peuvent pas être utilisées directement par les bactéries sont hydrolysées en molécules simples (acides aminés, acides gras, sucres, etc.). Par la suite, lors de l'acidogénèse, les bactéries acidogènes dégradent ces monomères solubles en acides gras volatils et en alcools. Lors de la 3^e étape, les acides gras volatils sont transformés en acide acétique, en hydrogène (H₂) et en dioxyde de carbone (CO₂). Enfin, lors de la méthanogénèse, l'action synergique de différentes bactéries méthanogènes permet de convertir le substrat en méthane (CH₄) et ainsi produire le biogaz, composé de CH₄ (60 %), de CO₂ (40 %) et d'autres composés en traces comme du H₂S, NH₃ et H₂ (Y. Li et al., 2019).

Le biogaz est perçu comme étant le produit le plus important de la biométhanisation puisqu'il peut être utilisé en tant que combustible et fournir une source d'énergie renouvelable. L'industrie mondiale du biogaz est en forte expansion et a augmenté de plus de 90 % entre 2010 et 2018. L'Europe est le plus grand producteur de biogaz au monde avec plus de 70 % de la production mondiale, soit 64 Tera Watt par heure (TWh), suivie par l'Amérique du Nord avec 15 TWh (IRENA, 2019; Norouzi & Dutta, 2022). La croissance rapide de l'industrie du biogaz est aussi ressentie au Canada, qui a subi entre 2011 et 2022 une augmentation d'environ 50 % des nouveaux projets d'usine de biométhanisation. En 2020, le nombre d'installations de biogaz au Canada s'élevait à 279 (Canadian Biogas Association, 2021). Compte tenu de la hausse importante des installations de biométhanisation à travers le monde, il y aura de grands volumes de digestat produit devant être traités.

1.3.2 Digestats de biométhanisation

La composition du digestat varie en fonction de la provenance des déchets organiques, de la configuration du digesteur et de l'inoculum utilisé lors de la digestion anaérobie. En général, le digestat se caractérise par un pH alcalin, une teneur élevée en azote ammoniacal (46.2 – 79 %) et en macronutriments tels que le potassium, le phosphore, le soufre et d'autres éléments comme le cobalt, le fer et le sélénium (Monlau et al., 2015). La principale voie de valorisation des digestats de biométhanisation est l'utilisation de ceux-ci comme amendement pour les terres agricoles. Cependant, certaines critiques sont associées à cette application. Tout d'abord, comme le témoigne le

Tableau 1-1, la composition du digestat est grandement influencée par la provenance des intrants utilisés lors du processus de biométhanisation. Les propriétés fertilisantes du digestat varient donc beaucoup, ce qui complique son épandage dans sa forme brute. De plus, dans plusieurs régions, les lois en vigueur représentent un obstacle important à l'usage du digestat comme agent fertilisant. En effet, l'épandage de ce produit est régi par des législations environnementales strictes concernant les niveaux de fertilisation en azote et en phosphore, la présence de pathogènes et la teneur en métaux lourds (Sfetsas et al., 2022; Vaneckhaute et al., 2017). Le dépôt direct de digestat sur le sol peut engendrer des problèmes environnementaux comme une lixiviation des nitrates, des émissions d'ammoniaque ou encore causer l'eutrophisation (Ritigala et al., 2021). Enfin, le digestat possède une teneur élevée en eau, ce qui dresse une barrière d'un point de vue économique en raison des coûts de gestion élevés liés au transport et au stockage. Un fractionnement du digestat peut donc être réalisé, souvent par une presse à vis, un crible à tambours (crible vibrant) ou une centrifugeuse, afin de réduire ces coûts et extraire les composés d'intérêts (Törnwall et al., 2017). Généralement, une séparation liquide-solide est appliquée au digestat à sa sortie du digesteur. La fraction liquide, riche en nutriments et en minéraux solubles, s'apparente beaucoup à un

engrais minéral et possède un potentiel de valorisation élevé. D'un autre côté, la fraction solide est riche en matière organique récalcitrante et offre peu de possibilités de récupérer les nutriments puisque ceux-ci sont fortement liés organiquement (Catenacci et al., 2022; Vaneckhaute et al., 2017).

Tableau 1-1. Composition proximale des digestats bruts (Kovačić et al., 2022)¹

Paramètre	Unité	Valeur
pH	-	5.6–8.6
Matière sèche (MS)	%	0.7–90
Matière organique	%MS	15.6–98.0
Carbone total	%MS	10.4–58.7
Azote total	%MS	0.2–20.5
NH ₄ ⁺ -N	g.kg ⁻¹ MS	2.1-17.9
Ca	g.kg ⁻¹ MS	0.6–98.5
K	g.kg ⁻¹ MS	0.9–110.5
Mg	g.kg ⁻¹ MS	0.1–14.1
P	g.kg ⁻¹ MS	0.1–54.0

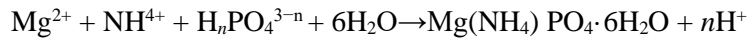
1.3.2.1 Digestat liquide

En général, une partie de la fraction liquide du digestat est recirculée dans le digesteur anaérobie. Cependant, afin de maintenir une production de biogaz stable, il est recommandé de ne pas réintroduire plus de 50 % du volume de la fraction liquide dans le digesteur. Souvent, le digestat liquide résiduel est simplement appliqué directement sur les sols agricoles (Martel & Desmeules, 2013). Toutefois, différentes technologies sont aussi employées afin d'accroître sa valeur. En effet, la fraction liquide est particulièrement exploitée pour l'ammoniac et le phosphore qu'elle contient. De plus, le digestat liquide peut être employé comme engrais concentré pour les cultures hydroponiques ou encore pour produire de la biomasse algale. De nombreuses méthodes de traitement physique, biologique ou chimique sont donc

¹ Modifié de Kovačić et al. (2022) en accord avec la licence Creative Commons Attribution (CC BY) license <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

employées afin de valoriser le digestat liquide et extraire les produits ciblés (Akhiar et al., 2020; Sfetsas et al., 2022).

En raison de sa teneur élevée en azote (ammoniacale et/ou ammonium) et en phosphore, le digestat liquide peut être utilisé pour produire de la struvite au lieu d'être directement épandu dans les champs. La struvite est un complexe de magnésium – ammonium – phosphate obtenu généralement sous l'effet de la chaleur. La réaction de précipitation de la struvite s'exprime ainsi (Shi et al., 2018) :



où n est 0, 1 ou 2.

La struvite est un fertilisant solide qui est plus facile à transporter et appliquer que le digestat liquide. L'utilisation de struvite permet une fertilisation à libération lente en évitant des problèmes tels que la brûlure des cultures ou le ruissèlement des nutriments. La struvite produite à partir de digestat liquide représente une alternative durable aux engrais conventionnels à base de phosphate (Bach et al., 2022).

Le digestat liquide peut aussi être utilisé comme engrais concentré pour les cultures hydroponiques. Cependant, en raison de différents facteurs tels que la teneur élevée en ammonium, le pH variable ou la présence de pathogènes, un traitement doit être appliqué (O'Connor et al., 2022). Différentes méthodes, comme une pasteurisation ou une filtration membranaire, permettent de réduire ces sources d'inhibition. Pelayo Lind et al. (2021) ont démontré que l'utilisation d'un digestat agricole préalablement dilué et dénitrifié, a permis de réduire de 20% (< 1 semaine) le temps de culture de plants de bok choy en hydroponie. De plus, selon les résultats de Ronga et al. (2019), le digestat est une alternative durable comme source de nutriments pour la production de laitue (*Lactuca sativa* L.) en hydroponie. Dans cette étude, la combinaison de digestat et d'une solution standard a permis d'améliorer la croissance des plantes en agissant sur différents paramètres comme les racines, le système caulinaire et le poids sec total. Des études plus approfondies concernant la sécurité est la viabilité économique de la valorisation du digestat pour les cultures hydroponiques sont nécessaires. Néanmoins, cette application est une méthode prometteuse pour réduire ou remplacer les fertilisants synthétiques et ainsi encourager la production en serre durable (Ntinis et al., 2021).

Des technologies émergentes telles que la production de biosurfactants, de biopesticides ou de biomasse algale à partir de digestat voient le jour. Ces recherches récentes permettent de créer une valeur ajoutée aux digestats et attirent ainsi l'investissement dans le secteur de la biométhanisation. Le marché des biosurfactants s'élève à plusieurs milliards de dollars (Singh et al., 2019). Cependant, ceux-ci sont souvent produits à partir de matières premières dispendieuses, ce qui limite l'expansion de l'industrie. L'utilisation du digestat, un substrat peu coûteux, est donc très intéressante pour sa valeur économique et son efficacité

de production élevée (Patria et al., 2021). Dans un même ordre d'idée, des biopesticides peuvent être produits à partir de digestat. *Bacillus thuringiensis* est le biopesticide microbien le plus utilisé à travers le monde. À ce jour, il a été démontré que le digestat est un milieu de culture permettant la croissance de ce biopesticide. Cependant, des travaux à l'échelle supérieure doivent être réalisés afin d'améliorer la capacité de *Bacillus thuringiensis* à coloniser cette matière dans des quantités plus importantes (Mejias et al., 2020; Rodríguez et al., 2019). Enfin, la culture de microalgues est un procédé qui permet de valoriser les nutriments du digestat. Une fois récoltée, la biomasse algale peut être utilisée pour extraire une multitude de produits à forte valeur ajoutée tels que pour produire des biocarburants, des aliments pour les animaux, des composés cosmétiques ou pharmaceutiques, des engrais à libération lente, etc. Stiles et al. (2018) ont démontré qu'après une dilution et en ajustant le ratio C:N:P du digestat, la croissance d'un consortium de microalgues et de bactéries a été accrue et celui-ci a pu être utilisé comme source d'alimentation pour le bétail et l'aquaculture. L'introduction de la culture de microalgues à la filière de la biométhanisation est très prometteuse puisque cette biotechnologie permet à la fois de produire une biomasse à valeur ajoutée tout en fixant le dioxyde de carbone de l'atmosphère par photosynthèse (Sfetsas et al., 2022).

1.3.2.2 Digestat solide

En ce qui concerne la fraction solide de digestat, elle est particulièrement réputée pour son utilisation comme amendement de sol (Tambone et al., 2015; Zeng et al., 2016). En effet, plusieurs travaux de recherche démontrent le potentiel agronomique de la fraction solide en raison de sa teneur élevée en macronutriments et en matière organique (Samoraj et al., 2022). Cependant, contrairement à la fraction liquide, la fraction solide respecte rarement les critères pour être appliquée directement sur les terres agricoles (Bustamante et al., 2012) et nécessite généralement un traitement par compostage (Teglia et al., 2011).

Des technologies thermochimiques telles que la gazéification, la pyrolyse et la carbonisation hydrothermale peuvent être utilisées pour valoriser le digestat solide et produire des biocarburants et du biochar. La gazéification consiste en une oxydation partielle réalisée à une température élevée d'environ 700 °C. Ce procédé génère un gaz de synthèse (syngas), un combustible majoritairement composé de CO et H₂. Afin d'assurer la bonne qualité du syngas, le digestat doit avoir une teneur maximale en humidité de 30 % (Agarwal et al., 2022; Sarker et al., 2021). Similairement à la gazéification, la pyrolyse du digestat produit aussi un syngas. Cependant, cette technologie est effectuée en déficit d'oxygène et à une température plus basse, entre 300 – 800 °C. Enfin, la carbonisation hydrothermique du digestat nécessite le chauffage dans l'eau à une température entre 70 et 250 °C sous une pression de 2-10 Mpa. Contrairement à la gazéification et la pyrolyse, la carbonisation hydrothermale ne demande pas de séchage préalable du digestat et

l'utilisation du digestat brut est possible. Toutes ces méthodes thermochimiques produisent du biochar, un résidu carboné solide, pouvant être utilisé comme amendement de sol (Agarwal et al., 2022). Certaines études démontrent que le biochar serait un amendement amélioré comparativement au digestat puisqu'il permettrait de fixer les métaux lourds et certains nutriments (P, K et Ca), limitant leur rejet dans les eaux souterraines (Folgueras et al., 2013). Bien que ces technologies permettent d'accroître la production d'énergie grâce au syngas, elles nécessitent beaucoup d'énergie sous forme de chaleur (Catenacci et al., 2022). De plus, des produits chimiques nocifs sont souvent nécessaires et ceux-ci peuvent avoir un effet inhibiteur sur les propriétés du biochar. Des recherches additionnelles sont donc nécessaires afin de valider le bilan énergétique et la faisabilité à grande échelle de ces technologies pour la valorisation du digestat solide (Monlau et al., 2015).

Une autre possibilité est l'utilisation du digestat solide comme substrat pour effectuer différentes cultures comme celles de champignons ou d'insectes. O'Brien et al. (2019) ont testé l'utilisation de digestat solide provenant de la digestion anaérobie de fumier de vaches laitières et de déchets alimentaires comme substrat pour la culture du champignon *Pleurotus ostreatus*. Cette recherche démontre qu'à une concentration de 35 % p/p, le digestat solide fournit la productivité la plus élevée. Cependant, l'utilisation du même digestat à une concentration de 70 % a inhibé la croissance du champignon, probablement en raison de la teneur élevée en sodium. Des résultats similaires ont aussi été obtenus par Schimpf et al. (2019) qui ont étudié l'utilisation de digestat solide pour la culture du champignon *Lentinula edodes*. Parallèlement, l'application de digestat comme substrat pour élever des insectes décomposeurs peut s'avérer être une option durable pour la gestion des résidus organiques (Cesaro, 2021). Peu d'études ont été réalisées sur la culture d'insectes sur du digestat de biométhanisation. Cependant, le potentiel que possèdent les insectes décomposeurs à convertir différents résidus organiques en produits à valeur ajoutée est confirmé. En effet, l'utilisation d'insectes pour valoriser les MOR est une opportunité viable économiquement et respectueuse de l'environnement (Chavez, 2021; Siddiqui et al., 2022).

1.3.3 L'entomoculture et la gestion des résidus organiques

Selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'un des défis qu'auront à faire face les producteurs agricoles au cours des prochaines années sera de diminuer les émissions de gaz à effet de serre tout en répondant à une hausse de la demande en produits animaliers liée à la croissance de la population. De plus, il est estimé qu'une grande partie de la nouvelle population sera urbaine et consommera presque deux fois plus de protéines d'origine animale qu'aujourd'hui (FAO, 2011). Afin d'assurer la croissance durable du secteur agro-alimentaire, il est essentiel de développer de nouvelles voies d'approvisionnement en protéines et en lipides à faible coût. L'entomoculture, la culture d'insectes, est une approche intéressante

pour la production d'aliments pour les humains et les animaux d'élevage. De nombreuses recherches proposent la bioconversion de MOR par des insectes décomposeurs comme une solution efficace pour réduire le gaspillage des matières organiques. Cette approche se base sur le fait que l'élevage d'insectes à l'échelle industrielle permettrait de convertir efficacement plusieurs tonnes de déchets en produits ayant une haute valeur (alimentation humaine et animale, engrais, biocarburant, lubrifiant, produits pharmaceutiques, teintures, etc.). En effet, constituant un aliment naturel du régime alimentaire de nombreux animaux, les insectes pourraient être utilisés dans la moulée d'animaux d'élevage comme les poissons et les porcs (Gao et al., 2019; Ojha et al., 2020). De plus, certaines espèces d'insectes, comme la larve de la mouche soldat noire, sont très riches en matières grasses. Ces lipides peuvent être isolés et utilisés pour la production d'huile à des fins de biocarburant (Franco et al., 2021). D'autres avenues sont aussi possibles comme l'extraction de la chitine contenue dans l'exosquelette de plusieurs insectes. Il existe une multitude d'applications à la chitine, particulièrement dans les domaines du biomédical et de l'alimentaire (Cláudia da Costa Rocha et al., 2021; Mohan et al., 2020; Soetemans et al., 2020). Enfin, lors de leur croissance, les insectes décomposeurs produisent du frass, un résidu organique composé des excréments des insectes, de leurs exuvies et des restes de leur alimentation. Le frass possède des propriétés prometteuses comme engrais organiques, notamment un apport élevé en éléments nutritifs au sol (Beesigamukama et al., 2022).

D'un point de vue environnemental, la production d'insectes possède de nombreux avantages comparativement à l'élevage de bétail traditionnel. En effet, les études démontrent que l'élevage d'insectes a une empreinte écologique minimale puisque peu d'eau, de nourriture et de superficie d'élevage sont nécessaires à leur culture. De plus, l'élevage d'insectes émet nettement moins de gaz à effet de serre que la production de bétail, soit environ 100 fois moins (Cadinu et al., 2020). En effet, la production de CO₂ moyenne liée à l'élevage de bovins est estimée à 2850 g de CO₂/kg de gain de masse et celle du porc entre 80 – 1130 g de CO₂/kg de gain de masse. Chez les insectes, les émissions varient entre 2 – 122 g de CO₂/kg de gain de masse, dépendamment de l'espèce utilisée (Oonincx et al., 2010).

Parmi les différentes espèces d'insectes décomposeurs comestibles, les grillons (*Grillidae*) et les vers à farine (*Ténébrionidae*) sont réputés comme aliment pour l'humain (Hénault-Ethier et al., 2017). Ces insectes possèdent une valeur nutritive élevée, faisant d'eux des suppléments alimentaires intéressants (Hong et al., 2020; Ordoñez-Araque & Egas-Montenegro, 2021). En ce qui concerne la valorisation des matières organiques, diverses espèces de mouches (*Stratiomyidae* et *Muscidae*) sont plus appropriées. Les larves de mouches possèdent des taux de consommation généralement élevés et permettent de traiter des déchets ayant des risques sanitaires (fumiers d'animaux, boues d'épuration, etc.) en grande quantité (Čičková et al., 2015; Hénault-Ethier et al., 2017).

1.3.4 La mouche soldat noire

La mouche soldat noire (MSN ; *Hermetia illucens*) est un insecte qui détient un potentiel prometteur pour la valorisation de différents résidus organiques. Au cours de la dernière décennie, la production de larves de MSN a suscité beaucoup d'intérêt, surtout en raison de la possibilité d'utiliser ces larves comme ingrédient alimentaire alternatif pour les animaux de ferme ou comme aliments pour les animaux de compagnie (Van Huis, 2020).

1.3.4.1 Le cycle de vie de la mouche soldat noire

La MSN est une espèce d'insecte diptère faisant partie de la famille des Stratiomyidae. Elle est originaire des régions tropicales ou subtropicales, mais présente dans le monde entier. Ces mouches se tiennent principalement autour du bétail ou de la matière organique en décomposition, ce qui les rend intéressantes pour le traitement des biodéchets (Amrul et al., 2022).

Le cycle de vie de la MSN est composé de 5 étapes, à savoir l'œuf, la larve, la prépupe, la puppe et l'adulte (Figure 1-1). Après une incubation d'environ quatre jours, les néonates larvaires éclosent des œufs (Salam et al., 2022). Ces néonates, d'une longueur d'environ 1 mm, effectuent leur croissance en consommant de la matière organique. Le stade larvaire est la phase de croissance la plus importante de la MSN ou des taux de réduction de la biomasse variant entre 13 – 85 % peuvent être obtenus, tout dépendamment du substrat utilisé pour les nourrir (Siddiqui et al., 2022). Une fois prépupe, les larves sont riches en protéines et en lipides. En effet, lorsque nourries avec un substrat approprié, elles peuvent atteindre des teneurs d'environ 40 – 45 % en protéines et 40 % en lipides (Caruso et al., 2014). À ce stade, les larves peuvent atteindre une longueur d'environ 27 mm et un poids de 220 mg (Amrul et al., 2022). Au stade de prépupe, les larves changent de couleur, passant du brun clair au brun foncé et finalement au noir. Au cours de cette phase, le canal de digestion est vidé et les prépupe migrent vers un endroit plus sec pour la pupaison (Soetemans et al., 2020). Dépendamment du régime alimentaire utilisé, le passage de prépupe à puppe prend entre 10 jours et 3 semaines, ou même plusieurs mois. En effet, une croissance très lente peut être observée si le substrat utilisé pour nourrir les larves n'est pas approprié (Salam et al., 2022). La transition de puppe à mouche dure entre 2 à 3 semaines. Une fois adulte, les MSN n'ont plus besoin de source de nourriture. En effet, seulement une source d'eau est nécessaire afin qu'elles puissent s'hydrater, leur seul but étant de s'accoupler. La Figure 1-1 présente le cycle de vie de la MSN de l'œuf à l'adulte qui, dans les conditions appropriées, dure environ 40 à 43 jours. Les conditions environnementales, comme la température, la lumière et l'humidité sont des facteurs fondamentaux pour assurer le succès du cycle de vie des MSN et sont discutées plus en détail ci-dessous (section 1.3.4.2) (Amrul et al., 2022; Siddiqui et al., 2022).

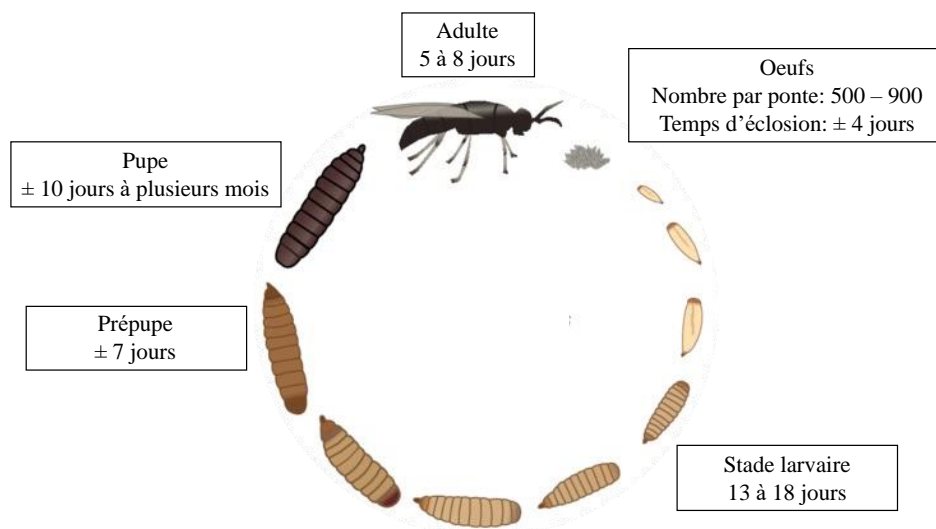


Figure 1-1. Cycle de vie de la mouche soldat noire (modifié de De Smet et al. (2018))

1.3.4.2 Traitement des MOR par les larves de MSN

Le procédé de traitement des résidus organiques par les MSN comprend différentes étapes soit : (1) le prétraitement des déchets (la réduction de la taille des particules, la déshydratation, etc.), (2) le traitement des biodéchets par les larves de MSN, (3) la séparation des larves de MSN des frass et (4) la valorisation des larves et du frass en produits commerciaux (Amrul et al., 2022). La Figure 1-2 illustre le déroulement classique de ce processus. L'élevage de larves de MSN peut être fait sur une multitude de MOR différentes, comme des déchets alimentaires ou des fumiers d'animaux. Pour se faire, la MOR est inoculée avec des néonates qui effectuent leur croissance en consommant le substrat. Un des avantages particuliers de la larve de MSN est son taux de consommation élevé. En effet, le traitement des MOR par les larves de MSN est généralement très rapide et efficace et des taux élevés de conversion des déchets en biomasse larvaire peuvent être atteints, soit environ 30 % (Siddiqui et al., 2022).

