



## Lien entre paramètres opératoires, microorganismes et performances de la digestion anaérobie par voie sèche

Amel Abbassi-Guendouz

### ► To cite this version:

Amel Abbassi-Guendouz. Lien entre paramètres opératoires, microorganismes et performances de la digestion anaérobie par voie sèche. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2012. Français. NNT: . tel-02809121

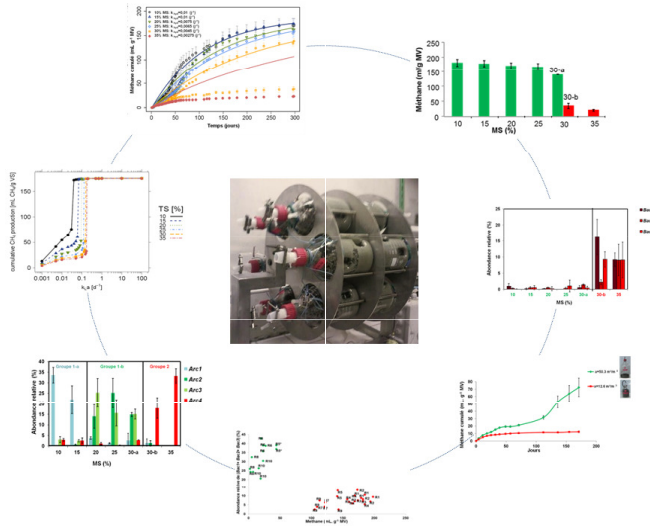
**HAL Id: tel-02809121**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02809121>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## Lien entre paramètres opératoires, microorganismes et performances de la digestion anaérobie par voie sèche

*Link between operating parameters, microorganisms and performances of  
dry anaerobic digestion*

**Amel ABBASSI-GUENDOUZ**

**UNIVERSITE MONTPELLIER 2  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

***Discipline : Biotechnologie - Microbiologie***

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

présentée et soutenue publiquement

par

***Amel ABBASSI-GUENDOUZ***

**Le 06 Avril 2012.**

**Titre :**

***LIEN ENTRE PARAMETRES OPERATOIRES, MICROORGANISMES ET  
PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE***

**JURY**

M. **Alain GRASMICK**  
M. **Jean Philippe DELGENES**  
M. **Renaud ESCUDIE**  
M. **Joan MATA-ALVAREZ**  
M. **Patrick DABERT**  
M. **Pierre BUFFIERE**

Président  
Directeur de Thèse  
Co-Directeur de Thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur



## Résumé

La digestion anaérobie est un processus de transformation de la matière organique en biogaz riche en méthane. Les déchets solides sont le plus souvent traités par une technologie par voie sèche qui est caractérisée par des teneurs en matières sèches supérieures à 20%. Du fait de la faible teneur en eau, la digestion sèche présente de nombreuses inconnues scientifiques, tant au niveau microbiologique que physico-chimique. Le but de cette thèse est de comprendre l'influence des paramètres opératoires spécifiques à la digestion anaérobie par voie sèche sur les performances et le comportement des communautés microbiennes de ce processus. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la teneur en matières sèches au-delà de 30% et la diminution de la surface spécifique d'échange ont un effet négatif sur le processus de digestion anaérobie. En effet, lorsque la teneur en matières sèches est supérieure à 30%, le transfert des gaz dissous du milieu réactionnel vers le ciel gazeux peut limiter la méthanisation. L'analyse des populations microbiennes montre la présence de traceurs bactériens liés au non fonctionnement de la digestion anaérobie. Ces microorganismes sont des *clostridii* et sont présents quel que soit l'inoculum utilisé. L'étude des populations méthanogènes montre une sensibilité de ces microorganismes à leur environnement : des shifts de populations méthanogènes ont été observés en fonction de la concentration en matières sèches. Ce travail a permis d'accroître les connaissances dans le domaine de la digestion anaérobie sèche, ces connaissances pouvant contribuer à améliorer les performances des procédés.

## Link between operating parameters, microorganisms and performances of dry anaerobic digestion

### Abstract

Anaerobic digestion is the transformation of organic matter into biogas rich in methane. Solid waste is treated by dry anaerobic digestion process with a total solid content higher than 20%. The high solids content make the process difficult to control. The aim of this work is to study the influence of operating parameters specific to dry anaerobic digestion on performances and behavior of microbial communities. The results show that increasing the solids content higher than 30% and decreasing the specific surface area of change have a negative effect on the anaerobic digestion process. Indeed, when the solids content exceeds 30%, the transfer of dissolved gas from the reaction mixture to the headspace can limit anaerobic digestion. The analysis of microbial populations demonstrates the presence of bacterial bio-indicators related to no-functioning anaerobic digestion. These bio-indicators correspond to the *clostridium* genus and are present regardless of the inoculum source. The study of methanogenic *Archaea* shows a sensitivity of these microorganisms. Shifts in the methanogenic populations related to the concentration of total solids were observed. This work has improved the fundamental knowledge of dry anaerobic digestion which can help improve the performance of this process.

**DISCIPLINE** : Biotechnologie – Microbiologie

**MOTS-CLES** : digestion anaérobie par voie sèche, bactéries, méthanogènes, bio-indicateurs, transfert de matière, matières sèches

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE** : Institut National de Recherche Agronomique

– Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA-LBE), UR050, Avenue des Etangs,



# ***SOMMAIRE***

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b>                                                         | <b>1</b>  |
| <b>I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                                                   | <b>7</b>  |
| <b>I.1. La digestion anaérobie</b>                                                   | <b>9</b>  |
| <b>I.2. Étapes de la digestion anaérobie</b>                                         | <b>10</b> |
| I.2.1. Hydrolyse                                                                     | 11        |
| I.2.2. Acidogénèse                                                                   | 12        |
| I.2.3. Acétogénèse                                                                   | 13        |
| I.2.4. Méthanogénèse                                                                 | 14        |
| I.2.4.1. Diversité des méthanogènes impliqués dans la digestion anaérobie            | 14        |
| I.2.4.2. Influence des conditions environnementales sur les communautés méthanogènes | 15        |
| <b>I.3. Paramètres opératoires en digestion anaérobie</b>                            | <b>16</b> |
| I.3.1. Température                                                                   | 16        |
| I.3.2. pH et teneur en AGV                                                           | 16        |
| I.3.3. Mélange et agitation du milieu réactionnel                                    | 17        |
| I.3.4. Humidité/concentration en matière sèche                                       | 17        |
| <b>I.4. Etat de l'art sur la Digestion Anaérobie par voie sèche</b>                  | <b>19</b> |
| I.4.1. Avant-propos :                                                                | 19        |
| I.4.2. Review and Perspectives of dry anaerobic digestion (DAD) processes            | 20        |
| I.4.2.1. Introduction                                                                | 20        |
| I.4.2.2. Fundamentals of anaerobic digestion (AD) in dry processes                   | 23        |
| I.4.2.2.1. Microbial fundamentals of DAD                                             | 23        |
| I.4.2.2.1.1. Hydrolysis and acidogenesis                                             | 24        |
| I.4.2.2.1.2. Acetogenesis                                                            | 26        |
| I.4.2.2.2. Waste composition                                                         | 29        |
| I.4.2.2.2.1. Biochemical composition                                                 | 29        |
| I.4.2.2.2.3. Modification of biochemical structure                                   | 31        |
| I.4.2.2.2.3.1. Chemical treatment                                                    | 33        |
| I.4.2.2.2.3.2. Thermal treatment                                                     | 33        |
| I.4.2.2.2.3.4. Biological treatment                                                  | 34        |
| I.4.2.2.3.1. The role of water                                                       | 35        |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| I.4.2.2.3.1.1. Different forms of water                                    | 35 |
| I.4.2.2.3.1.2. Influence of water on microbial kinetics                    | 36 |
| I.4.2.2.3.2. Size of solids                                                | 37 |
| I.4.2.2.3.3. Mixing                                                        | 38 |
| I.4.2.2.3.3.1 Rheological properties                                       | 38 |
| I.4.2.2.3.3.2. Influence of mixing on biological degradation               | 39 |
| I.4.2.3. Perspectives                                                      | 40 |
| I.4.2.3.1. Improving waste and digestate characterization                  | 40 |
| I.4.2.3.2. Assessing the efficiency of the pre-treatments                  | 41 |
| I.4.2.3.3. Understanding the role of microbial communities                 | 41 |
| I.4.2.3.4. Understanding the role of water                                 | 42 |
| I.4.2.3.5. Characterizing hydrodynamics                                    | 42 |
| I.4.2.3.6. Developing specific instrumentation, modeling and control tools | 43 |
| I.4.3. Conclusion                                                          | 43 |

## **II. MATERIEL ET METHODES 47**

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>II.1. Caractérisation du substrat et de l'inoculum</b>                        | <b>49</b> |
| II.1.1. Quantification des matières sèches et matières volatiles                 | 49        |
| II.1.2. Fractionnement selon Van Soest                                           | 49        |
| II.1.3. Potentiel méthane (BMP)                                                  | 50        |
| <b>II.2. Dispositif expérimental</b>                                             | <b>50</b> |
| <b>II.3. Suivi analytique des bioréacteurs</b>                                   | <b>53</b> |
| II.3.1. Quantification de la production du biogaz et analyse de sa composition   | 53        |
| II.3.2. AGV et pH                                                                | 53        |
| <b>II.4. Analyse de biologie moléculaire</b>                                     | <b>53</b> |
| II.4.1. Empreinte moléculaire par SSCP (Single Strand conformation Polymorphism) | 53        |
| II.4.1.1. Extraction et amplification de la région V3 de l'ADNr 16S              | 54        |
| II.4.1.2. CE-SSCP                                                                | 54        |
| II.4.2. Clonage et séquençage de l'ARNr 16S                                      | 55        |
| II.4.3. La PCR quantitative                                                      | 56        |
| <b>II.5. Modélisation par ADM1</b>                                               | <b>57</b> |

### **III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE----- 61**

|                                                                                                        |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| III.1.1. Avant-propos -----                                                                            | 63     |
| III.1.2. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation ----- | 64     |
| III.2.1.1. Introduction -----                                                                          | 64     |
| III.2.1.2. Materials and methods-----                                                                  | 66     |
| III.2.1.2.1. Substrate characterization -----                                                          | 66     |
| III.2.1.2.1.1. Van Soest fractionation -----                                                           | 66     |
| III.2.1.2.1.2. The biochemical methane potential -----                                                 | 67     |
| III.2.1.2.2. Batch preparation and operating conditions -----                                          | 67     |
| III.2.1.2.3. Analytical methods -----                                                                  | 68     |
| III.2.1.2.3.1. Biogas quantification and composition analysis-----                                     | 68     |
| III.2.1.2.3.2. VFA and pH analysis-----                                                                | 68     |
| III.2.1.2.4. Mathematical model -----                                                                  | 69     |
| III.2.1.3. Results and Discussion -----                                                                | 71     |
| III.2.1.3.1. Impact of TS content on anaerobic digestion performance -----                             | 71     |
| III.2.1.3.1.1. Methane production rate -----                                                           | 73     |
| III.2.1.3.1.2. Maximum methane yield -----                                                             | 74     |
| III.2.1.3.1.3. pH and VFA concentration -----                                                          | 75     |
| III.2.1.3.1.4. Model results -----                                                                     | 76     |
| III.2.1.4. Conclusion -----                                                                            | 83     |
| III.1.3. Discussion -----                                                                              | 83     |
| <br>III.2. Rôle clef de la surface spécifique d'échange -----                                          | <br>86 |
| III.2.1. Introduction-----                                                                             | 86     |
| III.2.2. Moyens expérimentaux mis en œuvre -----                                                       | 86     |
| III.2.3. Résultats et discussion -----                                                                 | 88     |
| <br>III.3. Conclusion-----                                                                             | <br>90 |

### **IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE----- 93**

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV.1. Avant-propos-----                                                                            | 95 |
| IV.2. Influence of total solids on Bacterial and Archaeal communities in anaerobic digestion ----- | 96 |

|                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV.2.1. Introduction -----                                                                                     | 97         |
| IV.2.2. Materials and methods-----                                                                             | 99         |
| IV.2.2.1. Chemical analysis -----                                                                              | 99         |
| IV.2.2.2. Microbial analysis-----                                                                              | 99         |
| IV.2.2.2.1. DNA extraction and 16S rRNA gene amplification -----                                               | 99         |
| IV.2.2.2.2. CE-SSCP DNA fingerprinting -----                                                                   | 100        |
| IV.2.2.2.3. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene -----                                                      | 100        |
| IV.2.2.2.4. Quantitative PCR -----                                                                             | 102        |
| IV.2.3. Results-----                                                                                           | 102        |
| IV.2.3.1. Performances Methanogenic performance of the microbial ecosystem in high solids batch tests. -----   | 102        |
| IV.2.3.2. Characterisation of the bacterial community based on CE-SSCP fingerprints analysis -----             | 103        |
| IV.2.3.3. Characterisation of the archaeal methanogenic community based on CE-SSCP fingerprints analysis ----- | 108        |
| IV.2.4. Discussion -----                                                                                       | 113        |
| IV.2.4.1. High TS content affects methane production -----                                                     | 113        |
| IV.2.4.2. Impact of high TS contents on methane production -----                                               | 114        |
| IV.2.4.2.1. Shift of the bacterial community structure when methanogenesis was inhibited -----                 | 114        |
| IV.2.4.2.2. TS content responsible of archaeal population shifts -----                                         | 115        |
| IV.2.5. Conclusion -----                                                                                       | 117        |
| <b>IV.3. Discussion -----</b>                                                                                  | <b>118</b> |

## **V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE----- 123**

|                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>V.1. Avant-propos-----</b>                                                                    | <b>125</b> |
| <b>V.2. Omnipresence of bacterial tracers linked to dry anaerobic digestion inhibition -----</b> | <b>126</b> |
| V.2.1. Introduction -----                                                                        | 126        |
| V.2.2. Materials and methods-----                                                                | 129        |
| V.2.2.1. Methane production batch test -----                                                     | 129        |
| V.2.2.2. Chemical analysis -----                                                                 | 130        |
| V.2.2.3. Microbial analysis -----                                                                | 131        |
| V.2.2.3.1. DNA extraction and 16S rRNA gene amplification -----                                  | 131        |
| V.2.2.3.2. DNA fingerprinting-----                                                               | 131        |
| V.2.2.3.3. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene-----                                          | 132        |
| V.2.3. Results -----                                                                             | 132        |
| V.2.3.1. Clustering bacterial populations according to methanogenic performances -----           | 132        |

|                                                                                               |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| V.2.3.2. Link between bacterial community structure and operating conditions -----            | 134            |
| V.2.3.3. Link between bacterial community structure and anaerobic digestion performances----- | 135            |
| V.2.4. Discussion -----                                                                       | 139            |
| <b>V.3. Discussion -----</b>                                                                  | <b>141</b>     |
| <br><b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES -----</b>                                        | <br><b>147</b> |
| <br><b>LISTES DES FIGURES -----</b>                                                           | <br><b>153</b> |
| <br><b>LISTE DES TABLEUX-----</b>                                                             | <br><b>155</b> |
| <br><b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----</b>                                                  | <br><b>156</b> |

---

## Publications scientifiques

---

**Amel Abbassi-Guendouz, Doris Brockmann, Eric Trably, Claire Dumas, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Moisture content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation », *Bioresource Technology*, (2012), 111:55-61.

**Amel Abbassi-Guendouz, Eric Trably, Jérôme Hamelin, Claire Dumas, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Behavior of micro-organisms at high solid anaerobic digestion under stress conditions », *FEMS Ecology Microbiology* (soumise)

**Amel Abbassi-Guendouz, Julien Bollon, Pierre Buffière, Eric Trably, Claire Dumas, Remi Bayard, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Review and Perspectives of dry anaerobic digestion (DAD) processes », *Bioresource Technology* (Soumise)

**Amel Abbassi-Guendouz, Jérôme Hamelin, Eric Trably, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Omnipresence of bacterial tracers linked to dry anaerobic digestion inhibition » *bioresource technology* (soumise)

**Amel Abbassi-Guendouz, Eric Trably, Jérôme Hamelin, Claire Dumas, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Influence of specific surface area of the exchange on dry anaerobic digestion » (en préparation)

## Communications

---

Présentation orale: 3<sup>rd</sup> international symposium on energy from biomass and waste (Venice 2010):

**Amel Abbassi-Guendouz, Eric Trably, Claire Dumas, Jérôme Hamelin, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Influence of total solid concentration on anaerobic digestion from wet to dry technology »

Présentation orale: 1<sup>st</sup> International Conference on Biogas Microbiology (Leipzig, 2011)

**Amel Abbassi-Guendouz, Eric Trably, Jérôme Hamelin, Claire Dumas, Jean-Philippe Delgenès, Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié** : « Influence of total solids on bacterial and archaeal communities in semi-dry and dry anaerobic digestion »



---

---

***INTRODUCTION GENERALE***

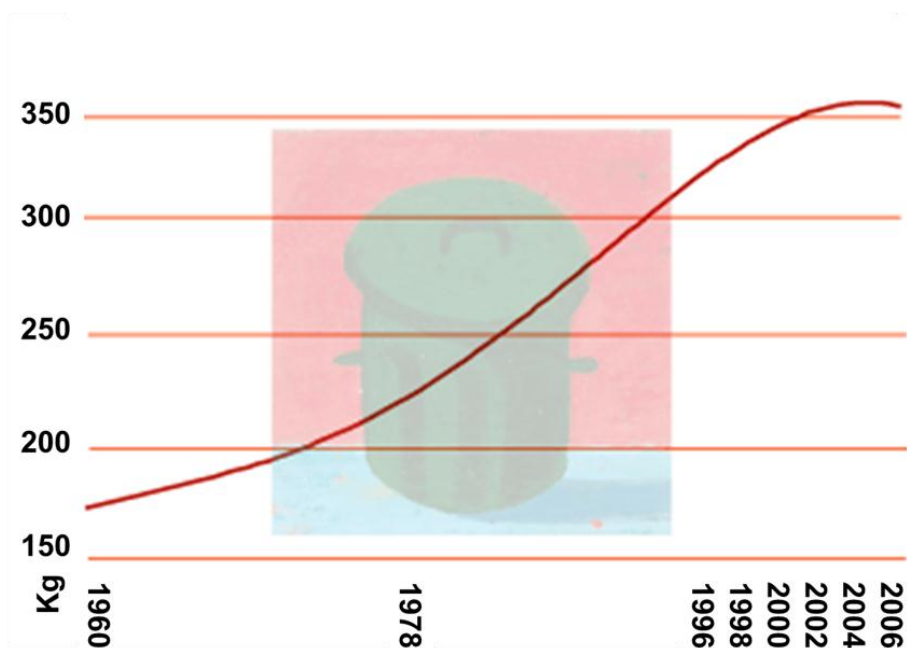
---

---

## INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

En 1800, notre planète comptait 900 millions d'habitants. En 2002, nous étions 6 milliards (ADEME) et actuellement la population planétaire est estimée à 7 milliards (Nations Unies). Cette explosion démographique est accompagnée d'une consommation excessive des ressources terrestres induisant une grande production de déchets. En 1990, la production mondiale de déchets ménagers s'élevait à environ un milliard de tonnes et elle est en augmentation continue. Les Français produisent 30 millions de tonnes de déchets ménagers comprenant 6 millions de tonnes d'encombrants et de déchets verts et 22 millions de tonnes d'ordures ménagères. (ADEME, 2007). La production d'ordures ménagères en France a doublé en quarante ans. Même si depuis 2002 la production de déchets connaît une stabilisation, chaque habitant produit tout de même en moyenne un peu plus de 350 kg d'ordures ménagères par an (Figure I-1). Si aucun traitement n'est appliqué aux déchets, la matière organique se décompose lentement, ce qui génère des gaz à effet de serre dans l'atmosphère.



**Figure I-1 : Progression de la production d'OM par habitant en provenance stricte des ménages (ADEME, 2007).**

La digestion anaérobie est un processus biologique qui permet la dégradation de la matière organique en absence d'oxygène. La mise en œuvre dans des bioprocédés

## INTRODUCTION GENERALE

permet : (i) la transformation de la matière organique en biogaz riche en méthane qui représente une source d'énergie renouvelable et multifonctionnelle, (ii) la diminution de la quantité de déchets, ainsi que (iii) la limitation du risque de diffusion du gaz à effet de serre provenant de la dégradation non contrôlée de la matière organique dans l'environnement. Le processus de digestion anaérobie comprend une succession d'étapes réalisées par différents groupes microbiens. Un des produits finaux de la digestion anaérobie est le méthane.

Selon la teneur en matières sèches, il existe trois types de technologies de digestion anaérobie des déchets solides : la digestion anaérobie humide, la digestion anaérobie semi-sèche et la digestion anaérobie par voie sèche (Forester *et al.* , 2008 ; Montero *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2010 ; P. Vandevivere *et al.*, 2000). Cette dernière est la technologie la plus appropriée pour le traitement des déchets ménagers. Malgré les avantages évidents de la digestion anaérobie par voie sèche dans le traitement des déchets ménagers (réduction de la taille des réacteurs, de la quantité d'eau utilisée...), cette technologie reste mal maîtrisée et comporte de nombreuses inconnues du fait de la faible teneur en eau qui limite, entre autres, l'homogénéisation des milieux réactionnels ainsi que l'activité microbienne.

Le but de cette thèse est d'améliorer les connaissances dans le domaine de la digestion anaérobie par voie sèche afin de mieux maîtriser ce procédé. Ces recherches ont été menées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, au sein de l'Objet Thématique « Biodisponibilité, Biodégradabilité et Cotraitements (Bio2Co) ». Cette thèse a été financée dans le cadre du projet ANR ANAMIX (programme Bioénergie), qui implique également l'INSA de Lyon et Valorga international qui commercialise des digesteurs anaérobies avec une technologie voie sèche.

Les principaux résultats de ce travail de thèse sont détaillés dans des chapitres spécifiques. Ils sont principalement constitués de publications soumises ou en cours de soumission. Chaque publication sera introduite par un avant-propos et suivie par une discussion plus approfondie que celle incluse dans l'article. La structure du document est la suivante.

## INTRODUCTION GENERALE

Les questionnements scientifiques spécifiques au sujet de thèse seront précisés à l'issue du chapitre bibliographique (Chapitre I). Le chapitre bibliographique contient en partie une revue qui résume l'état de l'art de la digestion anaérobie par voie sèche.

Le Chapitre II traite du matériel et méthodes utilisés pour répondre aux questions scientifiques.

Dans un premier temps, des expériences ont été réalisées en réacteurs batchs afin d'étudier les paramètres opératoires les plus susceptibles d'influencer la digestion anaérobie par voie sèche. Les liens entre concentrations en matières sèches et performances, et entre surface spécifique d'échange (interface milieu réactionnel/phase gazeuse) et performances ont été mis en évidence. Les résultats obtenus font l'objet d'un premier chapitre de résultats (Chapitre III).

Le rôle de la concentration en matières sèches sur les microorganismes impliqués dans le processus de digestion anaérobie a ensuite été recherché. Un changement des communautés microbiennes en lien avec la concentration en matières sèches et les performances de la DA a été observé. Les résultats obtenus seront décrits dans le chapitre IV.

Dans l'optique d'élargir et de généraliser les conclusions obtenues suite aux travaux exposés dans le chapitre IV, la recherche d'un lien entre la composition en microorganismes et les performances en terme de production de biogaz a été réalisée pour des réacteurs inoculés avec différentes sources. Ceci a permis de définir des traceurs microbiens liés aux performances de la digestion anaérobie. Ces résultats sont présentés dans le chapitre V.

## INTRODUCTION GENERALE

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

---

### ***I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

---

---

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1. La digestion anaérobie

La Digestion Anaérobie (DA) est le processus de dégradation de la matière organique par des microorganismes en condition anaérobie. Le produit final de la DA est du biogaz composé principalement de méthane (50-70%) et de CO<sub>2</sub> (30-50%). Les procédés de la DA sont très utilisés dans le traitement des déchets agricoles, ménagers, alimentaires et des boues des stations d'épuration des eaux usées. La DA permet la réduction de la matière organique en produisant une énergie renouvelable.

L'histoire de la DA remonte à 2000 ans, pour le traitement des déjections animales en Chine et en Inde (Veenstra, 2000). Plus tard, après la découverte des émissions de méthane provenant des habitats naturels anaérobies par Volta en 1776, des biogaz produits « naturellement » ont été collectés pour être utilisés comme un combustible, essentiellement pour l'éclairage. Il a ensuite fallu attendre la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle pour que la digestion anaérobie soit appliquée pour le traitement des eaux usées et des déchets solides (Gijzen, 2002).