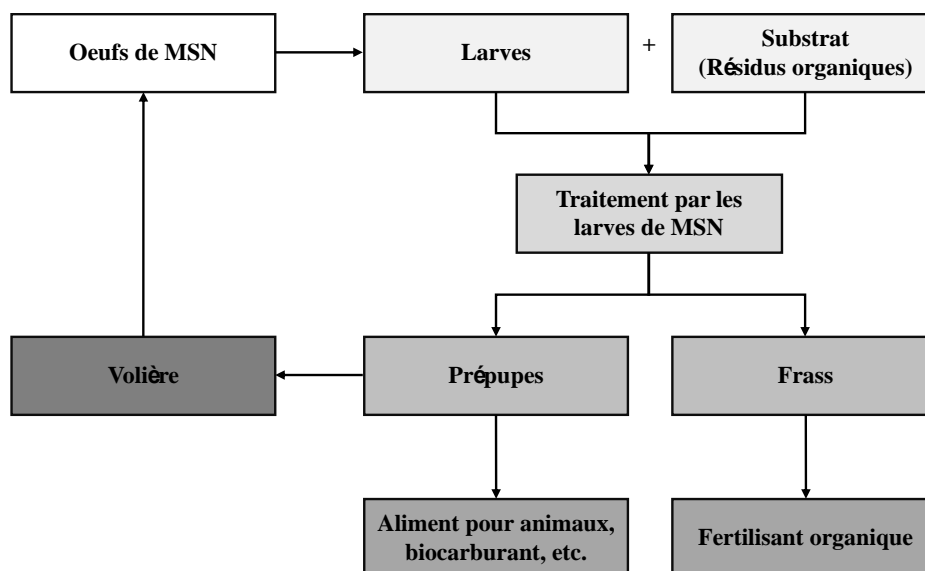


Figure 1-2. Étapes du procédé de traitement par les larves de MSN²

Afin de s’assurer de la performance et de l’efficacité du traitement, l’environnement naturel de la MSN doit être imité autant que possible. L’installation consiste donc en une pièce simulant un climat tropical, soit une température entre 27 et 30 °C et une humidité ambiante d’environ 60 à 70 % (Shumo et al., 2019; Tomberlin et al., 2009).

Au stade adulte, les MSN sont placées dans des volières pour s’y accoupler et pondre. Il est important de situer ces volières sous une lumière directe du soleil ou une lumière artificielle adaptée (450 – 700 nm). En effet, la lumière du soleil joue un rôle important dans l’accouplement, la survie, la croissance et le développement (Salam et al., 2022). De plus, la volière doit contenir une source d’eau, de préférence sucrée, pour que les mouches restent hydratées ainsi qu’un récipient pour la ponte. Ce récipient doit être attractif en imitant l’odeur de la décomposition de matières organiques. Parfois, un mélange d’aliments fermentés est utilisé (Boafo et al., 2023).

Une fois la ponte réalisée, les œufs sont récupérés et placés dans un récipient d’éclosion contenant un substrat de haute qualité afin d’assurer une croissance optimale. De l’alimentation commerciale pour poulet ou encore un mélange de céréales connu sous le nom de diète de Gainesville (50 % son de blé, 30 % farine de luzerne et 20 % farine de maïs jaune) sont des diètes souvent utilisées comme substrat pour les néonates (Bosch et al., 2020; Hogsette, 1992). Après l’éclosion, les larves se nourrissent de ce substrat pendant

² Modifié de Amrul et al. (2022) en accord avec la licence Creative Commons Attribution (CC BY) license <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

environ 5 jours. Par la suite, elles sont placées dans un nouveau substrat ayant une valeur nutritive plus faible, soit la MOR visée à être traitée. Parfois, environ 2 à 5 % de ces larves sont récupérées et nourries d'une diète bien définie afin de maintenir un cycle de vie stable dans la colonie. Il est nécessaire d'ajuster l'humidité du substrat afin que les larves puissent aisément circuler dans celui-ci. Une teneur en eau du substrat qui varie entre 40 à 70 % est optimale pour assurer une bonne croissance (Fatchurochim et al., 1989). Parallèlement, le pH est un paramètre ayant une influence importante sur la survie des larves de MSN. Plusieurs études démontrent qu'un pH de 6 est idéal pour la croissance des larves de MSN. Toutefois, Ma et al. (2018) ont rapporté des gains de masse élevés lorsque les larves étaient élevées sur la même diète avec un pH variant entre 6 – 10, témoignant de la bonne capacité des larves de MSN à s'adapter à différents pH.

Le taux d'alimentation, soit la quantité de nourriture donnée aux larves, a un impact sur plusieurs paramètres comme le poids final des larves, le temps de développement et le taux de réduction du substrat. Manurung et al. (2016) ont étudié l'effet du taux d'alimentation sur la bioconversion de paille de riz par les larves de MSN. Ces travaux ont démontré qu'un taux d'alimentation élevé (200 mg/larve/jour) permettait d'obtenir un temps de développement plus rapide et un taux de bioconversion et de survie élevé. Cependant, il a été observé que lorsque les larves sont nourries avec une grande quantité de substrat, elles en consomment en plus petite partie. Cela résulte en des taux de consommation de substrat plus faible, ce qui n'est pas bénéfique en termes d'application pour la réduction des déchets. Un taux d'alimentation variant entre 100 et 150 mg/larve/jour de diète semble être optimal pour la gestion des résidus organiques (Diener et al., 2009; Nyakeri et al., 2019). Parallèlement, la densité larvaire est un paramètre qui affecte le temps de développement, la survie et le poids des larves. Parra Paz et al. (2015) recommandent une densité larvaire d'environ 1.2 larve/cm². Cependant, afin de produire une plus grande biomasse larvaire, une densité allant jusqu'à 5 larve/cm² peut être utilisée sans influence significative sur le processus (Barragan-Fonseca et al., 2018; Parra Paz et al., 2015).

Une fois transformées en prépupe, les larves tenteront de migrer afin de trouver un endroit sec loin de leur nourriture. À ce stade, les prépupe sont récupérées soit pour être valorisées (protéines, lipides, etc.) ou soit pour compléter le cycle de vie. Les prépupe ou pupes peuvent être récoltées simplement en les laissant migrer par elles même ou bien en les sélectionnant à la main (Diener et al., 2011). Une fois sorties de leur bac, elles sont placées dans un nouveau récipient situé dans la volière qui contient un substrat d'émergence permettant aux prépupe de se cacher et éventuellement se transformer en mouches. À cette étape, le frass est aussi récupéré et valorisé.

1.3.5 Traitement du digestat par les larves de MSN

L'utilisation du digestat de biométhanisation comme substrat pour élever des larves de MSN permettrait de recycler les MOR en des produits à hautes valeurs ajoutées. Quelques essais portant sur ce sujet ont déjà été réalisés. Spranghers et al. (2017) ont analysé la possibilité d'élever des larves de MSN à partir de différents substrats, dont du digestat de biométhanisation. Les résultats de cette étude démontrent que le digestat ne semble pas répondre adéquatement aux besoins nutritifs des larves puisque la biomasse larvaire la plus faible a été obtenue avec le digestat. Similairement, Veldkamp et al. (2021) ont obtenu une faible croissance des larves de MSN sur du digestat. Dans cette étude, les valeurs obtenues pour l'index de réduction et l'efficacité de bioconversion sont plus faibles avec le digestat que les autres substrats testés. D'un autre côté, Fu et al. (2022) rapportent des résultats plus prometteurs. En effet, cette étude qui porte sur la production de protéines d'insectes à partir de digestat de déchets alimentaires indique une performance efficace des larves de MSN. Dans cette étude, le poids final des larves élevées sur le digestat (155.72 ± 6.78 mg) était plus élevé que celles élevées sur les résidus alimentaires pré-biométhanisation (110.34 ± 5.53 mg) (Fu et al., 2022). Elsayed et al. (2020) ont aussi rapporté des résultats intéressants. Leur étude, portant sur la culture de larves de MSN sur du digestat provenant de fumier de poulet et de paille de colza, présente des larves atteignant un poids d'environ 144 mg/larve. Cette étude confirme le potentiel prometteur que détient l'élevage de larves de MSN sur du digestat solide pour la transformation des déchets en biocarburant (Elsayed et al., 2020).

Afin d'améliorer les performances des larves de MSN sur le digestat, des mélanges avec d'autres résidus à plus haute teneur en nutriments peuvent être réalisés. De plus, un prétraitement peut être appliqué au digestat afin d'augmenter la digestibilité des nutriments et ainsi faciliter l'assimilation de ceux-ci par les larves de MSN.

1.3.5.1 Optimisation du taux de bioconversion

Afin d'améliorer la performance du traitement des larves de MSN sur le digestat de biométhanisation différentes solutions sont possibles, comme l'application d'un prétraitement sur le digestat ou encore le mélange de digestat avec d'autres résidus organiques ayant une valeur nutritive supérieure.

L'application d'un prétraitement sur le digestat pourrait améliorer la disponibilité des nutriments et ainsi les rendre plus facilement assimilables par les larves de MSN. Dans les cas où le digestat possède une teneur élevée en fibres, cibler celles-ci pour les dégrader en sucres réducteurs est intéressant. Peu de recherches ont été effectuées sur l'application d'un prétraitement sur le digestat pour la valorisation via les larves de MSN. Cependant, plusieurs études ont été réalisées sur l'application de différents prétraitements

(physique/thermique, chimique et biologique) sur des biomasses lignocellulosiques. Au même titre qu'un substrat lignocellulosique, la mise en œuvre d'un prétraitement sur le digestat permettrait potentiellement d'améliorer l'efficacité et la fiabilité de la bioconversion (Peguero et al., 2022).

Les traitements physiques (mécaniques et thermiques) sont les plus fréquemment employés, principalement en raison de leur facilité de fonctionnement et leur faible investissement (Mahmood et al., 2019). Des méthodes mécaniques à l'aide de divers appareils comme des broyeurs à marteaux, à lames ou à disques ou bien des extrudeuses sont souvent utilisées. Un broyage est généralement effectué pour réduire la taille des particules et augmenter la surface de contact et la porosité du substrat, ce qui peut faciliter l'ingestion de la nourriture pour les larves (Oyedeki et al., 2020; Peguero et al., 2022). De plus, coupler le traitement mécanique à un traitement thermique permettrait de détruire les parois cellulosiques tout en réduisant la présence de microorganismes (Barua & Kalamdhad, 2017). La performance des traitements thermiques dépend fortement des conditions opératoires, soit la température, la pression et le temps de traitement (Peguero et al., 2022). En effet, si ces paramètres ne sont pas bien ajustés, des microorganismes et des nutriments bénéfiques à la croissance des larves de MSN peuvent être dégradés. De plus, l'application d'un traitement thermique peut engendrer la production de composés nuisibles au développement des larves de MSN, tels que des tanins ou des composés phénoliques (Peguero et al., 2022). Isibika et al. (2019) ont testé l'effet de différents prétraitements, dont une hydrolyse thermique (120 °C, 2 bar pendant 1h) sur des pelures de bananes pour leur valorisation avec les larves de MSN. Dans cette étude, le prétraitement thermique n'a pas amélioré la digestibilité du substrat, possiblement en raison de l'augmentation de la teneur en tanins. Les larves élevées sur le substrat prétraité thermiquement ont donc obtenu un poids final plus faible que les autres prétraitements étudiés (Isibika et al., 2019). D'un autre côté, Liew et al. (2022) ont obtenu des résultats plus encourageants en étudiant l'impact d'un prétraitement thermique à différentes températures sur des boues activées pour la culture de larves de MSN. Le traitement effectué à la température la plus élevée et la durée la plus longue, soit 90 °C pendant 16 h, a été le plus performant par rapport au poids final des larves et l'efficacité de bioconversion. L'application de ce prétraitement thermique a permis d'améliorer l'appétence du substrat et donc favoriser la croissance des larves de MSN (Liew, Mong, et al., 2022). Selon Peguero et al. (2022) des traitements thermiques effectués à une température plus basse (80 – 90 °C) et pendant un temps plus long (> 60 min) seraient plus appropriés pour des substrats visant à être utilisés pour l'élevage des larves de MSN.

Des prétraitements chimiques comme l'utilisation de bases alcalines pour solubiliser la lignine et dégrader l'hémicellulose semblent être bénéfiques. En effet, une étude menée par Liu et al. (2021) a démontré qu'un prétraitement au peroxyde alcalin appliqué sur de la paille de riz, un résidu agricole riche en matière lignocellulosique, a permis d'éliminer une grande partie de la lignine et un peu de l'hémicellulose. Cette

dégradation a favorisé la digestion de la paille de riz et a augmenté le taux de bioconversion par les larves de MSN (Liu et al., 2021). D'autres essais ont été réalisés avec de l'ammoniac (NH_3). Isibika et al. (2019) ont obtenu des résultats intéressants avec des larves plus larges et une bioconversion plus efficace lorsque le substrat était prétraité avec du NH_3 . Cependant, Peguero et al. (2023) ont obtenu des résultats différents. En effet, le prétraitement à l'ammoniac (5 %) testé dans cette étude a réduit de plus de moitié la performance des larves de MSN par rapport au contrôle non traité. Selon cette étude, le prétraitement à l'ammoniac aurait une certaine toxicité pour les larves de MSN. L'application d'un prétraitement chimique sur le substrat doit donc tenir compte d'une possible nocivité des composés chimiques utilisés (Peguero et al., 2023). Un autre prétraitement chimique possible est l'utilisation d'enzymes cellulolytiques ciblant la dégradation des fibres en sucres réducteurs. Comparativement à l'utilisation de produits chimiques, les traitements enzymatiques sont moins coûteux (Bolzonella et al., 2020). L'hydrolyse enzymatique des biomasses lignocellulosiques est particulièrement populaire pour la production de biocarburant (Zhang et al., 2021). Plusieurs études démontrent une dégradation efficace des fibres en sucres simples par ce traitement (Cutrim et al., 2019). À ce jour, très peu d'études ont été réalisées sur l'application d'une hydrolyse enzymatique sur un substrat avant l'élevage de larves de MSN. Cependant, les essais réalisés sur les biomasses agricoles laissent croire que ce prétraitement serait avantageux pour l'élevage des larves de MSN.

D'autres études portent sur les traitements biologiques, comme des fermentations avec des bactéries, des levures ou des champignons bénéfiques aux larves de MSN. Ces microorganismes, lorsqu'ils sont présents sur des déchets organiques, produisent des enzymes qui dégradent la cellulose et les tanins présents dans le substrat. Ces traitements sont généralement peu coûteux, respectueux de l'environnement et efficaces (Katongole et al., 2017). Toutefois, le temps de décomposition peut être long, ce qui peut limiter l'application d'un tel procédé à l'échelle industrielle. Plusieurs facteurs influencent l'efficacité des traitements microbiens comme la température, l'humidité, le temps d'incubation et l'inoculum utilisé (Peguero et al., 2022). L'utilisation de champignons dégradant la lignine peut être intéressante lorsqu'un substrat à haute teneur ligneuse est utilisé. Parmi les différentes espèces, les champignons à pourriture blanche (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* et *Ceriporiopsis subvermispora*) sont des candidats d'intérêt. Différentes études démontrent que l'application de ces champignons préalablement à l'élevage des larves de MSN a permis d'augmenter la croissance de celles-ci (Fitriana et al., 2022; N. K. Singh et al., 2021). Évidemment, afin d'obtenir de bonnes performances par les larves de MSN, il est nécessaire de sélectionner une souche de microorganismes qui convient au substrat à valoriser. Isibika et al. (2019) ont testé l'effet de différents prétraitements microbiens sur la performance des larves de MSN. Dans cette étude, des bactéries isolées de la flore intestinale des larves de MSN ainsi que des champignons, soit le *Trichoderma reesei* et le *Rhizopus oligosporus*, ont été sélectionnés. Différents traitements ont donc été testés avec des temps d'inoculation différents variant entre 7, 14 et 21 jours à 28 °C. De manière

générale, les larves nourries avec un substrat ayant subi un prétraitement microbien ont obtenu un poids plus élevé que celles élevées sur le substrat non traité. Cette amélioration de la performance des larves de MSN est probablement due à une augmentation de la digestibilité et de la disponibilité des nutriments du substrat (Isibika et al., 2019). Cependant, de la recherche additionnelle est encore nécessaire afin d'optimiser et valider l'efficacité des traitements biologiques à l'échelle pilote et industrielle. De plus, des analyses économiques devront être réalisées afin de balancer efficacité et coûts selon l'application d'un prétraitement.

Des recherches plus approfondies et appliquées au digestat sont nécessaires afin de valider la pertinence d'un prétraitement pour l'amélioration de la bioconversion avec les larves de MSN. Afin d'augmenter l'efficacité de croissance des larves, une autre possibilité consiste à mélanger le digestat avec d'autres résidus organiques afin d'augmenter la teneur en nutriments. Le mélange de différents substrats a déjà été testé et semble prometteur. Rehman et al. (2017) ont analysé le potentiel de conversion des larves de MSN lorsque du fumier de vache, un résidu organique à haute teneur en fibres et difficilement consommable par les larves de MSN, est mélangé avec des résidus de soja. Leur étude a démontré que le mélange améliore les performances des larves de MSN. Le ratio de fumier et de soja de 2:3 a permis aux larves d'obtenir un gain de masse plus élevée que lorsque le fumier ou le soja était utilisé séparément. Similairement, un mélange de résidus de restauration et de paille de riz testé par Zheng et al. (2012) a amélioré la croissance des larves de MSN. Dans cette étude, un taux de biomasse et un rendement en graisse maximale ont été obtenus avec un rapport des résidus de restauration et de paille de riz d'environ 8:2. En considérant que le digestat est riche en matières lignocellulosique, mélanger celui-ci avec d'autres résidus permettrait d'améliorer la conversion du substrat par les larves de MSN. Cependant, certains facteurs susceptibles d'inhiber la croissance des larves peuvent être retrouvés avec le digestat et doivent être considérés. En effet, le digestat de biométhanisation peut contenir une teneur élevée en métaux, en coagulant/floculant, en pathogènes ou encore en microplastiques qui peuvent affecter le développement des larves de MSN.

1.3.5.2 Contraintes

À partir d'une certaine concentration, les métaux sont susceptibles d'être toxiques pour diverses plantes et animaux (Lievens et al., 2021). Comme en témoignent différentes études, cette toxicité peut aussi être détectée chez la MSN. Tout d'abord, Cho et al. (2020) ont démontré que la salinité avait un impact sur le développement des larves de MSN. En effet, d'après cette étude, plus la concentration de NaCl augmente dans le substrat et plus la croissance, le taux de réduction du substrat et le taux de pupaison diminuent. Selon Cai et al. (2018), des concentrations élevées en plomb, nickel, bore et mercure peuvent avoir un effet négatif sur le gain de masse des larves de MSN. De plus, le zinc, le cuivre, le chrome, le cadmium et le

mercure ont réduit légèrement la survie des larves. Cependant, les larves de MSN semblent pouvoir tolérer des teneurs élevées en métaux. En effet, Wu et al. (2020) ont démontré que des concentrations de cadmium de 100 – 800 mg/kg et de cuivre entre 10 – 80 mg/kg n'avaient pas d'effet significatif sur le gain de masse et le taux de mortalité des larves de MSN. Cette étude démontre que les larves de MSN peuvent supporter des teneurs élevées en Cd et en Cu, des métaux pouvant être retrouvés dans les MOR, particulièrement les fumiers d'animaux et les boues d'épuration municipale (Cai et al., 2018). Malgré leur résistance élevée à la présence de métaux, il est important de mentionner que les larves de MSN sont sujettes à accumuler ces composés dans leurs tissus adipeux. En effet, différentes études démontrent que les larves de MSN accumulent les métaux lourds présents dans leur substrat. Des précautions face à l'utilisation de larves de MSN comme aliment pour les animaux d'élevage sont donc à considérer lorsqu'un substrat à haute teneur en métaux lourds est utilisé. Cependant, la recherche semble démontrer que la teneur en métaux lourds dans l'huile larvaire reste faible, ce qui permet d'employer celle-ci pour produire des biocarburants (Bohm et al., 2022; Liu et al., 2022). Il est donc possible d'utiliser les larves de MSN afin d'améliorer la qualité d'un substrat résiduel, comme du digestat, et d'en faire un fertilisant organique à teneur réduite en métaux lourds (arsenic, cadmium, mercure et plomb) (Biancarosa et al., 2018, 2019).

De plus, le traitement des eaux usées municipales fait régulièrement usage de coagulants/floculants qui, une fois les boues redirigées vers des stations de biométhanisation, peuvent être retrouvés dans le digestat. La floculation/coagulation est aussi une méthode chimique utilisée pour traiter le digestat afin de minimiser la turbidité et la teneur en solides en suspension, améliorer l'efficacité du traitement et prévenir l'encrassement des installations de digestion anaérobie (Chozhavendhan et al., 2023; Ritigala et al., 2021). L'effet des coagulants/floculants, comme le chlorure de poly aluminium (PAC), le polyacrylamide (PAM) ou des sels de fer, sur la croissance des larves de MSN est peu étudié (Urbanowska et al., 2020). Zhang et al. (2022) ont analysé l'effet des floculants industriels sur la bioconversion des larves de MSN. Leurs résultats ont démontré que lorsque les larves étaient exposées à une teneur de 400 mg/L en floculant (PAC et PAM), le temps de développement était plus long et le gain de masse, la survie, le taux de réduction et le taux de bioconversion étaient réduits. La présence de floculants dans le substrat a donc inhibé la croissance et la performance des larves de MSN. De plus, la bioaccumulation de l'aluminium contenue dans les floculants a été observée, limitant l'utilisation des larves dans le domaine alimentaire (Zhang et al., 2022). Des études plus approfondies doivent être réalisées afin de définir si l'inhibition du taux de bioconversion des larves de MSN est causée par la toxicité de l'aluminium ou à un changement des propriétés physiques dû à l'ajout de floculant. À cet effet, Li et al. (2021) ont testé l'utilisation de coagulant/floculant comme méthode pour le contrôle des moustiques nuisibles. Leur recherche a démontré que l'utilisation de PAC contenant 28 % de Al_2O_3 a résulté en un taux élevé de mortalité de la larve de moustique. D'après cette étude, l'élimination des moustiques immatures par coagulation/floculation est principalement causée par

des effets physiques, les larves ayant un accès limité à la nourriture et à l'oxygène en raison de la présence des floes (Li et al., 2021).

Des microplastiques peuvent être retrouvés dans le digestat de biométhanisation, principalement en raison des emballages alimentaires. Dans leur étude, Lievens et al. (2022) ont analysé l'influence de la présence de chlorure de polyvinyle (PVC) (micro-, meso- et macroplastiques) sur les larves de MSN. Les résultats ont démontré qu'aucune différence significative n'est observée entre les larves élevées sur les déchets alimentaires de contrôle et les déchets alimentaires contenant des PVC. De plus, il semblerait que les larves aient été capables de réduire plus efficacement les déchets alimentaires contenant des macroplastiques, probablement dû au fait que le substrat était plus structuré, facilitant l'accès à l'oxygène. Similairement, Cho et al. (2020) ont étudié la présence de polyéthylène et polystyrène sur la croissance des larves de MSN et l'efficacité de bioconversion de résidus alimentaires. Les diètes contenant des microplastiques ont eu pour effet de diminuer le taux de réduction du substrat, mais d'augmenter le taux de pupaison des larves. Par conséquent, même si l'efficacité du traitement a été réduite par la présence de microplastiques, les larves de MSN peuvent être utilisées pour le traitement de MOR comportant ces contaminants. Toutefois, comme les métaux lourds, les microplastiques peuvent être accumulés dans les tissus des larves. Cette possible bioaccumulation doit être considérée lorsque les larves de MSN sont utilisées pour l'alimentation animale. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier les effets à long terme de la bioaccumulation des différents composés (métaux, microplastiques, etc.).

1.4 Structure du mémoire

Ce travail de recherche vise à développer une nouvelle voie de valorisation des digestats solides de biométhanisation par l'élevage de larves de MSN. Ce mémoire de maîtrise est divisé en cinq chapitres :

- Le chapitre 1 présente une introduction générale avec une mise en contexte afin de bien comprendre le cadre dans lequel a été réalisé ce travail. Par la suite, une revue de littérature exhaustive est présentée afin de documenter les travaux antérieurs en lien avec le sujet de recherche.
- Le chapitre 2 présente une étude préliminaire sous forme d'article scientifique rédigé en anglais. Cette recherche se consacre principalement à l'étude de la valeur nutritive des digestats pour les larves de MSN. De plus, l'application d'un prétraitement, soit une hydrolyse enzymatique, sur les digestats de biométhanisation afin d'améliorer la performance du traitement des larves de MSN est testée.
- Le chapitre 3 présente les travaux de recherche complémentaire au chapitre 2 sous forme d'article scientifique rédigé en anglais. Cet article porte sur l'intégration de résidus agricoles prétraités pour améliorer la valorisation des digestats de biométhanisation par les larves de MSN. Suite aux résultats obtenus lors de l'étude préliminaire, il a été possible de réaliser des travaux de recherche plus poussés visant à développer une méthode plus efficace de valorisation des digestats de biométhanisation. Le but de cette étude est d'optimiser la performance obtenue lors de l'étude préliminaire.
- Le chapitre 4 consiste en une discussion générale et une conclusion. Cette section synthétise et met en relation les différents éléments présentés dans les chapitres 2 et 3, identifie les éventuels défis liés à ces travaux et présente les perspectives pour la recherche à venir.

2 VALORIZATION OF PRETREATED BIOGAS DIGESTATE WITH BLACK SOLDIER FLY (*HERMETIA ILLUCENS*, L; DIPTERA: STRATIOMYIDAE) LARVAE

Valorisation du digestat de biométhanisation prétraité par les larves de mouches soldat noires (*Hermetia illucens*, L; Diptera : Stratiomyidae)

C. Pas^{1,2,3}, D. Brodeur⁴, M.-H. Deschamps², Y. Lebeuf², K. Adjalle⁴, S. Barnabé⁵, M. Eeckhout³, G. Vandenberg², C. Vaneekhaute¹

¹BioEngine, Université Laval, 1065 avenue de la Médecine, Québec, Canada, G1V 0A6

²Département des sciences animales, Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, Canada, G1V 0A6

³Ghent University, Valentin Vaerwyckweg 1, Schoonmeersen, Ghent, Belgium, 9000

⁴Institut national de la recherche scientifique, 490 rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

⁵Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada

Publié au journal : Environmental Management, le 1 octobre 2022.

DOI : [10.1016/j.jenvman.2022.115529](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115529)

Contribution des auteurs

Célia Pas: conception, méthodologie, analyse formelle, rédaction - copie originale. **Daphné Brodeur**: analyse formelle, interprétation, rédaction - copie originale. **Marie-Hélène. Deschamps**: conception, validation, rédaction - révision et édition. **Yolaine Lebeuf**: ressources . **Kokou Adjalle**: ressources. **Simon Barnabé**: supervision, administration du projet. **Mia Eeckhout** : conception, supervision, acquisition de financement. **Grant Vandenberg** : rédaction - révision et édition. **Céline Vaneekhaute** : conception, rédaction - révision et édition, supervision, acquisition de financement.

Highlights

- Chemical analysis of biogas digestate shows high fiber and mineral contents
- Enzymatic hydrolysis of digestate improves larvae growth
- Appropriate treatment or formulation could increase larvae growth on digestate
- Performance of black soldier fly larvae is highly dependent on nutrient content

Abstract

Increasing concerns related to the negative environmental impacts of food waste have motivated the development of new solutions to complete the waste cycle of organic residues. One particular "waste" product, the solid digestate from anaerobic digestion, has been identified for further bioprocessing. Black soldier fly (BSF, *Hermetia illucens*) larvae are known for their great potential in the processing of organic waste. In this study, this potential was investigated to further process the digestate waste stream. Digestate is considered a low potential source of nutrients for larvae due to the presence of different fiber fractions. However, the lignocellulosic matter in this residue could be enzymatically hydrolyzed to release residual carbohydrates. For this study, digestate from a full-scale anaerobic digestion plant in Quebec (Canada) which processes a range of feedstocks (fruits, vegetables, garden wastes, sludge derived from dairy processing and wastewater treatment) was sourced. Digestate was treated with Accelerase® DUET enzyme complex to hydrolyze lignocellulosic matter and compared to a standard diet. For each treatment, 600 four-day old larvae were fed daily with 160 g (70% relative humidity) of diets for 6 days and harvested 3 days later. Although their growth and total biomass were significantly lower than the standard diet, larvae fed on hydrolyzed digestate were almost two times larger than the larvae fed on crude digestate. Furthermore, the content of organic matter, lipids and minerals in the diets and frass were analyzed. Finally, the feasibility of applying BSF treatment for digestate valorization is discussed. According to this study, enzyme-treated digestate does not allow efficient larval growth compared to the standard diet. The development of a more effective method of pretreatment is required for BSF larvae to become an eco-friendly solution for digestate valorization.

Keywords: Anaerobic digestion; Black soldier fly; Digestate; Enzymatic hydrolysis; *Hermetia illucens*; Recovery.

1 Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a biological process that allows a dual recovery of waste by the production of energy in the form of biogas and organic fertilizer, i.e., digestate, while reducing greenhouse gas emissions (Mwene-Mbeja et al., 2020; Pramanik et al., 2019). Due to the latest energy and climate policies promoting renewable energy, AD has gained significant popularity in recent years (Bhatnagar et al., 2022). Indeed, the success of this technology has led to a strong development of AD plants around the world, especially in the United States, Europe and China (Akhiar et al., 2020). According to The World Biogas Association, there are currently approximately 132,000 small, medium or large-scale anaerobic digesters operating worldwide (Primmer, 2021). This industry is also growing rapidly in Canada, particularly due to the interest of biogas as a sustainable and local energy source. In fact, the production of this renewable natural gas could convert the organic waste management into an economic opportunity (Energir, 2019). Nevertheless, the establishment of an important number of AD plants will generate a large quantity of digestate that must be disposed of and/or valorized.

Digestate is the nutrient-rich residue obtained from the AD of waste. Several studies show that the properties of digestate as fertilizer are significant (Albuquerque et al., 2012; Głowacka et al., 2020; Mata-Alvarez et al., 2014). For example, Głowacka et al. (2020) showed that the use of digestate on acidic soil with low macronutrient content improved the physicochemical properties, such as pH, organic carbon, organic nitrogen and available nutrient content, and increased the yield of switchgrass forage without decreasing its nutritional value. In addition, a study by Warnars & Oppenoorth (2014) stated that digestate could improve crop revenues with an average of 25%. Thus, digestate could be a substantial alternative to costly chemical fertilizers (J. Lu & Xu, 2021; Vaneekhaute et al., 2013). However, the use of raw digestate remains limited because its composition and level of stability vary greatly with the substrate used during AD (Albuquerque et al., 2012; Mata-Alvarez et al., 2014). The valorization of this organic residue as fertilizer is therefore not always the most convenient method, especially in developed countries where the majority of soil is already saturated in nutrients (Fuchs & Drosig, 2013). Indeed, the application of this product is governed by strict environmental regulations regarding nitrogen and phosphorus fertilization levels (Vaneekhaute et al., 2017). Moreover, post-treatment of digestate is often necessary to improve its quality, reduce phytotoxicity, accelerate stabilization and improve nutrient conservation (J. Lu & Xu, 2021).

In general, digestate undergoes liquid-solid separation as it leaves the digester. The liquid fraction, rich in nutrients and soluble minerals, has a high recovery potential while the solid fraction, rich in recalcitrant organic matter (OM), offers little opportunity for nutrient recovery since the nutrients are strongly organically bound (Barampouti et al., 2020; Vaneekhaute et al., 2017). Currently, the liquid fraction is particularly popular for struvite and ammonia, which can be recovered by different extraction techniques

(Akhiar et al., 2020). Regarding the solid fraction, it is particularly known for its application as compost or soil amendment (Tambone et al., 2015; Zeng et al., 2016). However, solid digestate competes with many fertilizing residual materials already used to enrich agricultural land, such as manure (Varma et al., 2021; Zhang et al., 2021). The valorization of the solid digestate as compost is therefore not always appropriate and it is essential to find other recovery pathways. In this regard, digestate is seen as a low-cost source of nutrients for rearing edible decomposer insects (Spranghers et al., 2017).

Over the past decade the interest in insects to upcycle organic waste streams as a food source for humans and animals has been increasing exponentially (van Huis, 2019). The larval stage of one insect species in particular, the black soldier fly (BSF; *Hermetia illucens*) can grow on many different organic materials, ranging from table waste to animal manures (Nguyen et al., 2015; van Huis, 2019). In addition, BSF larvae have a high biomass reduction rate, reaching up to 50% for manure (Myers et al., 2008; Rehman et al., 2017). These characteristics make the BSF one of the most suitable insects for the decomposition of organic waste materials (Zhang et al., 2021). In fact, there is a large amount of work demonstrating the ability of BSF larvae to decompose OM. Spranghers et al. (2017) reported the potential for rearing BSF on a variety of substrates, including solid digestate. In this study, BSF larvae were able to grow on digestate, but their total biomass was lower than the larvae reared on other substrates, such as restaurant residues. The reason for this lower yield may be the lack of carbohydrates an energy source in the solid digestate. Indeed, this residue is generally rich in lignocellulosic material that is difficult for larvae to convert into simple sugars, which hinders their development (Manurung et al., 2016; Spranghers et al., 2017). Applying a pretreatment to the solid digestate that targets the breakdown of lignocellulosic fibers could potentially make these nutrients readily available to BSF larvae.

Efficient degradation of lignocellulosic materials (cellulose, hemicellulose, and lignin) into simple sugars is a challenge in several fields, particularly in biofuels (Leu & Zhu, 2013). Pretreatments such as the use of alkaline bases to remove lignin and break down cellulose (Liu et al., 2021), enzymatic hydrolyses that improve the saccharification of lignocellulose (Leu & Zhu, 2013) and heat treatments that destroy cellulose walls while reducing the presence of microorganisms (Barua & Kalamdhad, 2017) are all likely to improve the bioconversion of digestate by BSF larvae. Indeed, a study by Liu et al. (2021) demonstrated that alkaline peroxide pretreatment applied to rice straw improved the digestion of this substrate by BSF larvae and thus, increased the conversion rate of rice straw to larval biomass. These results are consistent with the study by Isibika et al. (2019) on the effects of different pretreatments (microbiological, chemical, and thermal) on banana peels as a substrate for BSF rearing; the majority of pretreatments tested improved the conversion of organic waste to biomass compared to untreated banana peels. Further studies regarding the optimization

of these pretreatments are therefore interesting as they present promising opportunities in terms of substrate digestibility for BSF larvae (Isibika et al., 2019).

The main goal of this study was to develop a new sustainable solution for the valorization of the solid fraction of digestate. We hypothesized that enzymatic digestion to hydrolyze lignocellulosic fibers could increase nutrient availability of digestate for BSF larvae.

2 Materials and Methods

2.1 Experimental diets

2.1.1 Standard diet (STD)

The Gainesville diet (50 % wheat bran, 30 % alfalfa meal and 20 % yellow corn flour; Hogsette, 1992) was used as a standard diet (STD). Prior to the experiments, the dry ingredients were mixed in one batch (20 kg) and stored at 4 °C. At each feeding day, the STD was returned to ambient temperature and humidified at 70% relative humidity (RH) prior to being given to the larvae.

2.1.2 Unprocessed digestate diet (D)

The solid fraction (35.58 ± 0.38 % of dry matter, DM) of digestate originating from an anaerobic digestion plant in Quebec (Canada) processing garden waste, dairy whey permeate, animal manure and biological sludge was used. 20 kg of the solid fraction were harvested by shoveling randomly in a pile of digestate and transferred to the *Groupe de recherche intégré en physiologie et sciences animales* (GRIPHA) at Université Laval (Quebec, Canada) prior to being stored at 4°C. The digestate diet was prepared on the day of feeding by adjusting the RH to 70% prior to being given to the larvae.

2.1.3 Processed digestate

The enzyme cocktail Accellerase® DUET (Genencor, 2011) was used to increase the availability of nutrients of the solid digestate to the larvae. One fraction was incubated with the enzyme cocktail at the optimal enzyme conditions (*digestate incubated with enzymes*; DIWE) while the other was incubated with the enzyme cocktail at BSF rearing conditions (*digestate with added enzymes*; DWAE). For DIWE, 4 kg of fresh digestate (1.42 kg of DM 64.4 % RH) were pre-treated in two batches with the enzyme cocktail given the manufacturer recommendations (45-60°C, pH 4.0-5.5, 0.25 mL enzyme/g biomass; Genencor, 2011). A preliminary study carried out during 96h in our laboratory had found that during the digestion process of the digestates, the concentration of reducing sugar in the hydrolysates stopped increasing after 48h.

Therefore, after adding the Accellerase® DUET solution, the pH of the mixture was adjusted with NaOH to pH of approximately 5.0 and humidified to 88 % RH to allow homogeneous mixing during 48h in an incubation shaker (Multitron Standard, Infors HT)(52.0 ± 3.9 °C, 180 rpm and a pH of 4.6 ± 0.5). For DWAE, the digestate was incubated with the Accellerase® DUET solution (0.25 mL enzyme/g biomass) in batches of 700 g at 27.5 ± 0.5 °C, a pH of 8.0 ± 0.2 and a 70 % RH, 48 h before the diet was given to the larvae.

2.2 Rearing and feeding trials

The rearing of BSF larvae was conducted at the *Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques* (LARSA) of Université Laval (Quebec, Canada). Neonates hatching took place in an incubator (Growth cabinet, MLR-350, Sanyo, Osaka, Japan) at constant photoperiod (12L:12D), temperature (27 °C) and relative humidity (80%). Eggs were suspended 24h (day 0) above 200 g of feed (Gainesville diet, 70% RH) that contained a fungicide (0.15% Methyl 4-hydroxybenzoate; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada; Bruno *et al.*, 2019) to control mold development.

At day 4, neonates (larval length = 3.0 ± 0.5 mm) were sieved from feeding substrate and distributed in 16 (n=4/diet) bioconversion bins (5 L plastic buckets - IPL 4412) covered with gaze (Agryl P-12, Agryl, Courbevoix, France). A total of 600 larvae were counted manually and weighed (density of 1.2 larvae/cm²; Parra Paz *et al.*, 2015). For each experimental diet, 160 g was added each day from day 4 to day 9. Each day, the diet was thoroughly mixed prior to measuring the temperature and pH of the substrate (Thermo Scientific Orion star A 32 portables pH meter, Singapore). Bins were incubated in the dark at constant temperature (27 °C) and humidity (65% RH). Larvae and frass of two replicate bins of the STD were collected at appearance of the first prepupa (day 10). Since prepupal stage was not reached for D, DIWE and DWAE, harvest time was extended until no signs of growth were observed for two consecutive days (i.e., day 13) (Bosch *et al.*, 2020). Therefore, for the three other diets (D, DIWE, DWAE) and the two remaining bins of the STD, the feeding trial ended at day 13. No additional feed was given between day 10 and day 13.

At harvest, the larvae were separated from their substrate (frass) using hand tweezers. Total wet masses of the larvae and frass were weighted. The larvae and a subsample of frass (400 g) were frozen at -20°C before being freeze-dried for 5 days.

2.3 Growth performance and diet conversion efficiency

Growth performance and conversion efficiency were estimated for each diet on a dry matter basis. The total number of larvae per bin were counted and weighed. Larvae length was measured using a caliper on a subsample of 20 individuals. Dried frass was also weighed.

The larvae mass gain was determined using the final total larvae mass (m), the initial total larvae mass (m_0) as well as the number of larvae before (n_0) and after feeding trials (n) where:

$$\text{Larval mass gain (\%)} = \frac{\frac{m}{n} - \frac{m_0}{n_0}}{\frac{m_0}{n_0}} \times 100 \quad \text{Equation 2-1}$$

The larval length growth was determined using the following formula where l_0 is the larvae length at the start of the treatment and l_{ave} is the average larvae length at the end of the treatment:

$$\text{Larval length gain (\%)} = \frac{l_{ave} - l_0}{l_0} \times 100 \quad \text{Equation 2-2}$$

The mortality (%) was determined as follows:

$$\text{Mortality (\%)} = 100 - \left(\frac{n}{n_0} \times 100 \right) \quad \text{Equation 2-3}$$

The efficiency of conversion of digestion (ECD, %) was calculated using the formula proposed by Gold et al. (2020), where:

$$\text{ECD (\%)} = \frac{\text{Larval gain mass (g)}}{\text{mass of the diet added (g)} - \text{mass of residual frass (g)}} \times 100 \quad \text{Equation 2-4}$$

2.4 Chemical composition of the diets and frass

Contents of dry matter (DM) were evaluated on 2 g samples and after drying them in a vacuum oven at 98°C (Vacuum Oven LabLine, model 6273, Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, USA; AOAC, 2016). The carbon and nitrogen content were determined using an organic elemental analyzer (Vario Max CN, elemental). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) was determined using the ANKOM technology method filter bag technique (for A200 and A200I). Reducing sugar content was determined using the Rebelein method (Zoecklein et al., 2012). The content in phosphorus, potassium, sodium, magnesium and calcium were measured using an ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer) after samples were incinerated at 500 °C for 4 h and dissolved in 0.4% HCl (AOAC Official Method 2011.14). To evaluate total lipids, an ether extraction was performed according to method

AOCS AM5-04 from the American Oil Chemists' Society (1998) with ethyl ether (120 min at 90°C) using TX4 filters (XT15 Extractor, ANKOM Technology, New York, NY, USA). All nutrient contents were expressed as a percentage (%) of the dry matter and analyses were performed in duplicate.

2.5 Statistical analysis

Each parameter of growth performance and/or chemical analyses on diets and frass were analyzed by one-way ANOVAs followed by Tukey comparison tests. The assumption of normality and homogeneity of the variance were verified using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. If not met, a one-way Welch test was performed. All statistical analyses were performed using the R computing environment (R 3.5.2).

3 Results

3.1 Visual observations

Visual observations showed that the DIWE diet was very sticky which made it difficult for larvae to penetrate the medium. Where normally the larvae crawl and eat in the lower layers of their substrate, they now crawled on top of the incubated digestate and sometimes even stuck to the substance. This was due to the enzymes complex used that liquefies the substrate (Genencor, 2011). The different viscosity of the DIWE compared to the other substrates must be taken into account when further conclusions are drawn.

According to Figure 2-1a, the positive control with the STD, reached a significantly higher temperature than the other samples, indicating increased larvae activity. At day 10, a drop in temperature is seen as larvae reach the end of their larvae stage. The digestate and the DWAE have similar temperature profiles. Both treatments remain very close to the environmental temperature. The DIWE shows a higher rise in temperature after the feeding stage (day 10).

The pH of the digestates evolved in very different ways compared to the standard (STD; Figure 2-1b). The pH of the Gainesville mixture before treatment was around 6 and varies during the feeding stage between 4.5 and 7. When no additional diet was added, the pH rose above 8. In the STD, by the 13th day almost every digestible fraction of the substrate was consumed and re-excreted. This was also visible as the color of the Gainesville turned from a yellow shade to a darker brown. For the D and DWAE diets, the initial pH of ~8 has declined steadily during the feeding trial, reaching ~ 6.8 at day 13. Not much was observed in pH during the feeding stage as the larvae were barely growing and daily addition of the diet renders any pH change by the larvae negligible. In the DIWE diet (initial pH of 5) an increase of pH was only observed from day 10 onwards, once no more diet was being added.

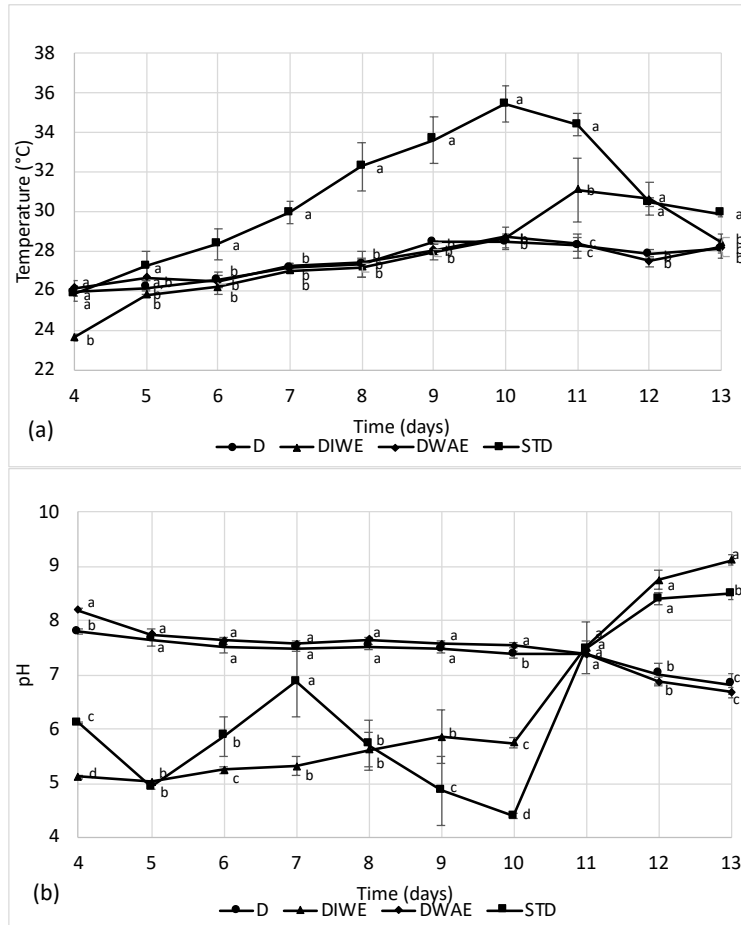


Figure 2-1. Changes in (a) temperature and (b) pH of the diets during BSF larval feeding trials. STD = standard diet; D = non-processed digestate; DIWE = digestate incubated with enzymes and DWAE = digestate with added enzymes. abc Values within days with same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

3.2 Chemical composition of diets and frass

The chemical composition of the diet and the frass are presented in Table 2-1 and Table 2-2, respectively.