Plusieurs technologies sont utilisées pour le traitement des ordures ménagères: l'incinération, le stockage en décharge, le compostage, et la digestion anaérobie. Le traitement thermique et l'enfouissement en installation de stockage de déchets représentent plus de 80% du devenir des OM. Le tri et le recyclage traitent 13% des OM ; quant au compostage et la méthanisation, ils ne centralisent que 6% du gisement (Figure I-2) (ADEME, 2007).

La digestion anaérobie représente la plus faible proportion des technologies utilisées pour le traitement des déchets ménagers (ADEME, 2004). Pourtant elle comporte plusieurs avantages, notamment :

- la diminution de la quantité de déchets organiques,
- la valorisation de la matière organique et la production d'énergie,
- l'énergie produite est renouvelable et permet de diminuer les émissions de gaz à effet de serre issues des énergies fossiles,
- une faible emprise au sol des unités de traitement et l'existence d'installations compactes en cas de DA par voie sèche,

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

- une réduction des nuisances olfactives, et des risques microbiologiques et climatiques.

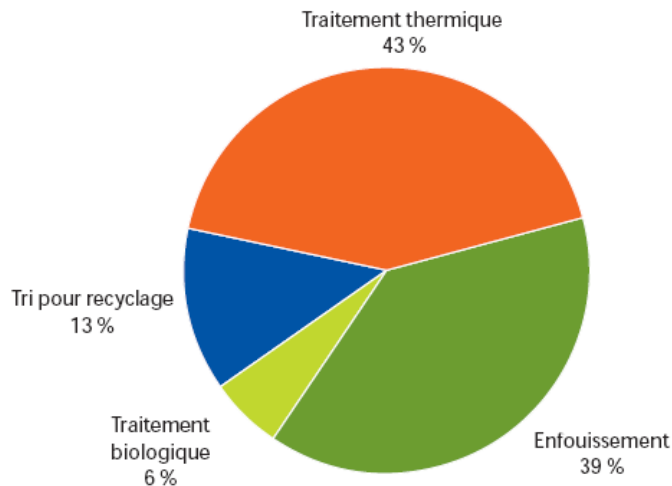


Figure I-2: Mode de traitement des OM (ADEME 2007).

### I.2. Étapes de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie de substrats organiques peut se schématiser en quatre étapes : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse, et enfin la méthanogénèse (Figure I-3). Les espèces microbiennes impliquées dans la DA des matières organiques peuvent différer d'un environnement à l'autre, en fonction de propriétés physico-chimiques, de la température, du pH, de la pression osmotique ou de la composition du substrat (Garcia *et al.*, 2000). La concentration des bactéries anaérobies dans un digesteur type est souvent supérieure à  $10^{16}$  cellules / mL. Cette population se compose de bactéries saccharolytiques ( $\sim 10^8$  cellules / mL), de bactéries protéolytiques ( $\sim 10^6$  cellules / mL), de bactéries lipolytiques ( $\sim 10^5$  cellules / mL), et de méthanogènes ( $\sim 10^8$  cellules / mL) (Gerardi, 2003).

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

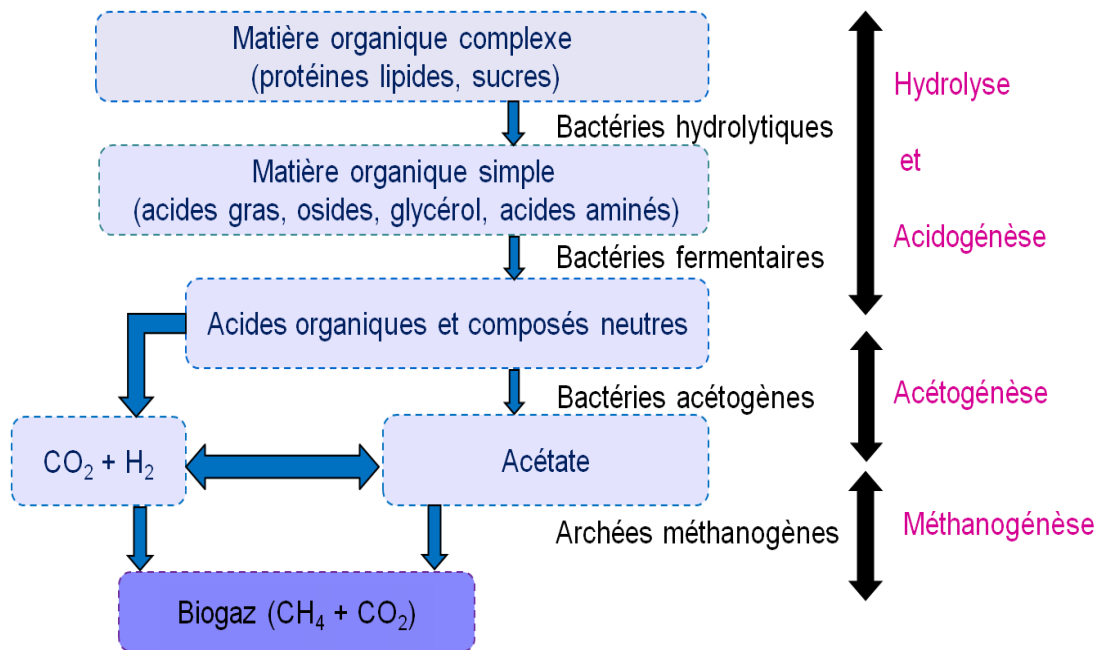


Figure I-3: Principaux processus et étapes de dégradation anaérobie de la matière organique.

### I.2.1. Hydrolyse

L'hydrolyse est le processus de transformation de la matière organique complexe en molécules plus simples assimilables par les microorganismes. L'hydrolyse est principalement réalisée par des bactéries. Dans le cas spécifique du rumen, des champignons anaérobies peuvent également contribuer à l'hydrolyse (Nsereko *et al.*, 2000). La dégradation est réalisée par l'intermédiaire d'enzymes produits par ces microorganismes. L'hydrolyse des molécules complexes est catalysée par plusieurs enzymes extra-cellulaires telles que les cellulases, protéases ou lipases. La phase hydrolytique de dégradation des composés les plus récalcitrants comme la lignine, la cellulose et les parois cellulaires viables est relativement lente et peut être limitante dans la DA de substrats solides (Polprasert, 1989).

Les micro-organismes capables de dégrader les composés ligno-cellulosiques sont trouvés parmi une large gamme de groupes taxonomiques. Beaucoup de bactéries aérobies et anaérobies sont cellulolytiques : les *Actinomycetales* (aérobie, phylum des

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

*Actinobacteria*) et les *Clostridiales* (Firmicutes, anaérobie). Les micro-organismes anaérobies cellulolytiques sont principalement trouvés dans les genres *Acetivibrio*, *Anaerocellum*, *Butyrivibrio*, *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fervidobacterium*, *Halocella*, *Spirochaeta*, *Thermotoga*, *Fibrobacter* et *Ruminococcus*... (Lynd *et al.*, 2002; Burrell *et al.*, 2004).

Cependant, la dégradation de la cellulose n'est pas une réaction qui permet un gain d'énergie aux microorganismes. Pour que cette réaction soit bénéfique pour les bactéries, il est nécessaire que les bactéries hydrolytiques transforment les molécules simples issues de la dégradation en Acides Gras Volatils (AGV) (O'Sullivan *et al.*, 2005).

### I.2.2. Acidogénèse

Les produits issus de l'hydrolyse sont transformés en acides organiques et en alcool par des bactéries acidogènes (Kim *et al.*, 2011). Les principaux produits de l'acidogénèse sont des AGV: l'acide formique, acétique, propionique, butyrique, iso-butyrique, valérique et iso-valérique, caproïque et iso-caproïque. D'autres composés sont également formés: l'éthanol, le lactate, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>... (Kim *et al.*, 2011). Les bactéries acidogènes ont un taux de croissance 30 à 40 fois plus élevé que celui des méthanogènes, et elles peuvent survivre à des conditions extrêmes telles qu'un pH bas ou une température élevée. Il a été reporté qu'un déséquilibre ou une forte croissance des espèces acidogènes par rapport aux méthanogènes peut causer une accumulation de produits intermédiaires défavorables à la croissance des méthanogènes. Un tel déséquilibre entre les populations microbiennes peut nuire aux performances de la DA. Cet équilibre dépend énormément de l'établissement d'une communauté microbienne adaptée lors du démarrage de la digestion anaérobie (McMahon *et al.*, 2001, 2004)

L'implication de beaucoup de groupes bactériens dans l'acidogénèse a été mise en évidence: *Lactobacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium sp.*, *Zymomonas mobilis*, *Eubacterium sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Acetobacterium sp.*, *Syntrophomonas wolfei*... (Amani *et al.*, 2010)

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.2.3. Acétogénèse

L'acétogénèse correspond à la transformation des produits issus de l'acidogénèse en acétate,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ . Ce sont les seuls substrats qui peuvent être métabolisés efficacement par les méthanogènes. Cette réaction est réalisée par des bactéries dites acétogènes. Il existe deux groupes de bactéries acétogènes.

Les acétogènes productrices obligatoires d'oxygène (OHPA : Obligate Hydrogen Producing Acetogens) utilisent les AGV, l'alcool et les acides gras à plus longues chaînes pour produire de : acétate,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ . D'un point de vue thermodynamique, l'énergie ( $\Delta G$ ) nécessaire à l'oxydation des AGV et à la production d'hydrogène ne permet pas aux OHPA de supporter de fortes concentrations en hydrogène. C'est pour cette raison qu'une interaction entre les bactéries OHPA et des microorganismes consommateurs d'hydrogène tels que les méthanogènes hydrogénotrophes est indispensable pour l'équilibre de la réaction de DA. La relation entre les OHPA et les espèces consommatrices d'hydrogène correspond à une relation syntrophique. L'équilibre de la réaction de méthanisation est important et en même temps fragile. L'accumulation d'inhibiteurs peut être un obstacle à la réalisation de la réaction (Mara et Horan, 2003). Dans les environnements méthanogènes, la pression en hydrogène doit être inférieure à  $10^{-4}$  atm pour stimuler les OHPA. Parmi les espèces identifiées comme OHPA, on retrouve les *Syntrophomonas wolfei* et les *Syntrophobacter wolinii* (Mara et Horan, 2003).

Le deuxième groupe des bactéries acétogènes est constitué par les bactéries homoacétogènes. Elles utilisent l' $\text{H}_2$  et le  $\text{CO}_2$  pour la production d'acétate. Ce sont également des espèces syntrophiques qui participent à la diminution de la quantité d'hydrogène. Les bactéries homoacétogènes sont trouvées dans les genres : *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butiribacterium*, *Clostridium* (Mara et Horan, 2003).

Les bactéries homoacétogènes sont en compétition directe avec les méthanogènes hydrogénotrophes (utilisatrice de  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ ) et interagissent syntrophiquement avec les méthanogènes acétoclastes (Liu et Conrad, 2011). La méthanogénèse réalisée par les archées méthanogènes hydrogénotrophes ( $\Delta G = 130$  kJ/mole) est plus exergonique que l'homoacétogénèse ( $\Delta G = 95$  kJ/ mole) (Liu et Conrad, 2011). Ces deux réactions sont

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

plus exergoniques pour de faibles températures. Cependant, les bactéries homoacétogènes semblent être mieux adaptées aux basses températures que les méthanogènes (Kotsyurbenko *et al.*, 2001).

### I.2.4. Méthanogenèse

Le méthane atmosphérique est de 70-80% d'origine biologique, et il est produit par les méthanogènes issus d'environnement naturel, principalement les sols, les sédiments submergés et le tube digestif de nombreuses espèces animales (Moletta, 2008). Phylogénétiquement, les méthanogènes sont des Archaea. Ils comportent des espèces thermophiles extrémophiles et halophiles extrémophiles, ainsi que certaines espèces soufre dépendantes (Zinder, 1993). L'isolement des méthanogènes en laboratoire est difficile à réaliser du fait de la méconnaissance de leurs besoins de croissance. Les archées méthanogènes vivent en association avec d'autres espèces bactériennes. Ces microorganismes comportent divers métabolismes trophiques.

#### I.2.4.1. Diversité des méthanogènes impliqués dans la digestion anaérobie

Les méthanogènes sont des microorganismes anaérobies strictes. Ils utilisent une biochimie complexe pour la synthèse du méthane dans le cadre de leur métabolisme énergétique. Selon leurs métabolismes trophiques, les méthanogènes sont séparées en trois catégories:

- a. Les méthanogènes hydrogénotrophes :** Cette catégorie comporte les espèces qui oxydent le  $H_2$  et réduisent le  $CO_2$  pour former du méthane (Garcia *et al.*, 2000).
- b. Les méthanogènes méthylotrophes :** Les microorganismes de cette catégorie utilisent des composés méthylés comme le méthanol, le méthylamines, ou le sulfure de diméthyle (Garcia *et al.*, 2000).
- c. Les méthanogènes acétoclastes:** Elles comportent les espèces qui utilisent l'acétate pour produire du méthane ; deux espèces de ce groupe sont acétotrophes obligatoires.

Certaines espèces méthanogènes ont des caractéristiques nutritionnelles particulières et ne peuvent pas être placées dans une catégorie nutritionnelle unique (Garcia *et al.*, 2000). Dans cette thèse, nous nous intéresserons principalement aux méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes.

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### ***1.2.4.2. Influence des conditions environnementales sur les communautés méthanogènes***

Les méthanogènes sont des microorganismes très sensibles au changement de leur environnement. Outre leurs extrêmes sensibilités à l'oxygène (microorganismes anaérobies strictes) et à l'hydrogène, d'autres paramètres influencent leur survie et leur croissance. Plusieurs études montrent qu'un changement de certains paramètres environnementaux tels que la concentration en AGV, le pH, et la température peuvent provoquer des changements de populations méthanogènes (Hori *et al.*, 2006 ; Kotsyurbenko *et al.*, 2001 ; Kotsyubenko *et al.*, 2007 ; Blume *et al.*, 2009). Même si la présence d'AGV et notamment de l'acétate favorise la croissance des méthanogènes acétoclastes, des études ont mis en évidence que les *Methanobacteriales*, qui sont des hydrogénotrophes, sont les méthanogènes les plus résistantes à de fortes concentrations en AGV et à de faibles pH par rapport aux *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinaceae* et *Methanosaetaceae* (ces deux dernières étant des acétoclastes) (Blume *et al.*, 2009). En effet, les *Methanobacteriales* sont capables de croître jusqu'à un pH de 4.5 (Kotsyubenko *et al.*, 2007). Une étude de McMahon *et al.* (2004) montre que *Methanosaeta* et *Methanosarcina* disparaissent à partir de concentrations d'acétate supérieures à 8 g.L<sup>-1</sup>, laissant place à *Methanobacterium*. Les deux espèces acétoclastes qui disparaissent suite aux fortes concentrations en acétate pourraient être remplacées par des bactéries oxydatrices et qui sont plus résistantes aux fortes concentrations d'AGV et à de faibles pH. Les bactéries oxydatrices d'acétate produisent de l'hydrogène et du dioxyde de carbone (Goberna *et al.*, 2009) pour favoriser la croissance des méthanogènes hydrogénotrophes qui sont plus résistantes à l'acidité. Il a été signalé que les homoacétogènes sont mieux adaptées aux températures basses par rapport aux méthanogènes hydrogénotrophes (Kotsyurbenko *et al.*, 2001). À des températures faibles, les homoacétogènes sont favorisées et produisent de l'acétate ; dans ces conditions, il est alors possible que le développement des méthanogènes acétoclastes soit favorisé. En ce qui concerne les deux méthanogènes acétoclastes *Methanosarcina* (métabolisme multiple : hydrogénotrophe et acétoclaste) et *Methanosaeta*, des études ont montré que *Methanosarcina* possède des taux de croissance plus élevés à des

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

concentrations en acétate supérieures à 1 mmol.L<sup>-1</sup>, alors que *Methanosaeta* est favorisée à des concentrations plus faibles en acétate (Hori *et al.*, 2006).

### I.3. Paramètres opératoires en digestion anaérobie

#### I.3.1. Température

La digestion anaérobie est opérationnelle à plusieurs températures : psychrophiles, mésophiles, thermophiles. Cependant les principales conditions utilisées sont la mésophilie (35-40°C) ou la thermophilie (50-60°C). La température influence principalement les vitesses de réaction, qu'elles soient chimiques ou biochimiques (El-Fadel *et al.*, 1996).

Même si la DA en conditions mésophiles ou thermophiles présente habituellement des rendements et des productions en méthane proches (Cecchi *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2010), la condition thermophile présente cependant certains avantages. Les temps de séjour sont généralement plus courts en conditions thermophiles par rapport à ceux nécessaires en conditions mésophiles (Buffière *et al.*, 2007). Un réacteur thermophile nécessite plus d'énergie pour le maintien de la température, mais permet l'élimination de certains germes pathogènes (Buffière *et al.*, 2007). La DA thermophile présente de meilleures conditions de démarrage (Lu *et al.*, 2006) du fait que le régime méthanogène soit stabilisé plus tôt (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997). Dans les conditions thermophiles, l'étape d'hydrolyse est également favorisée. Selon Bouallagui *et al.* (2004), le taux d'hydrolyse de la cellulose dans des conditions thermophiles est d'environ 5 à 6 fois plus élevé que celui observé dans des conditions mésophiles. Cependant, les conclusions peuvent être différentes selon la nature du substrat. Dans le cas des études de Li *et al.* (2010), le substrat subit des opérations de prétraitements qui libèrent des composés facilement biodégradables et donc favorise la production rapide des AGV, de sorte que le système s'acidifie. Ces conditions d'acidification peuvent être inhibitrices pour la DA.

#### I.3.2. pH et teneur en AGV

Le pH optimal des méthanogènes se situe autour de 7. Les pH d'hydrolyse et de l'acidogénèse ont été rapportés comme étant optimal entre pH 5,5 et 6,5 (Alastair *et al.*, 2008). Les communautés bactériennes peuvent être inhibées dans des conditions de pH acides. Par exemple, la structure des communautés bactériennes peut changer

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

significativement en réponse à l'évolution des conditions de fermentation de pH neutre à acide (Delbes *et al.*, 2000, 2001; Liu *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007). De plus, l'activité des bactéries au sein des mêmes communautés bactériennes peut être modifiée en fonction du gradient de pH dans des conditions acides. Ye *et al.* (2007) ont constaté que la structure des communautés bactériennes à pH 4 est similaire à celle de communautés observées à des pH de 5 et de 6, mais l'efficacité de l'acidogénèse est sérieusement réduite.

La concentration en AGV est une des causes de la baisse du pH. A un pH faible, les AGV sont sous leurs formes indissociées. Cette forme est la plus toxique pour les microorganismes. Les AGV affectent plus spécifiquement les méthanogènes (Vedrenne, 2007). Les bactéries sont moins sensibles aux AGV. Cependant, pour des concentrations supérieures à 10 g L<sup>-1</sup> en AGV, seules quelques microorganismes peuvent résister (Zehnder, 1978).

### I.3.3. Mélange et agitation du milieu réactionnel

Le mélange a pour objectif d'assurer plusieurs fonctions : mettre en contact des matières organiques et la biomasse microbienne active, permettre la libération des bulles de biogaz dans le milieu, empêcher la sédimentation des matières particulaires denses. L'effet du mélange dépend du type de substrat. Le type de mélange, en continu ou intermittent à différentes intensités, peut influencer la production de méthane en fonction du type de substrat (Kaparaju *et al.*, 2007)

La séparation spatiale entre méthanogènes et acidogènes est le facteur clé pour une DA et une décomposition efficace des déchets ménagers (Vavilin et Angelidaki, 2004). Si la méthanogénèse est le facteur limitant pendant le démarrage, il est préférable d'éviter une agitation vigoureuse qui inhibe la croissance et la propagation des méthanogènes à travers le réacteur. Si l'hydrolyse devient l'étape limitante, un mélange vigoureux peut améliorer la production de méthane et la dégradation des solides (Vavilin et Angelidaki, 2004).

### I.2.4. Humidité/concentration en matières sèches

La digestion anaérobie par voie humide comporte une concentration en matières sèches (MS) inférieure à 10%. Dans les systèmes de DA par voie sèche, le milieu est maintenu

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

à une teneur en solides de 20 à 40% en MS, de sorte que seuls des substrats très secs (> 50% TS) doivent être dilués (Oleszkiewicz et Poggi-Varaldo, 1997). Alors que les systèmes humides traitant les déchets avaient été initialement inspirés de la technologie utilisée pour la digestion des boues organiques, des travaux de recherche menés durant les années 90 ont démontré que le rendement en biogaz est au moins identique dans un système où les déchets ont été conservés dans leur état solide d'origine (non dilué) et un système dans lequel les déchets ont été dilués (Spendlin et Stegmann, 1988; Baeten et Verstraete, 1993; Oleszkiewicz et Poggi-Varaldo, 1997). La limitation ne semble pas être liée aux réactions de dégradations biochimiques à des valeurs élevées de MS, mais plutôt les problèmes de manipulations, de pompage et de mélange des flux solides. Alors que la plupart des réalisations industrielles construites jusqu'à la fin des années 80 se sont appuyées sur des systèmes humides, les nouvelles usines érigées durant la dernière décennie sont uniformément partagées entre les systèmes humides ou secs (De Baere, 1999). Les caractéristiques physiques des déchets à haute teneur en solides imposent des approches techniques fondamentalement différentes de celles des systèmes humides en termes de manipulation, de mélange et de pré-traitements et de post traitement. D'autres paramètres plus fondamentaux sont importants à approfondir tels que le comportement des microorganismes impliqués dans la réaction de DA à des concentrations élevées en matières sèches qui posent un problème d'homogénéisation. Cependant, dans certain cas, la non homogénéisation du milieu peut permettre d'éviter des problèmes de dissémination de polluants et donc de blocage total des réactions de digestion anaérobie dans le méthaniseur.

Les conditions de la méthanisation en installation de stockage des déchets non dangereux (ISDND) sont très similaires à celles en digestion anaérobie par voie sèche en digesteur. En effet, les taux d'humidité des déchets de stockage sont voisins de 35% alors que des taux supérieurs à 65% d'humidité sont nécessaires pour avoir des cinétiques de dégradation satisfaisante (Moletta, 2008). Afin d'humidifier les déchets, la recirculation du lixiviat (jus issus de la percolation à travers le massif des déchets) permet de bien répartir l'humidité, et donc d'accélérer la cinétique de biodégradation des déchets et de production de biogaz (Moletta 2008). Les débits de lixiviats recirculés sont très différents en fonction de chacun des sites.

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le paragraphe qui suit traite plus spécifiquement de la DA par voie sèche. Pour cette partie, nous avons choisi de ne pas évoquer les stockages en système de décharge et de se focaliser sur la DA opérée en réacteur.

### **I.4. Etat de l'art sur la Digestion Anaérobie par voie sèche**

#### **I.4.1. Avant-propos :**

Au cours de cette thèse, nous allons nous intéresser principalement à la digestion anaérobie par voie sèche qui comporte une teneur en MS allant de 20 à 40%. La digestion anaérobie par voie sèche est une technique avantageuse pour le traitement des déchets solides. Cependant, la quantité limitée en eau et la concentration élevée en MS rendent l'agitation difficile dans les réacteurs. De plus, la compacité du milieu réactionnel et le manque d'eau rendent difficile le contact entre microorganismes et substrat ou entre les différents microorganismes de la chaîne trophique de la DA. Afin de replacer ce projet de thèse dans son contexte et de cibler le manque de connaissances dans le domaine de la digestion anaérobie par voie sèche, une revue bibliographique a été réalisée avec le LGCIE (INSA de Lyon) dans le cadre du projet ANAMIX.

La première partie de cet article s'attache à détailler les aspects techniques et technologiques des procédés anaérobies par voie sèche. Dans une seconde partie, les éléments fondamentaux de la DA par voie sèche sont exposés. Enfin, les perspectives de recherche sur la DA par voie sèche sont détaillées. Nous avons fait le choix de commencer cette revue bibliographique par les technologies développées avant d'expliquer les processus. La structure de cet article a été choisie au regard du déroulement chronologique de la mise en place de la DA par voie sèche. En effet, la technologie a été lancée de façon empirique au niveau industriel, et les recherches sur les paramètres de fonctionnement et les processus biologiques et physico-chimiques n'ont été réalisées que par la suite. Cette revue a été soumise à la revue *Bioresource Technology*.

### **I.4.2. Review and Perspectives of dry anaerobic digestion (DAD) processes**

---

#### **Abstract:**

Due to its high solid content, Dry Anaerobic Digestion processes involve specific operational difficulties and scientific issues. The aim of this paper is to present an up-to-date overview of the fundamental knowledge about high-solid digestion. First, the microbial consortia involved in the metabolic pathways are considered with regard to this specific environment. On account of the heterogeneity of the organic matters, their biochemical composition and biodegradability are assessed by means of macroscopic experimental techniques. Then follows a discussion of pretreatment usually applied to modify the biochemical structure and promote the biodegradation of organic materials. The overall low water content of the digested media induces specific physical phenomena such as rheology, mixing, particle size or water distribution, which are emphasized. Perspectives for future research are proposed with a view to achieve a better understanding of media behaviour and in-depth processes, and subsequently, an improved operation of industrial DAD systems.

---

#### ***I.4.2.1. Introduction***

A major problem for urban communities is the excessive consumption of land resources which is closely linked to the overproduction of municipal solid waste. In Europe (UE 27), the annual production of municipal solid waste average is now 524 kg year<sup>-1</sup>, though there is a huge variation between countries, from 306 kg year<sup>-1</sup> in the Czech Republic to 802 kg year<sup>-1</sup> in Denmark (Eurostat, 2010). Overall, 40% of this waste goes to landfill, 20% is incinerated and 23% is sorted, whereas only 17% is biologically treated (composting or digestion). To maintain a global balance, it is essential to find other ways of waste disposal. Anaerobic digestion (AD) is one of the most attractive technologies for turning solid organic waste into energy (Mata-Alvarez, 2000). It consists in degrading organic material by microorganisms while producing biogas, a renewable source of energy, and a digested material, often named digestate, which can be used as an organic fertilizer in agriculture.

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Depending on the water content of the media treated in the digester, three main types of digestion processes have been developed: wet, semi-dry and dry. Wet digestion systems, which are characterised by a Total Solid (TS) concentration lower than 10%, have been widely used to anaerobically stabilise biosolids (*i.e.* sludges) produced in wastewater treatment plants. For the digestion of solid waste (organic fraction of municipal solid waste, green waste, agricultural waste...), semi-dry ( $10\% < \text{TS} < 20\%$ ) and dry digestion technologies ( $\text{TS} > 20\%$ ), also known as high-solids processes, reduce the amount of water to be added compared to wet processes (Forster-Carneiro et al., 2008 ; Guendouz et al., 2008, 2010 ; Montero et al., 2008). Compared to wet digestion technology, dry systems offer certain advantages: less energy needed and smaller digesters for the same organic loading rate, simpler phase-separation step, simplification of the pretreatment stage for incoming materials.

The effects on biogas production efficiency of the main operational parameters of the process (retention time, temperature, inoculation, C/N ratio) are now well known. In 2010, dry systems represented about 60% of the total treatment capacity in Europe, corresponding to a treatment capacity of  $3.5 \text{ ktons years}^{-1}$ ) (De Baere et al., 2010). Four main industrial continuous processes share the market of Dry Anaerobic Digestion DAD: VALORGA, DRANCO, KOMPOGAS and LARAN. A comprehensive DAD plant included equipment for the pretreatment steps of the feedstock, an anaerobic digester and a post-treatment of waste streams. Whereas AD biological conversions are the same for every industrial installation, these plants are run under different operating conditions in terms of pretreatment, mixing, feeding, and handling (Table 1).

DAD, however, is a less mature technology than wet AD and can suffer from biological, physical and chemical problems due to excessive amounts of solids. The physical behaviours specific to dry digestion media, as well as their singular biochemical and chemical properties in comparison to wet processes, mean that DAD requires dedicated research which represents an exciting challenge. The processes involve operational and scientific issues related to the overall behaviour of digestion media: in particular, biochemical characterization, rheological behaviour, mass transfer within the media, mixing, handling and biological evolution.

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

**Table I-1 : Characteristics of the main industrial technologies**

|                                                                      | VALORGA                                                                                                | DRANCO                                                                                     | KOMPOGAS                                                           | LARAN                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Reactor geometry</b>                                              | Cylindrical vertical                                                                                   | cylindrical vertical<br>(Conical bottom)                                                   | horizontal                                                         | Horizontal                                                                    |
| <b>Temperature</b>                                                   | thermophilic/<br>mesophilic                                                                            | thermophilic/<br>mesophilic                                                                | thermophilic                                                       | thermophilic/<br>mesophilic                                                   |
| <b>Pre-treatments</b>                                                | shredding<br>aerobic fermentation<br>(BRS)<br>hand sorting<br>magnetic separation<br>ballistic sorting | shredding<br>rotating sieve<br>magnetic separation<br>ballistic sorting                    | star screening<br>hand sorting<br>magnetic separation<br>shredding | shredding<br>screening<br>magnetic separation<br>pre-composting<br>(2-3 days) |
| <b>TS content</b>                                                    | 30% incoming<br>waste                                                                                  | 45-50 % incoming<br>waste                                                                  | 22-28 % inner<br>material                                          | 15-45%                                                                        |
| <b>Retention time<br/>(days)</b>                                     | 18-23                                                                                                  | 15-30                                                                                      | 15-20                                                              | 20                                                                            |
| <b>Organic loading<br/>rate</b>                                      | 3-7 kgVS/m <sup>3</sup> /day                                                                           | 10-20 kgCOD<br>/m <sup>3</sup> /day                                                        | 6 kgVS/m <sup>3</sup> /day                                         | 6-8 kgVS/m <sup>3</sup> /day                                                  |
| <b>Hydrodynamic<br/>behaviour</b>                                    | Plug-flow                                                                                              | Plug-flow                                                                                  | Plug-flow                                                          | Plug-flow                                                                     |
| <b>Mixing mode</b>                                                   | biogas injection                                                                                       | recycling                                                                                  | Low speed<br>internal agitator                                     | Transverse in<br>line internal<br>agitators                                   |
| <b>Methane yields<br/>(m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/t wet waste)</b> | 80-160                                                                                                 | 100-200                                                                                    | 110-130                                                            | 100                                                                           |
| <b>Post-treatments</b>                                               | Dewatering<br>composting<br>refining<br>screening                                                      | dewatering<br>composting<br>screening<br>separation (sand,<br>fibres, inert<br>recovering) | dewatering<br>composting<br>screening                              | Dewatering<br>Composting                                                      |

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

The objective of this paper is to present an up-to-date overview of the fundamental knowledge about high-solid digestion including microbial kinetics, waste composition and physical phenomena. We then propose perspectives for further research aimed at a better understanding of media behaviour (physical, chemical, biochemical and biological) and processes with the ultimate goal of enhancing the design and operations of industrial DAD systems.

### ***1.4.2.2. Fundamentals of anaerobic digestion (AD) in dry processes***

#### *1.4.2.2.1. Microbial fundamentals of DAD*

Although microbiological processes have been widely studied in wet anaerobic digestion, only little is known about the behaviour of microbiological communities in dry conditions. To date, bioprocesses running under thermophilic DAD have been most widely investigated (Montero et al., 2008; Forster-Carneiro et al., 2008). Thermophilic DAD are thus known to offer several advantages:

- (i) High temperatures favour the hydrolytic activity of the microorganisms. Bouallagui et al. (2004) showed that the hydrolysis rate of cellulose under thermophilic conditions was about 5 to 6 times higher than under mesophilic conditions. On the other hand, in terms of methane yield, mesophilic and thermophilic processes usually present similar performances.
- (ii) Thermophilic DAD facilitates a faster start-up of the biological processes involved by limiting the accumulation of inhibitory by-products such as Volatile Fatty Acids (VFA) and the consequent drop in pH (Lu et al., 2006). Because of such lower levels of VFA and a more even pH, the methanogenic regime stabilizes earlier in thermophilic DAD (Poggi-Varaldo et al., 1997).
- (iii) As a result, thermophilic high-solids anaerobic digestion processes are usually run with lower HRT (10-20 days) than the HRT in mesophilic conditions (15-30 days) (Poggi-Varaldo et al., 1997).

As to the microbiological characteristics in DAD, only very few studies have investigated the impact of microbial diversity and structure on reactor performance in the specific environment of DAD. In a noteworthy study, Forster-Carneiro et al. (2008) studied the influence of the inoculum level on a DAD process treating food waste in

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

thermophilic batch conditions. Their results showed a better performance (removed organic matter and cumulative biogas and methane production) with 30% of inoculum compared to 20%. Pursuing this question, Montero et al. (2009) suggested that not only the quantity of inoculum is important but also the ratio of methanogens to total bacteria: an inoculum containing 23% of methanogens permitted a faster start-up of DAD. Thus both the quantity and composition of the inoculum are important for the efficient operation of the various phases of DAD.

### I.4.2.2.1.1. Hydrolysis and acidogenesis

In AD, different bacteria are involved in the biodegradation of organic matter with a first stage including the hydrolysis of complex organic polymers, followed by the microbial fermentation of the organic compounds released (acidogenesis). In DAD, determining which of the microorganisms are involved in each of these stages is particularly difficult since they are often involved in both. Yabu et al. (2011) investigated the community of microorganism involved in thermophilic DAD using ammonia-stripped model garbage. It was shown that the most important phylum was affiliated to *Thermotogae*, which is consistent with data from literature on AD under high temperature. Many different bacterial populations were associated but no functional role was shown: *Thermotogae*, *Synergistetes*, *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria*, *Firmicutes*, specially *Clostridiales* order and some *Bacillaceae* family members.

During the hydrolysis step, complex molecules are transformed into simpler products easily degradable by micro-organisms (Montero et al., 2008). The secretion of extracellular enzymes by hydrolytic micro-organisms depends to a great extent on the waste constituents and the structure of their cells, including their membrane and cellular wall composition. Hydrolytic enzymes have a different localisation in the cell. Extracellular enzymes of Gram-positive bacteria pass through the cell membrane and are then slow down slightly going through the cell wall before their subsequently release into the environment. For Gram-negative bacteria, cellular enzymes can be anchored to the cytoplasm, inside or outside the cytoplasmic membrane, to the periplasm or attached to the internal or external side of the cell wall, or secreted into the

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

surroundings. Thus, extracellular enzymes display high diversity as to their location (Thirunavukkarasu and Priest, 1984). Localisation of these enzymes is defined by the state of the cells, especially when the cells that secrete the enzymes are on the surface of organic polymers or free in the liquid (Thirunavukkarasu and Priest, 1984). Confer and Logan (1997) showed that insoluble complex macromolecules such as polysaccharides and proteins are degraded by the attached cells, and the by-products by the free cells. The hydrolysis process also concerns polymers smaller enough ( $<1000$  amu) to be transported through the bacterial cell wall and directly assimilated by the micro-organisms. In contrast, other studies have shown that hydrolysis is mainly caused by the activity of the enzymes of the free cells whereas only a small amount of degrading is carried out by biofilm-cell enzymes (Zhang et al., 2007). These observations are particularly important for a better understanding of DAD processes. In DAD, water content, which is lower than in wet AD, could lead to a decrease in the speed of free cell migration, and, as a consequence, less surface colonised by the cells attached to the substrate. In DAD and in high-solids systems, the colonisation of the substrate by free cells is rather hindered by the difficulty of mixing and homogenisation.

The products resulting from hydrolysis are then converted by bacterial acidogenic fermentation into Volatile Fatty Acids (VFA), as in wet AD. The main VFA formed are: formic, acetic, propionic, butyric, iso-butyric, valeric, iso-valeric, caproic and iso-caproic acids. Several other microbial by-products are also generated, including ethanol, lactic acid,  $\text{CO}_2$ , and  $\text{H}_2$ . According to Veeken et al. (2000), hydrolysis is notably slowed down between pH 5 and 7 because VFA are in their undissociated form and so more toxic for hydrolytic micro-organisms. Dong et al. (2010) showed that VFA concentration increases with VS content under "semi-dry" anaerobic digestion conditions. In this case, VFA inhibition occurred and the addition of supplementary water helped by increased dilution of the inhibitory substances. Furthermore, Staley et al. (2011) reported the existence of a correlation between pH, i.e. through VFA accumulation in the microorganisms' local environment, and the water content, ranging from 50% to 95%, in methanogenesis from refuse. The authors suggested nevertheless the presence of neutral niches in heterogeneous systems serving to initiate methanogenesis in refuse. In such cases, the most active bacteria belonged to

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

*Clostridiales* which are strictly anaerobic bacteria growing at a low pH. In addition, Abbassi-Guendouz et al. (2012) reported similar results with the existence of a threshold value at 30% TS, i.e. 70% water content. Beyond this value, methanogenesis was greatly inhibited by VFA accumulation. In their study, the authors suggested the predominance of liquid-to-gas transfer mechanisms to explain the inhibition methanogenesis, due in all likelihood to hydrogen inhibition or the accumulation of carbonates in the local environment of the microorganisms.

To avoid the limitations of DAD, several studies have been carried out using a combined stage with a DAD step for solids and the recirculation of the leachate in a methanogenic reactor (Zhang et al., 2007; Montero et al., 2008). Recirculation of the leachate may promote hydrolysis because it permits good distribution of microorganisms, enzymes, nutrients and, at the same time, it dilutes potential toxic VFA (Zhang et al., 2007).

### I.4.2.2.1.2. Acetogenesis

In this stage all VFA are transformed into acetate by heteroacetogenic bacteria while  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$  are transformed into acetate by homoacetogenic bacteria. In particular, Obligate Hydrogen Producing Acetogenic bacteria (OHPA) are involved in this reaction. Hydrogen is produced here along with other by-products. Because of hydrogen accumulation in the media through acidogenesis and acetogenesis, the reactions catalysed by these bacteria quickly become thermodynamically unfavourable and are only possible when hydrogen is immediately consumed. So the occurrence of acetogenesis reactions depends greatly on  $\text{H}_2$ -consuming bacteria such as hydrogenotrophic methanogens, and, to a lesser extent, homoacetogenic bacteria or others consumers such as sulfate-reducing bacteria. The balance of these syntrophic relationships between the microbial communities involved is a key to the stability of the whole system (Moletta and Verstraete, 2008). The average concentration of VFA in the local medium is therefore the result of their production during the fermentation step and their consumption by methanogenic microorganisms. During the fermentation step in DAD, biodegradable products are converted into VFA in the very local environment and so the concentration of VFA and hydrogen may increase substantially if

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

hydrogenotrophic methanogens are few at this stage. During the second phase of DAD, the number of acetoclastic methanogens increases and, since they are in an exponential growth phase, acetic acid consumption is faster than its production (Montero et al., 2008).

### I.4.2.2.13. Methanogenic step

Methanogenesis is the final stage in anaerobic digestion and is the sole stage in which methane is produced. The micro-organisms involved in this step are methanogenic archaeal bacteria. They are divided into two groups. Acetoclastic methanogens convert acetate into methane and carbon dioxide; this group produces 70% of total methane (Zinder, 1993). The second mechanism is performed through two pathways: the first is the direct transformation into methane by hydrogenotrophic methanogens of  $H_2$  and  $CO_2$  generated during the previous acidogenic and acetogenic phases. The second pathway, less significant, is two-staged, except when certain acetotrophic methanogens are missing (Karakashev et al., 2006): acetate is first oxidized into  $H_2$  and  $CO_2$  by syntrophic bacteria (often *Clostridium* sp.) and then these gases are stoichiometrically transformed into methane. The global hydrogenotrophic reaction is responsible for 30% of the methane produced in AD (Hattori et al., 2000). Hydrogenotrophic methanogens play a key role in anaerobic digestion because they maintain an  $H_2$  pressure below the level inhibiting the whole microbial process. This is indispensable for the activity of syntrophic bacteria involved in the acetogenic step.

In AD, methanogenic populations correspond to the rate-limiting step of the biogas production due to their growth which is the slowest of all microorganisms (Zinder, 1993). Especially because of the condensed local environment in the start-up stage of DAD, the hydrogenotrophic methanogens are the most abundant methanogens because the hydrogen production rates are very high at this point in process due to the activity of acetogenic bacteria. These acidogenic bacteria also produce VFA but most of the  $CH_4$  generated during start-up comes from the activity of hydrogenotrophic methanogens (Montero et al., 2008). Also, acetate could be synthesized from  $H_2$  and  $CO_2$  by the homoacetogenesis process. Associated to the activity of hydrogenotrophic methanogens producing  $CH_4$  from  $CO_2$  and  $H_2$ , both of the microbial communities involved tend to lower the  $H_2$  concentration to reach a tolerable local level ( $<10$  Pa), favouring

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

syntrophic bacteria. Moreover, acetotrophic methanogens are inhibited in the presence of hydrogen which, during the start-up phase of DAD reactors, leads to a low number of acetotrophic methanogens. Montero et al. (2009) reported a ratio between hydrogenotrophic and acetotrophic methanogens of 11:1 in the start-up stage of thermophilic DAD. An increase of the organic loading rate caused a decrease in the  $H_2$  rate and so decreased the hydrogenotrophic methanogens. This led to an increase in acetotrophic methanogens, reversing the hydrogenotrophic/acetotrophic ratio to 7:32, with consequent acetoclastic methanogenesis, although the ratio of *Archaea* among all microorganisms always remained the same. For organic loading rates of 5.07, 5.92, and 7.50 kg VS  $m^{-3} d^{-1}$ , Montero et al. (2008) found that the ratio of hydrogenotrophic and acetotrophic methanogens evolved to 9:24, 7:33 and 7:32, respectively. These results are consistent with those observed by McMahon et al. (2001, 2004). In contrast, Yabu et al. (2011) reported the dominance of hydrogenotrophic methanogens throughout the DAD process. In addition, the evolution in the overall methanogen make-up is closely related to changes in biogas composition. When the ratio of hydrogenotrophic to acetotrophic methanogens was 9:24, 7:33, and 7:32, the  $CH_4$  produced represented 26%, 50% and 41% of the total gas output, respectively (Montero et al., 2009). The greater the predominance of acetotrophic archaea, the higher the proportion of methane in total biogas.

Since hydrogenotrophic methanogens are to the key species in regulating the built-up in  $H_2$  partial pressure, the high concentration of hydrogenotrophic methanogens compared to acetotrophic methanogens in inoculum permits a faster start-up of DAD due to the higher rate of  $H_2$  consumption by these micro-organisms during hydrolysis and acidogenesis (Montero et al., 2009).

Moreover, the amounts of all methanogens and more specially acetotrophic methanogens correlate positively with the methane yields observed in dry digesters and, also, with organic loading rate (OLR) and VS removal rate (Montero et al., 2008). According to Stroot et al. (2001), an increase in the OLR is accompanied by an increase in acetic acid concentration. Consequently, acetoclastic methanogens cannot consume acetic acid quickly enough to avoid its accumulation (Montero et al., 2010). This allows the growth and selection of micro-organisms such as *Methanosarcinia* which consume

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

acetate faster (Karakashev et al., 2006). *Methanosarcinia* sp. presents the advantage of resisting high concentrations of VFA, notably values of acetic acid. In addition, this species is active between pH 5-8 which likelihood prevails in the local environment of methanogens in DAD (Ten Brummeler et al., 1992). Moreover, Van Meenen et al. (1988) suggested that the presence and activity of *Methanosarcinia* sp. in DAD was probably due to its high resistance to cationic concentrations.

### I.4.2.2.2. Waste composition

In respect to the anaerobic digestion of solid waste, the hydrolysis of organic matter and methane production are considered to be the determining stage in biodegradation. The heterogeneity of the matrix induces different behaviour during biological treatment. One part is hydrolysed very quickly (rapidly biodegradable fraction) whereas the other part is transformed more slowly. It is therefore necessary to characterize and separate out the waste streams before introducing them into the anaerobic digester to run the process and ensure the efficient performance of reactor. In addition, the biodegradability of a specific waste can be improved by applying appropriate bio-physico-chemical pretreatment.

#### I.4.2.2.2.1. Biochemical composition

The composition of the organic matter is a very important factor in DAD, particularly that of the fermentable fraction. Organic matter can be divided into readily biodegradable compounds (sugars, alcohol, VFA, amino acids) and slowly biodegradable fractions (crystalline cellulose, hemicellulose, long-chain lipids, complex proteins, polyamides). The make-up of the organic matter is crucial in the case of DAD because it impacts on process stability and efficiency. For instance, large concentrations of readily-biodegradable soluble material can induce rapid production of VFA by the fermentative microflora, causing a possible rapid accumulation of VFA on account of the lower kinetics of methanogens and certain inhibitory effects on anaerobic digestion (Schievano et al., 2010).

Certain key parameters provide a good indication of the suitability of a given waste for anaerobic digestion. The most common parameter considered is the Volatile Solids (VS) content and the biochemical methane potential test (BMP). VS content represents

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

the loss through combustion at 550°C and is related to the organic matter content but not to the biodegradability of the substrate (Buffière et al., 2006). Indeed, VS content includes non-biodegradable synthetic organic matter (e.g. plastics, rubber) as well as poorly-degradable substances (e.g. lignins). Good alternative indicators of organic matter content and biodegradability are the determinations of the Total Organic Carbon (TOC) and Chemical Oxygen Demand (COD). COD measurement is still not commonly used in the case of solid wastes and Municipal Solid Waste (MSW) because standard methods have to be adapted and optimised for the characterisation of solid substrates with high suspended-solid content (Raposo et al., 2008). However, this should be systematically undertaken to be able to compare the degradability of different waste streams (Buffière et al., 2006). Experimental techniques based on separation can also be used, for instance by first extracting the water-soluble fraction from the non-water soluble fraction and then assessing the biodegradability of each (Buffière et al., 2008).

The amount of fats is also useful as an indicator for assessing, in the one hand, substrate methane potential since fats have particularly high energy potential (around 2 g COD per 1 g VS), and, on the other hand, anticipating operational disturbances. In fact, some acids commonly found in vegetable oils, such as linoleic acid and 18-carbon acid with two double bonds as well as their degradation by-products (saturated and unsaturated), can potentially inhibit acetoclastic methanogenesis in weak concentrations (30 mg/L, Lalman and Bagley, 2000). Another interesting approach, initially proposed by Van Soest (1963) for assessing the digestibility of animal food, can also be used to estimate the degree of digestibility of complex organic waste. This method relies on successive extractions by detergents, each fraction corresponding to a specific substance (soluble matter, hemicellulose, cellulose and lignin). The composition of the waste in terms of lignocellulosic compounds influences its biodegradability (Buffière et al., 2006). A Van Soest fractionation of MSW (Guendouz et al., 2008; Lesteur et al. 2010) resulted in 28% of soluble-like fraction, 12% of hemicellulose-like fraction, 38% of cellulose-like fraction, and 22% of lignin-like fraction. The main part was thus composed of Cellulose+Lignin-like fractions whose biodegradability is known to be slow (Buffière et al. 2006).

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.4.2.2.2.2. Biological reactivity and biodegradability

Chemical and biochemical characterization can give a rough idea about anaerobic biodegradability without requiring AD tests. However, some additional tests need to be done to assess overall anaerobic biodegradability.

Biochemical Methane Potential (BMP) test determines the maximum amount of methane that can be produced in anaerobic conditions (Angelidaki and Sanders, 2004). The duration of the test is typically 30 to 40 days. However, BMP tests take place in ideal degradation condition, which do not systematically prevail in industrial installations. Both BMP and COD measurements can be used to assess overall biodegradability. Since (from Buswel's equation) 1 g degraded COD produces 350 NmL of CH<sub>4</sub>, biodegradability can thus be calculated by comparing the amount of methane produced with the degraded COD using the following equation:

$$BD = \frac{B_0}{350 \times COD}, \quad (1)$$

where  $B_0$  is the final methane yield assessed by the BMP test (mLCH<sub>4</sub> gVS<sup>-1</sup>) and COD (gO<sub>2</sub> gVS<sup>-1</sup>).

Alternatively, the OD<sub>20</sub>, which corresponds to the O<sub>2</sub> consumption in short-term biodegradation (20 h), or the Biological Oxygen Demand (BOD) can be used as rapid methods but these measurements are influenced more by the soluble and easily-hydrolysable compounds than by the insoluble and recalcitrant part of the organic matter. This information could be of major importance in DAD, since biodegradable compounds are converted to VFA during the fermentation and could involve a rapid accumulation of VFA in local environments, resulting in the inhibition of the subsequent reactions (paragraph 2.1.2).

### I.4.2.2.2.3. Modification of biochemical structure

Depending on feedstock composition and biodegradability, a key challenge is the enhancement of the hydrolysis of the slowly-degradable fraction of the waste to improving biogas production rates before its introduction within the anaerobic digester. Many types of pretreatments have been designed to facilitate the biodegradation of sludges or lignocellulosic materials (particularly in the case of bioethanol production).

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

The main objective of pretreatment is to modify biochemical structure by breaking down complex molecules into monomers or soluble organic material. Pretreatment technology can be divided into five different categories: chemical, thermal, thermochemical, biological and mechanical. In contrast to the others pretreatment, mechanical techniques mainly affect the physical structure of the solids by reducing the particle size and increasing the surface area of the substrates accessible to microorganisms. Since the overall biochemical structure is not greatly affected, mechanical pretreatment is discussed in section 2.4.2 below devoted to reducing the particle size. Table 2 summarizes the effects of chemical, thermal and biological pretreatment.