The amount of dry matter was higher in the STD compared to the digestate based diets.

Table 2-1 shows that nitrogen concentration is higher in the digestate ($3.8 \% \pm 0.1$) than in the STD ($2.4 \% \pm 0.1$). A significant difference between the digestate and the DIWE ($3.4 \% \pm 0.1$) was found ($p = 0.0013$), but not with DWAE ($3.9 \% \pm 0.1$). A significant difference between the diet and the frass was found only for the STD and the DIWE for nitrogen concentration.

For the mineral content, certain data concerning phosphorus, calcium, magnesium and potassium content must be considered with caution, as a higher value is detected in the frass. This could be due to the presence

of exuviae in the frass, however, in the future, multiple samples must be analyzed and sufficient mixing should be performed to avoid possible sampling errors and ensure the accuracy of the ICP analysis.

From Table 2-1, the digestate diets have a higher mineral content than the STD. The amount of phosphorus, calcium and sodium in the digestate-based diets is higher than in the STD. The high calcium concentration in the digestate is probably due to the fact that the anaerobic digestion plant from which the digestate samples were taken incorporates wastewater from dairy industries into their process. An elevated level of sodium is found for the DIWE, due to the addition of NaOH for pH adjustment during pre-processing. A high concentration of sodium or calcium in the diet might have affected larvae growth but, so far, there is no literature describing growth inhibition related to high sodium or calcium concentrations. Final conclusions related to the DIWE must be evaluated with caution, as the high levels of sodium and calcium are an extra factor to consider. There was only a significant difference in sodium content between the diet and frass of BSF larvae reared on the DWAE ($p = 0.0054$). Furthermore, there was a higher potassium level in the STD than in the digestate based diets ($1.53 \% \pm 0.01$). A small statistically relevant difference between the concentration of potassium in the diet and frass ($p < 0.0300$) was found for the unprocessed digestate and the DWAE. The STD and the digestate-based diets had similar concentrations of magnesium.

The lignocellulose concentration of the non-processed digestate ($60.19 \% \pm 1.77$) is significantly higher than the STD ($34.20 \% \pm 0.40$). ADF analysis specifies that almost half ($48.42 \pm 0.41 \%$) of lignocellulose concentration for non-processed digestate consists of only cellulose and lignin. Similar to NDF concentration, ADF concentration of the non-processed digestate is significantly higher than the STD ($15.25 \% \pm 0.43$).

The concentrations of reducing sugars in the STD is significantly higher than in the digestate-based diets. Almost no glucose was detected after 10 days of the experiment. The concentrations of reducing sugars (expressed on dry matter basis) prior to the treatment of the digestate-based diets were significantly different ($p = 0.0426$) between the non-processed digestate (0.68%) and the DIWE (1.37%), but not the DWAE diet (0.81%) ($p = 0.5862$).

The lipid content of all the experimental diets was similar. A significant difference in the lipid content between the diet and frass was found for the unprocessed digestate ($p=0.0035$) and the DWAE ($p=0.0108$).

Table 2-1. Proximate composition (% , dry basis) of the experimental diets

% , dry basis	Diets ¹			
	STD	D	DIWE	DWAE
Organic matter	94	67	69	67
NDF ²	34.2	60.2	-	-
ADF ³	15.3	48.4	-	-
Carbon	45	37	37	37
Nitrogen	2.4	3.8	3.4	3.9
Lipids	3.4	3.4	4.2	3.0
Sugars	4.8	0.68	1.4	0.81
P	0.82	1.8	1.4	1.7
Ca	0.53	3.3	2.2	3.0
Mg	0.36	0.40	0.31	0.37
Na	0.04	0.19	3.11	0.17
K	1.5	0.48	0.56	0.50

¹STD = standard diet; D = non-processed digestate; DIWE = digestate incubated with enzymes and DWAE = digestate with added enzymes.

²NDF = Neutral detergent fiber

³ADF = Acid detergent fiber

Table 2-2. Proximate composition (% , dry basis) of the frass.

% , dry basis	Frass ¹				
	Day 10	Day 13			
		STD	D	DIWE	DWAE
Dry matter	49 ± 0.1	36 ± 0.3	64 ± 1.2 ^a	63 ± 1.1 ^a	62 ± 0.86 ^a
Carbon	24 ± 1.6	16 ± 0.1	34 ± 0.3 ^a	33 ± 0.3 ^a	34 ± 0.32 ^a
Nitrogen	1.5 ± 0.1	0.8 ± 0.0	3.7 ± 0.0 ^a	3.2 ± 0.0 ^b	3.9 ± 0.0 ^a
Lipids	2.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2 ^a	2.9 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a
Sugars	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
P	1.2 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.8 ± 0.0 ^a	1.6 ± 0.0 ^b	1.8 ± 0.0 ^c
Ca	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	3.1 ± 0.0 ^a	2.6 ± 0.0 ^b	3.2 ± 0.0 ^c
Mg	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^c
Na	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.1 ^b	0.2 ± 0.0 ^c
K	2.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.5 ± 0.0 ^a

¹STD = standard diet; D = non-processed digestate; DIWE = digestate incubated with enzymes and DWAE = digestate with added enzymes. ^{abc} Values within rows with same letter are not significantly different ($p > 0.05$). Values presented are mean ± standard deviation (n=4)

3.3 Larval growth performance

A lower increase in larval length was observed in larvae fed unprocessed digestate (D; Table 2-3) The DIWE and the DWAE have a significant higher length gain than D. All 3 digestate-based diets had a low growth after 13 days compared to the STD (Figure 2-2). No significant difference was observed between DWAE and the DIWE ($p = 0.2015$). No further growth in length was observed between STD larvae at day 10 and day 13 ($p = 0.1293$).

However, larval weight continued to increase in STD between 10 and 13 days. Larvae mass gain reached 302 ± 73 %, 471 ± 93 % and 577 ± 208 % for the digestate, DWAE and DIWE, respectively. A significant difference was observed between DWAE and DIWE at day 13. The mortality rate for the STD was low (3-4%) compared to digestate diets (~17%). Due to the sticky nature of the diet, the mortality and the ECD could not be determined in DIWE because all larvae could not be removed from the substrate.

Finally, the ECD of the DWAE diet was not found to be different as compared to the crude digestate diet and both were found to have a lower ECD than the standard diet at day 10 and day 13 (Table 2-3).

Table 2-3. Growth performance (mean \pm s.d., dry basis) and efficiency of conversion (ECD) of the larvae fed on the experimental diets after 10 and 13 days.

% , dry basis	Diet ¹				
	10 days	13 days			
		STD	D	DIWE ²	DWAE
<i>Mortality</i>	3.4 ± 4.8	4.3 ± 1.4	17.8 ± 2.8^a	n.a.	16.5 ± 8.0^b
<i>Length gain</i>	453 ± 48^a	490 ± 36^a	64 ± 68^b	156 ± 99^c	132 ± 62^c
<i>Mass gain</i>	8122 ± 323^a	8429 ± 1733^b	302 ± 73^c	577 ± 208^d	471 ± 93^c
<i>ECD</i>	74.9 ± 0.5	66.0 ± 2.4	35.0 ± 6.9	n.a.	37.9 ± 5.5

¹STD = standard diet; D = non-processed digestate; DIWE = digestate incubated with enzymes and DWAE = digestate with added enzymes.

² For DIWE, mortality and ECD were not evaluate because all larvae could not be removed from the substrate

^{abc} Values within rows with same letter are not significantly different ($p>0.05$). Values presented are mean \pm standard deviation (n=4)



Figure 2-2. Mean length of the BSF larvae after 13 days when fed on a) raw digestate, b) digestate incubated with enzymes (DIWE) or with added enzymes (DWAE) and, c) standard diet (STD).

4 Discussion

4.1 Digestate as a food source for BSF larvae

According to the results of this study, larvae growth on non-processed digestate is insufficient, as there was no sign of growth after several weeks. From the temperature and pH results, the non-processed digestate as well as the DWAE diets do not indicate any larvae growth. However, the measurements on the DIWE diet do show promising activity compared to the other digestate treatments. Since the DWAE follows the same trend as the non-processed digestate, this enzyme complex is not adequate to convert the fiber fraction to digestible sugars to increase the availability of nutrients of the digestate for the larvae. Enzymatic hydrolysis was therefore more efficient under the appropriate conditions of enzyme application (DIWE). Nevertheless, the glucose concentration after pretreatment remains low and the enzymatic hydrolysis needs to be further optimized. The high concentrations of sodium and calcium in the digestate-based diets could also have an impact on larval growth. Wide range of sodium and calcium contents in organic-side streams were also reported by Broeckx et al. (2021) but to our knowledge, the effect of high sodium or calcium contents on larval growth and survival is still unknown. Experiments with a standard diet and different concentrations of sodium or calcium could be carried out to assess the effect of these compounds on the growth of BSF larvae. Results from the growth performance (Table 2-3) show that enzymatic hydrolysis improved the growth of the larvae. However, when growth on pre-processed digestate is compared to the growth on the control diet, the pre-processed digestate diets are not an adequate food source for the rearing of BSF larvae. The optimization of the operating conditions and the hydrolysis process of the digestate is required to allow efficient growth as discussed below.

The experimental conditions used in this study must be adjusted and well controlled for all the samples to enhance the assimilation of digestate by larvae. An important parameter is the viscosity of the diet. Indeed, as mentioned in section 3.1, the DIWE diet had a higher viscosity than the other diets. This factor can affect the growth of the larvae, as Cammack & Tomberlin (2017) reported that a substrate moisture between 70 and 80% is ideal for the development of BSF larvae. The adjustment of the viscosity could be accomplished by lowering the humidity of the substrate or by adding a bulking agent, such as agar, to regulate the water content and increase porosity (Yang et al., 2013). Subsequently, particle size is another factor that has not been taken into account. There are several reports regarding the mouthparts of the BSF, but little information on the maximum particle size for growing larvae (Bruno et al., 2020; Gold et al., 2018; Oliveira et al., 2015). For this study, the STD was prepared using 2 mm sieves. However, for the digestate-based diets the particle size was not determined. The particles in the digestate were coarser and more difficult for the larvae to reach. Grinding and sieving the biomass before the experiment may have eliminated this issue and improved digestibility. According to Bosch et al. (2020), grinding is generally performed with a 1 mm

sieve. Substrate pH is also a parameter to consider. In this study, the pH of the digestate-based diets differed significantly from the STD, which may suggest that this was detrimental to larval growth. Indeed, the DIWE had a low initial pH of 5.13 ± 0.04 and, according to Meneguz et al. (2018), a pH outside the range of 6-12 results in lower larvae growth. This study states that the pH could influence the availability of the nutrients by affecting the activity of enzymes present in the gut of the larvae (Meneguz et al., 2018). Nevertheless, BSF larvae appear to tolerate a wide pH range. Indeed, Ma et al. (2018) reported that the greatest gain in larval mass was observed for pH between 6 and 10 when using a mixture of bran and corn flour as a substrate. By mixing the digestate with higher pH substrates, the pH level could be adjusted to a range more suitable for the growth of BSF larvae while providing additional nutrients.

Three aspects outlined by Leu & Zhu (2013) in their review regarding factors affecting enzymatic hydrolysis should be addressed. These consist of (1) the intimate contact of the reactants, (2) the reactivity of the reactants, and (3) the reaction conditions (temperature, pH, etc.). These three processes are important to consider in order to maximize the saccharification of lignocellulose (Leu & Zhu, 2013). For example, substrate size reduction would increase the surface area of the biomass cellulose accessible to enzymes, and therefore improve the hydrolysis (Zhu, 2011). Regarding the reaction conditions, enzymatic hydrolysis tests with different enzyme concentrations should be carried out to determine the optimal dosage, as in this study, only the recommendation of the supplier for these parameters was considered. Furthermore, coupling enzymatic hydrolysis with other methods of degradation of lignocellulosic materials would be beneficial since the complex structure of lignocellulose limits the accessibility of hydrolytic enzymes to carbohydrates. A treatment prior to enzymatic hydrolysis could thus alter the structure of the lignocellulosic biomass and make it more efficient at releasing monomeric sugars (Alvira et al., 2010; Martín Pérez et al., 2017). Hydrothermal treatments, for example, are effective and eco-friendly techniques that remove hemicellulose and lignin, exposing the cellulose fibrils to enzymes for carbohydrate depolymerization (Sarker et al., 2021). Steam explosion and subcritical water hydrolysis are popular hydrothermal methods that have the advantage of not producing toxic compounds that could inhibit the growth of BSF larvae compared to chemical hydrolysis, such as the use of acid or alkali solvents (Bhutto et al., 2017; Sarker et al., 2021). In fact, alkaline pretreatments are proven to be very effective on biomass with high lignin content (H. Zhang et al., 2021). However, using high quantities of this chemical might inhibit larvae growth.

Another possibility is to inoculate the substrate with microorganisms that can perform pre-processing of the digestate. For instance, the addition of white rot (e.g., *Phanerochaete chrysosporium*, *Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor*), a fungi with high lignin reduction rate, could improve fiber degradation (Mäkelä et al., 2021; D. Wu et al., 2022). Indeed, this microorganism secretes ligninase that removes the physical barrier of lignin and enhances accessibility to enzymes (Rouches et al., 2016). Singh et al. (2021)

reported that a pretreatment of white rot fungi prior to vermicomposting of leaf litter biomass significantly reduced the lignocellulose content of the substrate and produced higher quality compost with increase in total N, P and Ca. In addition, microbial pretreatment would be beneficial, as not only would the larvae have more reducing sugars at their disposal, but the biomass of the microorganisms themselves could be digested as well. Another benefit of microbial treatment is that it can alter the feed characteristic, which could promote BSFL growth (Raksasat et al., 2020; Wong et al., 2020a; Wong et al., 2020c). Wong et al. (2020b) reported that BSFL growth was enhanced when 14-21 day fermentation with a powdered bacterial consortium was performed on coconut endosperm waste prior to larval feeding. This increase in growth was mainly due to the presence of acid-producing bacteria that released organic acids and other nutrients that improve the palatability of BSFL. Microbial treatment would also be more cost efficient as enzyme complexes are expensive and need to be purchased on a regular basis.

Finally, the ECD values give an indication on the digestibility of the substrates. In fact, the ECD values of the larvae reared on the STD were very high. This means that the Gainesville diet used in this study was highly digestible compared to the digestate-based diets. When comparing ECD results with the study of Manurung et al. (2016) on bioconversion of rice straw by BSF larvae, it can be notice that the ECD values obtained for the digestate and the DWAE are considerable. Indeed, for Manurung et al. (2016), ECD values between 9.92% and 10.85% were obtained for different feeding rates compared to 35% and 37.9% obtained for the digestate and DWAE, respectively. Similarly, Veldkamp et al. (2021) obtained a conversion efficiency of 20% for BSF larvae reared on digestate. The low performance of digestate is mainly caused by the poor nutrient content and quality of the digestate-based diets, which hinders the further growth of the larvae (Barragan-Fonseca et al., 2018). Consequently, appropriate treatments or formulations should be developed to allow larvae to grow on this substrate.

4.2 BSF treatment as a solution for digestate processing

In this study, the larvae were unable to bioconvert a large percentage of the digestate. The BSF treatment was therefore not a viable solution for digestate processing. In order to allow the efficient recovery of this residue, the reduction rate must be improved. To do so, larvae could be added at an older age to start at a higher feeding rate. In fact, when recommending experimental standardization approaches for BSF feeding studies, Bosch et al. (2020) suggested that 5 day old larvae should be used with experimental diets. Older larvae have an enhanced ability to consume more difficult to assimilate feedstocks and would therefore consume more food than younger larvae (Nyakeri et al., 2019). Mixing digestate with other organic residues (e.g., food waste or agricultural residues) to improve the nutrient content of the substrate could also increase the treatment performance (Raksasat et al., 2020). Finally, the composition of the digestate is highly

dependent on the inputs of the anaerobic digester. The presence of inhibitors in digester inputs, such as coagulants/flocculants, can negatively affect treatment performance. In this study, the digestate was not analyzed for the presence of these compounds, and it is therefore possible that they may have reduced larval growth. Although the results of this study do not favour the use of BSFL treatment, (Elsayed et al., 2020) has shown promising results with the bioconversion of digestate from anaerobic digestion of agricultural residues. Similarly, Wee & Su (2019) demonstrated potential for the application of a two-step process of anaerobic digestion of dairy manure followed by BSFL treatment. The complementation of biogas digestate with other organic-sides streams to increase the nutrient content of the substrate and improve BSFL growth should also be explored. There is still work to be done regarding the technical aspects of the edible insects grown on AD residues to ensure adequate growth. If a more efficient method of pre-processing digestate is developed permitting adequate yields of larval biomass, BSF larvae could potentially become an alternative eco-friendly solution for digestate processing.

5 Conclusion

The growth of BSF larvae reared on solid digestate and pre-processed digestate at different conditions was studied. Results show that larval growth was not observed when fed non-processed digestate, but the implementation of an enzyme-based preprocessing method improved the development of BSF larvae. Based on the growth and chemical content, the digestate incubated at optimal enzyme conditions (48h incubation at 52.0 ± 3.9 °C and a pH of 4.6 ± 0.5) and performed the best in this study. Further research is required on determining limiting factors that influence hydrolysis should be performed. Based on this research, a balance between enzyme performance and costs must be established. Furthermore, the results of this paper should not be generalized for all digestate residues, since the composition of the digestate varies along with the feedstock of the anaerobic digester. The development of an effective method of digestate preprocessing to achieve high larvae biomass yields is necessary for BSF larvae to potentially become an eco-friendly solution for digestate processing.

Acknowledgements

This research was funded by Ghent University. Céline Vaneeckhaute holds the Canada Research Chair in Resource Recovery and Bioproducts Engineering.

3 INTEGRATION OF PRETREATED CROP RESIDUES TO IMPROVE THE VALORIZATION OF BIOGAS DIGESTATE BY THE BLACK SOLDIER FLY (*HERMETIA ILLUCENS*, L; DIPTERA: STRATIOMYIDAE) LARVAE

Intégration de résidus agricoles prétraités pour améliorer la valorisation du digestat de biométhanisation par les larves de mouche soldat noire (*Hermetia illucens*, L; Diptera: Stratiomyidae)

D. Brodeur¹, M.-H. Deschamps², G. Vandenberg², S. Barnabé³, M.-A. Déry³, C. Vaneekhaute⁴, K. Adjalle^{1*}

¹Institut national de la recherche scientifique, 490 rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

²Département des sciences animales, Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, Canada, G1V 0A6

³Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada

⁴BioEngine, Université Laval, 1065 avenue de la Médecine, Québec, Canada, G1V 0A6 *corresponding author: kokou.adjalle@inrs.ca

En cours de soumission au journal : Waste and Biomass Valorization

Contribution des auteurs

Daphné Brodeur: conception, méthodologie, analyse formelle, interprétation, rédaction - copie originale.

Marie-Hélène Deschamps: conception, validation, rédaction - révision et édition. **Grant Vandenberg** : rédaction - révision et édition. **Simon Barnabé**: supervision, administration du projet. **Marc-André Déry** : ressource, rédaction - révision et édition. **Céline Vaneekhaute** : ressource. **Kokou Adjalle**: supervision, rédaction - révision et édition.

Lien entre l'article précédent :

Selon l'article précédent, l'application du prétraitement sur le digestat de biométhanisation a permis d'améliorer la croissance des larves de MSN. Cependant, le rendement de bioconversion reste faible et il est nécessaire d'apporter des modifications au procédé afin de le rendre efficace. La teneur en nutriments et la texture du digestat semble restreindre la croissance des larves. Cet article adresse ces problématiques en testant le mélange de digestat avec d'autres résidus organiques, soit des résidus agricoles. L'intégration de ces résidus permettrait d'améliorer les rendements et la performance des larves élevées sur du digestat.

Highlights

- Chemical analysis of two biogas digestates shows difference in fiber content
- Enzymatic hydrolysis of agricultural crops improves larvae growth
- Mixing agricultural residues with digestate decreases larvae growth
- Some digestate are better suited to black soldier fly growth than others

Abstract

The growing interest in anaerobic digestion has led to an increase in the production of digestate that must be valorized. This work evaluates the possibility of using the black soldier fly larvae (BSFL) to valorize biogas digestate, maize residue and alfalfa. The solid fraction of two digestates originating from distinct biogas plants was used. Different diets were developed using digestate, maize residue and alfalfa. In addition, thermal hydrolysis as well as enzymatic hydrolysis were performed on the agricultural crops to break down fibers into reducing sugars. Chemical analysis of the substrates and a performance analysis were conducted. Application of the pretreatment on the agricultural crops improved larval growth. Although larvae reached higher mass gain on the pretreated maize residue and alfalfa than on the non-pretreated crops, once these agricultural crops were mixed with digestate, performance decreased. Indeed, larval growth on digestate-based diets was very poor compared to the standard diet. A significant difference was found between length gain of the two digestates, indicating that some digestate may be more suitable than others for BSFL cultivation. According to the results of this study, BSFL treatment of digestate was not efficient and further research is needed to make digestate processing by BSFL effective.

Keywords: Agricultural residue, anaerobic digestion, black soldier fly, digestate, enzymatic hydrolysis, thermal hydrolysis, valorization

1 Introduction

Concerns about climate changes are increasing around the world, raising the need for efficient waste management methods (Rehman et al., 2023; Surendra et al., 2016). Anaerobic digestion, a natural process of degradation of organic matter, is a well-established technology that has been widely used as a treatment method for organic waste and sewage sludge (Liew et al., 2022). This sustainable organic waste management method is of particular interest since it allows the dual valorization of organic residues through the production of biogas, a renewable energy source, and digestate, an organic residue with interesting agronomic properties (Torrìsi et al., 2021). Controlled biogas production by anaerobic digestion has great benefit as it reduces greenhouse gas emissions and eliminates problematic waste (Gaj & Cichuta, 2022). The main agronomic characteristic of digestate is its content of macronutrients, such as nitrogen, phosphorus and potassium, which are found in mineral form and easily available to plants (Dahlin et al., 2017). In general, digestate is separated into liquid and solid fractions as it leaves the digester. The liquid fraction, rich in nutrients and soluble minerals, has a higher recovery potential than the solid fraction, rich in recalcitrant organic matter (Vaneckhaute et al., 2017). For example, liquid digestate can be used as a concentrated fertilizer for hydroponic farming or to produce algal biomass (Leong & Chang, 2022; Södergren et al., 2022). Numerous physical, biological or chemical treatment methods are used to valorize the liquid digestate and extract products of interest (Akhiar et al., 2020; Bach et al., 2022; Sfetsas et al., 2022). Concerning the solid fraction of digestate, it is often used directly as soil amendment or compost (Gurmesssa et al., 2021; Tambone et al., 2015). Indeed, many studies show the potential of the solid fraction as a soil amendment due to its high macronutrient and organic matter content (Samoraj et al., 2022). However, there are still several issues associated with the direct application of digestate, such as variability in the fertilizing properties, environmental legislation, transport and storage cost, etc. (Nkoa, 2014; Sfetsas et al., 2022; Vaneckhaute et al., 2017). Although digestate has significant agronomic benefits as an organic fertilizer, the inevitable growth of the biogas industry leads to the production of large quantities of digestate, making it essential to consider different application alternatives for this product (Gaj & Cichuta, 2022).