**Table I-2: Summary of pretreatments**

| <i>Pre-treatment</i> | <i>Mode of action</i>           | <i>Type of waste</i>    | <i>Effect</i>                                                  | <i>References</i>                                                                                                         |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biological           | unclear                         | MSW                     | Increase hydrolysis and bioavailability                        | Fdz Guelfo ., 2011<br>Charles <i>et al.</i> , 2009                                                                        |
| Biological           | Enzymatic (specific)            | all                     | Lignin oxidation                                               | Arora and Sharma, 2009                                                                                                    |
| Chemical             | Acid (dissolves hemicellulose)  | lignocellulosic         | Increase COD solubilization                                    | Knappert <i>et al.</i> , 1981                                                                                             |
| Chemical             | Alkaline (attack uronic bounds) | Lignocellulosic, sludge | Improve bioavailability                                        | Datta, 1981                                                                                                               |
| Chemical             | Oxidative (no specific)         | Lignocellulosic, sludge | Improve bioavailability                                        | Kumar <i>et al.</i> , 2009                                                                                                |
| Thermal              |                                 | Lignocellulosic, sludge | Improve solubilization<br>Production of recalcitrant compounds | Hendriks and Zeeman, 2009<br>Gavala <i>et al.</i> , 2003<br>Bougrier <i>et al.</i> , 2008<br>Menardo <i>et al.</i> , 2011 |
| Thermo-chemical      | Temperature + alkaline          | MSW                     | Improve solubilization and methane yield                       | Fdz-Guelfo <i>et al.</i> , 2011<br>Wang <i>et al.</i> , 2009<br>Frigon and Guiot, 2010                                    |

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### *I.4.2.2.2.3.1. Chemical treatment*

Chemical pretreatment is not commonly used in dry digestion processes. Mild treatment with chemical reactants has been widely used for improving the biodegradability of sludge and lignocellulosic substrates. It usually consists in adding dilute acids (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) or alkaline compounds (NaOH or Ca(OH)<sub>2</sub>) (López Torres and Espinosa Lloréns, 2008). Acid pretreatment removes hemicellulose without dissolving lignin. 13% of COD solubilisation was observed by acidifying kitchen wastes with HCl (10 N) at room temperature ( $18 \pm 2$  °C for 24h; Ma et al., 2011). Alkaline pretreatment leads to the saponification of uronic bonds between hemicelluloses and lignin, increases pore size and thus improves access for hydrolytic enzymes (Datta, 1981). At 25°C with a 1% NaOH solution (16 mL g<sup>-1</sup> substrates), the conversion of VFA was doubled. In both cases, toxicity problems should be considered due to the use of high ion concentrations.

### *I.4.2.2.2.3.2. Thermal treatment*

Thermal pretreatment consists in heating the solids to temperature >100°C in the presence of water. The pretreatment increases the hydrolysis and the solubilisation of solid waste. Forms of thermal pretreatment, including steam explosion and pressure cooking, have a high potential for being cost-effective (Hendriks and Zeeman, 2009). Several studies have measured the effect of thermal pretreatment at different temperatures and for different lengths of time on waste-activated sludge, slurry manure, and sewage sludge. Little information exists about the effect of thermal pretreatment of solid and lignocellulosic biomass on methane yields. Menardo et al. (2011) evaluated the effect of thermal pretreatment (120°C, 30 min) on the digested solid fraction by measuring biogas and methane yields. The specific CH<sub>4</sub> yields of digested solid fractions ranged between 71.4 and 156.9 NL kgVS<sup>-1</sup>, whereas applying thermal pretreatment increased the methane yield, respectively, to 153.7 and 175.7 NL kgVS<sup>-1</sup>.

Concerning lignocellulosic biomass, pretreatment by steam explosion has been one of the most widely investigated options. Such treatment increases the surface area of the particles, enhancing the accessibility to hemicelluloses and celluloses and, thus, the biodegradability of the substrates. Bauer et al. (2009) observed a 30% rise in biogas production following steam explosion at 180°C for 25 min. Similar positive effects were

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

observed by Liu et al. (2002) on MSW. Apparently, steam explosion combines thermal and mechanical effects to give good results for lignocellulose uptake.

### **I.4.2.2.3. Thermo-chemical treatment**

Some combinations of thermal and chemical treatment have been studied as a way of improving biogas production from solid wastes. Fernandez-Guelfo et al. (2011) tested alkaline treatment for enhancing the hydrolysis and solubilisation of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): the use of NaOH (3 g L<sup>-1</sup>) at 180°C and 3 bars increased the soluble COD by 246%. Wang et al. (2009) obtained a 50% increase in the soluble COD and biogas production by treating sorted waste (kitchen garbage and leaves) at 170°C, 4% (g of solid) NaOH for 1h. Using Ca(OH)<sub>2</sub> (3%) for 72h increases methane production by 17% for sugar beet tops and hay (Frigon and Guiot, 2010). Recently, Shahriari et al. (2012) showed that the combination of microwave (85°C) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.38 and 0.66 g:GTS) pretreatment did not significantly improve methane production and entailed a longer lag phase than the controls. The best pretreatment was obtained with a microwave at 115°C and 145°C.

### *I.4.2.2.3.4. Biological treatment*

Hydrolysis of complex substrates consists in the breaking down of each biochemical fraction of a waste (proteins, lipids, sugars) by specific enzymes: proteases, lipases, and, for the largest part of lignocellulosic materials, by cellulases and hemicellulases. The addition of enzymatic cocktails was studied as a wet pretreatment for ethanol-methane production (Frigon and Guiot, 2010). Recently, the effect on methane production and lignin degradation of landfill waste by the addition of enzymes was studied by Jayasinghe et al. (2011). Thanks to an addition of peroxydases in the recirculation of the leachate, methane production was increased from 5.7 NmLCH<sub>4</sub>/g<sub>VS</sub> to 200mL CH<sub>4</sub> gVS<sup>-1</sup> and the lignin was reduced from 68.4% to 6.2%. However, the important quantity of enzymes and water needed to achieve this performance mean that the technique cannot be suitable for DAD. Among biological pretreatment methods, several authors report the benefit to methane yield of a pre-aeration step. Thermophilic DAD performance was investigated early by comparing pre-aerated OFMSW to fresh OFMSW (Mata-Alvarez et al., 1993). A higher methane yield for pre-aerated OFMSW was assumed to be due to

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

the biological pretreatment, making some organic fraction more easily available to the anaerobic microbial population. The removal of the easily-biodegradable fraction of MSW by pre-aeration is known to minimize the risk of acidification and inhibition during the start-up of methanogenesis in batch conditions (Ten Brummeler and Koster, 1990). In DAD, Charles et al. (2009) also confirmed the positive effect of a pre-aeration of 48 h to reduce the excess of easily-degradable organic compounds in OFMSW. Fernandez-Güelfo et al. (2011) determined that biological pretreatment (with mature compost 2.5 v/v) enhanced hydrolytic activity, with a 51% increase in COD. The use of *Aspergillus Awamori* and sludge from wastewater treatment plant affected COD solubilisation by less than 30%.

### *I.4.2.2.3. Physical phenomena encountered in dry AD*

#### *I.4.2.2.3.1. The role of water*

##### *I.4.2.2.3.1.1. Different forms of water*

Due to the presence of solids, the properties of a part of the water in dry anaerobic digesters differ somewhat from those of free water in terms of vapour pressure, enthalpy, entropy, viscosity and density (Vaxelaire, 2001). Water distribution, which depends on the interactions of the water with the medium compounds, determines the water's bioavailability for microbial activity. Such availability may be reduced by the water's interaction with soluble molecules (osmotic effect) and, above all, by the matrix effect and the adsorption of the water onto the solid surface (Pommier et al., 2007). The various kinds of water mainly are distinguished by the type and the intensity of their physical bonding to the solids: a simple way to differentiate the types is to divide the water content into two parts: "bound" water, which is held chemically, physically or both; and the "free" water, which is the remaining water content that behaves as loose water.

Numerous works have been devoted to determining water distribution in composting systems, especially in sludge dewatering assessment studies (Vaxelaire, 2001). Only one recent work (Garcia-Bernet et al., 2011a) has been devoted to the characterization of biowaste and associated digestates sampled in industrial DAD plants. Hydration and

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

vicinal water fractions of biowaste and digestates are similar and only represent about  $0.1 \text{ g}_{\text{water}} \text{ gDM}^{-1}$ . Capillary fraction changes with microbial degradation, and this last fraction being more important in the digested media. Capillary water fractions of the different digestates ranged from 2 to  $2.5 \text{ g}_{\text{water}} \text{ gDM}^{-1}$ .

### *I.4.2.2.3.1.2. Influence of water on microbial kinetics*

Water is essential to the anaerobic digestion process because it dissolves nutrients and substrates and facilitates their diffusion throughout the porous medium to bacterial sites (Lay et al., 1997; Mora-Naranjo et al., 2004; Pommier et al., 2007). Waste biodegradation in landfills is highly affected by water content, highlighted by the positive effect of leachate injection which increases biological reactions (Benbelkacem et al., 2010; Pommier et al., 2007).

Heterogeneity of the substrate is suspected of being an adverse factor in anaerobic digestion because of less contact between the microorganisms and the substrate. So the degradation of the substrate decreases, affecting the production of biogas. Homogeneity of the substrate is a problem in dry anaerobic digestion due to high TS concentrations (Hartmann and Haring, 2005).

Fernandez et al. (2008) showed that, for mesophilic DAD of OFMSW in batch conditions, a higher solid content reduced substrate degradation by about 16.85% and decreased the methane production from 4.11 to  $2.79 \text{ LCH}_4 \text{ gDOC}^{-1}$  consumed, for 20% and 30% TS respectively. The methanogenic stage began at day 14 for the reactor with 20% TS and at day 28 for the reactor with 30% TS. At 30% TS, production of methane was 17% lower than at 20% TS. The decrease in biogas and methane generation was detected at day 45 for the 20% TS reactor and at day 80 for the 30% TS reactor. This result was confirmed by Forster-Carneiro et al. (2008): thermophilic DAD food waste showed better performance at 20% of TS compared to 25% and 30% TS. They obtained a VS removal of 49.7%, 40.0% and 31.6% and the cumulative daily average of biogas amounted to 7136, 6308 and 6135 mL for the digesters run at 20%, 25% and 30% respectively.

The measurement of specific methanogenic activity (SMA), corresponding to the maximum methane production rate, can be used to assess biomass activity as a function

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

of the water content. In dry mesophilic conditions, Le Hyaric et al. (2011) found the propionate uptake rate decreased by 3.5 when the solid content was raised from 18% to 35% TS. A similar study with acetate as the substrate showed a similar result in thermophilic conditions (Laubie et al., 2010).

Using a kinetic model, Fernandez et al. (2010) showed that at 20% TS the specific growth rate of microorganisms was better than at 30% TS ( $0.192 \text{ d}^{-1}$  and  $0.131 \text{ d}^{-1}$ , respectively). Furthermore, methane production during the methanogenesis stage was 7.1 L and 5.53 L for a TS content of respectively 20% and 30%. This shows that water content affects not only the growth of microorganisms but also reactor efficiency.

### I.4.2.2.3.2. Size of solids

The reduction of particle size increases the surface area accessible to microorganisms and enzymes and favours both the permeation of water and the homogenization of the waste (Sharma et al., 1988). As a general rule, mechanical pretreatment is used in DAD plants. A study has been done on the influence of a shredding pretreatment of cardboard material on various aspects of its anaerobic digestion-biodegradation rate, maximum methane yield (Pommier et al., 2010). The authors observed no significant differences either on the quantity of biogas produced, or on its production rate. With lignocellulosic biomass, its reduction to a fine powder decreases the polymerization of hemicellulose and the cristallinity of cellulose. Palmowski and Muller (2000) studied the comminution of organic samples (apples, rice, sunflower seeds, hay and maple leaves). The reduction of the particle size to millimetre scale or hundreds of micrometers (maples leaves) reduced by more than 50% the time needed to reach 80% of maximum methane potential and enhanced the solubilisation of the organic compounds. Gas production raised in the case such a substrate as maple leaves with high fiber content (15 % methane production increase when particles reduced from 2 cm to 120  $\mu\text{m}$ ). No improvement for more easily biodegradable substrates such as mixture of apples, carrots and potatoes or meat was observed (95% biodegradability for untreated waste versus 88 % for ground waste). By increasing the hydrolysis rate for all substrates, the reduction of particle size leads to a significant reduction in the length of the hydrolysis stage, thus enhancing the process itself.

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Mshandete et al. (2006) studied the degradation and biogas production potential of sisal fiber with sizes ranging from 2 mm to 100 mm, at 33°C. Total fiber degradation increased from 31% to 70% for the 2 mm fibers as compared to untreated sisal fibers. Moreover, the methane yield was inversely proportional to particle size, with an increase of 23% when the fibers were chopped to 2 mm ( $0.22 \text{ L CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$  for 2 mm, compared to  $0.18 \text{ L CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$  for untreated fibers). Several investigations have shown that methane yields and the kinetic constants of organic solid substrates increase with mechanical pretreatment that significantly reduces particle size (Forster-Carneiro et al., 2008; Izumi et al., 2010).

However, excessive reduction of particle size sometimes results in the accumulation of soluble organic compounds such as VFA due to faster kinetics of hydrolysis and acidogenesis. The consequence can be inhibition of the methanogenesis phase, resulting in a drop in methane production (Izumi et al., 2010).

### I.4.2.2.3.3. Mixing

Mixing is an important factor in the successful design of an anaerobic digestion process for solid waste. Depending on the technology, different ways of mixing have been developed: by gas, paddles or an external pumping device. However, before identifying and/or improving macro-mixing within a digester, the first step is to characterize the physical, especially the rheological properties of the digestates.

#### *I.4.2.2.3.3.1 Rheological properties*

The rheology of anaerobically-digested solid waste is partially understood. A digestate is a complex and heterogeneous medium. Furthermore, solids take the form of irregular lumps of several centimetres, even after the pretreatment operations. As a consequence, raw digestates cannot be characterised using conventional rheometers (rotating coaxial cylinders, cone-and-plate geometry) because of the small distance ( $\sim \text{mm}$ ) between moving and stationary solid surfaces and, also, because of the small sampling volume (10 to 100 ml).

Two main strategies were developed. Battistoni (1993) initially adopted a procedure consisting first in sieving the digested solid waste to select the finest fraction ( $<0.84$

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

mm), before using a commercial rotational viscosimeter to analyse the rheological behaviour. Different kinds of semi-dry digested OFMSW and sludge were investigated. Flow curves can be interpolated applying a Bingham plastic model and two rheological parameters can thus be measured: the yield stress corresponding to the stress required to start the medium flowing; and the rigidity coefficient representing the internal resistance of the medium to flow under a given shear rate. The rheological characteristics depend on the origin of OFMSW. For a given OFMSW source, both yield stress and rigidity coefficient can be related to VS content using an exponential law. However, depending on waste origin, the fine fraction represents from 60% to 90 % of the TS of the raw waste, but the main assumption of Battistoni and co-workers is that the fine fraction of solid waste represents the whole waste (Battistoni et al., 1993).

A second methodology, a “slump test” technique, was adapted from techniques used in the concrete industry to analyse actual anaerobically-digested solid waste containing coarse particles, representative of dry or semi-dry digestion technology (Garcia-Bernet et al., 2011b). This test consists of filling a cylindrical chamber with the digestate and measuring the final height loss of a slurry suddenly left to subside under its own weight. The slump curve confirmed that digestates are a visco-elastic material (Battistoni et al., 1993) and the yield stress can be estimated from the final slump height. Raw dry-digested OFMSW are characterized by high yield stresses ranging between 200 and 800 Pa. it was found that yield stress is related to TS content through an exponential law. The role of particle size was also investigated using a synthetic medium (cardboard pulp): a medium containing smaller particles was characterized by smaller yield stresses.

### *1.4.2.2.3.3.2. Influence of mixing on biological degradation*

The influence of the mixing mode and its thoroughness on digester performance and stability has been investigated mainly for wet anaerobic digestion but the information available in the literature is contradictory. On the one hand, some studies have demonstrated that mixing improves performance (Elnekave et al., 2006) because adequate mixing is required to homogenize the suspension of solids so as to prevent segregation of particles and to distribute enzymes and micro-organisms throughout the

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

digester. On the other hand, minimal mixing conditions can improve the anaerobic digestion of solids (Stroot et al., 2001): the main assumption is that shear stress can disrupt the spatial syntrophic relationships and structures between organisms (McMahon et al., 2001, Stroot et al., 2001). Karim et al. (2005a) have reported the effect of various degree of mixing thoroughness, including recycling injection, impeller, slurry recirculation and no mixing, on the degrading of a manure slurry using a continuous reactor performing wet to semi-dry anaerobic digestion (5, 10 and 15% TS). For 5% TS (wet anaerobic digestion), mixing had no significant effect on digester performance. At low solid concentrations, Karim et al. (2005b) assumed that the naturally-produced biogas might be sufficient to provide adequate mixing when no mixing device was used. The role of external mixing became significant with an increase in TS. Depending on the mode of mixing and the TS content of the feed (10% and 15% TS), a mixed digester can produce about 10%-30% more biogas than an unmixed digester. In the particular case of high solid content, the effective viscosity of the fluid increases and so mixing devices facilitate the convective transport of soluble and solid compounds within the digester. However, mixing of the digestate during the start-up period was not beneficial in reactors fed with 15% TS manure slurry because a lower pH and less biogas production were observed (Karim et al., 2005a).

### ***1.4.2.3. Perspectives***

#### *1.4.2.3.1. Improving waste and digestate characterization*

Much work has have been done in recent years on the biochemical characterization of types of waste and digestion media. Research is under way worldwide on assessing by simple measurements the biodegradability and the methane potential of a given product (biochemical composition, NIR spectra). Further research is expected in this field to upgrade the methods used. New methods are also being investigated, including differential thermogravimetric analysis, which can provide useful information and interesting correlations between chemical structure/composition and the bioreactivity.

Concerning the digesting media, there is still very little data on their physico-chemical properties. Upto now, the only operating parameter considered has been the water content. We have seen that other parameters may impact the physical behaviour of these

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

media, such as particle size (which affects their rheological properties), the nature of the waste (which affects the distribution of water) and the mixing mode (affecting almost all physical properties). More research is required to enhance our understanding of the physical characteristics of the digesting media.

### *I.4.2.3.2. Assessing the efficiency of the pre-treatments*

Pretreatment is generally qualified according to performance criteria associated with the digestion process: improvement of methane production (amount / speed) and solubilisation efficiency (for destructive treatment). In our opinion, these criteria are essential but not sufficient alone in selecting the appropriate pretreatment for dry digestion.

First of all, the way a given treatment works has not been well evaluated. For instance, thermal treatments favour the solubilisation of organic compounds but this positive effect is generally counterbalanced by a poor improvement in overall biodegradability. This is due in the main to the formation of recalcitrant organic substances that cannot be assimilated by the micro-organisms. It would be of greater interest to focus more on the effect of a treatment on the lignocellulosic structure of the waste because lignocelluloses are the least available to enzymes and, also on how recalcitrant compounds are converted into biodegradable compounds.

Secondly, actual types of industrial pretreatment have generally not been evaluated. When considering MSW, it generally undergoes several unit operations (e.g. rotary screens, rotary bioreactors, ballistic sorting ...) that affect both its mechanical structure and bioreactivity. As far as we know, types of industrial mechanical-biological treatment have not been sufficiently well documented and should be investigated further in order to assess their efficiency and role in the treatment process.

### *I.4.2.3.3. Understanding the role of microbial communities*

Dry anaerobic digesters are largely a black screen in regards to their microbial communities. Micro-organisms affect the proper functioning of anaerobic digestion and the activity of such microbes is affected by all the operating parameters in the process. Research has been carried out on the micro-organisms involved in dry anaerobic digestion, including methanogenic communities as to their distribution and nature.

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Malfunctioning of the anaerobic digestion process can appear when changes occur in the microbial community. Studies of wet anaerobic digestion have shown that hydrolysis is caused mainly by the activity of enzymes in free cell and not by those in biofilm cells. Also, DAD entails further specific parameters such as the distribution of microorganisms, both hydrolytic and methanogenic, and their colonizing dynamics. Understanding these mechanisms will make possible the use of parameters which promote efficient dry digestion. Identifying the structure of microbial communities, particularly under dynamic or transitional conditions, could well be an indicator of the efficacy of a reactor, permitting the detection of a malfunction in the anaerobic digestion by observation of a modification in the structure or abundance of microbial community before macroscopic changes appear.

### *I.4.2.3.4. Understanding the role of water*

Because of the high solid content of the digestates, water distribution and, more precisely, water availability is a key parameter for understanding the mechanisms involved in DAD. Low water content can directly affect the chemical thermodynamic properties of the localised environment where the microbial reactions take place. In addition, since digesters are only intermittently mixed and because of the high effective viscosity of the media, transport of dissolved compounds within such macroscopic porous media is driven mainly the diffusion phenomena. Experimental studies must be carried out to identify and characterize the diffusion coefficients of the overall water distribution and the biochemical composition of the digesting media. Diffusive transport can limit the availability to the microorganisms of the soluble substrate. It can also limit the removal of soluble gas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) causing biological inhibition.

### *I.4.2.3.5. Characterizing hydrodynamics*

The mixing potential of a high-solids digester at the industrial as well as at the laboratory scale is difficult to determine because of the complexity and the heterogeneity of the digested media structure. Even if the impact of mixing on biological activity remains an open question, efficient mixing is required to homogenize and enhance the transport of solids, soluble compounds and microorganisms within such pasty matrices but, also, to prevent phase separation and solid segregation in

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

industrial plants. Characterising macro-mixing in dry digesters requires the development of experimental methods for identify both the liquid and the solid phases. Computational Fluid Dynamics (CFD) is also an effective tool for predicting flow distribution and mixing rates in these opaque media. However, the rheological law must be integrated into CFD software, and experimental research is required to model the rheological behaviour of digestates.

### *I.4.2.3.6. Developing specific instrumentation, modeling and control tools*

Dry digestion is usually carried out in large tanks where the mechanical properties of the medium are very heterogeneous (presence of fibers, small bits of glass, low water content). On-line measurements are difficult, even with simple sensors such as pH probes. There is thus a need for suitably-adapted sensors, probably coupled to model-based devices. Recent advances in the field have proven that near-infrared spectrometric methods, once calibrated for a given matrix, could be of interest for performing complex measurements such as VFA (Jacobi et al., 2009). At all moment, off-line analysis remains the usual way of getting information from a dry digester. Enhancing this technology could give rise to new sensors based on non-intrusive techniques (specific sensors for trace organic compounds in the biogas) or software sensors (based on basic analysis in combination with a modelling approach).

### **I.4.3. Conclusion**

Ce travail bibliographique démontre que, malgré les nombreuses recherches réalisées dans le domaine de la digestion anaérobie, la technologie par voie sèche reste très peu étudiée et comporte encore beaucoup de points sombres. Sur le plan scientifique, l'état de l'art exposé dans cette revue bibliographique montre que la plupart des recherches faites dans le domaine de la méthanisation par voie sèche se sont intéressées aux paramètres opératoires tels que la concentration en matières sèches et leurs liens avec les performances, sans pour autant donner une explication aux différences de performances en fonction de ce paramètre. Il a été également constaté que les recherches réalisées ont été faites pour un nombre très restreint de concentrations en MS, un large gradient allant de la digestion humide à la digestion sèche n'ayant jamais été étudié. Ce panel doit permettre de caractériser l'influence réelle des concentrations

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

en MS sur les paramètres de production de biogaz et de déterminer les gammes en MS pour lesquelles la digestion anaérobie est inhibée ou favorisée.

Cette synthèse bibliographique permet également de mettre en évidence le manque de compréhension des liens entre les paramètres opératoires, les performances et la structuration des populations microbiennes impliquées dans les procédés secs. En effet, les études s'intéressant aux microorganismes impliqués dans le DA par voie sèche ciblent principalement la composition initiale de l'inoculum et non pas l'évolution des communautés dans le temps et en fonction des paramètres opératoires.