The interest of using black soldier fly larvae (BSFL) to upcycle various organic matters into high quality feed (protein and lipid) and soil amendment (frass) has increased exponentially in recent years (Lim et al., 2022; Van Huis, 2022; Yang-Jie et al., 2023). More and more studies tend to show that frass, the residue remaining after BSFL treatment, has enhanced properties and functionalities when compared to other organic fertilizing materials (Song et al., 2021; Tan et al., 2021). For example, Menino et al. (2021) studied the effect of BSF frass as an organic fertilizer on ryegrass. Their study found significant soil productivity and increased level of organic matter, P, N and K when frass was applied. Thus, if BSFL were able to

effectively valorize digestates, they could bioconvert a low value substrate (digestate) into a high value substrate (frass).

Composed mainly of lignocellulosic materials and organic nitrogen, solid digestates were already studied for the rearing of BSFL (Pas et al., 2022; Spranghers et al., 2017; Veldkamp et al., 2021). As demonstrated by Pas et al. (2022), although BSFL were able to grow on digestate, their total biomass is often lower than larvae reared on other substrates. One reason for this lower yield is the lack of carbohydrates in the solid digestate. Indeed, biogas digestate is generally rich in lignocellulosic matter that is difficult to consume by the larvae, which reduces their development (Manurung et al., 2016; Pas et al., 2022; Spranghers et al., 2017). Nevertheless, depending on the feedstock used during anaerobic digestion, larval growth can be superior (Elsayed et al., 2020). This is the case of Fu et al. (2022) who obtained more encouraging results. In this study, the final weight of larvae reared on digestate was higher than those reared on food residues. In addition, in order to improve the performance of larvae reared on digestate, various physical and chemical treatments were proposed to remove lignin and break down cellulose into digestible sugars, but with limited results (Liu et al., 2021; Pas et al., 2022; Rahmani et al., 2023).

Mixing digestate with different substrates, such as agricultural residues, could increase nutrient content and enhance bioconversion and growth performance of BSFL. Indeed, it has been shown that BSFL can digest waste, but when combined with another type of residue with higher nutritional value, survival rate, development time, larval weight, bioconversion, food conversion ratio and waste reduction are significantly improved (Rehman et al., 2023). Maize and alfalfa are two crops heavily produced in Quebec, Canada (Statistics Canada, 2022). Maize production generates large quantities of residues (mainly stover and cobs) that need to be valorized (OFA, 2012). On the other hand, alfalfa is a sustainable crop available in large quantities that could improve the nutrient content if mixed with digestate. However, maize residue and alfalfa have high lignocellulosic content and need to be pretreated to release carbohydrates (Bakala et al., 2023). The aim of this work was therefore to investigate whether mixing digestate with hydrolyzed (enzymatic and/or thermal) crop residues (maize and alfalfa) could increase BSFL bioconversion yield.

2 Material and methods

2.1 Feeding substrates

2.1.1 The Gainesville diet

The Gainesville diet (50 % wheat bran, 30 % alfalfa meal and 20 % yellow corn flour; Hogsette, 1992) was used as a standard diet (STD). All dry ingredients were mixed in a single batch (20 kg) and stored at 4 °C. The STD was returned to ambient temperature and humidified to 70% relative humidity (RH) prior to feeding the larvae for all experiments.

2.1.2 Solid fraction of biogas digestates

The solid fraction of digestates originating from two different anaerobic digestion plants in Quebec (Canada) were used. The first solid digestate D1 was collected from a plant processing garden waste, dairy whey permeate, animal manure and biological sludge (*Société d'économie mixte d'énergie renouvelable de la région de Rivière-du-Loup, SÉMER, Québec, Canada*), while the second (D2) was collected from a plant processing food and green waste from residential sources and septic sludge (*Société d'économie mixte de l'est de la Couronne Sud, SEMECS, Québec, Canada*). Approximately 20 kg of the solid fraction of both digestates were harvested randomly and transferred to the *Institut National de la Recherche Scientifique* (INRS; Quebec, Canada) prior to being stored at 4°C for 48h. Digestates were dried in an oven at 50°C for 4 days, grounded to 1 mm using a hammer mill (Thomas Model 4 Wiley Mill, New Jersey, USA) (Bosch et al., 2020), and stored at 4°C until experiments.

2.1.3 Agricultural crop diets

Maize residue (Maize_R; *Zea mays*) (leaves, stover and cobs) and alfalfa (Alf; *Medicago sativa*) originating from Agrosphère Inc. (Quebec, Canada) and Virentia Inc. (Québec, Canada) respectively, were used. The maize residues were obtained dry and were grounded to 1 mm (Cutting mill Pulverisette 15, Fritsch, Germany) before being stored at 4°C. Fresh alfalfa was dried for 48h at room temperature before being grounded to 1 mm (Cutting mill Pulverisette 15, Fritsch, Germany) and stored at 4°C.

2.1.4 Pretreated crop residue diets

Two different pretreatments, (1) an enzymatic hydrolysis and (2) a thermal hydrolysis followed by an enzymatic hydrolysis, were applied to the maize residue and alfalfa.

Enzymatic hydrolysis

The enzyme cocktail Accellerase® DUET of Dupont Industrial Bioscience was used to degrade lignocellulosic matter into simple sugars of maize residue and alfalfa. The enzymatic hydrolysis was performed in batches of 250 g of biomass by following the manufactures recommendations (45-60°C, pH 4.0-5.5, 0.25 mL enzyme/g biomass; Genencor, 2011). A citric buffer solution (10% w/v) was used in order to keep pH around 4.8. Enzymatic hydrolysis was performed during 48h (Pas et al., 2022) at 55°C and agitation of 180 rpm in an incubation shaker (Multitron Standard, Infors HT). Samples were taken before and after hydrolysis for both hydrolyzed maize residue diet (Maize_{R,EH}) and hydrolyzed alfalfa diet (Alf_{EH}). After enzymatic hydrolysis, RH content of both diets was adjusted to approximately 70% by adding dry maize residue or dry alfalfa (approximately 100 g) to obtain similar texture and viscosity of the STD. The diets were then stored at -20°C.

Thermal hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis

Thermal hydrolysis was performed on maize residue and alfalfa in batches of 250 g in an autoclave at 100 °C for 15 min (Tuttnaeuer 3870 ELVC) with NaOH (1 % w/v; 1 g NaOH in 0.1 L distilled water). Maize residue and alfalfa were fully submerged in the NaOH solution to solubilize the lignin present in the biomass (Sharma et al., 2019). Temperature of 100°C is chosen in order to preserve some nutrients sensitive to high heat. After thermal hydrolysis, both substrates were filtered and washed with distilled water. The heat pretreated maize residue and alfalfa were then dried in an oven at 50 °C for 48 h before being enzymatically hydrolyzed using the same method as described above. The RH of thermally and enzymatically treated maize residue and alfalfa (Maize_{R,TH+EH} and Alf_{TH+EH}) was adjusted to approximately 70% by adding dry maize residue or dry alfalfa (approximately 100 g), respectively. Diets were then stored at -20 °C.

2.1.5 Diet formulations

Six different mixed diets were formulated and tested (see Table 3-1). The first formulation (F1) was a mixture of 50% D1 and 50% Maize_{R,EH}, the 2nd formulation (F2) is a mixture of 50% D1 and 50% Alf_{EH}, the 3rd formulation (F3) is a mixture of 50% D2 and 50% Maize_{R,EH}, the 4th formulation (F4) is a mixture of 50% D2 and 50% Alf_{EH}, the 5th formulation (F5) is a mixture of 50% D1, 25% Maize_{R,EH} and 25% Alf_{EH} and the 6th formulation (F6) is a mixture of 50% D2, 25% Maize_{R,EH} and 25% Alf_{EH}. All mixtures were done in dry basis and the RH content was adjusted at 70 % by adding distilled water. Once the formulations were prepared, they were stored at -20°C.

2.2 Feeding trials

One day prior to the experiment, the diets were brought at room temperature. All diets RH were adjusted to 70 % except for the digestate diets (D1 and D2) that were adjusted to 50 % to obtain similar texture and viscosity as the STD. Three rearing trials were performed (same conditions and same STD for each experiment, see Table 3-3. Experiment 1 aimed to test raw substrates (STD, D1, D2, Maize_R and Alf) while pre-treated residues (STD, Maize_{R,EH}, Alf_{EH}, Maize_{R,TH+EH} and Alf_{TH+EH}) and mixed diets (F1 to F6) were tested during experiment 2 and 3, respectively.

The rearing of BSFL was conducted at the *Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques* (LARSA) of Université Laval (Quebec, Canada). Hatching of the neonates took place in an incubator (Growth cabinet, MLR-350, Sanyo, Osaka, Japan) at constant photoperiod (12L:12D), temperature (30°C) and relative humidity (80%). Eggs were suspended 24h (day 0) above 200 g of feed (Gainesville diet, 70% RH) that contained a fungicide (0.15% Methyl 4-hydroxybenzoate; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada; Bruno et al., 2020) to control mold development.

At day 5, neonates (larval length = 5.3 ± 0.2 mm) were sieved from feeding substrate and 200 larvae were counted manually and weighed (density of 1.6 larvae/cm²; Parra Paz et al., 2015) prior to be distributed in bioconversion bins (n=3/diet) (2.4 L plastic buckets – 5’’X 6’’) covered with gaze (Agryl P-12, Agryl, Courbevoix, France). 108 g of experimental diets (dry basis, DM)/bins were added (200 mg/larvae/day, for 9 days; Nyakeri et al., 2019). Bins were incubated in the dark at constant temperature (30 °C) and humidity (70% RH).

2.3 Sampling

Each day, the diet was thoroughly mixed and temperature and pH of the substrate were measured (Thermo Scientific Orion star A 32 portables pH meter, Singapore). Moreover, 10 individuals were randomly sampled, weighted (mg) and pictured to measure larval length using *ImageJ* (version 1.53) software.

Larvae and frass were collected at appearance of the first prepupae (day 10 for STD). Since prepupal stage was not reach for every experimental diets, harvest time was extended until no signs of growth were observed for two consecutive days (Bosch et al., 2020). Therefore, for experimental diets that did not reach the prepupal stage, the feeding trial ended at day 12 or 13.

At harvest, larvae were separated from the substrate (frass) and counted using hand tweezers. Total wet biomasses of larvae and frass were weighted. The larvae and a subsample of frass were frozen at -20°C. Dried larvae and frass were also weighed after a drying of 100°C overnight.

2.4 Chemical composition of the diets

DM contents were evaluated on 2 g samples and after drying them in a vacuum oven (Vacuum Oven LabLine, model 6273, Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, USA; AOAC, 2016) at 105°C overnight. The carbon, nitrogen, hydrogen and sulfur (CHNS) content were determined using an organic elemental analyzer (Vario Max CN, Elementar). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were determined using the ANKOM technology method filter bag technique (for A200 and A200I) (ANKOM²⁰⁰ fiber analyzer, New York, United States). Acid detergent lignin (ADL) was determined according to ANKOM technology method using sulfuric acid (72 % by weight). Sugar content was determined using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (model TSQ Quantum, Thermo Fisher Scientific). Metal content was measured using an ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer) (Agilent 5110) after samples were incinerated at 500°C for 4 h and dissolved in HNO₃/H₂O₂. All nutrient contents were expressed in percentages (%) and on a dry basis. Analyses were performed in duplicate.

2.5 Growth performance and diet conversion efficiency

Growth performance and conversion efficiency were estimated for each diet on a dry matter basis.

The larvae mass gain was determined using the final total larvae mass (m), the initial total larvae mass (m_0) as well as the number of larvae before (n_0) and after feeding trials (n) where:

$$\text{Larval mass gain (\%)} = \frac{\frac{m}{n} - \frac{m_0}{n_0}}{\frac{m_0}{n_0}} \times 100 \quad \text{Equation 3-1}$$

The larval length growth was determined using the following formula where l_0 is the larvae length at the start of the treatment and l_{ave} is the average larvae length at the end of the treatment:

$$\text{Larval length gain (\%)} = \frac{l_{ave} - l_0}{l_0} \times 100 \quad \text{Equation 3-2}$$

The mortality (%) was determined as follows:

$$\text{Mortality (\%)} = 100 - \left(\frac{n}{n_0} \times 100 \right) \quad \text{Equation 3-3}$$

Where n is the final number of larvae and n_0 is the initial number of larvae.

The bioconversion rate (% , DM) was calculated using the formula proposed by Gold et al. (2020), where:

$$\text{Bioconversion (\%)} = \frac{\text{Larval gain mass (g)}}{\text{mass of the diet added (g)}} \times 100 \quad \text{Equation 3-4}$$

2.6 Statistical analysis

Each parameter of growth performance and diet conversion efficiency on the different diets were analyzed by a one-way ANOVA followed by a Tukey comparison test. The statistical analyses were carried out separately for each experiment. All statistical analyses were performed using the Rstudio computing environment (Rstudio 2022.02.3+492).

3 Results

3.1 Chemical composition of diets

Various chemical analyses were performed on the substrate used and results are shown in Table 3-1 and Table 3-2.

3.1.1 Ash, fiber, sugar, CHNS and metal content

Ash content is significantly higher in D1 and D2 compared to the STD, Maize_R and Alf. Maize_R has the highest fiber content with 74.58 ± 1.76 % NDF. Digestate D1 contains less fiber than D2 with 23.29 ± 0.47 % NDF for D1 and 43.65 ± 1.76 % NDF for D2. Fiber content of both digestates is mainly cellulose and lignin. Indeed, no hemicellulose was detected for D1 and D2. Hemicellulose would be totally consumed during anaerobic digestion. Maize_R has the lowest sugar content, only in the form of glucose, with 0.5 ± 1.06 %. The highest sugar content is found for Maize_{R,EH} with 10.26 ± 4.88 %. Both Maize_{R,TH+EH} and Alf_{TH+EH} have lower sugar content than Maize_{R,EH} and Alf_{EH}. CHNS analysis was performed on all diets. The carbon and hydrogen content are higher in STD. D1 has the highest nitrogen and sulfur contents, respectively 4.04 ± 0.16 % and 2.09 ± 0.46 %. Metal content analysis was performed on STD, D1 and D2 and is shown in Table 3-2. Overall, both digestates have higher metal content than the STD. The calcium content is particularly high for D1 (3.84 ± 0.15 %). In addition, aluminum, iron and sodium contents in D1 and D2 is very high compared to STD. Potassium and magnesium content are found to be higher in the STD than for both digestates.

Table 3-1. Proximate composition (% , dry basis) of the diets for each experiment

		Experiment 1				Experiment 2				Experiment 3					
	STD ¹	D1	D2	Maize _R	Alf	Maize _{R, EH}	Maize _{R, TH+EH}	Alf _{EH}	Alf _{TH+EH}	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Gainesville ¹	100														
D1		100								50	50			50	
D2			100									50	50		50
Maize _R				100											
Alf					100										
Maize _{R, EH}						100				50		50		25	25
Maize _{R, TH+RH}							100								
Alf _{EH}								100			50		50	25	25
Alf _{TH+EH}									100						
Proximate analyses (% , dry basis)															
Ash	5.90	32.63	37.95	5.88	10.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NDF ²	35.28	23.29	43.65	74.58	46.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADF ²	18.27	27.31	46.73	52.85	43.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADL ²	3.00	15.22	31.27	9.18	6.35										
Xylose	-	-	-	<0.20	<0.20	2.09	2.57	<0.20	<0.20	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	<0.20	3.05	<0.20	<0.20	4.51	<0.20	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	0.50	2.37	8.16	6.82	4.94	8.00	-	-	-	-	-	-
Total sugar	-	-	-	0.50	5.42	10.26	9.39	9.45	8.00	-	-	-	-	-	-
Carbon	45.90	38.49	34.13	42.10	39.82	42.90	41.95	41.17	39.29	38.47	40.14	36.24	36.85	38.50	36.88
Hydrogen	6.31	5.08	4.20	5.55	4.45	5.58	5.17	4.91	7.13	4.36	3.74	4.55	4.74	5.27	4.46
Nitrogen	2.44	4.04	2.85	0.71	3.84	0.76	0.54	3.10	2.31	2.82	3.36	2.08	2.99	3.07	2.30
Sulfur	0.26	2.09	0.70	0.00	0.09	0.00	0.00	0.14	0.07	1.62	1.72	0.31	0.28	1.54	0.29

¹STD = standard diet used in each experiment and composed of 50% wheat grain; 30% alfafa and 20% yellow corn (Hogsette, 1992); D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maize_R = maize residue; Alf = alfafa; Maize_{R, EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maize_{R, TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf_{EH} = Alfafa enzymatically pretreated; Alf_{TH+EH} = Alfafa thermally and enzymatically pretreated;

²NDF=Neutral detergent fiber, ADF=Acid detergent fiber, ADL=Acid detergent lignin

Table 3-2. Metal content of substrates (% , dry basis)

		Experiment 1				Experiment 2				Experiment 3					
	STD ¹	D1	D2	Maize _R	Alf	Maize _{R, EH}	Maize _{R, TH+EH}	Alf _{EH}	Alf _{TH+EH}	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Gainesville ¹	100														
D1		100								50	50			50	
D2			100									50	50		50
Maize _R				100											
Alf					100										
Maize _{R, EH}						100				50		50		25	25
Maize _{R, TH+RH}							100								
Alf _{EH}								100			50		50	25	25
Alf _{TH+EH}									100						
Proximate analyses (% , dry basis)															
Al	0.0022	0.1110	0.4581	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
As	-	0.0002	0.0002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	0.0008	0.0013	0.0019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ba	0.0011	0.0072	0.0055	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca	0.4795	3.8409	1.3510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd	-	0.0001	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co	-	0.0003	0.0003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr	-	0.0010	0.0020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	0.0010	0.0105	0.0045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe	0.0116	2.5020	1.1346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	1.3155	0.3122	0.5590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg	0.4016	0.3250	0.3044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mn	0.0066	0.0302	0.0192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mo	0.0001	0.0002	0.0002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na	0.0205	0.1580	0.2303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ni	-	-	0.0011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	0.7488	1.8287	0.3735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pb	-	0.0010	0.0013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sc	-	0.0002	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Se	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn	-	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sr	0.0017	0.0115	0.0052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ti	0.0001	0.0047	0.0175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	0.0043	0.0013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	0.0049	0.0358	0.0128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹STD = standard diet used in each experiment and composed of 50% wheat grain; 30% alfalfa and 20% yellow corn (Hogsette, 1992); D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maizer_R = maize residue; Alf = alfalfa; Maizer_{R,EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maizer_{R,TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf_{TH+EH} = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated;

3.2 Visual observations, pH and temperature

Visual observation on the diet texture and on the larval behavior were made during all experiments. Figure 3-1 shows the average larvae length at the end of every experiment. The temperature and pH variations over time are shown in Figure 3-2 and Figure 3-3.

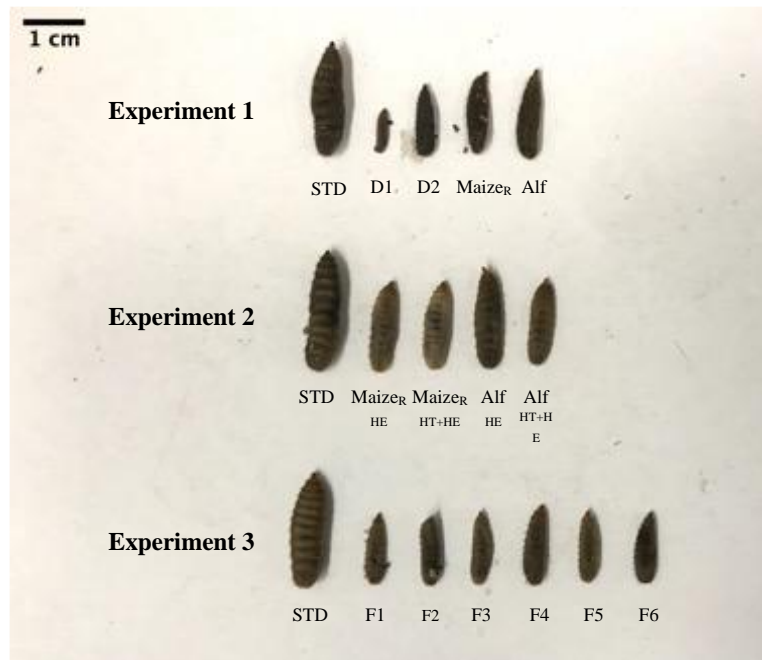


Figure 3-1. Average length of larvae at the end of all experiments (STD = standard diet; D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maizer = maize residue; Alf = alfalfa; Maizer_{EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maizer_{TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf_{EH} = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf_{TH+EH} = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated; F1 = D1/Maizer_{HE}; F2 = D1/Alf_{HE}; F3 = D2/Maizer_{HE}; F4 = D2/Alf_{HE}; F5 = D1/Maizer_{HE} /Alf_{HE}; F6 = D2/Maizer_{HE} /Alf_{HE})

3.2.1 Experiment 1

Solid digestates D1 and D2, the Maizer_R and Alf were tested during experiment 1. The viscosity of both digestate was higher than the STD, the Maizer_R and Alf diet. This inappropriate texture resulted in larvae trying to escape the bin or laying on top of the substrate instead of crawling underneath. The Maizer_R and Alf diets offered similar texture as the STD. The temperatures of all diets, except the STD and Alf, remained constant. An important temperature rise is seen for Alf at day 6, reaching 34.7 °C, and a small rise of temperature (0.6 °C) was observed for this diet at day 9, indicating small larvae activity when substrate reached 32.3 ± 0.2 °C (Figure 3-2). In comparison, an important rise of temperature for the STD was observed from day 7 to day 9, reaching 34.5 ± 0.2 °C at day 8. A significant difference between the temperature of D1 and D2 is seen at day 9 ($p = 0.0306$), with D2 obtaining a slightly higher temperature. The temperature of STD dropped at day 10, simultaneously with the beginning of the prepupal stage.

Regarding pH, no important changes for D1 and D2 were observed. A rise of pH for Maize_R (from 5.9 to 7.8) and Alf (from 5.7 to 8.7) diets was seen from day 5 to day 6. This rise might indicate some larvae activity or is due to microorganism being activated when the substrates were put in the incubator at 30 °C. The STD is the only diet of experiment 1 that reached the prepupal stage. The STD has showed pH variation similar to experiment 2 and 3.

3.2.2 Experiment 2

The effect of the pre-treatments on Maize_R and Alf diets were analyzed during experiment 2. All experimental diets texture were similar to STD. Larvae reared on Alf_{TH+EH} tried to escape the diet by crawling over the edge or underneath the lid. For Alf_{EH}, larval behavior was similar to STD, with all larvae trying to hide underneath the substrate. Similarly to experiment 1, the STD reached the highest temperature (36.8 ± 0.6 °C) of all treatments. Alf_{TH+EH} and Alf_{EH} reached higher temperature than both pretreated maize residue, respectively 32.0 ± 0.8 °C at day 8 and 32.1 ± 0.6 °C at day 9. Both pretreated maize residue diets remained at around 30.6 °C during all experiment (Figure 3-2). All experimental diets had a pH that dropped in the first 2-3 days and then increased, similar to the STD (Figure 3-3b). Only STD and Alf_{EH} reached the prepupal stage.

3.2.3 Experiment 3

All the formulations (F1-F6) had a similar texture to STD. The temperature of all the formulations remained constant (approximately 30 °C) and significantly different from the STD throughout the entire experiment. As for experiment 1 and 2, the STD showed an important rise of temperature at day 8, reaching 35.3 ± 0.3 °C. As seen on Figure 3-3c, no significant variation of the pH was observed for all the formulations. Temperature and pH curves of F1-F6 in experiment 3 were found to be similar to D1 and D2 in experiment 1. STD and F4 reached the prepupal stage.

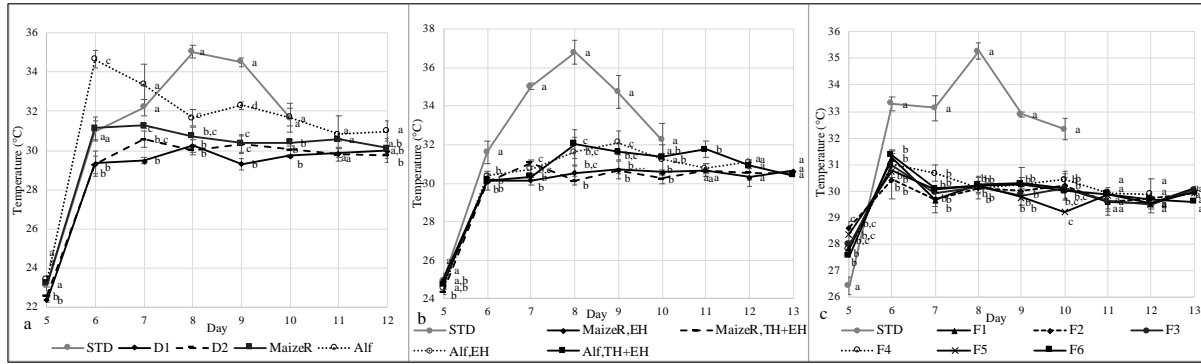


Figure 3-2. Temperature over time for experiment 1 (a), experiment 2 (b) and experiment 3 (c) (STD = standard diet; D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maize_R = maize residue; Alf= alfalfa; Maize_{R,EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maize_{R,TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated; F1= D1/Maize_{R,HE}; F2= D1/Alf; F3= D2/Maize_{R,HE}; F4= D2/Alf; F5= D1/Maize_{R,HE} /Alf; F6=D2/Maize_{R,HE} /Alf)

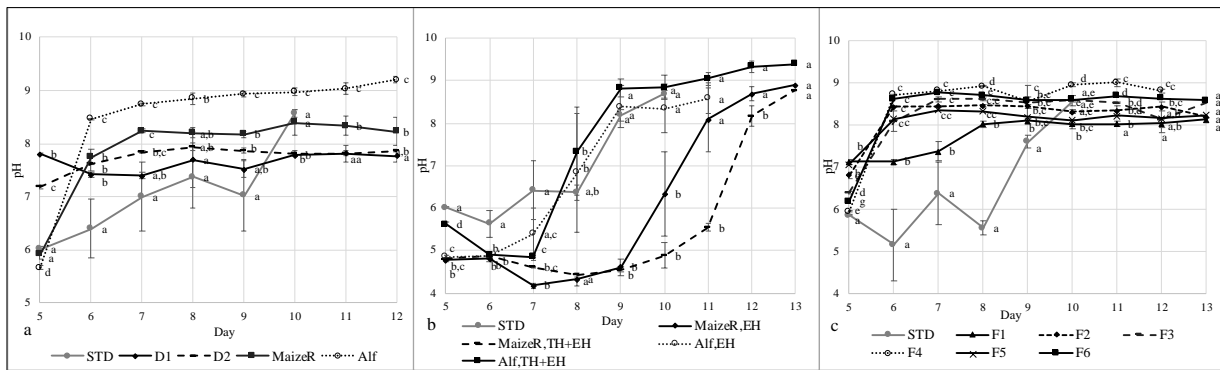


Figure 3-3. pH over time for experiment 1 (a), experiment 2 (b) and experiment 3 (c) (STD = standard diet; D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maize_R = maize residue; Alf= alfalfa; Maize_{R,EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maize_{R,TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated; F1= D1/Maize_{R,HE}; F2= D1/Alf; F3= D2/Maize_{R,HE}; F4= D2/Alf; F5= D1/Maize_{R,HE} /Alf; F6=D2/Maize_{R,HE} /Alf)

3.3 Growth performance of the diets

Growth performance parameters are shown in Table 3-3 and Figure 3-4 and Figure 3-5

Table 3-3. Performance parameter results for bioconversion experiments (mean \pm s.d., dry basis)

Diets ¹ .	Mortality (%)	Mass gain (%)	Length gain (%)	Efficiency of bioconversion (%)
Experience 1				
STD	1,2 \pm 2,3 ^a	756 \pm 89 ^a	210 \pm 13 ^a	14,84 \pm 1,05 ^a
D1	12,0 \pm 3,5 ^b	62 \pm 62 ^b	45 \pm 6 ^b	0,71 \pm 0,56 ^b
D2	2,0 \pm 0,5 ^a	206 \pm 97 ^{b,c}	102 \pm 5 ^c	2,98 \pm 0,81 ^{b,c}
Maizer _R	N.A ²	252 \pm 124 ^{b,c}	81 \pm 13 ^c	3,17 \pm 0,60 ^c
Alf	1,8 \pm 1,2 ^a	328 \pm 75 ^c	136 \pm 18 ^d	5,85 \pm 1,09 ^d
Experience 2				
STD	4,5 \pm 2,6 ^a	1432 \pm 230 ^a	210 \pm 17 ^a	18,72 \pm 2,69 ^a
Maizer _{R,HE}	5,3 \pm 5,5 ^a	524 \pm 42 ^{b,c,d}	154 \pm 3 ^b	10,16 \pm 0,72 ^b
Maizer _{R,HT+HE}	3,5 \pm 3,6 ^a	552 \pm 119 ^{b,c,d}	179 \pm 32 ^{a,b}	9,97 \pm 0,80 ^b
Alf _{HE}	2,3 \pm 2,8 ^a	965 \pm 256 ^{a,c}	182 \pm 24 ^{a,b}	13,87 \pm 0,33 ^c
Alf _{HT+HE}	4,0 \pm 1,0 ^a	316 \pm 156 ^d	157 \pm 15 ^{a,b}	9,59 \pm 0,49 ^b
Experience 3				
STD	0,0 \pm 1,0 ^a	1596 \pm 191 ^a	255 \pm 12 ^a	15,62 \pm 0,79 ^a
F1	7,8 \pm 4,1 ^{a,b}	355 \pm 85 ^{b,c}	106 \pm 21 ^b	3,34 \pm 0,36 ^{b,c}
F2	9,0 \pm 6,3 ^{a,b}	257 \pm 69 ^c	102 \pm 14 ^b	2,60 \pm 0,56 ^c
F3	5,2 \pm 4,0 ^{a,b}	457 \pm 120 ^{b,c}	108 \pm 18 ^b	3,74 \pm 0,33 ^{b,c}
F4	6,3 \pm 2,5 ^{a,b}	609 \pm 7 ^b	133 \pm 16 ^b	4,85 \pm 0,92 ^b
F5	6,5 \pm 2,3 ^{a,b}	348 \pm 49 ^{b,c}	106 \pm 15 ^b	3,37 \pm 0,21 ^{b,c}
F6	10,3 \pm 2,6 ^b	612 \pm 43 ^b	131 \pm 11 ^b	3,89 \pm 0,94 ^{b,c}

¹STD = standard diet; D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maizer = maize residue; Alf = alfalfa; Maizer_{R,HE} = Maize residue enzymatically pretreated; Maizer_{R,HT+HE} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf_{HE} = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf_{HT+HE} = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated; F1= D1/Maizer_{R,HE}; F2= D1/Alf_{HE}; F3= D2/Maizer_{R,HE}; F4= D2/Alf_{HE}; F5= D1/Maizer_{R,HE} /Alf_{HE}; F6=D2/Maizer_{R,HE} /Alf_{HE}

²For Maizer mortality rate could not be determined because all larvae could not be removed from the substrate

^{abc} Values within rows with same letter are not significantly different ($p > 0.05$). Statistical analysis was only performed within one experiment. Values presented are mean \pm standard deviation (n=3)

3.3.1 Experiment 1

STD performed significantly better than other experimental diets with the highest mass and length gain, respectively 756 \pm 89 % and 210 \pm 13 %. D1 performed the worst, with a significantly higher mortality rate (12.0 % \pm 2.3) and a significantly lower bioconversion efficiency (0.71 \pm 0.56 %), than other diets. No significant difference was found between the mass gain of D2, Maizer_R and Alf. Figure 3-4a shows that weight gain for D1 is almost negligible. The weight gain curves for D2 and Maizer_R are very similar. Same

results are seen for the length gain over time. Alf is the experimental diet that performed the best with the highest mass gain ($328 \pm 75\%$), length gain ($136 \pm 18\%$) and bioconversion efficiency (5.85 ± 1.09).

3.3.2 Experiment 2

Compared to STD, all experimental diets have a significantly lower mass gain except Alf_{EH}. No significant difference was found between Maize_{R,EH} and Maize_{R,TH+EH} for any performance parameters. Alf_{EH} is the experimental diet that performed the best with the highest mass gain ($965 \pm 256\%$), length gain ($182 \pm 24\%$) and bioconversion efficiency ($13.87 \pm 0.33\%$). Alf_{EH} had a significant higher bioconversion efficiency compared to all pretreated experimental diets.

3.3.3 Experiment 3

The three formulations containing D2 (F3, F4 and F6) performed better than the formulations containing D1 (F1, F2 and F5). Figure 3-4c and Figure 3-5c show minor difference between the weight and length gain of all the formulations over time. F4 is the experimental diet that performed the best with a higher mass gain ($609 \pm 7\%$), length gain ($133 \pm 16\%$) and bioconversion efficiency ($4.85 \pm 0.92\%$) than all other experimental diets. Larvae reared on F4 show significantly higher weight (73.3 ± 6.7 mg) on day 11 than all other diets except F6. A significant difference is found for F4 length gain with all other diets at day 12.

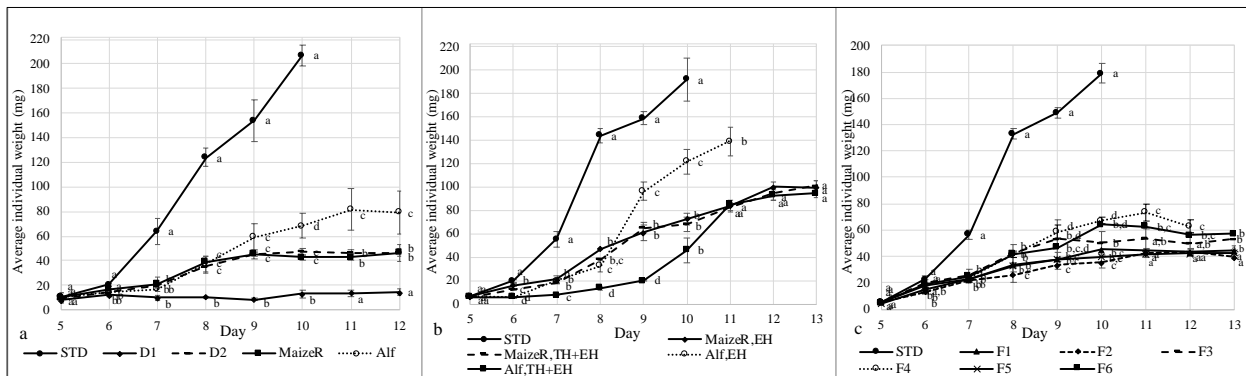


Figure 3-4. Weight gain curves for experiment 1 (a), experiment 2 (b) and experiment 3 (c) (STD = standard diet; D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maize_R = maize residue; Alf = alfalfa; Maize_{R,EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maize_{R,TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf_{EH} = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf_{TH+EH} = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated; F1= D1/Maize_{R,HE}; F2= D1/Alf_{HE}; F3= D2/Maize_{R,HE}; F4= D2/Alf_{HE}; F5= D1/Maize_{R,HE} /Alf_{HE}; F6=D2/Maize_{R,HE} /Alf_{HE})

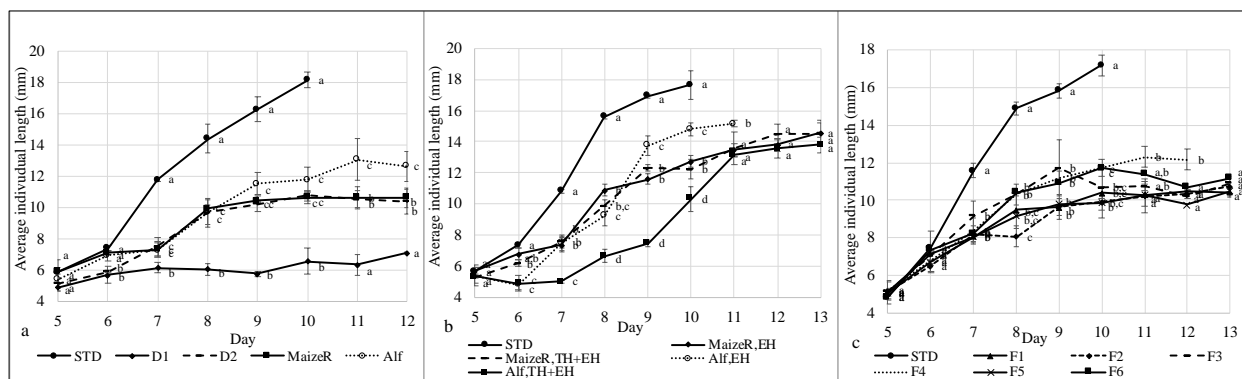


Figure 3-5. Length gain curves for experiment 1 (a), experiment 2 (b) and experiment 3 (c) (STD = standard diet; D1 = solid digestate 1; D2 = solid digestate 2; Maize_R = maize residue; Alf = alfalfa; Maize_{R,EH} = Maize residue enzymatically pretreated; Maize_{R,TH+EH} = Maize residue thermally and enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa enzymatically pretreated; Alf = Alfalfa thermally and enzymatically pretreated; F1= D1/Maize_{R,HE}; F2= D1/Alf; F3= D2/Maize_{R,HE}; F4= D2/Alf; F5= D1/Maize_{R,HE} /Alf; F6=D2/Maize_{R,HE} /Alf)

4 Discussion

According to the results obtained, digestate processing with BSFL was not effective. Indeed, the growth of larvae reared on digestate-based diets was very poor. The temperature and pH curves of D1 and D2 (experiment 1) as well as those of F1-F6 formulations (experiment 3) do not indicate any larval activity. As reported by Pas et al. (2022), once the digestates are humidified, they become very sticky, which may affect larval growth. Experiment 1 shows very minimal to no mass gain for larvae reared on D1. Digestate D2 appears to have a more favorable nutritional composition as larvae achieved higher mass gain ($206 \pm 97\%$), length gain ($102 \pm 5\%$) and bioconversion rate ($2.98 \pm 0.81\%$) than larvae reared on D1 ($62 \pm 62\%$ for mass gain, $45 \pm 6\%$ for length gain and $0.71 \pm 0.56\%$ for bioconversion rate). According to chemical analyses, nitrogen and sulfur content could be responsible for the low yield of larvae reared on D1. Indeed, these compounds are found in higher content in D1. The presence of these compounds could inhibit the growth of the larvae. Peguero et al. (2023) evaluated the effect of an ammonia pretreatment of different fibrous biowaste on BSFL rearing performance. The ammonia pretreatment tested in this study reduced the performance of BSFL by more than half compared to the untreated control. According to this study, ammonia pretreatment would have some toxicity to BSFL. In the same regard, Lu et al. (2021) showed that nitrogen source significantly affects the growth of larvae. In fact, when NH_4Cl or NaNO_3 was added to the feed, the larval weight, protein and lipid yield was significantly lower than the other groups. Their study suggests that these nitrogen sources have a negative effect on larvae growth. Even though in our study the form of nitrogen was not investigated, the digestate can often contain high levels of ammonia and ammonium (Möller & Müller, 2012). It is therefore important to consider the presence of these compounds in the substrate. In addition, aluminum, calcium, iron and phosphorus content is higher in D1 than in D2 and

it may have had an effect on larval growth. The high calcium content of D1 probably originated from the wastewater from dairy industry processed by the biogas plant. A few studies have investigated the effect of metals, particularly heavy metals, on BSFL. In general, these studies indicate that BSFL are able to tolerate high concentrations of metals without significant effect on their development (Cai et al., 2018; Wu et al., 2020). In fact, Wu et al. (2020) showed that high levels of copper and cadmium did not have a significant impact on BSFL weight gain. Nevertheless, presence of metals in digestates should be considered since this subject has not been studied in great detail. Although, according to the performance of the larvae, D1 is definitely not well suited for BSFL growth. Alf was the experimental diet in experiment 1 that performed the most efficiently with a length gain ($136 \pm 18\%$) and a bioconversion rate ($5.85 \pm 1.09\%$) significantly different from the other diets. However, no significant difference was found between the mass gain of D1, D2, Maizer and Alf.

The application of a pre-treatment on maize residue and alfalfa improved the performance of the larvae. Enzymatic hydrolysis increased sugar content and thus allowed better growth, with larvae reared on Alf_{EH} reaching the prepupal stage. No significant difference was found between the two pre-treatments performed on maize residues. However, a significant difference ($p=0.0083$) is present between the mass gain of Alf_{EH} and Alf_{TH+EH}. Thus, enzymatic hydrolysis alone appears to be more effective than the combination of thermal and enzymatic hydrolysis. The presence of NaOH, used during thermal hydrolysis, might have inhibited the growth of the larvae, but no study has been done on this so far.

Mixing the digestate with pretreated Maizer_{EH} and Alf_{EH} during experiment 3 seems to have decrease the performance of the larvae. The best performing formulation, and the only one that reached the prepupal stage, was F4 (50% D2 and 50% Alf_{EH}). According to these results, D2 seems more favourable to larval growth than D1. Thus, the feedstock used during anaerobic digestion has an impact on the digestate digestibility by BSFL. Indeed, spectroscopic analyses have shown that digestates from anaerobic digestion inherit the chemical attributes of the feedstocks from which they originate, and thus the composition of the digestate must be evaluated on a case-by-case basis by assessing combinations of feedstocks as well as the configuration of the digestion facilities (Nkoa, 2014). As seen in the study by Fu et al. (2022), a digestate produced from food residues showed a better potential as a substrate for rearing BSFL. Indeed, they obtained efficient larval growth on this digestate, probably due to the high crude protein content ($34.50 \pm 2.36\%$), which resulted in high individual larval weights (155.72 ± 6.78 mg). Similarly, digestate produced by anaerobic digestion of pretreated rapeseed straw and chicken manure used by Elsayed et al. (2020) obtained efficient BSFL growth. According to their work, BSFL rearing on solid digestate for biodiesel production is a new efficient approach for waste recycling. Therefore, research on the use of BSFL to

valorize the digestate should focus on biogas plants that have a well-defined input and that produces a digestate that would suit the needs of the BSFL.

5 Conclusion

Anaerobic digestion produces digestate that can be used as a low-cost feeding substrate for BSFL cultivation. In this work, two digestates originating from different biogas plants were mixed with pretreated agricultural crop residues and used to rear BSFL. Chemical analysis showed an increased in sugar content for the pretreated crops. Rearing trials indicated poor growth of larvae fed digestate-based diets. Although, larvae achieve higher mass gain when fed pretreated maize residue and alfalfa, once these agricultural crops were mixed with digestate, mass and length gain decreased. The feedstock used during anaerobic digestion has a significant impact on the digestate digestibility by BSFL. Further research is needed to develop an effective method for digestate processing with BSF larvae.

Acknowledgements

This research was funded by Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (reference 2021-PR-285600)

4 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

En raison de la forte croissance de la population mondiale, de plus en plus de MOR sont générées et doivent être récupérées et valorisées. Pour se faire, la biométhanisation est une technologie qui a gagné beaucoup d'intérêt. Inévitablement, la hausse du nombre d'usines de biométhanisation cause une augmentation de la quantité de digestat produit qui doit être traité. Parallèlement, la croissance démographique mondiale provoque une augmentation des besoins en protéines pour l'alimentation animale. L'objectif principal de ce travail consiste à adresser ce besoin grandissant en protéines tout en développant une nouvelle voie de valorisation pour les digestats de biométhanisation. L'idée est donc d'utiliser les digestats dans un régime alimentaire pour l'élevage des larves de MSN. Les objectifs spécifiques de cette étude étaient de :

- Caractériser la fraction solide de digestat et déterminer le potentiel nutritif pour les larves de MSN;
- Appliquer un prétraitement thermique et/ou enzymatique sur des biomasses agricoles pour améliorer la biodisponibilité des nutriments;
- Formuler des diètes à base de digestat et de substrats agricoles prétraités afin d'améliorer la croissance des larves de MSN;
- Analyser la performance de croissance des larves de MSN sur les formulations développées;

Dans un premier temps, une étude préliminaire ayant pour but d'évaluer le potentiel nutritif des digestats pour les larves de MSN a été réalisée. Lors de cette recherche, l'effet d'un prétraitement sur la digestibilité du digestat pour les larves de MSN a aussi été étudié. Deux hydrolyses enzymatiques ont été appliquées sur le digestat dans des conditions opératoires différentes (température et pH). Tout d'abord, il a été constaté que le digestat ne permettait pas une croissance efficace des larves. En effet, les larves élevées sur le digestat ont obtenu un gain de masse et un taux de bioconversion très faible. Cependant, lors de l'application du prétraitement sur le digestat, la performance a été améliorée. L'application du prétraitement enzymatique a permis d'obtenir des larves environ deux fois plus grosses en comparaison au digestat non traité. Cependant, le gain de masse et l'efficacité de bioconversion des larves élevées sur le digestat prétraité aux enzymes restent faibles comparativement à la diète standard. En effet, les larves ont été incapables de bioconvertir un pourcentage important de digestat. Selon les résultats de cette recherche, l'utilisation des larves de MSN n'est pas une solution efficace pour le traitement du digestat. Différentes raisons expliquent ce faible rendement. Entre autres, la faible valeur nutritive des digestats ainsi que la texture visqueuse ne permettant pas aux larves de se mouvoir facilement dans le substrat ont nui à leur développement. Des ajustements doivent être effectués au processus afin de permettre la valorisation du digestat par les larves de MSN.