Cette revue bibliographique nous a donc permis de cibler les axes de recherches encore peu exploités. Afin de contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes spécifiques au processus de DA par voie sèche, un premier objectif de la thèse a été de faire varier des paramètres opératoires spécifiques à la DA par voie sèche afin comprendre les causes réelles de l'inhibition de la DA à de fortes concentrations en MS, ainsi que d'étudier le comportement des populations microbiennes dans les milieux secs. Une meilleure compréhension des facteurs biotiques et abiotiques pourrait permettre une meilleure maîtrise de cette technologie.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact de la teneur en MS sur la DA en étudiant une gamme de concentration allant de 10% (DA humide) et 15% (DA semi sèche) à 20, 25, 30, 35% en MS (DA sèche). Ce gradient a été réalisé dans le but de voir l'influence de la concentration en matières sèches sur les performances de la DA, et de cibler les concentrations critiques qui possèdent un effet inhibiteur sur la DA. La modélisation des résultats obtenus par le modèle ADM1 montre qu'une des causes du blocage de la méthanogénèse à de fortes teneurs en matières sèches est le transfert de gaz entre milieu réactionnel et ciel gazeux. Afin d'établir et de vérifier cette hypothèse, nous avons conçu une expérience afin de confirmer le rôle clef du transfert liquide-gaz via la surface spécifique d'échange sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche.

L'influence de la concentration en MS sur la structure des populations microbiennes a été également étudiée. Nous avons établi un lien étroit entre concentration en MS et composition des populations méthanogènes. Nous avons également mis en évidence un lien entre inhibition de la méthanogénèse et apparition de certaines espèces

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

bactériennes. L'utilisation de conditions opératoires distinctes telles que des inocula d'origines différentes a permis de montrer l'ubiquité de ces bactéries qui peuvent ainsi représenter des bio-indicateurs d'inhibition de la digestion anaérobie par voie sèche.

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

---

### ***II. MATERIEL ET METHODES***

---

---

Ce second chapitre regroupe l'ensemble des matériels et méthodes utilisés tout au long de cette thèse. Cette partie permet d'avoir une vision d'ensemble sur les techniques utilisées, même si leurs descriptions sont incluses dans les publications exposées dans les chapitres suivants.

## II. MATERIEL ET METHODES

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. Caractérisation du substrat et de l'inoculum

#### II.1.1. Quantification des matières sèches et matières volatiles

Dans un creuset en céramique préalablement séché et taré, environ 30 mL d'échantillon (inoculum ou substrat) sont introduits. Le creuset est ensuite pesé puis placé dans un four à 105°C durant 24h afin que toute l'eau contenue dans l'échantillon soit évaporée. Le creuset est pesé suite à cette étape de séchage. Enfin, l'échantillon est disposé dans un four à 550°C pendant 2h, et pesé à nouveau.

La matière sèche (MS) de l'échantillon correspond au poids de cet échantillon après séchage à 105°C. La matière volatile (MV) correspond à la différence entre le poids de l'échantillon sec et celui de l'échantillon après son passage au four à 550°C.

#### II.1.2. Fractionnement selon Van Soest

Les échantillons de déchets solides sont préalablement lyophilisés et broyés finement pour être fractionnés en utilisant la méthode proposée par Van Soest (Van Soest, 1963). Le procédé de fractionnement séquentiel a été réalisé en utilisant un système de FIBREBAG pour échantillons (6 GERHARDT Allemagne), en suivant les étapes suivantes:

(1) La fraction correspondant aux composés solubles (SOL) est obtenue par extraction avec un détergent neutre (30 g L<sup>-1</sup> de C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S; 18,61 g L<sup>-1</sup> de C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 2H<sub>2</sub>O; 6,81 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 10H<sub>2</sub>O; 4,56 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 ml L<sup>-1</sup> de C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) pendant 60 min à 100°C.

(2) Après extraction de SOL, la fraction correspondant aux composés hémicellulosiques (HEM) est extraite par un détergent acide (20 g L<sup>-1</sup> C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>NBr, 26,7 ml L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 95-97%) pendant 60 min à 100°C.

(3) Suite à l'extraction des composés SOL et HEM, la fraction correspondant à la lignine (LIGN) est obtenue par l'élimination de la cellulose (CEL) en mettant le sac dans du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%) pendant 3 heures. La fraction restante correspond à de la lignine.

A la fin de chaque étape, les échantillons extraits sont lavés avec de l'eau déminéralisée et séchés au four à 100 ° C avant le passage à l'étape suivante.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1.3. Potentiel méthane (BMP)

Pour chaque échantillon, une quantité de substrat correspondant à 1g de matière sèche du substrat est placée en condition mésophile (35°C) dans des fioles de 600 mL pour un volume utile de 400 mL. Le substrat est mélangé à une solution d'oligo-éléments ( $\text{FeCl}_2$ , 4  $\text{H}_2\text{O}$  (2 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2$ , 4  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NiCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{ZnCl}_2$  (0,05 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,05 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0,05 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  (0,04 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g  $\text{L}^{-1}$ )), une solution de macro-éléments ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  (26 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  (6 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  (3 g  $\text{L}^{-1}$ )), une Solution  $\text{Na}_2\text{S}$ , 9  $\text{H}_2\text{O}$  (40 g  $\text{L}^{-1}$ ) et un tampon bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$  (50 g  $\text{L}^{-1}$ )). Une boue anaérobie est utilisée comme inoculum avec une concentration de 20 gMV  $\text{L}^{-1}$ . Pendant 60 jours, la production de méthane a été mesurée tous les 2 jours à l'aide d'un micro-GC (Chromatographie en phase gazeuse) Varian CP4900. La valeur BMP correspond alors à la quantité de gaz cumulée produite après 60 jours d'incubation. La méthode est décrite en détail dans la littérature (Angelidaki *et al.*, 2009 ; Hansen *et al.*, 2004). Les tests BMP ont été effectués en triplicat.

### II.2. Dispositif expérimental

Le substrat utilisé dans le cadre de cette thèse est du carton plein de couleur grise et de marque « cartonnage Michel ». Le carton a été choisi comme substrat modèle parce qu'il est composé principalement de cellulose. La cellulose est le composé majoritaire des déchets ménagers (ADEME, 2009). Le carton a été broyé et tamisé pour avoir des particules de taille inférieure à 2 mm de diamètre en utilisant un broyeur à lame de marque Mill SM-100.

Le carton a été mélangé à de l'eau, des oligo-éléments et de l'inoculum. Le ratio S/X (substrat/microorganismes) (v/v) était de 20 pour toutes les expérimentations réalisées. Le choix d'opérer les réacteurs avec un ratio S/X élevé avait pour objectif de limiter l'influence de la composition initiale de l'inoculum sur l'évolution des microorganismes dans les milieux réactionnels. Les quantités d'eau et de substrat dans le mélange dépendent de la teneur finale en matières sèches dans le réacteur. Pour 100 mL de mélange, 1mL de la solution d'oligo-éléments a été ajouté ( $\text{FeCl}_2$ , 4  $\text{H}_2\text{O}$  (2 g  $\text{L}^{-1}$ ),

## II. MATERIEL ET METHODES

$\text{CoCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$  ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NiCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$  ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{ZnCl}_2$  ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  ( $0,04 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$  ( $0,01 \text{ g L}^{-1}$ )).

Trois batteries d'expérimentations ont été réalisées en condition batch et à température mésophile ( $35^\circ\text{C}$ ). Afin d'avoir un environnement anaérobie en début d'expérimentation, le ciel gazeux de chaque batch a été remplacé par de l'azote.

- (1) Pour la première expérimentation, des fioles de 600mL sont utilisées. Chaque fiole contient 100 mL de milieu réactionnel. Six conditions sont testées : 10, 15, 20, 25, 30, 35% de matières sèches. L'inoculum est du jus de presse de digestat issu d'un digesteur de déchets ménagers en condition sèche (Valorga international, Varenne Jarcy) prélevé en hiver. Pour chaque condition, quatre réplicats sont réalisés. Les batch n'ont pas subi de mélange.
- (2) Pour la deuxième expérimentation, d'autres batchs ont été mis en place avec une teneur en MS de 25%. Trois autres inocula ont été utilisés : du jus de presse issu du même digesteur que celui utilisé dans le cadre de première expérimentation mais prélevé en été, du rumen de vache adulte et des boues digérées de Muret. Un autre type de récipient a été utilisé ; des fioles de 2000 mL contenant 400 mL de milieu réactionnel. Certaines fioles ont été agitées par un dispositif fabriqué au laboratoire (figure II-1). Le principe de cet agitateur est de faire tourner des fioles contenant des chicanes horizontalement autour d'un axe. L'axe tourne grâce à un moteur à une vitesse de 2 tours/ min à une fréquence de 15 min toutes les 2h. Cependant, avec les teneurs en MS utilisées, l'agitation du milieu réactionnel n'a pas été celle recherchée, puisque la majorité du milieu a adhéré sur les parois de la fiole. Ces expérimentations ont toutefois été poursuivies, car l'évolution des fioles agitées était différente des celles qui ne l'était pas. Quatre réplicats ont été réalisés par condition.

## II. MATERIEL ET METHODES



**Figure II-1: Photographie de l'agitateur utilisé pour certaines expérimentations**

- (3) Pour la troisième expérimentation, la teneur en MS est maintenue à 25%. Le but de cette expérimentation était d'étudier l'influence de la surface spécifique d'échange sur les performances de la DA par voie sèche. Des flacons cylindriques de tailles différentes ont été utilisés. Trois répétitions appelées « petites fioles » ont été réalisées avec des flacons de 600 mL (diamètre de 8 cm). Trois autres répétitions (Grandes fioles) ont été effectuées dans des flacons de 5000 mL (diamètre de 16 cm). Tous les flacons contenaient 400 mL de milieu réactionnel. Par conséquent, la surface spécifique des « grandes fioles » était de  $50.3 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ , et celle des petites fioles de  $12.6 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ . Les fioles ont été reliées à des sacs, afin de maintenir le ciel gazeux, dont le volume diffère selon la taille des fioles, à pression atmosphérique. Pour un même volume de biogaz produit dans une petite fiole, une pression plus importante aurait pu influencer le processus de méthanisation. Des détails complémentaires sont décrits dans le chapitre III.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.3. Suivi analytique des bioréacteurs

#### II.3.1. Quantification de la production du biogaz et analyse de sa composition

La production de biogaz est mesurée par la méthode de déplacement de l'eau (éprouvette renversée). Le volume est ensuite normalisé en fonction de la température. La composition du biogaz a été déterminée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (Varian CP4900- $\mu$ GC) par injection d'un volume d'échantillon de 2 ml. Ce chromatographe est équipé de deux colonnes: une colonne PLOT Molsieve 5A pour la détermination de la composition en O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et CO et une colonne HayeSep pour la quantification de CO<sub>2</sub>. L'étalonnage a été réalisé avec un gaz composé de CO<sub>2</sub> (25%), O<sub>2</sub> (2%), N<sub>2</sub> (10%) et du CH<sub>4</sub> (63%). Le gaz vecteur est l'hélium.

#### II.3.2. AGV et pH

Les Acides Gras Volatils (AGV) ont été analysés après centrifugation de l'échantillon (13000 rpm, 15 min). Les concentrations en AGV ont été mesurées par un chromatographe en phase gazeuse (Varian CP3900- $\mu$ GC) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne utilisée était un semi-capillaire Econocap FFAP (Alltech). Le gaz vecteur est de l'azote. Le reste de la technique de dosage est décrit dans Ganesh *et al.* (2010).

Le pH a été mesuré directement sur le digestat en utilisant un pH-mètre Eutech Instruments pH510 avec une électrode METTLER TOLEDO InLab Expert ® pH Pt1000.

### II.4. Analyse de biologie moléculaire

#### II.4.1. Empreinte moléculaire par SSCP (Single Strand conformation Polymorphism)

La zone variable V3 de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR, une des deux amorces utilisées utilisé est marqué par l'utilisation d'un fluorophore puis l'ADN dénaturé en ADN simple brin subit une migration par électrophorèse qui est réalisée sur un gel non dénaturant de polyacrylamide. Dans des conditions non-dénaturantes, la structure secondaire de l'ADN simple brin est générée par des interactions intramoléculaires. La

## II. MATERIEL ET METHODES

mobilité électrophorétique des ADN simples brins est donc fonction de leur masse moléculaire et de leur structure secondaire. En théorie une espèce correspond à un pic.

Pour analyser les résultats issus de cette thèse cette technique a été utilisée en fin de la réaction. 0,5 g de l'échantillon a été prélevé et conservé à -20°C.

### ***II.4.1.1. Extraction et amplification de la région V3 de l'ADNr 16S***

L'ADN total a été extrait en utilisant l'ADN QIAamp selles (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant.

La région V3 de l'ADNr 16S a été amplifiée en utilisant les paires d'amorces W49 - W104 pour les bactéries et W274 - W275 pour les archées (Tableau II-1). Chaque tube contenait 0,5 µM de chaque amorce, 1 µL de l'ADN purifié (0,5 µL pour les archées), 0,5 U d'ADN polymérase *Pfu* Turbo (Stratagene), 1 x de tampons de l'ADN polymérase *Pfu* Turbo, 200 µM pour chaque dNTP, le mélange a été ajusté à un volume total de 50 µL pour l'amplification bactérienne et 25 µL pour celle des archées avec de l'eau ultra pure (MDP Lavoisier, France). Les amorces W104 et W275 sont marquées par une molécule fluorescente à leur extrémité 5' afin de permettre la détection des brins d'ADN lors du passage en SSCP

L'amplification est réalisée en suivant le programme de température suivant : 94°C durant 2 min (dénaturation initiale), 25 cycles de 30s pour les bactéries et 30 cycles de 30s pour les archées à 94°C (dénaturation), 30s à 51°C pour les bactéries et 61°C pour les archées (hybridation), 30s à 72°C (élongation), 10 min d'élongation à 72°C. La taille et la pureté du produit de PCR sont analysées par électrophorèse sur gel à 2% d'agarose et révélation au BET (Bromure d'éthyldium).

### ***II.4.1.2. CE-SSCP***

L'électrophorèse de la CE-SSCP a été réalisée dans un ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Un microlitre des produits PCR a été dilué de 5 à 500 fois et mélangé avec 18,8 ml de formamide et de 0,2 ml de standard interne ROX GeneScan (Applied Biosystems). Les échantillons ont été dénaturés à 95 ° C pendant 5 min, puis immédiatement refroidis dans la glace.

## II. MATERIEL ET METHODES

Les données de la CE-SSCP ont été analysées en utilisant le logiciel GeneScan (Applied Biosystems) et la StatFingerprints (bibliothèque R) (Michelland *et al.*, 2009).

**Tableau II-1: Amorces et sondes utilisées pour l'amplification par PCR du gène de l'ADNr 16S. En gris les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN des archées, et en noir celles utilisées pour l'amplification de l'ADN bactérien**

|      | Sequence (5'-3')                                | Position <sup>a</sup> ( <i>Escherichia coli</i> ) | Reference                    |
|------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|
| W49  | ACGGTCCAGACTCCTACGGG                            | F330                                              | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W104 | FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-Tamra                   | R533                                              | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W274 | CCCTACGGGGCGCAGCAG                              | F340                                              | Ovreas <i>et al.</i> (1997)  |
| W275 | FAM-TTACCGCGGCGGCTG-Tamra                       | R519                                              | Ovreas <i>et al.</i> (1997)  |
| W18  | GAGTTTGATCMTGGCTCAG                             | F9                                                | Brosius <i>et al.</i> (1981) |
| W31  | TTACCGCGGCTGCTGGCAC                             | R500                                              | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W280 | TTACCGCGGCGGCT                                  | R500                                              | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W208 | ACTCC TACGG GAGGC AG                            | F338                                              | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W209 | GACTA CCAGG GTATC TAATC C                       | R805                                              | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W210 | Yakima Yellow- TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C -Tamra | F516                                              | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W211 | ATTAG ATACC CSBGT AGTCC                         | F787                                              | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W212 | GCCAT GCACC WCCTC T                             | R1059                                             | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W213 | FAM-AGGAA TTGGC GGGGG AGCAC-Tamra               | F915                                              | Yu <i>et al.</i> (2004)      |

### II.4.2. Clonage et séquençage de l'ADNr 16S

Bien que nécessitant souvent une étape d'amplification par PCR, le clonage dans un vecteur, est une méthode peu coûteuse qui permet d'amplifier un gène (dans notre cas le gène d'ADNr 16S) en l'insérant dans des vecteurs de clonage ce qui facilite leur séquençage ultérieur.

## II. MATERIEL ET METHODES

Le séquençage d'une région variable du gène 16S tel que la région V3 permet de discriminer et d'identifier des espèces microbiennes.

Tout d'abord, la région V3 de l'ADNr 16S a été amplifiée en utilisant les amorces W18 – W31 pour les bactéries et W274 - W280 pour archées (Tableau II-1). Chaque tube contenait 1 µL de l'ADN purifié (0,5 µL pour les archées), 1 µL de Red Taq polymérase (Sigma), 5 µL de tampon Red Taq et 200 µM pour chaque dNTP, le tout est ajusté à un volume total de 50 µL pour l'amplification bactérienne et 25 µL pour celle des archées avec de l'eau ultra pure (MDP Lavoisier, France).

Le programme de température appliqué est le suivant : 94°C durant 2 min (dénaturation initiale), 25 cycles de 1 min pour les bactéries et 30 cycles de 1 min pour les archées à 94°C (dénaturation), 30s à 50°C pour les bactéries et 65°C pour les archées (hybridation), 1 min à 72°C (élongation), 10 min d'élongation à 72°C. La taille et la pureté du produit de PCR sont analysées par électrophorèse sur gel à 2% d'agarose et révélation au BET (Bromure d'ethyidium). L'ADN amplifié a été purifié à l'aide Qiaquick kit (Qiagen). Le reste de la technique de clonage et séquençage est décrit par Wery *et al.* (2009). Les séquences ont été déposées dans GenBank sous l'accension HE613791 HE613797.

### II.4.3. La PCR quantitative

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume total de 25 µL. Le mélange contient 5 µL d'ADN à amplifier, 12,5 µL de L'Express qPCR Supermix pré-mélangé à du ROX (Invitrogen). A ce mélange s'ajoutent des amorces du gène de l'ARNr 16S et une sonde. Pour les bactéries, W208 (250 nM) et W209 (250 nM) sont les amorces utilisées et la sonde est la W210 (50 nM) (Tableau II-1). Pour les archées, les amorces utilisés sont W211 (250 nM) et W212 (250 nM) et la sonde est W213 (nM) (Tableau II-1). Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un realplex2S Mastercycler ep (Eppendorf). La réaction a eu lieu après une séquence de 20 sec à 95 ° C, suivie de 40 cycles de 15 sec à 95 ° C et 1 min à 60 ° C. Tous les tests ont été effectués en double exemplaire. Les résultats ont ensuite été comparés à une courbe standard pour obtenir le nombre de copies cibles dans l'échantillon. Les courbes d'ADN standard ont été générées par l'amplification d'une série 10-dilutions d'un clone de

## II. MATERIEL ET METHODES

référence (Snell-Castro *et al.*, 2005). Le cycle seuil (CS) correspond au nombre de cycles à partir duquel la réaction est devenue exponentielle. Le CS de l'échantillon a été comparé à une courbe linéaire standard réalisée avec CS d'un nombre de gènes connu. Le nombre total de bactéries ou archées a été exprimé en nombre de copies cibles par gramme de VS.

L'abondance d'une population identifiée par CE-SSCP a été obtenue en multipliant le pourcentage de l'abondance relative du pic obtenue par CE-SSCP par le nombre total de gènes cibles obtenus à partir des données PCRq.

### II.5. Modélisation par ADM1

La digestion anaérobie est une réaction complexe. Batstone *et al.* (2002) ont développé et proposé un modèle générique, l'ADM1, regroupant l'ensemble des étapes réactionnelles importantes de la dégradation de la matière organique en condition anaérobie. Ce modèle offre un outil mathématique capable d'assister l'optimisation du fonctionnement d'un procédé de digestion anaérobie tout en offrant des possibilités d'extensions ou de simplifications suivant le substrat à dégrader ou le type de procédé étudié. Le modèle ADM1 compte 26 ou 32 variables d'état permettant ainsi de décrire le comportement dynamique des différentes réactions.

Ce modèle intègre les principales réactions de conversion de la matière organique en CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> et en matières inertes. La conversion de la matière se passe de la manière suivante. Tout d'abord intervient une réaction de déstructuration qui consiste à convertir la matière organique complexe en protéines, glucides, lipides et matières inertes. Ensuite l'hydrolyse enzymatique transforme les composés biochimiques particuliers en acides aminés, sucres simples et acides gras à longues chaînes. Cette étape est souvent considérée comme l'étape limitante de la digestion anaérobie. L'hydrolyse du premier ordre permet de simuler convenablement cette étape biochimique ( Batstone, *et al.*, 2002, Vavilin, *et al.*, 2002, Mora-Naranjo, *et al.*, 2004). Cette cinétique du premier ordre est présentée par l'équation suivante :

$$\frac{dX}{dt} = -k_h \cdot X \quad (2)$$

où X représente la matière hydrolysable et  $k_h$  la constante d'hydrolyse.

## II. MATERIEL ET METHODES

Les constantes d'hydrolyse sont différentes selon les substrats à dégrader. La détermination de ces constantes est réalisée grâce à des expérimentations de caractérisation du substrat. Les étapes intracellulaires incluses dans la structure du modèle sont les suivantes : (1) l'acidogénèse qui est la conversion des sucres simples ou des acides aminés en AGV et en hydrogène (2) l'acétogénèse où le propionate, le butyrate et le valérate sont convertis en acétate et en hydrogène ; (3) la méthanogénèse acétoclaste au cours de laquelle le méthane est produit à partir de l'acétate en  $\text{CH}_4$  ; la méthanogénèse hydrogénophile qui est la réduction du  $\text{CO}_2$  par l' $\text{H}_2$  pour produire du  $\text{CH}_4$ .

Dans notre étude nous avons considéré notre substrat comme composé uniquement de carbohydrates. Et les étapes de dégradation des protéines et lipides n'ont pas été considérées.

La caractérisation du carton broyé utilisé pour l'ADM1 est basée sur les résultats du fractionnement Van Soest et la fraction de fibres dégradables (hémicellulose et de cellulose). Dans le modèle, la variable pour les glucides,  $X_{\text{CH}}$ , a été considérée comme étant composée de la fraction biodégradable des hémicelluloses, la cellulose, et la fraction organique soluble. La fraction non dégradables de l'hémicellulose et de la cellulose, ainsi que la fraction de lignine ont été considérées comme matières inertes ( $X_I$ ). La fraction biodégradable des hémicelluloses et la cellulose (principaux constituants dégradables de carton) a été calibrée avec la courbe de gaz à 10% MS. Les valeurs de  $0,33 \text{ g.TS}^{-1} \text{ g}_{\text{COD}}$  a été attribuée à  $X_{\text{ch}}$  et  $0,85 \text{ g.TS}^{-1} \text{ g}_{\text{COD}}$  à  $X_I$ . Les simulations ont réalisées sur Matlab / Simulink (version 7.3.0).

Le modèle a été calibré avec les données expérimentales des expériences en batch à 10% de MS. Par rapport aux paramètres standards proposés par Batstone et Keller (2003) pour la digestion anaérobie des boues, deux paramètres principaux ont été modifiés afin de tenir compte des teneurs élevées en matières sèches : La constante du premier ordre de la vitesse d'hydrolyse des glucides et le coefficient de transfert de masse liquide / gaz. La valeur par défaut de la constante de vitesse d'hydrolyse de premier ordre de glucides ( $k_{\text{hyd}}$ ,  $X_{\text{CH}}$ ) est de  $10 \text{ jour}^{-1}$ . Pour la digestion anaérobie mésophile en conditions humides, les constantes de vitesse d'hydrolyse de premier ordre sur la dégradation des matières cellulosiques (cellulose, du papier de bureau, carton, papier journal) rapportées dans la littérature sont de 0,03 à  $0,07 \text{ jour}^{-1}$  (Vavilin *et al*,

## II. MATERIEL ET METHODES

2008;. Liebetrau *et al.* , 2004; Vavilin *et al.*, 2004). Cependant, les tests actuels ont été menés en conditions semi-sèches et sèches. Dans des conditions de faible humidité, Pommier *et al.* (2007) ont observé une forte influence de l'humidité sur les cinétiques et la production de méthane à partir de papier et des déchets de carton. Dans un travail de modélisation, Qu *et al.* (2009) ont utilisé une valeur de  $0,01 \text{ jour}^{-1}$  pour la constante de vitesse d'hydrolyse de papier de bureau à des teneurs de 40 et 66% de MS. Dans notre travail, la constante de vitesse d'hydrolyse du premier ordre des glucides ( $k_{\text{hyd}}$ ,  $X_{\text{CH}}$ ) est par conséquent réduite de sa valeur par défaut à  $0,01 \text{ jour}^{-1}$ .

Les produits gazeux issus de la réaction de digestion anaérobie sont produits dans le milieu réactionnel avant de passer dans la phase gazeuse. Le transfert de gaz entre ces deux milieux est défini par le coefficient de transfert liquide-gaz ( $k_{\text{La}}$ ). En digestion anaérobie par voie sèche, ce coefficient est un facteur important à prendre en compte du fait de la consistance du milieu.