Suite à cet essai, une deuxième étude a été réalisée afin d'adresser les problématiques survenues. Afin d'améliorer l'apport en nutriments et la texture du digestat, des mélanges de digestat avec des substrats agricoles prétraités ont été testés. Lors de ce travail, deux digestats provenant d'usines de biométhanisation

différentes, des résidus de maïs et de la luzerne ont été échantillonnés. De plus, une hydrolyse enzymatique ainsi qu'une hydrolyse thermique suivie d'une hydrolyse enzymatique ont été appliquées aux substrats agricoles. L'application des différents prétraitements a permis d'améliorer l'efficacité de bioconversion par les larves de MSN. En effet, les larves élevées sur les résidus de maïs et la luzerne prétraités ont obtenu un gain de masse, un gain de longueur et une efficacité de bioconversion plus élevés que les résidus de maïs et la luzerne non traités. Cependant, une fois les biomasses agricoles prétraitées mélangées au digestat, la performance a diminué. En effet, les larves nourries avec différentes formulations à base de digestat ont obtenu un gain de masse, un gain de longueur et un taux de bioconversion faible comparativement à la diète standard. Cette étude a permis de constater que certains digestats semblent être plus adaptés pour la culture des larves de MSN. En effet, la performance du digestat D2 a été significativement meilleure que celle du digestat D1. De plus, comme observée lors de la première étude, l'application du prétraitement sur les biomasses agricoles a permis d'améliorer la performance des larves. Cependant, des travaux additionnels sont toujours nécessaires afin de rendre le procédé efficace et optimiser la bioconversion du digestat par les larves de MSN.

En considérant les résultats de cette étude, les recherches futures devraient se concentrer sur des digestats provenant de site de biométhanisation agricole. L'utilisation d'un digestat agricole semble plus appropriée pour les larves de MSN puisqu'il permet de limiter la présence de certains contaminants pouvant inhiber la croissance des larves, améliorer la teneur en nutriments et améliorer la texture.

De plus, l'application d'un prétraitement biologique sur le digestat pourrait être pertinente et permettre d'améliorer la croissance des larves de MSN. L'utilisation de bactéries ou de champignons pour modifier la composition du digestat et le rendre plus facilement assimilable par les larves de MSN est intéressante sur différents points. Tout d'abord, ce traitement est peu coûteux et respectueux de l'environnement. Les traitements biologiques, contrairement aux traitements thermiques et enzymatiques, ne font pas usage de produits chimiques. Ceux-ci, même si utilisés dans de faibles quantités, peuvent être toxiques pour les larves de MSN et donc nuire à leur développement. De plus, l'application d'un prétraitement microbien permettrait de bonifier la teneur en nutriments du substrat puisque les larves pourraient se nourrir du digestat, mais aussi des bactéries ou des champignons présents.

Une autre voie à explorer serait l'utilisation des larves de MSN en amont de la biométhanisation et, donc, la biométhanisation des frass d'insectes. Peu d'études ont été réalisées sur ce sujet, et il manque toujours de la recherche afin de démontrer le potentiel méthanogène des frass. Cependant, cette approche est intéressante puisqu'elle permet de respecter la pyramide de gestion des matières résiduelles qui met de l'avant la réutilisation (élevage d'insectes) avant leur recyclage (biométhanisation).

Ainsi, des travaux futurs sont nécessaires afin d'optimiser la performance des larves de MSN sur le digestat. Néanmoins, la combinaison de la biométhanisation et des insectes comestibles décomposeurs détient un

potentiel prometteur pour la valorisation des MOR. Cet amalgame de biotechnologies représente un modèle d'économie circulaire et une solution durable pour l'élimination des déchets organiques permettant de produire du biocarburant et des aliments pour les animaux.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal, N. K., Kumar, M., Ghosh, P., Kumar, S. S., Singh, L., Vijay, V. K., & Kumar, V. (2022). Anaerobic digestion of sugarcane bagasse for biogas production and digestate valorization. *Chemosphere*, 295, 133893. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133893>
- Akhiar, A., Zamri, M. F. M. A., Torrijos, M., Battimelli, A., Roslan, E., Marzuki, M. H. M., & Carrere, H. (2020). *Anaerobic digestion industries progress throughout the world*. 476(1), 012074.
- Alburquerque, J. A., Fuente, C. de la, Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., & Bernal, M. P. (2012). Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *European Journal of Agronomy*, 43, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.06.001>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Amrul, N. F., Kabir Ahmad, I., Ahmad Basri, N. E., Suja, F., Abdul Jalil, N. A., & Azman, N. A. (2022). A Review of Organic Waste Treatment Using Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). *Sustainability*, 14(8), 4565. <https://doi.org/10.3390/su14084565>
- Bach, I.-M., Essich, L., Bauerle, A., & Müller, T. (2022). Efficiency of Phosphorus Fertilizers Derived from Recycled Biogas Digestate as Applied to Maize and Ryegrass in Soils with Different pH. *Agriculture*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/agriculture12030325>
- Bakala, H. S., Devi, J., Ankita, Sarao, L. K., & Kaur, S. (2023). Utilization of Wheat and Maize Waste as Biofuel Source. In N. Srivastava, B. Verma, & P. K. Mishra (Eds.), *Agroindustrial Waste for Green Fuel Application* (pp. 27–66). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6230-1_2
- Barampouti, E. M., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K., & Loizidou, M. (2020). Exploring technological alternatives of nutrient recovery from digestate as a secondary resource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 134, 110379. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110379>
- Barragan-Fonseca, K. B., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2018). Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(9), 761–770. <https://doi.org/10.1111/eea.12716>
- Barua, V. B., & Kalamdhad, A. S. (2017). Effect of various types of thermal pretreatment techniques on the hydrolysis, compositional analysis and characterization of water hyacinth. *Bioresource Technology*, 227, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.036>
- Beesigamukama, D., Subramanian, S., & Tanga, C. M. (2022). Nutrient quality and maturity status of frass fertilizer from nine edible insects. *Scientific Reports*, 12(1), 7182. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11336-z>
- Bhatnagar, N., Ryan, D., Murphy, R., & Enright, A. M. (2022). A comprehensive review of green policy, anaerobic digestion of animal manure and chicken litter feedstock potential – Global and Irish perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111884. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111884>
- Bhutto, A. W., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A. A., Karim, S., & Yu, G. (2017). Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*, 122, 724–745. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005>

- Biancarosa, I., Liland, N. S., Biemans, D., Araujo, P., Bruckner, C. G., Waagbø, R., Torstensen, B. E., Lock, E.-J., & Amlund, H. (2018). Uptake of heavy metals and arsenic in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae grown on seaweed-enriched media: Heavy metals in black soldier fly larvae grown on seaweed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2176–2183. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8702>
- Biancarosa, I., Sele, V., Belghit, I., Ørnsrud, R., Lock, E.-J., & Amlund, H. (2019). Replacing fish meal with insect meal in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) does not impact the amount of contaminants in the feed and it lowers accumulation of arsenic in the fillet. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(8), 1191–1205. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1619938>
- Boafo, H. A., Gbemavo, D. S. J. C., Timpong-Jones, E. C., Eziah, V., Billah, M., Chia, S. Y., Aidoo, O. F., Clotey, V. A., & Kenis, M. (2023). Substrates most preferred for black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) oviposition are not the most suitable for their larval development. *Journal of Insects as Food and Feed*, 9(2), 183–192. <https://doi.org/10.3920/JIFF2022.0034>
- Bohm, K., Hatley, G. A., Robinson, B. H., & Gutiérrez-Ginés, M. J. (2022). Black Soldier Fly-based bioconversion of biosolids creates high-value products with low heavy metal concentrations. *Resources, Conservation and Recycling*, 180, 106149. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.106149>
- Bolzonella, D., Battista, F., Mattioli, A., Nicolato, C., Frison, N., & Lampis, S. (2020). Biological thermophilic post hydrolysis of digestate enhances the biogas production in the anaerobic digestion of agro-waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 134, 110174. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110174>
- Bosch, G., Oonincx, D. G. A. B., Jordan, H. R., Zhang, J., van Loon, J. J. A., van Huis, A., & Tomberlin, J. K. (2020). Standardisation of quantitative resource conversion studies with black soldier fly larvae. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(2), 95–109. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0004>
- Broeckx, L., Frooninckx, L., Slegers, L., Berrens, S., Noyens, I., Goossens, S., Verheyen, G., Wuyts, A., & Van Miert, S. (2021). Growth of Black Soldier Fly Larvae Reared on Organic Side-Streams. *Sustainability*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/su132312953>
- Bruno, D., Bonacci, T., Reguzzoni, M., Casartelli, M., Grimaldi, A., Tettamanti, G., & Brandmayr, P. (2020). An in-depth description of head morphology and mouthparts in larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Arthropod Structure & Development*, 58, 100969. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100969>
- Bustamante, M. A., Alburquerque, J. A., Restrepo, A. P., de la Fuente, C., Paredes, C., Moral, R., & Bernal, M. P. (2012). Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass and Bioenergy*, 43, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.010>
- Cadinu, L. A., Barra, P., Torre, F., Delogu, F., & Madau, F. A. (2020). Insect Rearing: Potential, Challenges, and Circularity. *Sustainability*, 12(11), 4567. <https://doi.org/10.3390/su12114567>
- Cai, M., Hu, R., Zhang, K., Ma, S., Zheng, L., Yu, Z., & Zhang, J. (2018). Resistance of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to combined heavy metals and potential application in municipal sewage sludge treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1559–1567. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0541-x>
- Cammack, J. A., & Tomberlin, J. K. (2017). The Impact of Diet Protein and Carbohydrate on Select Life-History Traits of The Black Soldier Fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). *Insects*, 8(2), 56. PubMed. <https://doi.org/10.3390/insects8020056>
- Canadian Biogas Association. (2021). *Canadian 2020 Biogas Market Report*. https://biogasassociation.ca/resources/page/canadian_2020_biogas_market_report/
- Caruso, D., Devic, E., Subamia, I. W., Talamond, P., & Baras, E. (2014). *Technical handbook of domestication and production of Diptera Black Soldier Fly (BSF), Hermetia illucens, Stratiomyidae*.

- Catenacci, A., Boniardi, G., Mainardis, M., Gievers, F., Farru, G., Asunis, F., Malpei, F., Goi, D., Cappai, G., & Canziani, R. (2022). Processes, applications and legislative framework for carbonized anaerobic digestate: Opportunities and bottlenecks. A critical review. *Energy Conversion and Management*, 263, 115691. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.115691>
- Cesaro, A. (2021). The valorization of the anaerobic digestate from the organic fractions of municipal solid waste: Challenges and perspectives. *Journal of Environmental Management*, 280, 111742. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111742>
- Chavez, M. (2021). The sustainability of industrial insect mass rearing for food and feed production: Zero waste goals through by-product utilization. *Current Opinion in Insect Science*, 48, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.09.003>
- Childers, W. R., & Aasen, Arvid. (2007). *Luzerne | l'Encyclopédie Canadienne*. <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/luzerne>
- Cho, S., Kim, C.-H., Kim, M.-J., & Chung, H. (2020). Effects of microplastics and salinity on food waste processing by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of Ecology and Environment*, 44(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s41610-020-0148-x>
- Chozhavendhan, S., Karthigadevi, G., Bharathiraja, B., Praveen Kumar, R., Abo, L. D., Venkatesa Prabhu, S., Balachandar, R., & Jayakumar, M. (2023). Current and prognostic overview on the strategic exploitation of anaerobic digestion and digestate: A review. *Environmental Research*, 216, 114526. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114526>
- Čičková, H., Newton, G. L., Lacy, R. C., & Kozánek, M. (2015). The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Management*, 35, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>
- Cláudia da Costa Rocha, A., José de Andrade, C., & de Oliveira, D. (2021). Perspective on integrated biorefinery for valorization of biomass from the edible insect *Tenebrio molitor*. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.012>
- Cohn, Z., Latty, T., & Abbas, A. (2022). Understanding dietary carbohydrates in black soldier fly larvae treatment of organic waste in the circular economy. *Waste Management*, 137, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.10.013>
- Cutrim, F., Ramos, E., Abreu, M., Godinho, A., Maciel, A., Mendonça, C., & Cavalcante, K. (2019). A Study of Chemical Composition and Enzymatic Hydrolysis of Solid Organic Waste from Agrosilvopastoral Systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190110>
- Dahlin, J., Nelles, M., & Herbes, C. (2017). Biogas digestate management: Evaluating the attitudes and perceptions of German gardeners towards digestate-based soil amendments. *Resources, Conservation and Recycling*, 118, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2016.11.020>
- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., & Van Campenhout, L. (2018). Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), e02722-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17>
- Diener, S., Studt Solano, N. M., Roa Gutiérrez, F., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2011). Biological Treatment of Municipal Organic Waste using Black Soldier Fly Larvae. *Waste and Biomass Valorization*, 2(4), 357–363. <https://doi.org/10.1007/s12649-011-9079-1>
- Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research*, 27(6), 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Elsayed, M., Ran, Y., Ai, P., Azab, M., Mansour, A., Jin, K., Zhang, Y., & Abomohra, A. E.-F. (2020). Innovative integrated approach of biofuel production from agricultural wastes by anaerobic digestion and black

- soldier fly larvae. *Journal of Cleaner Production*, 263, 121495. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121495>
- Energir. (2019). *Et si on se chauffait grâce à nos déchets?* <https://www.energir.com/fr/a-propos/nos-energies/gaz-naturel/gaz-naturel-renouvelable/>
- FAO. (2011). *L'élevage dans le monde en 2011 – Contribution de l'élevage à la sécurité alimentaire*. <https://www.fao.org/home/fr>
- Fatchurochim, S., Geden, C. J., & Axtell, R. C. (1989). Filth Fly (Diptera) Oviposition and Larval Development in Poultry Manure of Various Moisture Levels. *Journal of Entomological Science*, 24(2), 224–231. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-24.2.224>
- Fitriana, E. L., Jayanegara, A., Astuti, D. A., & Laconi, E. B. (2022). Growth performance and nutrient composition of black soldier fly larvae reared on solid-state fermentation substrates with various white rot fungi. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(9).
- Folgueras, M. B., Alonso, M., & Díaz, R. M. (2013). Influence of sewage sludge treatment on pyrolysis and combustion of dry sludge. *Energy*, 55, 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.03.063>
- Franco, A., Scieuzo, C., Salvia, R., Petrone, A. M., Tafi, E., Moretta, A., Schmitt, E., & Falabella, P. (2021). Lipids from *Hermetia illucens*, an Innovative and Sustainable Source. *Sustainability*, 13(18), 10198. <https://doi.org/10.3390/su131810198>
- Fu, S.-F., Wang, D.-H., Xie, Z., Zou, H., & Zheng, Y. (2022). Producing insect protein from food waste digestate via black soldier fly larvae cultivation: A promising choice for digestate disposal. *Science of The Total Environment*, 830, 154654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154654>
- Fuchs, W., & Drosig, B. (2013). Assessment of the state of the art of technologies for the processing of digestate residue from anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 67(9), 1984–1993. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.075>
- Gaj, K., & Cichuta, K. (2022). Combined Biological Method for Simultaneous Removal of Hydrogen Sulphide and Volatile Methylsiloxanes from Biogas. *Energies*, 16(1), 100. <https://doi.org/10.3390/en16010100>
- Gao, Z., Wang, W., Lu, X., Zhu, F., Liu, W., Wang, X., & Lei, C. (2019). Bioconversion performance and life table of black soldier fly (*Hermetia illucens*) on fermented maize straw. *Journal of Cleaner Production*, 230, 974–980. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.074>
- Genencor. (2011). *Accellerase® trio™ Product Information*. [Www.Accellerated.Com/](http://www.accelerated.com/), 1–4. http://www.accelerated.com/fileadmin/user_upload/Documents/AccelleraseTrioProductLit01.pdf
- Głowacka, A., Szostak, B., & Klebaniuk, R. (2020). Effect of Biogas Digestate and Mineral Fertilisation on the Soil Properties and Yield and Nutritional Value of Switchgrass Forage. *Agronomy*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy10040490>
- Gold, M., Cassar, C. M., Zurbrügg, C., Kreuzer, M., Boulos, S., Diener, S., & Mathys, A. (2020). Biowaste treatment with black soldier fly larvae: Increasing performance through the formulation of biowastes based on protein and carbohydrates. *Waste Management*, 102, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.036>
- Gold, M., Tomberlin, J. K., Diener, S., Zurbrügg, C., & Mathys, A. (2018). Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Management*, 82, 302–318. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>
- Gurmessa, B., Cocco, S., Ashworth, A. J., Pedretti, E. F., Ilari, A., Cardelli, V., Fornasier, F., Ruello, M. L., & Corti, G. (2021). Post-digestate composting benefits and the role of enzyme activity to predict trace element immobilization and compost maturity. *Bioresource Technology*, 338, 125550. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125550>

- Hénault-Ethier, L., Dussault, M., Cabrera, P., Lefebvre, B., Taillefer, S., Deschamps, M.-H., & Vandenberg, G. (2017). Entotechnologie Les insectes au service de l'humain pour la gestion des résidus organiques. *Vecteur Environment*.
- Hogsette, J. A. (1992). New Diets for Production of House Flies and Stable Flies (Diptera: Muscidae) in the Laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 85(6), 2291–2294. <https://doi.org/10.1093/jee/85.6.2291>
- Hong, J., Han, T., & Kim, Y. Y. (2020). Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an Alternative Protein Source for Monogastric Animal: A Review. *Animals*, 10(11), 2068. <https://doi.org/10.3390/ani10112068>
- IRENA. (2019). *International Renewable Energy Agency (IRENA). Renewable Energy Statistics 2019*.
- Isibika, A., Vinnerås, B., Kibazohi, O., Zurbrügg, C., & Lalander, C. (2019). Pre-treatment of banana peel to improve composting by black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.), Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Waste Management*, 100, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.09.017>
- Katongole, C. B., Bakeeva, A., Passoth, V., & Lindberg, J. E. (2017). Effect of solid-state fermentation with *Arxula adenivorans* or *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) on hygienic quality and in-vitro digestibility of banana peels by mono-gastric animals. *Livestock Science*, 199, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.03.002>
- Kovačić, Đ., Lončarić, Z., Jović, J., Samac, D., Popović, B., & Tišma, M. (2022). Digestate Management and Processing Practices: A Review. *Applied Sciences*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/app12189216>
- Leong, Y. K., & Chang, J.-S. (2022). Integrated role of algae in the closed-loop circular economy of anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 360, 127618. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127618>
- Leu, S.-Y., & Zhu, J. Y. (2013). Substrate-Related Factors Affecting Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses: Our Recent Understanding. *BioEnergy Research*, 6(2), 405–415. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9276-1>
- Li, X.-R., Huang, M.-S., Leng, P.-E., Lu, X.-Y., & Xiao, B. (2021). Coagulation-flocculation: A potential application for mosquito Larval Source Management (LSM). *Acta Tropica*, 213, 105748. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105748>
- Li, Y., Chen, Y., & Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied Energy*, 240, 120–137. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.243>
- Lievens, S., Poma, G., De Smet, J., Van Campenhout, L., Covaci, A., & Van Der Borgh, M. (2021). Chemical safety of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*), knowledge gaps and recommendations for future research: A critical review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(4), 383–396. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0081>
- Lievens, S., Poma, G., Frooninckx, L., Van der Donck, T., Seo, J. W., De Smet, J., Covaci, A., & Van Der Borgh, M. (2022). Mutual Influence between Polyvinyl Chloride (Micro)Plastics and Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens* L.). *Sustainability*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/su141912109>
- Liew, C. S., Mong, G. R., Abdelfattah, E. A., Raksasat, R., Rawindran, H., Kiatkittipong, W., Mohamad, M., Ramli, A., Yunus, N. M., Lam, M. K., Da Oh, W., & Lim, J. W. (2022). Correlating black soldier fly larvae growths with soluble nutrients derived from thermally pre-treated waste activated sludge. *Environmental Research*, 210, 112923. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112923>
- Liew, C. S., Yunus, N. M., Chidi, B. S., Lam, M. K., Goh, P. S., Mohamad, M., Sin, J. C., Lam, S. M., Lim, J. W., & Lam, S. S. (2022). A review on recent disposal of hazardous sewage sludge via anaerobic digestion and novel composting. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 126995. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126995>
- Lim, J. J., Liew, C. S., Raksasat, R., Merican, Z. M. A., Kiatkittipong, K., Abdelfattah, E. A., Mohamad, M., Bashir, M. J. K., Ntwampe, S. K. O., & Lim, J. W. (2022). Cellulase pretreated palm decanter cake for

- feeding of black soldier fly larvae in triggering bioaccumulation of protein and lipid into biodiesel productions. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 53, 102485. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102485>
- Liu, C., Wang, C., Yao, H., & Chapman, S. J. (2021a). Pretreatment is an important method for increasing the conversion efficiency of rice straw by black soldier fly larvae based on the function of gut microorganisms. *Science of The Total Environment*, 762, 144118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144118>
- Liu, C., Wang, C., Yao, H., & Chapman, S. J. (2021b). Pretreatment is an important method for increasing the conversion efficiency of rice straw by black soldier fly larvae based on the function of gut microorganisms. *Science of The Total Environment*, 762, 144118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144118>
- Liu, T., Klammsteiner, T., Dregulo, A. M., Kumar, V., Zhou, Y., Zhang, Z., & Awasthi, M. K. (2022). Black soldier fly larvae for organic manure recycling and its potential for a circular bioeconomy: A review. *Science of The Total Environment*, 833, 155122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155122>
- Lu, J., & Xu, S. (2021). Post-treatment of food waste digestate towards land application: A review. *Journal of Cleaner Production*, 303, 127033. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127033>
- Lu, Y., Zhang, S., Sun, S., Wu, M., Bao, Y., Tong, H., Ren, M., Jin, N., Xu, J., Zhou, H., & Xu, W. (2021). Effects of Different Nitrogen Sources and Ratios to Carbon on Larval Development and Bioconversion Efficiency in Food Waste Treatment by Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Insects*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/insects12060507>
- Ma, J., Lei, Y., Rehman, K. ur, Yu, Z., Zhang, J., Li, W., Li, Q., Tomberlin, J. K., & Zheng, L. (2018). Dynamic Effects of Initial pH of Substrate on Biological Growth and Metamorphosis of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *Environmental Entomology*, 47(1), 159–165. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx186>
- Mahmood, H., Moniruzzaman, M., Iqbal, T., & Khan, M. J. (2019). Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 20, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.001>
- Mäkelä, M. R., Hildén, K. S., & Kuuskeri, J. (2021). Fungal Lignin-Modifying Peroxidases and H₂O₂-Producing Enzymes. In Ó. Zaragoza & A. Casadevall (Eds.), *Encyclopedia of Mycology* (pp. 247–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21127-8>
- Manurung, R., Supriatna, A., Esyanthi, R. R., & Putra, R. E. (2016). Bioconversion of rice straw waste by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.): Optimal feed rate for biomass production. *J Entomol Zool Stud*, 4(4), 1036–1041.
- MAPAQ. (2019). *Portrait diagnostique de l'industrie des grains au Québec*. <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/Publications/Pages/Details-Publication.aspx?guid=%7Bd96007f9-b0bf-4b1e-bf2b-07513d48924f%7D>
- Martel, S., & Desmeules, X. (2013). *Valorisation agronomique des digestats de méthanisation*. Agrinova.
- Martín Pérez, L., Benítez Casanova, L., Moreno Pérez, A. J., Pérez Gómez, D., Gavaldá Martín, S., Ledesma-García, L., Valbuena Crespo, N., Díez García, B., & Reyes-Sosa, F. M. (2017). Coupling the pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic biomass by the expression of beta-xylosidases. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(11), 2497–2506. <https://doi.org/10.1002/bit.26386>
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., & Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 412–427. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>