Le coefficient de transfert de masse volumétrique liquides / gaz ( $k_{\text{La}}$ ) a été réduit de sa valeur par défaut ( $200 \text{ d}^{-1}$ ; pour la digestion anaérobie des boues activées par voie humide) à  $0,5 \text{ j}^{-1}$  pour tenir compte d'un transfert réduit en raison de la texture pâteuse du mélange substrat-biomasse.

## II. MATERIEL ET METHODES

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

---

---

#### ***III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE***

---

---

En digestion anaérobie par voie sèche, à cause des teneurs élevées en MS et de la difficulté de mélange, le transfert du biogaz du milieu réactionnel vers le ciel gazeux devient problématique. Cette première partie de résultats traite les problèmes de transfert et leurs conséquences sur la digestion anaérobie en faisant varier deux paramètres opératoires : la concentration en matières sèches et la surface spécifique d'échange.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAÉROBIE PAR VOIE SÈCHE

#### III.1.1. Avant-propos

En digestion anaérobie par voie sèche, la diminution de la concentration en eau peut avoir plusieurs conséquences sur la digestion anaérobie, son fonctionnement et ses performances notamment sur la cinétique microbienne. Par exemple, Le Hayric *et al.* (2011) ont montré que l'activité spécifique des méthanogènes augmente d'un facteur 3.5 lorsque le pourcentage d'humidité passe de 65% à 82%. Des études ont également démontré de meilleures performances de méthanisation en termes de vitesse de production de méthane ainsi que de taux de dégradation du substrat à 20% de MS par rapport à 25 et 30% de MS (Forster-Carneiro *et al.*, 2008; Forster-Carneiro *et al.*, 2008; Fernandez *et al.* 2008). L'importance de la teneur en eau sur la dégradation biologique peut être liée à plusieurs causes : hétérogénéité du milieu réactionnel, problème de mélange, concentrations plus importantes en solutés (dont les AGV) liées à une dilution plus faible du substrat, répartition eau libre/eau liée et impact direct sur le métabolisme microbien...

L'objectif de cette publication est de mieux appréhender l'impact de la diminution des performances de dégradation anaérobie de composés solides avec l'augmentation de la teneur en matières sèches.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences en réacteurs « batchs » qui couvrent la gamme de fonctionnement de la digestion anaérobie par voie humide et par voie sèche (concentrations en MS variant de 10 à 35%). Nous avons utilisé un substrat modèle, du carton broyé, afin de s'affranchir, entre autre, du problème d'hétérogénéité et de reproductibilité d'un déchet réel. De plus, lors de l'inoculation des réacteurs, notre choix a été d'utiliser un ratio faible entre la quantité de substrat et la quantité de micro-organismes afin d'investiguer la mise en place des communautés microbiennes adaptées aux conditions environnementales (Lien avec le chapitre IV). Les performances de la digestion anaérobie ont été analysées par rapport à la production cumulée de méthane ainsi que l'analyse chimique du digestat (AGV, pH) en fin de réaction (298 jours).

Dans un second temps, nous avons utilisé des outils de modélisation (Anaerobic Digestion Model No. 1 -ADM1) afin de décrire les résultats expérimentaux. L'objectif était de tester des hypothèses pour mieux comprendre les mécanismes responsables de

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

la diminution des performances de la digestion anaérobie lorsque les teneurs en MS augmentent. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étape d'hydrolyse et au transfert de matière digestat/gaz.

#### **III.1.2. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation**

---

##### **Abstract:**

The role of the total solids (TS) content on anaerobic digestion was investigated in batch reactors. A range of TS contents from 10 to 35% was evaluated, four replicates were performed. The total methane production slightly decreased with TS concentrations increasing from 10 to 25% TS. Two behaviors were observed at 30% TS: two replicates had similar performances to that at 25% TS; for the two other replicates, the methane production was inhibited as observed at 35% TS. This difference suggested that 30% TS content corresponded to a threshold of the solids content, above which methanogenesis was strongly inhibited. The Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1) was used to describe the experimental data. The effects of hydrolysis step and liquid/gas mass transfer were particularly investigated. The simulations showed that mass transfer limitation could explain the low methane production at high TS, and that hydrolysis rate constants slightly decreased with increasing TS.

---

##### ***III.2.1.1. Introduction***

The production of waste including municipal solid waste (MSW) has significantly increased in recent years. For example, in France, MSW generation has more than doubled in less than 50 years, from 175 kg year<sup>-1</sup> capita<sup>-1</sup> in 1960 to 354 kg year<sup>-1</sup> .capita<sup>-1</sup> in 2006 (ADEME, 2009). Different technologies are used for MSW treatment, such as incineration or composting, but anaerobic digestion (AD) processes are particularly interesting in terms of organic matter reduction by converting organic compounds into biogas. The methane content in biogas represents a source of renewable energy.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

Based on the total solids (TS) content of solid waste, three main types of technologies have been developed: wet ( $\leq 10\%$  TS), semi-dry (10-20% TS) and dry ( $\geq 20\%$  TS) processes. Dry technologies, also called “high-solid” anaerobic processes, are attractive because the quantity of water added to the raw waste is substantially reduced, and consequently, the digester size is minimized. However, difficulties in operating dry anaerobic digestion at both laboratory and industrial scales are related to the high concentration of total solids. Fernandez *et al.* (2008) showed that methane production started at day 14 in a reactor with 20% TS and at day 28 in a reactor with 30%TS in mesophilic dry anaerobic batch reactors treating the organic fraction of municipal solid waste. The total methane production was 17% lower at 30% than at 20% TS. This result is consistent with the one obtained by Forster-Carneiro *et al.* (2008), which showed better performance of anaerobic reactors operated at 20% TS compared to 25% and 30% TS. It was suggested that a high TS content could reduce substrate degradation and, therefore, biogas production (Fernandez *et al.*, 2008). Le Hyaric *et al.* (2011) used a microbial metabolic intermediate, propionate, as substrate to study specifically the methanogenic activity in dry reactors. The specific methanogenic activity increased linearly by a factor of 3.5 when the moisture content increased from 65% to 82% (corresponding to 35 to 18% TS, respectively).

A high TS content also affects the physical properties of the digested solid waste. Water distribution was investigated by Garcia-Bernet *et al.* (2011a) in biowastes and associated digestates sampled in industrial dry AD plants. Even if the proportion of the hydration and vicinal water fractions is small ( $0.1 \text{ g}_{\text{water}} \text{ gDM}^{-1}$ ) compared to the total amount of water, the capillary water fractions of the digestates ranged from 2 to  $2.5 \text{ g}_{\text{water}} \text{ gDM}^{-1}$ : this fraction can represent up to 60% of the total water for a digestate having a TS = 20%. As a consequence, for dry AD systems, the high solids content strongly affects the rheological behavior of the digestates (Battistoni, 1993; Battistoni *et al.*, 1997; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Digested media are visco-elastic materials characterized by high yield stress levels, and yield stress increases with TS content according to an exponential law (Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Digesters are thus difficult to mix and homogenize. Indeed, Karim *et al.* (2005) showed that, when the

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

concentration of TS increases in reactors, mixing becomes more important for improving the production of methane. Nevertheless, under unmixed conditions, transport is likely governed by diffusion processes, which are strongly related to the porosity of the media and, thus, to the water content. Therefore, the diffusive transport resistance of soluble compounds (substrate or by-products) may have a strong influence on anaerobic digestion performance in dry systems.

The aim of this study is to assess the impact of the total solids content on anaerobic digestion of solid waste. Anaerobic batch reactor experiments were performed with TS concentrations ranging from 10 to 35%. The methane production performances were assessed. To better evaluate the impact of the water content on anaerobic digestion, the Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) was then used to describe the experimental data. The objective of the model application was to test some hypotheses in order to understand why the TS content affects the global anaerobic digestion performance. The effects of hydrolysis step and liquid/gas mass transfer were more particularly investigated.

#### ***III.2.1.2. Materials and methods***

##### *III.2.1.2.1. Substrate characterization*

###### *III.2.1.2.1.1. Van Soest fractionation*

The content of cellulose, hemicellulose and lignin-like fractions in the substrate was analyzed according to the Van Soest procedure (Van Soest, 1963). After shredding and sieving, 1 g of cardboard was placed in a Fiberbag system (Gerhardt Germany). The sequential fractionation procedure was performed for six samples as follows: (1) The soluble compounds were obtained by extraction with a neutral detergent ( $30 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ;  $18.61 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8, 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $6.81 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7, 10\text{H}_2\text{O}$ ;  $4.56 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $10 \text{ mL L}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$ ) at  $100^\circ\text{C}$  for 60 min; (2) the hemicellulose-like compounds were extracted by an acid detergent ( $20 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$ ;  $26.7 \text{ mL L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4, 95-97\%$ ) for 60 min at  $100^\circ\text{C}$ ; (3) the lignin-like compounds were obtained by removing the cellulose-like compounds for 3 h with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%). The remaining

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

fraction corresponds to lignin. At the end of each step, the extracted samples were washed with deionized water and oven-dried at 100°C before the transition to the next step.

#### III.2.1.2.1.2. The biochemical methane potential

The biochemical methane potential (BMP) of the cardboard was assessed according to Angelidaki and Sanders (2004). The assays were conducted in triplicate (and one blank) in 600 mL serum bottles at 35° C, with a working volume of about 400 mL. The serum bottles were filled with synthetic growth medium containing nutrients and trace elements, and inoculated with granular sludge from a mesophilic anaerobic digester of a sugar factory. The final sludge concentration in the bottles was 20 gVS L<sup>-1</sup>. The bottles were loaded with 1 g of cardboard (corresponding to 0.77 gVS). Biogas production and composition were measured daily. The methane production is expressed under standard condition and accounts for the variation of the gas content in the headspace of the reactors. The calculated BMP accounts for the global methane production without the residual (endogenous) methane production measured with the blank assay.

#### III.2.1.2.2. Batch preparation and operating conditions

A compact cardboard with a density of 1.42 kg m<sup>-3</sup>, branded “Cartonnages Michel”, was used as a substrate since cardboard represents usually the largest proportion of organic compounds in municipal solid waste (21.5%) after putrescible waste (32.2%) (ADEME, 2009). The cardboard was shredded using a cutting mill SM-100 and sieved at 2 mm.

Experiments were carried out in 600 mL batch flasks with a working volume of 100 mL. A mixture of cardboard, water, inoculum and oligo-elements was prepared to reach six TS contents from “wet” to “dry” anaerobic conditions: TS = 10, 15, 20, 25, 30, 35 %. A substrate to biomass ratio S/X of 20 (w/w) was used to limit the influence of the inoculum composition on the degradation, S and X representing the initial TS contents of the substrate and the biomass, respectively. The inoculum corresponded to a leachate of pressed MSW digestate sampled in an industrial plant treating MSW. One mL of an oligo-element solution was added to the mixture. This oligo-element solution was composed of: FeCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O (2 g L<sup>-1</sup>), CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (0.5g L<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O (0.1 g L<sup>-1</sup>),

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

$\text{NiCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{ZnCl}_2$  ( $0.05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $0.05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $0.05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.04 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.01 \text{ g L}^{-1}$ )). The experiments were run over 298 days under mesophilic conditions ( $35^\circ\text{C}$ ) without mixing. Each TS condition was tested in four replicates.

#### III.2.1.2.3. Analytical methods

##### III.2.1.2.3.1. Biogas quantification and composition analysis

Biogas production and composition were determined daily during the first two months, and then once a week after the exponential phase of methane production.

The biogas production was measured by the water displacement method and then normalized according to the ambient temperature. The biogas composition was determined using a gas chromatograph (Varian  $\mu\text{GC-CP4900}$ ) by injecting a sample volume of 2 mL. This gas chromatograph was equipped with two columns: a Molsieve 5A PLOT column for  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}$  and a HayeSep A column for  $\text{CO}_2$  quantification. The calibration was carried out with a standard gas composed of 25 %  $\text{CO}_2$ , 2 %  $\text{O}_2$ , 10 %  $\text{N}_2$  and 63 %  $\text{CH}_4$ . The temperatures were  $30^\circ\text{C}$  for the oven and  $100^\circ\text{C}$  for the injector and the thermal conductivity detector. The gas carrier of the flow was Helium.

##### III.2.1.2.3.2. VFA and pH analysis

Volatile fatty acids (VFA) were analyzed at the end of the batch test. After centrifugation (13000 rpm, 15 min), VFA concentrations were measured by a gas chromatograph (Varian  $\mu\text{GC-CP3900}$ ) equipped with a flame ionization detector (FID). The column used was a semi-capillar Econocap FFAP (Alltech). The gas carrier of the flow was nitrogen. The rest of the assay technique is described in Ganesh *et al.* (2010).

pH was measured directly on the digestate using a pH meter *Eutech Instruments pH510* with Mettler Toledo InLab® Expert Pt1000 pH electrodes.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

#### III.2.1.2.4. Mathematical model

The Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) (Batstone *et al.*, 2002) was used to describe the experimental data. The characterization of the shredded cardboard with respect to ADM1 state variables, in particular carbohydrates and particulate inerts, was based on the results of the Van Soest fractionation and the degradable fraction of fibers (hemicellulose and cellulose). The degradable fraction of hemicellulose and cellulose (major degradable constituents of cardboard) was calibrated with the gas curve at 10% TS. The estimated value of 40% is of the same order of magnitude as the degradable fraction of fibers reported by Koch *et al.* (2010) for grass silage. In the model, the state variable for carbohydrates,  $X_{ch}$ , was considered to be composed of the biodegradable fraction of hemicellulose and cellulose, and the soluble organic fraction. The non-degradable fraction of hemicellulose and cellulose, as well as the lignin fraction were considered as particulate inerts ( $X_i$ ). Overall,  $0.33 \text{ gCOD gTS}^{-1}$  were attributed to  $X_{ch}$  and  $0.85 \text{ gCOD gTS}^{-1}$  to  $X_i$ . Simulations were run in Matlab/Simulink (Version 7.3.0).

The model was calibrated to the experimental data of the batch experiments at 10% TS using a trial and error approach. Compared to the standard parameters proposed by Batstone and Keller (2003) for the anaerobic digestion of sludge, two main parameters were modified in order to account for the degradation of the specific substrate (i. e., cardboard) at high total solids contents: the first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates and the volumetric liquid/gas mass transfer coefficient.

The default value of the first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates ( $k_{hyd,Xch}$ ) is  $10 \text{ d}^{-1}$ . For wet anaerobic digestion conditions and under mesophilic conditions, hydrolysis rate constants for cellulosic material (cellulose, office paper, cardboard, newsprint) reported in the literature are about  $0.03$  to  $0.07 \text{ d}^{-1}$  (Vavilin *et al.*, 2008; Liebetrau *et al.*, 2004; Vavilin *et al.*, 2004). However, the present assays were conducted under semi-dry and dry conditions. At low moisture conditions, Pommier *et al.* (2007) observed a strong dependence on the moisture level for both kinetic rates and ultimate methane production from paper and cardboard waste samples. In a modeling work, Qu *et al.* (2009) used a value of  $0.01 \text{ d}^{-1}$  for the hydrolysis rate constant of office

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

paper at TS contents of 40 and 66%. In the present work, the first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates ( $k_{hyd,Xch}$ ) was, thus, reduced from its default value to  $0.01 \text{ d}^{-1}$ . The volumetric liquid/gas mass transfer coefficient  $k_T$  (corresponding to the  $k_{La}$  variable in the model) was reduced from its default value ( $200 \text{ d}^{-1}$ ; for wet anaerobic digestion of activated sludge) to  $0.5 \text{ d}^{-1}$  to account for a reduced gas transfer due the pasty texture of the substrate-biomass mixture. To our knowledge, the volumetric liquid/gas mass transfer coefficient has never been measured in dry anaerobic digestion processes. The volumetric mass transfer coefficient  $k_{La}$  depends on two parameters:  $k_L$  corresponding to the mass transfer coefficient, and  $a$  corresponding to the specific surface area. In dry and semi-dry anaerobic digestion processes, the volumetric mass transfer coefficient  $k_{La}$  is drastically reduced because of two main reasons:

- (1) the solid-liquid/gas interface is low, because of the low biogas bubble generation, and because of the unmixed conditions.
- (2) The mass transfer coefficient term is also affected by the low moisture content. The following equation accounts for the difference between the diffusivity coefficients of soluble compounds in the digestate  $D_i$  (*digestate*) and in the water  $D_i$  (*water*):

$$k_L(\text{digestate}) = k_L(\text{water}) \left( \frac{D_i(\text{digestate})}{D_i(\text{water})} \right)^{0.5} \quad (3)$$

Diffusivity coefficients decrease drastically with the decrease of the porosity (i. e., the water content) and the increase of viscosity, which is also strongly related to the TS content (Battistoni, 1993; Battistoni *et al.*, 1997; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b).

Based on these theoretical considerations, the order of magnitude of the volumetric mass transfer coefficient is strongly affected by the TS content. A  $k_T=0.5 \text{ d}^{-1}$  was considered for the assay conducted at TS = 10%.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

#### **III.2.1.3. Results and Discussion**

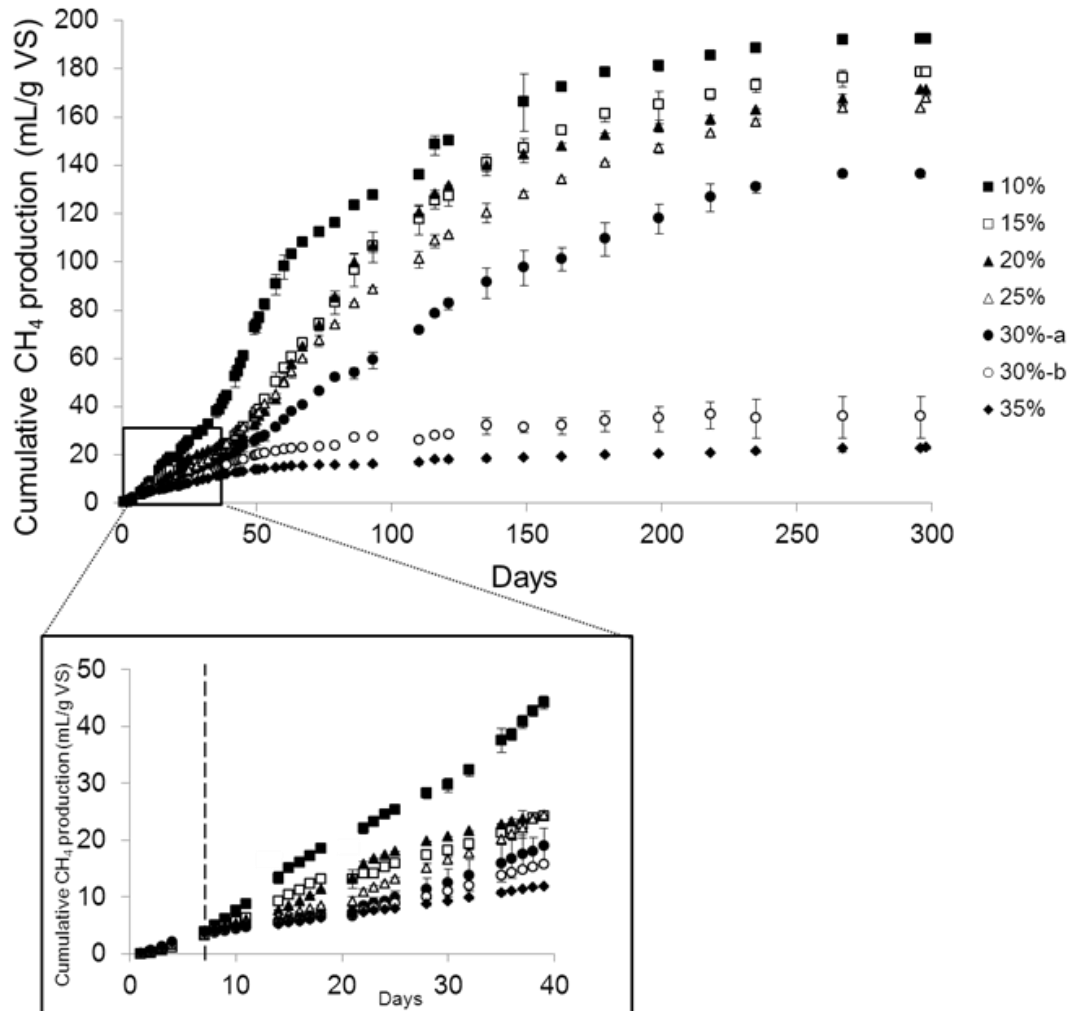
##### *III.2.1.3.1. Impact of TS content on anaerobic digestion performance*

Figure III-1 shows the cumulated methane production for the reactors operated at six different TS contents during the whole experiment. Each curve represents the average of four replicates, except for TS = 30% where two distinguished behaviors were observed. On the first 7 days (shown in the insert in Figure III-1), all the cumulated curves are similar. The initial rate of anaerobic degradation was, thus, identical for all TS contents, indicating that the intrinsic activity of the microbial consortium was the same for the different conditions, with an average methane rate of about  $0.48 \pm 0.05 \text{ mL gVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . After the first 7 days, the cumulated methane production was inversely proportional to the TS content (the first 40 days in Figure III-1).

Then, from 30-40 days of operation, methane production rates increased for the replicates having a TS content ranging from 10 to 25% (maximum methane rates are shown in Figure III-2), indicating the beginning of the exponential growth phase. During this phase, two different behaviors were observed at 30% TS. Two replicates followed a similar trend to that of the experiments conducted at 35% TS (named 30%-a in Figure III-1), whereas the two remaining replicates showed a behavior close to that at 25% TS (named 30%-b in Figure III-1). For 30%-b and 35% TS, the acceleration phase, corresponding to the exponential growth phase, never started. The highest  $\text{CH}_4$  production was about  $197 \text{ mL gVS}^{-1}$  at 10% TS. Since the biochemical methane potential (BMP) was about  $214 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$ , the biodegradation reaction was almost completed at 10% TS.

Considering that the COD of the substrate was  $1.44 \text{ gCOD gVS}^{-1}$ , the BMP was, thus,  $149 \text{ mL CH}_4 \text{ gCOD}^{-1}$  and corresponded to about 40% of the theoretical BMP value of  $350 \text{ mL CH}_4 \text{ gCOD}^{-1}$  (Buffière *et al.*, 2008).

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE



**Figure III-1: Cumulated methane production from cardboard according to the TS content. The insert corresponds to the first 40 days of the experiment.**

The low BMP value was probably due to the composition of the substrate: indeed only 73% of the TS content of this cardboard corresponded to volatile solids, and the remaining 27% to a mineral non-biodegradable fraction. Among the volatile solids (VS), the organic matter was composed of only 4% of soluble fraction and 14% of

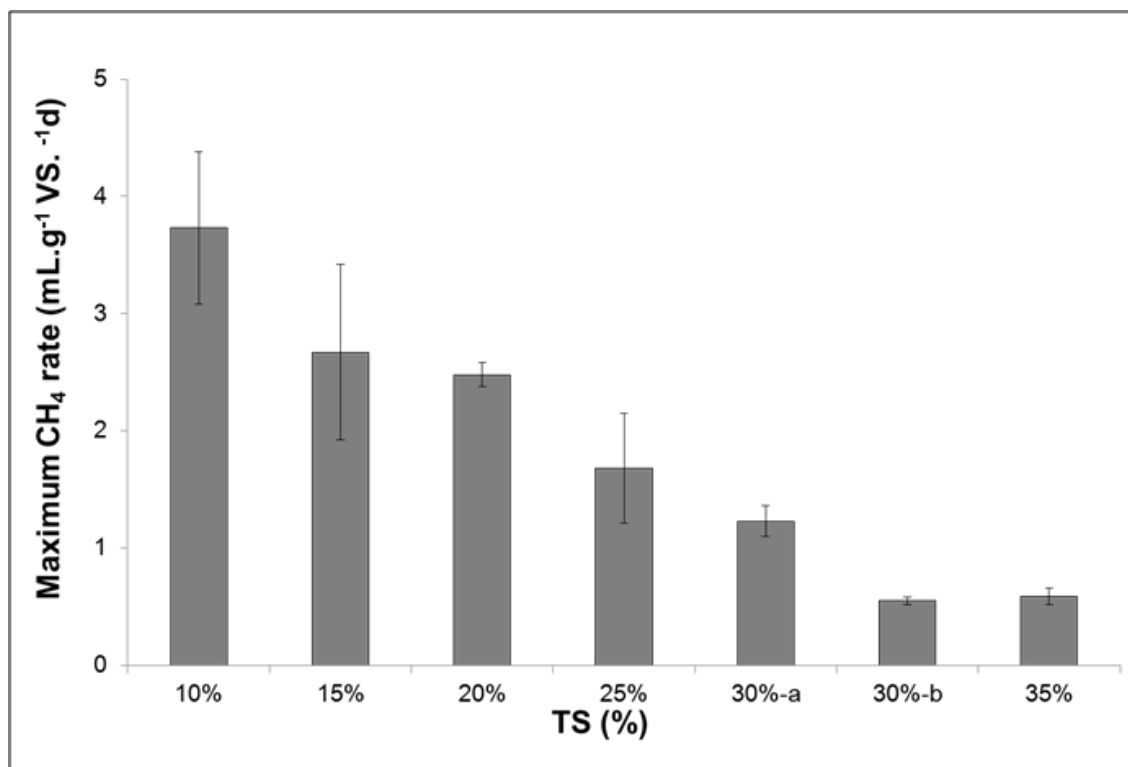
### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

hemicellulosic fraction: these two minor fractions represent the most degradable part of the organic matter. The two additional and most abundant fractions corresponding to cellulose and lignin represented 66% and 16% of the organic matter, respectively. These two fractions are resistant to biodegradation, especially under anaerobic conditions (Buffière *et al.*, 2008).