- Mejias, L., Estrada, M., Barrena, R., & Gea, T. (2020). A novel two-stage aeration strategy for *Bacillus thuringiensis* biopesticide production from biowaste digestate through solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *161*, 107644. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107644>
- MELCC. (2020a). Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MELCC). Analyse d'impact réglementaire de la Stratégie de valorisation de la matière organique. 2020, 37.
- MELCC. (2020b). Ministère de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques (MELCC). Stratégie de valorisation de la matière organique (p. 50).
- MELCC. (2021). Ministère de l'environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MELCC). Programme de traitement des matières organiques par biométhanisation et compostage (PTMOBC). <https://www.environnement.gouv.qc.ca/programmes/biomethanisation/>
- Meneguz, M., Gasco, L., & Tomberlin, J. K. (2018). Impact of pH and feeding system on black soldier fly (*Hermetia illucens*, L; Diptera: Stratiomyidae) larval development. *PloS One*, *13*(8), e0202591–e0202591. PubMed. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202591>
- Menino, R., Felizes, F., Castelo-Branco, M. A., Fareleira, P., Moreira, O., Nunes, R., & Murta, D. (2021). Agricultural value of Black Soldier Fly larvae frass as organic fertilizer on ryegrass. *Heliyon*, *7*(1), e05855. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05855>
- Mohan, K., Ganesan, A. R., Muralisankar, T., Jayakumar, R., Sathishkumar, P., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., & Revathi, N. (2020). Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in Food Science & Technology*, *105*, 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.016>
- Moletta, R. (2015). *La méthanisation (2e éd.)*. Lavoisier. <https://books.google.ca/books?id=e0qBbD1DeSUC>
- Möller, K., & Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review: Digestate nutrient availability. *Engineering in Life Sciences*, *12*(3), 242–257. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100085>
- Monlau, F., Sambusiti, C., Antoniou, N., Barakat, A., & Zabaniotou, A. (2015). A new concept for enhancing energy recovery from agricultural residues by coupling anaerobic digestion and pyrolysis process. *Applied Energy*, *148*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.03.024>
- Mwene-Mbeja, T. M., Dufour, A., Lecka, J., Kaur, B. S., & Vaneeckhaute, C. (2020). Enzymatic reactions in the production of biomethane from organic waste. *Enzyme and Microbial Technology*, *132*, 109410. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109410>
- Myers, H. M., Tomberlin, J. K., Lambert, B. D., & Kattes, D. (2008). Development of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Fed Dairy Manure. *Environmental Entomology*, *37*(1), 11–15. <https://doi.org/10.1093/ee/37.1.11>
- Nguyen, T. T. X., Tomberlin, J. K., & Vanlaerhoven, S. (2015). Ability of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae to Recycle Food Waste. *Environmental Entomology*, *44*(2), 406–410. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002>
- Nkoa, R. (2014). Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *34*(2), 473–492. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0196-z>
- Norouzi, O., & Dutta, A. (2022). The Current Status and Future Potential of Biogas Production from Canada's Organic Fraction Municipal Solid Waste. *Energies*, *15*(2), 475. <https://doi.org/10.3390/en15020475>
- Ntinias, G. K., Bantis, F., Koukounaras, A., & Kougiyas, P. G. (2021). Exploitation of Liquid Digestate as the Sole Nutrient Source for Floating Hydroponic Cultivation of Baby Lettuce (*Lactuca sativa*) in Greenhouses. *Energies*, *14*(21), 7199. <https://doi.org/10.3390/en14217199>

- Nyakeri, E. M., Ayieko, M., Amimo, F., Salum, H., & Ogola, H. J. O. (2019). *An optimal feeding strategy for black soldier fly larvae biomass production and faecal sludge reduction*. <https://doi.org/10.3920/JIFF2018.0017>
- O'Brien, B. J., Milligan, E., Carver, J., & Roy, E. D. (2019). Integrating anaerobic co-digestion of dairy manure and food waste with cultivation of edible mushrooms for nutrient recovery. *Bioresource Technology*, 285, 121312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121312>
- O'Connor, J., Mickan, B. S., Rinklebe, J., Song, H., Siddique, K. H. M., Wang, H., Kirkham, M. B., & Bolan, N. S. (2022). Environmental implications, potential value, and future of food-waste anaerobic digestate management: A review. *Journal of Environmental Management*, 318, 115519. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115519>
- OFA. (2012). *Biomass Crop Residues Availability for Bioprocessing* (p. 74). Ontario Federation of Agriculture. https://ofa.on.ca/wp-content/uploads/2017/11/Biomass_Crop_Residues_Availability_for_Bioprocessing_Final_Oct_2_2012.pdf
- Ojha, S., Bußler, S., & Schlüter, O. K. (2020). Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management*, 118, 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.010>
- Oliveira, F., Doelle, K., List, R., & O'Reilly, J. R. (2015). Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 3(5), 147–152.
- Oonincx, D. G. A. B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J. J. A., & van Huis, A. (2010). An Exploration on Greenhouse Gas and Ammonia Production by Insect Species Suitable for Animal or Human Consumption. *PLoS ONE*, 5(12), e14445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>
- Ordoñez-Araque, R., & Egas-Montenegro, E. (2021). Edible insects: A food alternative for the sustainable development of the planet. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 23, 100304. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100304>
- Oyededeji, O., Gitman, P., Qu, J., & Webb, E. (2020). Understanding the Impact of Lignocellulosic Biomass Variability on the Size Reduction Process: A Review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(6), 2327–2343. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06698>
- Parra Paz, A. S., Carrejo, N. S., & Gómez Rodríguez, C. H. (2015). Effects of Larval Density and Feeding Rates on the Bioconversion of Vegetable Waste Using Black Soldier Fly Larvae *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae). *Waste and Biomass Valorization*, 6(6), 1059–1065. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9418-8>
- Pas, C., Brodeur, D., Deschamps, M.-H., Lebeuf, Y., Adjalle, K., Barnabé, S., Eeckhout, M., Vandenberg, G., & Vaneckhaute, C. (2022). Valorization of pretreated biogas digestate with black soldier fly (*Hermetia illucens*, L; Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Journal of Environmental Management*, 319, 115529. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115529>
- Patria, R. D., Wong, J. W. C., Johnravindar, D., Uisan, K., Kumar, R., & Kaur, G. (2021). Food Waste Digestate-Based Biorefinery Approach for Rhamnolipids Production: A Techno-Economic Analysis. *Sustainable Chemistry*, 2(2), 237–253. <https://doi.org/10.3390/suschem2020014>
- Peguero, D. A., Gold, M., Endara, A., Niu, M., Zurbrügg, C., & Mathys, A. (2023). Evaluation of ammonia pretreatment of four fibrous biowastes and its effect on black soldier fly larvae rearing performance. *Waste Management*, 160, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.01.033>

- Peguero, D. A., Gold, M., Vandeweyer, D., Zurbrügg, C., & Mathys, A. (2022). A review of pretreatment methods to improve agri-food waste bioconversion by black soldier fly larvae. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 549. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.745894>
- Pelayo Lind, O., Hultberg, M., Bergstrand, K.-J., Larsson-Jönsson, H., Caspersen, S., & Asp, H. (2021). Biogas Digestate in Vegetable Hydroponic Production: PH Dynamics and pH Management by Controlled Nitrification. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 123–133. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00965-y>
- Pramanik, S. K., Suja, F. B., Zain, S. M., & Pramanik, B. K. (2019). The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. *Bioresource Technology Reports*, 8, 100310. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100310>
- Primmer, N. (2021). *Biogas: Pathways to 2030*. World Biogas Association.
- Rahmani, A. M., Tyagi, V. K., Gunjyal, N., Kazmi, A. A., Ojha, C. S. P., & Moustakas, K. (2023). Hydrothermal and thermal-alkali pretreatments of wheat straw: Co-digestion, substrate solubilization, biogas yield and kinetic study. *Environmental Research*, 216, 114436. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114436>
- Raksasat, R., Lim, J. W., Kiatkittipong, W., Kiatkittipong, K., Ho, Y. C., Lam, M. K., Font-Palma, C., Zaid, H. F. M., & Cheng, C. K. (2020). A review of organic waste enrichment for inducing palatability of black soldier fly larvae: Wastes to valuable resources. *Environmental Pollution*, 267, 115488. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115488>
- Recyc-Québec. (2018). *Matières organiques—Fiche informative*. <https://www.recyc-quebec.gouv.qc.ca/>
- Rehman, K. ur, Cai, M., Xiao, X., Zheng, L., Wang, H., Soomro, A. A., Zhou, Y., Li, W., Yu, Z., & Zhang, J. (2017). Cellulose decomposition and larval biomass production from the co-digestion of dairy manure and chicken manure by mini-livestock (*Hermetia illucens* L.). *Journal of Environmental Management*, 196, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.03.047>
- Rehman, K. ur, Hollah, C., Wiesotzki, K., Rehman, R. ur, Rehman, A. U., Zhang, J., Zheng, L., Nienaber, T., Heinz, V., & Aganovic, K. (2023). Black soldier fly, *Hermetia illucens* as a potential innovative and environmentally friendly tool for organic waste management: A mini-review. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*, 41(1), 81–97. <https://doi.org/10.1177/0734242X221105441>
- Ritigala, T., Demissie, H., Chen, Y., Zheng, J., Zheng, L., Zhu, J., Fan, H., Li, J., Wang, D., & Weragoda, S. K. (2021). Optimized pre-treatment of high strength food waste digestate by high content aluminum-nanocluster based magnetic coagulation. *Journal of Environmental Sciences*, 104, 430–443. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.12.027>
- Rodríguez, P., Cerda, A., Font, X., Sánchez, A., & Artola, A. (2019). Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*. *Waste Management*, 93, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.026>
- Ronga, D., Setti, L., Salvarani, C., De Leo, R., Bedin, E., Pulvirenti, A., Milc, J., Pecchioni, N., & Francia, E. (2019). Effects of solid and liquid digestate for hydroponic baby leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation. *Scientia Horticulturae*, 244, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.037>
- Rouches, E., Zhou, S., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2016). White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. *Process Biochemistry*, 51(11), 1784–1792. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.003>
- Salam, M., Shahzadi, A., Zheng, H., Alam, F., Nabi, G., Dezhi, S., Ullah, W., Ammara, S., Ali, N., & Bilal, M. (2022). Effect of different environmental conditions on the growth and development of Black Soldier Fly Larvae and its utilization in solid waste management and pollution mitigation. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102649. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102649>

- Samoraj, M., Mironiuk, M., Izydorczyk, G., Witek-Krowiak, A., Szopa, D., Moustakas, K., & Chojnacka, K. (2022). The challenges and perspectives for anaerobic digestion of animal waste and fertilizer application of the digestate. *Chemosphere*, 295, 133799. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133799>
- Sarker, T. R., Pattnaik, F., Nanda, S., Dalai, A. K., Meda, V., & Naik, S. (2021). Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*, 284, 131372. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131372>
- Schimpf, U., Schrader, A., Hübner, A., Schulz, R., & Neubauer, P. (2019). Utilisation of solid digestate from acidification reactors of continues two-stage anaerobic digestion processes in *Lentinula edodes* cultivation. *Bioresource Technology Reports*, 8, 100322. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100322>
- Sfetsas, T., Patsatzis, S., Chioti, A., Kopteropoulos, A., Dimitropoulou, G., Tsioni, V., & Kotsopoulos, T. (2022). A review of advances in valorization and post-treatment of anaerobic digestion liquid fraction effluent. *Waste Management and Research*, 40(8), 1093–1109. <https://doi.org/10.1177/0734242X211073000>
- Sharma, S., Nandal, P., & Arora, A. (2019). Ethanol Production from NaOH Pretreated Rice Straw: A Cost Effective Option to Manage Rice Crop Residue. *Waste and Biomass Valorization*, 10(11), 3427–3434. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0360-4>
- Shi, L., Simplicio, W. S., Wu, G., Hu, Z., Hu, H., & Zhan, X. (2018). Nutrient Recovery from Digestate of Anaerobic Digestion of Livestock Manure: A Review. *Current Pollution Reports*, 4(2), 74–83. <https://doi.org/10.1007/s40726-018-0082-z>
- Shumo, M., Khamis, F. M., Tanga, C. M., Fiaboe, K. K. M., Subramanian, S., Ekesi, S., van Huis, A., & Borgemeister, C. (2019). Influence of Temperature on Selected Life-History Traits of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Reared on Two Common Urban Organic Waste Streams in Kenya. *Animals*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/ani9030079>
- Siddiqui, S. A., Ristow, B., Rahayu, T., Putra, N. S., Widya Yuwono, N., Nisa', K., Mategeko, B., Smetana, S., Saki, M., Nawaz, A., & Nagdalian, A. (2022). Black soldier fly larvae (BSFL) and their affinity for organic waste processing. *Waste Management*, 140, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.12.044>
- Singh, N. K., Shahi, K., Kumar, K., & Suthar, S. (2021). Enhanced vermicomposting of leaf litter by white-rot fungi pretreatment and subsequent feeding by *Eisenia fetida* under a two-stage process. *Bioresource Technology Reports*, 13, 100609. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100609>
- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). Biosurfactant production: Emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Södergren, J., Larsson, C. U., Wadsö, L., Bergstrand, K.-J., Asp, H., Hultberg, M., & Schelin, J. (2022). Food waste to new food: Risk assessment and microbial community analysis of anaerobic digestate as a nutrient source in hydroponic production of vegetables. *Journal of Cleaner Production*, 333, 130239. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130239>
- Soetemans, L., Uyttebroek, M., & Bastiaens, L. (2020). Characteristics of chitin extracted from black soldier fly in different life stages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 3206–3214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.041>
- Song, S., Ee, A. W. L., Tan, J. K. N., Cheong, J. C., Chiam, Z., Arora, S., Lam, W. N., & Tan, H. T. W. (2021). Upcycling food waste using black soldier fly larvae: Effects of further composting on frass quality, fertilising effect and its global warming potential. *Journal of Cleaner Production*, 288, 125664. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125664>
- Sprangers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Owyn, A., Deboosere, S., De Meulenaer, B., Michiels, J., Eeckhout, M., De Clercq, P., & De Smet, S. (2017). Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*

-) prepupae reared on different organic waste substrates: Nutritional composition of black soldier fly. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>
- Statistics Canada. (2022). *Corn, sweet corn*. <https://www.statcan.gc.ca/o1/en/plus/1526-corn-sweet-corn>
- Stiles, W. A. V., Styles, D., Chapman, S. P., Esteves, S., Bywater, A., Melville, L., Silkina, A., Lupatsch, I., Fuentes Grünewald, C., Lovitt, R., Chaloner, T., Bull, A., Morris, C., & Llewellyn, C. A. (2018). Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 267, 732–742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.100>
- Surendra, K. C., Olivier, R., Tomberlin, J. K., Jha, R., & Khanal, S. K. (2016). Bioconversion of organic wastes into biodiesel and animal feed via insect farming. *Renewable Energy*, 98, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.022>
- Tambone, F., Terruzzi, L., Scaglia, B., & Adani, F. (2015). Composting of the solid fraction of digestate derived from pig slurry: Biological processes and compost properties. *Waste Management*, 35, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.10.014>
- Tan, J. K. N., Lee, J. T. E., Chiam, Z., Song, S., Arora, S., Tong, Y. W., & Tan, H. T. W. (2021). Applications of food waste-derived black soldier fly larval frass as incorporated compost, side-dress fertilizer and frass-tea drench for soilless cultivation of leafy vegetables in biochar-based growing media. *Waste Management*, 130, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.05.025>
- Teglia, C., Tremier, A., & Martel, J.-L. (2011). Characterization of Solid Digestates: Part 2, Assessment of the Quality and Suitability for Composting of Six Digested Products. *Waste and Biomass Valorization*, 2(2), 113–126. <https://doi.org/10.1007/s12649-010-9059-x>
- Tomberlin, J. K., Adler, P. H., & Myers, H. M. (2009). Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) in Relation to Temperature. *Environmental Entomology*, 38(3), 930–934. <https://doi.org/10.1603/022.038.0347>
- Törnwall, E., Pettersson, H., Thorin, E., & Schwede, S. (2017). Post-treatment of biogas digestate – An evaluation of ammonium recovery, energy use and sanitation. *Energy Procedia*, 142, 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.12.153>
- Torrisi, B., Allegra, M., Amenta, M., Gentile, F., Rapisarda, P., Fabroni, S., & Ferlito, F. (2021). Physico-chemical and multielemental traits of anaerobic digestate from Mediterranean agro-industrial wastes and assessment as fertiliser for citrus nurseries. *Waste Management*, 131, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.06.007>
- United Nations. (2022). *World Population Prospects—Population Division—United Nations*. <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/900>
- Urbanowska, A., Polowczyk, I., Kabsch-Korbutowicz, M., & Seruga, P. (2020). Characteristics of Changes in Particle Size and Zeta Potential of the Digestate Fraction from the Municipal Waste Biogas Plant Treated with the Use of Chemical Coagulation/Precipitation Processes. *Energies*, 13(22), 5861. <https://doi.org/10.3390/en13225861>
- Van Huis, A. (2020). Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: A review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(1), 27–44. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0017>
- Van Huis, A. (2022). Edible insects: Challenges and prospects. *Entomological Research*, 52(4), 161–177. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12582>
- Van Huis, Joost Van Itterbeeck, Harmke Klunder, Esther Mertens, Afton Halloran, Giulia Muir, & Paul Vantomme. (2013). *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Vaneekhaute, C., Lebuf, V., Michels, E., Belia, E., Vanrolleghem, P. A., Tack, F. M. G., & Meers, E. (2017). Nutrient Recovery from Digestate: Systematic Technology Review and Product Classification. *Waste and Biomass Valorization*, 8(1), 21–40. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9642-x>
- Vaneekhaute, C., Meers, E., Michels, E., Buysse, J., & Tack, F. M. G. (2013). Ecological and economic benefits of the application of bio-based mineral fertilizers in modern agriculture. *Biomass and Bioenergy*, 49, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.036>
- Varma, V. S., Parajuli, R., Scott, E., Canter, T., Lim, T. T., Popp, J., & Thoma, G. (2021). Dairy and swine manure management – Challenges and perspectives for sustainable treatment technology. *Science of The Total Environment*, 778, 146319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146319>
- Veldkamp, T., van Rozen, K., Elissen, H., van Wikselaar, P., & van der Weide, R. (2021). Bioconversion of Digestate, Pig Manure and Vegetal Residue-Based Waste Operated by Black Soldier Fly Larvae, *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae). *Animals*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/ani11113082>
- Wang, Y.-S., & Shelomi, M. (2017). Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food. *Foods*, 6(10), 91. <https://doi.org/10.3390/foods6100091>
- Warnars, L., & Oppenoorth, H. (2014). *A study on bioslurry results and uses* (Kelly Atkinson). Hivos. Editing: Kelly Atkinson Design: SAZZA Printing: Deltahage. ISBN/EAN 978-90-70435-07-3
- Wee, C. Y., & Su, J.-J. (2019). Biofuel Produced from Solid-State Anaerobic Digestion of Dairy Cattle Manure in Coordination with Black Soldier Fly Larvae Decomposition. *Energies*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/en12050911>
- Wong, C. Y., Ho, Y. C., Lim, J. W., Show, P. L., Chong, S., Chan, Y. J., Ho, C. D., Mohamad, M., Wu, T. Y., Lam, M. K., & Pan, G. T. (2020a). In-Situ Yeast Fermentation Medium in Fortifying Protein and Lipid Accumulations in the Harvested Larval Biomass of Black Soldier Fly. *Processes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/pr8030337>
- Wong, C. Y., Lim, J. W., Chong, F. K., Lam, M. K., Uemura, Y., Tan, W. N., Bashir, M. J. K., Lam, S. M., Sin, J. C., & Lam, S. S. (2020b). Valorization of exo-microbial fermented coconut endosperm waste by black soldier fly larvae for simultaneous biodiesel and protein productions. *Environmental Research*, 185, 109458. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109458>
- Wong, C. Y., Mohd Aris, M. N., Daud, H., Lam, M. K., Yong, C. S., Abu Hasan, H., Chong, S., Show, P. L., Hajoeningtijas, O. D., Ho, Y. C., Goh, P. S., Kausarian, H., Pan, G.-T., & Lim, J. W. (2020c). In-Situ Yeast Fermentation to Enhance Bioconversion of Coconut Endosperm Waste into Larval Biomass of *Hermetia illucens*: Statistical Augmentation of Larval Lipid Content. *Sustainability*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/su12041558>
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T. A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., Zhao, Y., & Song, C. (2022). Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere*, 286, 131635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131635>
- Wu, N., Wang, X., Xu, X., Cai, R., & Xie, S. (2020). Effects of heavy metals on the bioaccumulation, excretion and gut microbiome of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110323>
- Yang, F., Li, G. X., Yang, Q. Y., & Luo, W. H. (2013). Effect of bulking agents on maturity and gaseous emissions during kitchen waste composting. *Chemosphere*, 93(7), 1393–1399. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.002>
- Yang-Jie, D., Xiang, F.-M., Tao, X.-H., Jiang, C.-L., Zhang, T.-Z., & Zhang, Z.-J. (2023). A full-scale black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) bioconversion system for domestic biodegradable wastes to

- resource. *Waste Management & Research*, 41(1), 143–154. <https://doi.org/10.1177/0734242X221103936>
- Zeng, Y., De Guardia, A., & Dabert, P. (2016). Improving composting as a post-treatment of anaerobic digestate. *Bioresource Technology*, 201, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.013>
- Zhang, H., Han, L., & Dong, H. (2021). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 140, 110758. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>
- Zhang, J., Zhang, J., LI, J., Tomerlin, J. K., Xiao, X., REHMAN, K. ur, CAI, M., ZHENG, L., & YU, Z. (2021). Black soldier fly: A new vista for livestock and poultry manure management. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(5), 1167–1179. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63423-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63423-2)
- Zhang, Z., Chen, L., Yang, K., Wang, T., Wang, Y., Jia, Y., Yin, Y., Gu, P., & Miao, H. (2022). Toxic effects of industrial flocculants addition on bioconversion of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.). *Insects*, 13(8), 683.
- Zheng, L., Hou, Y., Li, W., Yang, S., Li, Q., & Yu, Z. (2012). Biodiesel production from rice straw and restaurant waste employing black soldier fly assisted by microbes. *Energy*, 47(1), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.09.006>
- Zhu, J. Y. (2011). Physical Pretreatment – Woody Biomass Size Reduction – for Forest Biorefinery. In *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass* (Vol. 1067, pp. 89–107). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1067.ch004>
- Zoecklein, B. W., Kenneth C. Fugelsang, Barry H. Gump, & Fred S. Nury. (2012). *Production wine analysis*. Springer Science & Business Media.