#### III.2.1.3.1.1. Methane production rate

Methane production rates were estimated from the cumulative methane production curves. The maximum methane production rate is shown in Figure III-2 for the different operating conditions. The maximum methane rate decreased with increasing TS contents. This result is consistent with previous work of Fernandez *et al.* (2010) who showed that the maximum methane rate was higher at 20% than at 30% TS. In the present work, the maximum methane rates were almost the same at 30%-b and 35% TS. However, the maximum methane rates were measured during the first seven days after the start-up of the experiment, corresponding therefore to the initial rate of anaerobic digestion. This initial rate was identical for all TS concentrations, because it corresponded to the intrinsic activity of the microbial consortium. For other TS concentrations, the maximum methane rates were observed between 40 to 80 days of experiment.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE



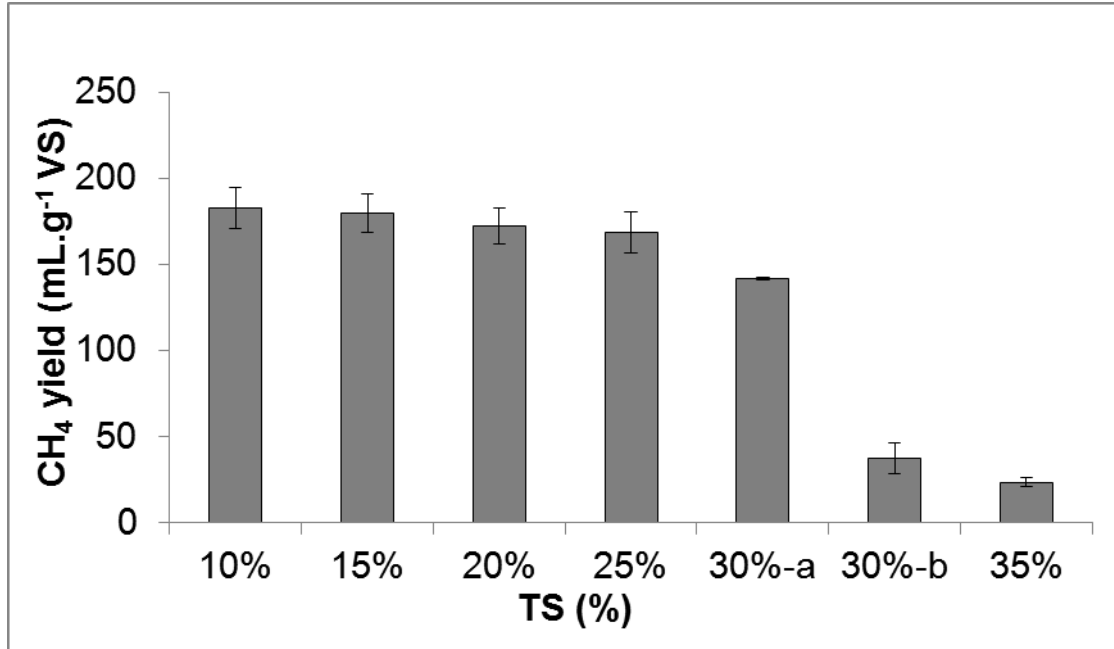
**Figure III-2: Influence of TS content on Maximum methane production rate.**

#### III.2.1.3.1.2. Maximum methane yield

The cumulative methane yields measured after 298 days are shown in Figure III-3. They were clearly dependent on the TS content. Analyses of variance (ANOVA) were performed, distinguishing three groups: the first group (G1), which included all replicates of 10, 15, 20, 25% TS, was significantly different from the second group (G2), which included 30%-a replicates (\* $p = 0.0011$ ); the third group (G3), which included replicates of 30%-b and 35% TS, was different from G1 and G2, with a very significant\*\*\* $p$  of  $2.2 \cdot 10^{-16}$  and  $2.02 \cdot 10^{-6}$ , respectively (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 5 \cdot 10^{-5}$ ; n.s., not significant ( $p > 0.05$ )). The methane production was inversely correlated to the TS concentration. The methane production was  $176 \pm 7$ ,  $142 \pm 1$  and  $30 \pm 10$  mL gVS<sup>-1</sup> for the groups G1, G2 and G3, respectively. Concerning the replicates named 30%-a, the reduction of the cumulated methane production is consistent with previous works. Indeed, Fernandez *et al.* (2008) observed a higher methane yield at 20% TS than at 30% TS for mesophilic conditions in batch tests. Likewise, Forster-Carneiro *et al.*

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

(2008) reported a higher methane production in thermophilic batch tests at 20% TS compared to 25% TS, and even higher than at 30% TS.



**Figure III-3: Influence of TS content on final methane yield (at the end of the experiment)**

At 30%-b and 35% TS, lower methane productions of about 37 and 24 mL.gVS<sup>-1</sup>, respectively, were observed. The difference in the behavior between the four replicates at 30% TS suggested that 30% TS could be considered as a threshold concentration for an inhibitory effect in high solids anaerobic digestion. This threshold could correspond to an inhibition of anaerobic digestion at high solids content due to a higher accumulation of metabolic by-products, such as volatile fatty acids.

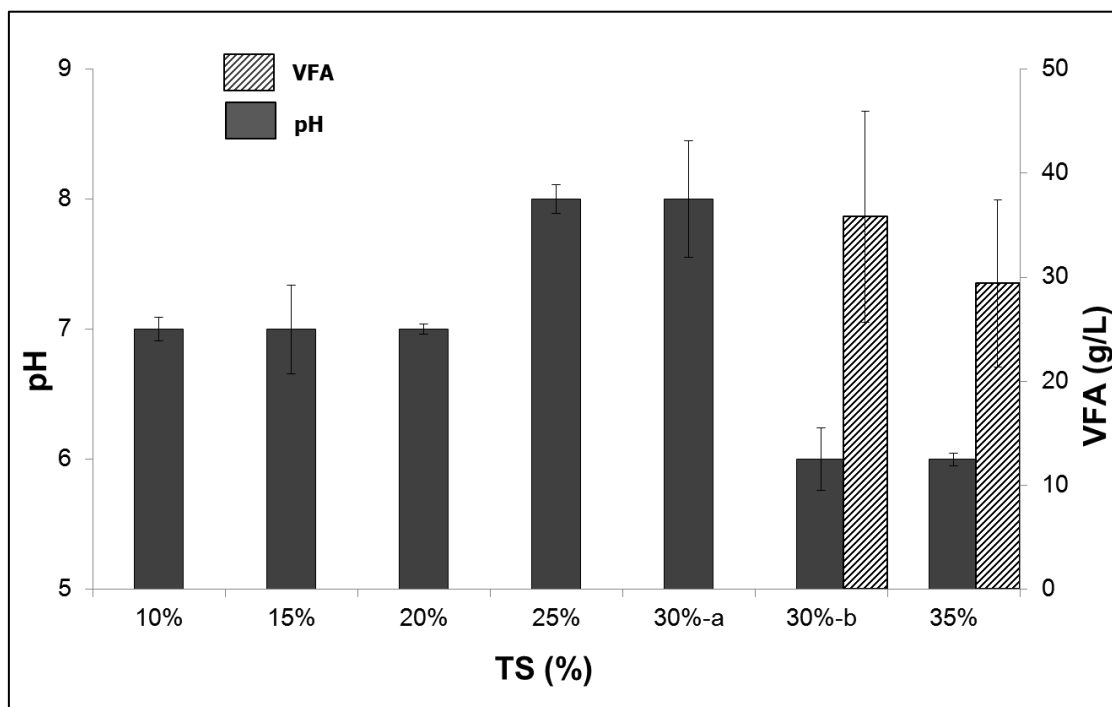
#### III.2.1.3.1.3. pH and VFA concentration

For a better understanding of the failure of dry anaerobic digestion at TS >30%, volatile fatty acids (VFA) and pH were analyzed at the end of the experiments (Figure III-4). For batch experiments with a good anaerobic digestion performance (between 10% TS and 30%-a), there was no accumulation of VFA and the average pH was 7.43±0.31.

When anaerobic digestion was inhibited (30%-b and 35% TS), high VFA concentrations were measured, with values ranging from 29 to 36 gVFA kgVS<sup>-1</sup>. Under semi-dry anaerobic digestion conditions, Li *et al.* (2010) already observed an increase of

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

the VFA concentration with increasing VS content (for TS contents of 16.0%, 13.5% and 11.0%, the maximum VFA value was  $22.4 \text{ g L}^{-1}$ ,  $6.8 \text{ g L}^{-1}$  and  $4.2 \text{ g L}^{-1}$ , respectively), and high concentrations of VFA inhibit the methane production (Ahring and Westermann, 1988). Mainly, total VFAs affect more specifically methanogens (Vedrenne, 2007). In addition, the average pH value was about 5.95 and 6.10 at 30%-b and 35% TS, respectively. These low pH values associated with VFA concentrations of 29 and  $36 \text{ g L}^{-1}$  might explain the inhibition of the anaerobic digestion process for these two TS contents, since VFA accumulation contributed to the decrease of pH. Moreover, at low pH, between 5 and 7, VFA are in their undissociated form, which is toxic for microorganisms (Zehnder, 1978).



**Figure III-4: Influence of TS content on pH and VFA concentration at the end of the experiment.**

#### III.2.1.3.1.4. Model results

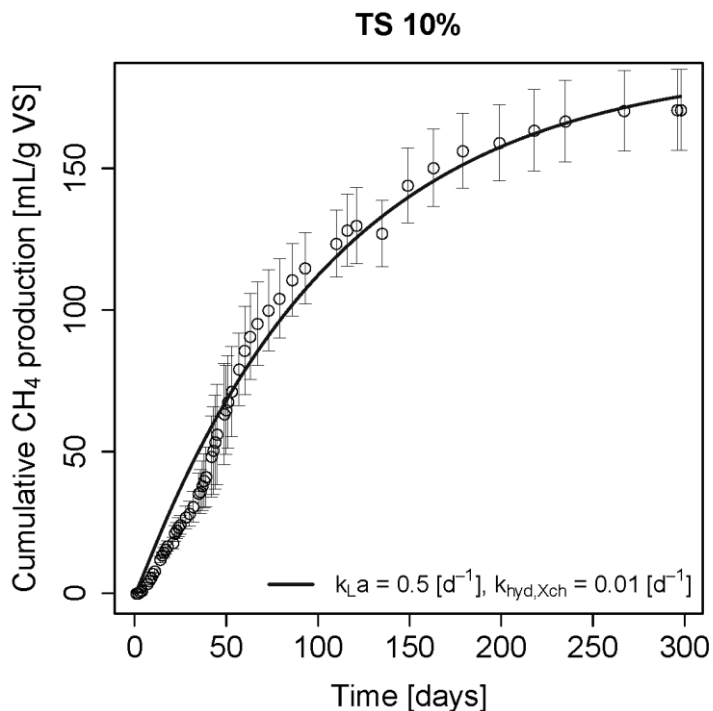
For better understanding of the origin of the limitation of anaerobic degradation at high solids contents, the Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) was used to describe this experimental data. Figure III-5 presents exemplarily simulation results for 10% TS

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

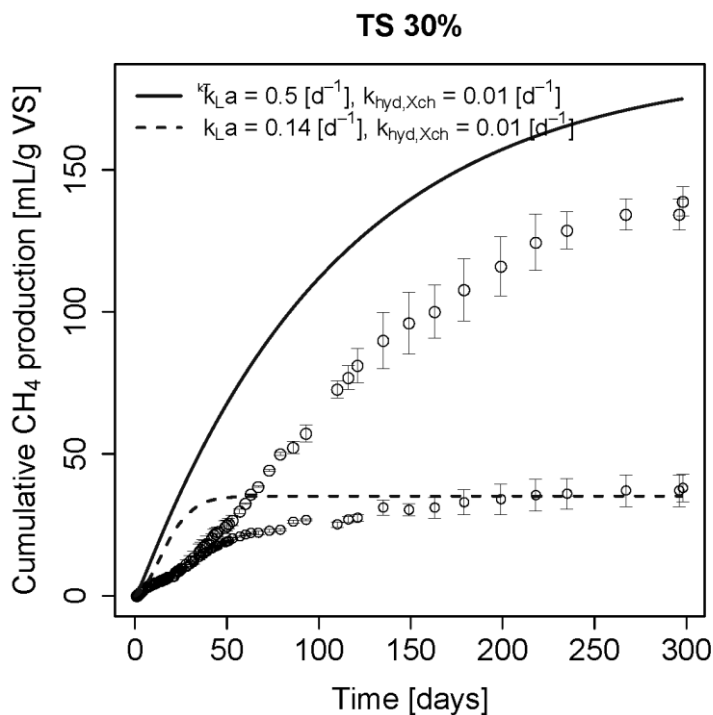
and the critical concentration of 30% TS. Model predictions closely followed the experimental data of cumulative methane production for a TS concentration of 10%, except for the first 50 days of the experiment. However, the model clearly over-predicted experimental data obtained for a TS concentration of 30%, using the same set of calibrated parameter values ( $k_T=0.5 \text{ d}^{-1}$  and  $k_{\text{hyd},X_{\text{ch}}}=0.01 \text{ d}^{-1}$ ). As the methane production rate decreased with increasing total solids content (see section '3.1.1 Methane production rate') and hydrolysis is the limiting step in methane production (Vavilin *et al.*, 2004), it was hypothesized that the first-order hydrolysis rate decreases with increasing TS concentration. Consequently, the first-order hydrolysis rate for carbohydrates,  $k_{\text{hyd},X_{\text{ch}}}$ , was decreased step by step with increasing TS concentration to fit simulation results, in particular the total cumulative methane production, to experimental data. The first-order hydrolysis rate needed to be reduced to  $0.0045 \text{ d}^{-1}$  in order to properly describe the final cumulative  $\text{CH}_4$  production for the two experiments that were not inhibited by high VFA concentrations and low pH at 30% TS (Figure III-6, solid line). The experimental results of the two experiments, in which methane production stalled due to very high VFA concentrations and reactor acidification, could not be described by further decreasing the hydrolysis rate (see section '3.2.1 Influence of the hydrolysis rate constant'). Thus, another mechanism must have been responsible for the inhibition of methane production.

Due to the pasty texture of the substrate-biomass mixture, the initial value of the liquid/gas transfer coefficient  $k_T$  was already reduced to  $0.5 \text{ d}^{-1}$  for a TS concentration of 10% to account for reduced mass transfer. As the viscosity of the substrate-biomass mixture increased and the porosity decreased with increasing TS content, it was hypothesized that the overall mass transfer decreases with increasing TS concentration. The overall mass transfer coefficient ( $k_T$ ) was, therefore, decreased to match measured and simulated total cumulative methane production for the two inhibited batch experiments at 30% TS. Reducing the value of  $k_T$  from  $0.5 \text{ d}^{-1}$  to  $0.02 \text{ d}^{-1}$  resulted in an adequate representation of the final cumulative methane production for the two inhibited experiments (Figure III-6, dashed line).

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE



**Figure III-5: Experimental and simulated cumulative CH<sub>4</sub> production at 10% TS, with calibrated values for  $k_T$  and  $k_{hyd,Xch}$ .**



**Figure III-6: Experimental and simulated cumulative CH<sub>4</sub> production at 30% TS, with calibrated values for  $k_T$  and  $k_{hyd,Xch}$ .**

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

Although the calibration of  $k_T$  and  $k_{hyd,Xch}$  allowed for describing the final cumulative methane production, the ADM1 did not describe very well the initial phase of cumulative methane production. The ADM1 describes hydrolysis as a simple first-order process. According to Vavilin *et al.* (2008), hydrolysis of certain complex substrates can, however, be better represented by the Contois model, which considers that hydrolysis kinetics depends on both substrate and biomass concentration (concentration of the biomass that produces the enzymes for hydrolysis). The Contois model is a more general model than the first-order hydrolysis kinetics and allows for better representing the sigmoid-type curve of cumulative methane production (Vavilin *et al.*, 2008).

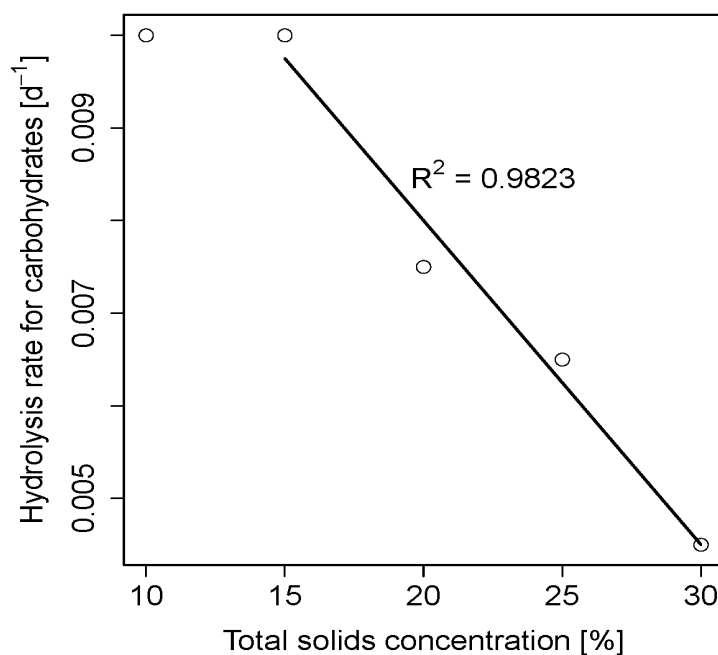
Using the Contois model, however, has no impact on the prediction of the final cumulative methane production (data not shown). As the aim of the modeling study was to find an explanation for the general trend of the experimental data (inhibition of anaerobic digestion of cardboard at high total solids contents), the first-order hydrolysis model is the simplest approximation of the hydrolysis step. In addition, the more complex structure of the Contois model makes it more difficult to identify and distinguish mechanisms influencing anaerobic digestion at high TS concentrations. Thus, first-order hydrolysis kinetics was used for deeper analysis of mechanisms affecting anaerobic digestion at high TS concentrations. Based on the simulation results presented above, two different mechanisms were identified that have a considerable impact on anaerobic digestion at high TS concentrations: 1) the rate of hydrolysis of particulate substrates (here only carbohydrates), and 2) the transfer of produced gas from the liquid phase to the gas phase. The influence of both phenomena is now presented in more detail.

#### *Influence of the hydrolysis rate constant*

For each TS concentration, the first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates was calibrated for batch experiments that were not inhibited by high VFA concentrations and low pH to meet the total cumulative methane production at the end of each batch experiment. Figure III-7 shows the calibrated hydrolysis rate constants for each TS concentration. The hydrolysis rate constants obtained for TS concentrations of 10% and 15% were similar. But the calibrated hydrolysis rate constants linearly decreased with

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

increasing TS concentration for  $15\% \leq TS \leq 30\%$ . This finding is in agreement with results presented by Pommier *et al.* (2007), who observed a strong impact of the moisture content on kinetic rates and maximum methane production in solid waste anaerobic digestion. Extrapolation of the hydrolysis rate constant for a TS concentration of 35% using the linear relationship shown in Figure III-7 gave a value of  $0.00275 \text{ d}^{-1}$ . With this hydrolysis rate constant and a  $k_T$  value of  $0.5 \text{ d}^{-1}$  (as used for all non-inhibited batch experiments), the ADM1 predicted a total cumulative methane production of  $107 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$  and no VFA accumulation for  $TS = 35\%$ . The total cumulative methane production predicted by the model was 4.5 times higher than that observed in the experiment ( $23.5 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$ ). Thus, a further decrease in the hydrolysis rate constant could not explain why methane production stalled at a total solids concentration of 35%.



**Figure III--7: Influence of the first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates on anaerobic digestion of cardboard for unlimited mass transfer as predicted by the ADM1.**

In summary, a decreasing first-order hydrolysis rate constant with increasing TS content could well describe experimental methane production at different TS in non-inhibited batch experiments. But a decreasing hydrolysis rate constant could not explain

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

considerable VFA accumulation, reactor acidification, and limited methane production observed in two batch

#### *Influence of the overall mass transfer coefficient*

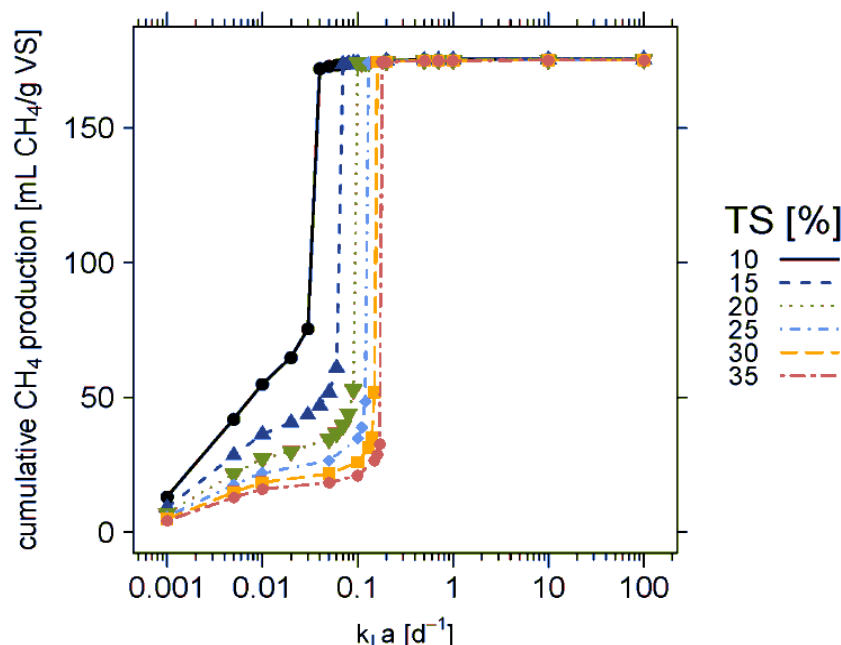
The influence of the overall mass transfer coefficient  $k_T$  was evaluated by varying its value between  $0.001 \text{ d}^{-1}$  and  $100 \text{ d}^{-1}$  for each studied TS concentration. The default value (named  $k_{La}$  in the original ADM1) is  $200 \text{ d}^{-1}$  for modeling anaerobic digestion of activated sludge (wet digestion) (Rosen and Jeppsson, 2006). The first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates was kept constant at  $0.01 \text{ d}^{-1}$  for all simulations to focus on the effect of the overall mass transfer coefficient. Figure III-8 shows the final cumulative methane production obtained for different values of  $k_T$  and different TS contents. A sudden and steep decrease in the cumulative methane production can be observed for  $k_T$  values between  $0.04 \text{ d}^{-1}$  and  $0.18 \text{ d}^{-1}$  depending on the TS content.

Above a critical  $k_T$  value, methane production was not influenced by overall mass transfer and the cumulative methane production remained almost constant independently of the  $k_T$  value. In this case, no VFA accumulation was observed. Below the critical  $k_T$  value, limited overall mass transfer clearly affected methane production and resulted in considerably lower cumulative methane production. Methane production was more sensitive to overall mass transfer limitations at high TS concentrations as the methane production dropped already at higher  $k_T$  values (at  $0.18 \text{ d}^{-1}$  for 35% TS compared to  $0.04 \text{ d}^{-1}$  for 10% TS). Low methane production always went along with accumulation of VFA and reactor acidification (data not shown).

The different behaviors in the batch experiments at 30% TS content might be related to slightly different actual total solids contents in the serum bottles as a result of minor inaccuracies in the preparation of the bottles, including measurement errors. In simulations, methane production at 30% TS content dropped from  $174.5 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$  to  $51.9 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$  when the mass transfer coefficient was reduced from  $0.16 \text{ d}^{-1}$  to  $0.15 \text{ d}^{-1}$ . At 35% TS, the methane production dropped already between  $k_T = 0.18 \text{ d}^{-1}$  and  $k_T = 0.17 \text{ d}^{-1}$  from  $174.5 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$  to  $32.8 \text{ mL CH}_4 \text{ gVS}^{-1}$ . In addition, the lines for TS 30% and 35% in Figure III-8 are very close to each other. Thus, a small increase in

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

the actual TS concentration at a desired TS content of 30% can have already a significant impact on the cumulative methane production.



**Figure III-8: Influence of the overall mass transfer coefficient  $k_La$  on anaerobic digestion of cardboard as predicted by the ADM1.**

According to model results, overall mass transfer limitation resulted in an accumulation of inorganic carbon ( $\text{CO}_2$ ), dissolved methane, and dissolved hydrogen, and can have an inhibitory effect on methanogenesis. Indeed, the  $\text{CO}_2$  produced during methanogenesis remains trapped in the matrix since the release of dissolved compounds is low in the digestate: therefore, the local  $\text{CO}_2$  concentration can increase, which may cause a local acidification, and hence inhibition of methanogenesis from the beginning of the experiment implicating VFA accumulation. The accumulation of dissolved hydrogen can also cause inhibition of valerate, butyrate, and propionate degradation and generate an accumulation of these VFA. “Obligated Hydrogen-Producing Acetogens” bacteria convert VFA and high molecular weight long-chain fatty acids to acetate, carbon dioxide and hydrogen. These  $\beta$ -oxidation reactions are thermodynamically not possible under standard conditions ( $\Delta G^\circ > 0$ ). In fact,  $\beta$ -oxidation occurs only at very low hydrogen partial pressure. Thus, produced hydrogen needs to be locally consumed (e.g.,

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

syntrophic association between hydrogen producing species and methanogenic species) (Ahring, 2003), or to be removed from the liquid phase through liquid/gas mass transfer.

An effect of a limitation of the overall mass transfer on hydrolysis cannot be reported as the ADM1 does not consider inhibition of hydrolysis. Overall, the simulation results clearly show that overall mass transfer limitation can explain limited methane production at 30% and 35% TS. But the decreasing cumulative methane production for TS concentrations between 15% and 30% cannot be attributed to mass transfer limitation.

#### ***III.2.1.4. Conclusion***

Based on experimental observations and ADM1 simulations, it was shown that the TS content affects the global anaerobic digestion performance of solids through (i) reduction of the microbial hydrolysis rate for  $10\% \leq TS \leq 25\%$  and (ii) physical limitation related to liquid/gas mass transfer for  $TS \geq 30\%$ . Further investigations need to be done to understand the role of the TS content on the behavior of the microbial community structure involved in the anaerobic digestion degradation of solids from wet to dry technologies.

#### **III.1.3. Discussion**

Grâce aux expériences menées dans cette étude, nous avons pu confirmer que la concentration en MS est un facteur clé qui influence considérablement le processus de DA, particulièrement pour un fonctionnement en mode « très sec ». A des teneurs en MS de 10, 15, 20, 25 %, la digestion anaérobie présente de bonnes performances en terme de quantité de méthane produite. Cependant, à 35% de MS, de très faibles quantités de méthane ont été produite et l'analyse des AGV et du pH montre des conditions non favorables à la méthanisation. A 30% de MS, deux comportements ont été observés : deux réplcats ont un comportement proche de celui observé à 25% de MS et les deux réplcats se comportent comme les batchs avec des teneurs de 35% de

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

MS. Cette différence entre les répliqués à 30% de MS suggère que cette teneur en MS est la limite pour un bon fonctionnement de la DA.

Les travaux de modélisation nous ont également permis de tester des hypothèses qui pourraient expliquer ce phénomène. Grâce aux simulations, nous avons pu voir qu'une accumulation des AGV n'expliquait pas les observations à forte concentration en MS, et en particulier le mauvais fonctionnement de la DA pour des teneurs en MS > 30%. Les simulations testées montrent que l'augmentation de la concentration en MS affecte l'hydrolyse. En effet, l'hydrolyse est négativement corrélée aux concentrations en MS et cela à partir de 15% de MS.

Cependant la diminution de la cinétique d'hydrolyse seule ne peut expliquer la très faible valeur de la production de méthane à 35% en MS qui est 4,5 fois inférieur à la production théorique prédite par le modèle. Celle-ci peut cependant être liée à la diminution du coefficient volumique de transfert de matière digestat/gaz (appelé communément  $k_{La}$  ou  $k_T$  dans la précédente publication) dans les milieux pauvres en eau. Ce coefficient est composé de deux termes : le coefficient de transfert de masse digestat/gaz  $k_L$  et la surface spécifique d'échange  $a$ . La relation suivante permet de prendre en compte l'influence du coefficient de diffusion d'un composé dissous dans la détermination du coefficient de transfert de masse  $k_L$  :

$$k_L(\text{digestat}) = k_L(\text{eau}) \left( \frac{D_i(\text{digestat})}{D_i(\text{eau})} \right)^{0.5} \quad (4)$$

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer pourquoi le coefficient de diffusion  $k_L$ , et donc le terme de transfert global  $k_{La}$  décroît avec l'augmentation du taux de matières sèches.  $k_L$  diminue avec la diminution de la porosité du milieu, ce qui est le cas lorsque le taux de MS augmente. De plus,  $k_L$  diminue également lorsque la viscosité augmente, celle-ci croît fortement, et de manière exponentielle, avec la concentration en MS (Battistoni, 1993; Battistoni *et al.*, 1997; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Bollon (2012) a mesuré les coefficients de diffusion de l'ion  $\Gamma$  dans des digestats provenant de procédés de digestion sèche, et a montré que le coefficient de diffusion dans un digestat à 25% de MS était environ 200 fois supérieur à celui de l'eau. Par conséquent, à partir de ces

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

conditions théoriques, nous pouvons en déduire que le coefficient volumique de transfert diminue fortement en condition sèche par rapport à une condition plus humide.

Le transfert limité, par exemple à 35% de MS, se traduit par une accumulation de biogaz dissous dans le milieu réactionnel. Cette accumulation de gaz et plus spécifiquement de  $\text{CO}_2$  doit favoriser l'acidification du milieu. Cette observation est compatible avec les résultats de mesure des pH obtenus à 35% de MS qui sont inférieurs à 6. La présence de  $\text{H}_2$  dissous dans le milieu réactionnel est également fortement envisageable. Ces deux paramètres (pH acide et  $\text{H}_2$ ) possèdent des effets inhibiteurs sur les communautés microbiennes. A des pH acides (entre 5 et 7), les activités microbiennes sont réduites (Veeken *et al.*, 2000). L'influence du pH est d'autant plus importante en présence des AGV qui se transforment en AGV indissociés toxiques pour les microorganismes (Zehnder, 1978).

D'un point de vue purement opérationnel, la limitation de la DA en voie sèche est un paramètre important à prendre en compte lors du design et de l'opération de digesteurs. En effet, le mélange des milieux réactionnels, particulièrement à de fortes teneurs en matières sèches, semble indispensable au maintien d'une bonne efficacité de la digestion anaérobie. En digestion anaérobie, le mélange est d'autant plus important lorsque la concentration en MS augmente (Karim *et al.*, 2005). Il est intéressant de remarquer une observation de terrain et de laboratoire qui renforce l'analyse précédente et le rôle majeur du transfert de matière des gaz dissous du digestat. La plupart des digesteurs industriels et de laboratoire par voie sèche possède une agitation intermittente (injection de biogaz, mécanique...), et une forte production apparente de biogaz est générée suite au mélange du milieu réactionnel. Cette augmentation de quantité de biogaz, est tellement rapide qu'elle ne peut être due qu'à un phénomène physique et non biologique. Le mélange permet ainsi d'homogénéiser le digestat et de créer de nouvelles interfaces qui peuvent ainsi favoriser le transfert du biogaz dissous en sursaturation.

Afin de confirmer l'influence du transfert sur la digestion anaérobie, nous avons développé une expérience afin de tester l'influence du seul terme du coefficient de transfert facilement accessible : la surface spécifique d'échange  $a$ .

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

#### III.2. Rôle clef de la surface spécifique d'échange

##### III.2.1. Introduction

Comme il est expliqué dans le paragraphe précédent, la concentration élevée en MS peut être problématique pour le transfert du biogaz produit. Outre la concentration en MS, un autre facteur sur lequel il est possible d'agir pour améliorer le transfert des composés dissous du milieu réactionnel vers le ciel gazeux est la taille de surface spécifique d'échange  $a$ . En effet, le transfert est piloté par deux variables qui sont :  $k_L$  (coefficient de transfert de masse liquide gaz) et la surface spécifique d'échange. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la surface spécifique d'échange peut favoriser de meilleures performances en DA par voie sèche, différentes surfaces spécifiques d'échange ont été testées. La surface spécifique d'échange est le rapport de la surface d'échange matrice/gaz ( $S$ ) sur le volume de l'échantillon ( $V$ ) :

$$a = \frac{S}{V} \quad (5)$$

Dans un digesteur par voie sèche non-mélangé, la surface d'échange ( $S$ ) peut correspondre au diamètre du réacteur.

##### III.2.2. Moyens expérimentaux mis en œuvre

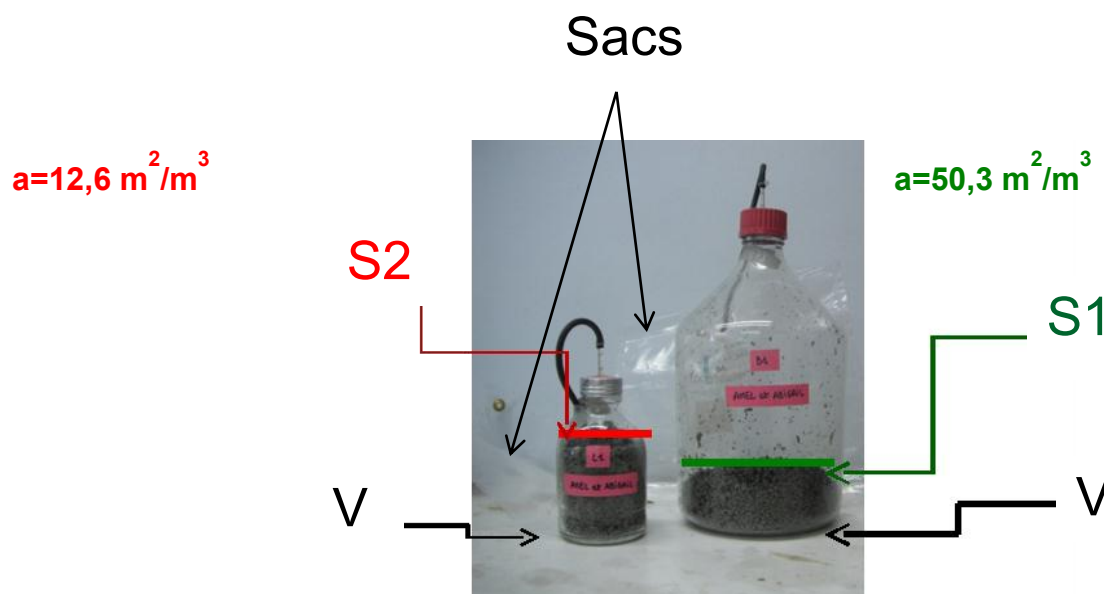
Pour étudier l'influence de la surface spécifique d'échange, des fioles de diamètres différents ont été utilisées en gardant toujours la même quantité ( $V$ ) de substrat. Des expériences ont ainsi été réalisées dans des flacons cylindriques de tailles différentes, fiole de 0,6 et de 5 L (Figure III-9). Trois répétitions ont été réalisées avec des flacons d'une capacité 0,6 L (petites fioles) possédant un diamètre de 8 cm et donc une surface d'échange est de  $50,3 \text{ cm}^2$ . Trois autres répétitions ont été effectuées dans des flacons de 5 L d'un diamètre de 16 cm, correspondant à la surface d'échange de  $201 \text{ cm}^2$  (grandes fioles). Tous les flacons contiennent le même volume d'échantillon  $V = 400 \text{ mL}$ . Par conséquent, la surface spécifique des grandes fioles est égale à :  $50,3 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ , et elle est de  $12,6 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$  pour les petites fioles.

Nous avons mis en œuvre ces réacteurs avec une concentration en MS de 25% Comme

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

il est indiqué dans la partie matériels et méthodes, le substrat utilisé pour cette expérimentation est du carton broyé et tamisé à 2mm. Le substrat a été inoculé avec du jus de presse de digesteur industriel de déchets ménagers avec un ratio S/X de 20. Quatre mL d'une solution d'oligo éléments ont été ajoutés au mélange. Les expériences ont été réalisées pendant 170 jours dans des conditions mésophiles (35 ° C) et sans mélange.

Pour toutes les conditions, les fioles ont été reliées à des sacs, afin de maintenir le ciel gazeux, dont le volume diffère selon la taille des fioles, à pression atmosphérique (figure III-9). Pour un même volume de biogaz produit dans une petite fiole, une pression plus importante aurait pu influencer le processus de méthanisation.



**Figure III-9: Photographie montrant 2 tailles de fioles, leurs surfaces spécifiques d'échange et le système de sacs reliés aux fioles.**

Un témoin négatif a été réalisé pour suivre l'activité endogène des microorganismes issus de l'inoculum. Toutes les 2 à 3 semaines, les volumes et la composition du biogaz ont été relevés. A la même fréquence, les fioles sont ouvertes pour prélever environ 2 g de digestat. Le prélèvement se déroule sous flux d'azote pour limiter la présence d'oxygène dans le ciel gazeux. De plus, après chaque prélèvement le ciel gazeux de

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

chaque fiole est entièrement renouvelé par de l'azote. Le milieu réactionnel prélevé est utilisé pour mesurer la concentration et la composition des AGV.

#### III.2.3. Résultats et discussion

Les résultats obtenus après 171 jours d'expérimentation montrent clairement l'influence de la surface spécifique d'échange sur la DA par voie sèche. La figure III-10 montre le suivi de la production de méthane dans les deux conditions opératoires. Une longue période de latence de 71 jours est observée à l'issue de laquelle la production de méthane était en moyenne de  $21,3 \text{ mL.g}_{\text{MV}}^{-1}$  pour les grandes fioles, et de  $11,5 \text{ mL.g}_{\text{MV}}^{-1}$  de MV pour les « petites fioles ». A l'issue de la période de latence, une phase exponentielle peut être observée uniquement dans le cas d'une grande surface spécifique d'échange. Les « petites fioles » ne produisent dès lors que peu de méthane. Au jour 171, la quantité de méthane cumulée est de  $71,4 \text{ mL.g}_{\text{MV}}^{-1}$  pour « les grandes fioles », ce qui représente un facteur 7 par rapport à l'autre condition expérimentale.

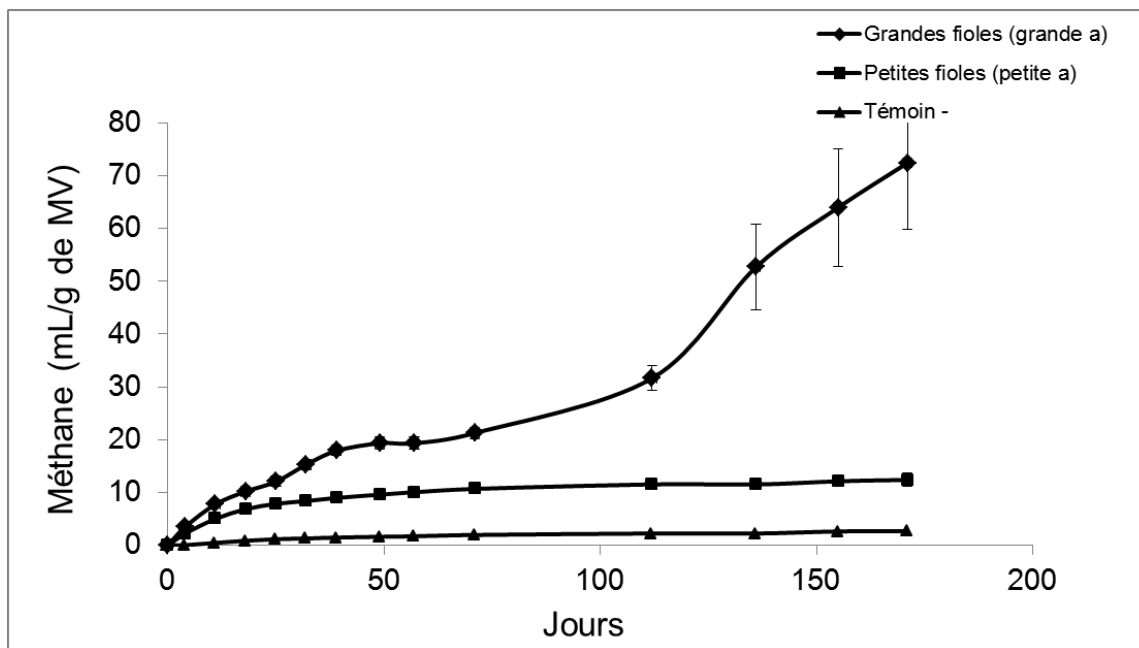


Figure III-10: Volume de méthane produit pour les deux surfaces spécifiques d'échange ainsi que pour le témoin négatif

La courbe de production de biogaz (Figure III-11) suit la même tendance que celle de production de méthane. Cependant, le pourcentage de méthane dans le biogaz est différent pendant la période de latence et après la phase exponentielle. En effet, pour les

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

grandes fioles, au cours de la phase de latence (de 0 à 71 jours), le pourcentage de méthane dans le biogaz était de 23% (pas d'hydrogène détecté). Cependant, toujours pour les grandes fioles entre les jours 71 et 171, le pourcentage de méthane a considérablement augmenté et est passé à 46%. Ceci montre que la phase limitante en début d'incubation était la méthanisation du fait que la croissance des méthanogènes est plus lente que celle des autres bactéries.

Le suivi des AGV (Figure III-12) montre, que dès le 4<sup>ème</sup> jour après le lancement de l'expérimentation, leur concentration était de 6 g.L<sup>-1</sup>, puis elle est montée jusqu'à 14 g.L<sup>-1</sup> au jour 25, et cela pour les deux surfaces d'échange étudiées. Cette observation confirme que la phase limitante dans le cadre de cette expérimentation n'est pas l'hydrolyse mais plutôt la méthanogenèse.

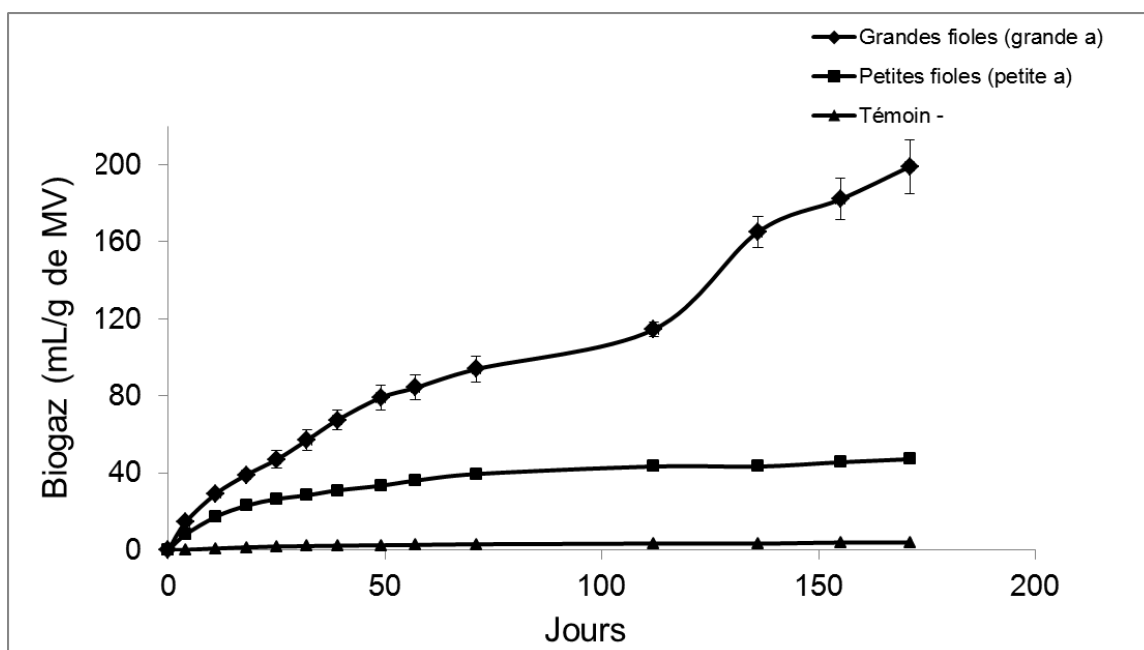
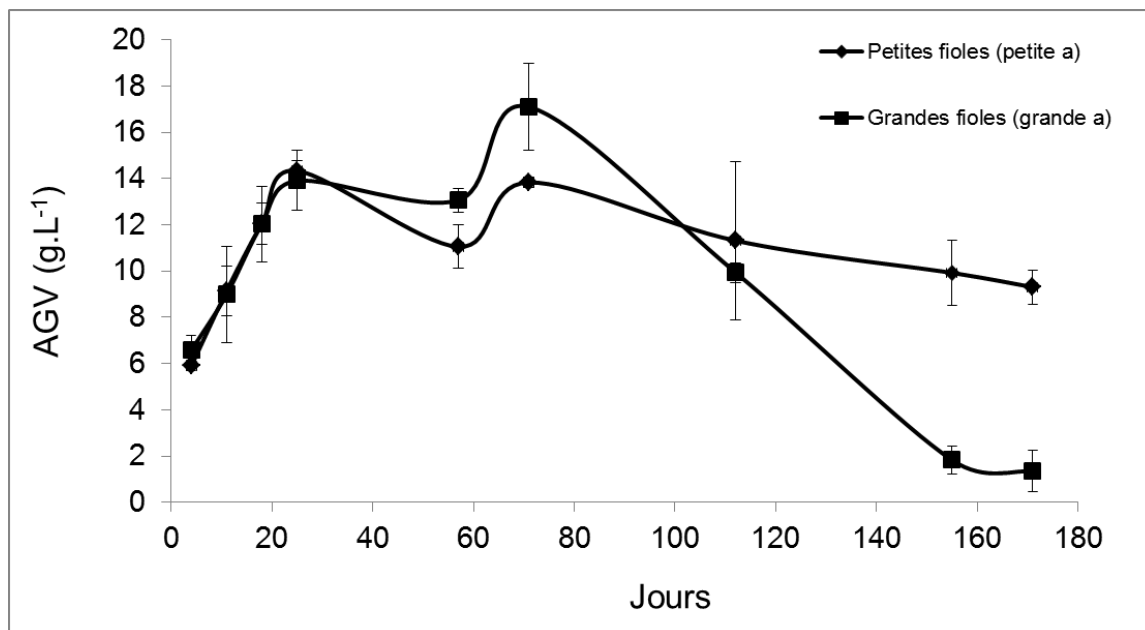


Figure III -11 : Cinétique de production de biogaz pour les deux différentes surfaces spécifiques d'échange ainsi que pour le témoin négatif

Contrairement à ce qui est indiqué dans la littérature (Aguilar *et al.*,1995), une concentration élevée en AGV (jusqu'à 17.1 g.L<sup>-1</sup> ) n'est pas inhibitrice pour les méthanogènes. Après le jour 71, la concentration en AGV commence à baisser considérablement pour les grandes surfaces d'échange, cette baisse d'AGV étant corrélée avec l'augmentation de la production de biogaz.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE



**Figure III-12 : Cinétique de production d'AGV pour les deux différentes surfaces spécifiques d'échange**

Cependant pour les petites fioles, les quantités d'AGV, méthane et biogaz sont stationnaires, ce qui signe l'inhibition de la réaction de méthanisation.

Cela peut être expliqué par le fait qu'à petite «a» la concentration en CO<sub>2</sub> dissous est élevée ce qui rend le milieu acide. Un pH acide est encore plus agressif lors de la présence des AGV qui passent sous leur forme indissociée.

Les résultats obtenus montrent donc la forte influence de la surface spécifique d'échange a sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche, particulièrement sur la mise en place de la réaction de méthanogénèse de la DA par voie sèche. La prise en compte de ce paramètre peut être un moyen d'améliorer les performances de la DA par voie sèche. L'amélioration de ce procédé de DA par voie sèche, en jouant sur la surface spécifique d'échange peut alors être réalisée de deux façons : par une optimisation du mélange ou par la conception de nouveaux types de réacteurs qui permettent d'augmenter les surfaces d'échange.

#### III.3. Conclusion

Dans ces travaux, nous avons clairement observé le rôle majeur de la teneur en matières sèches sur les performances de la DA. Outre la diminution des cinétiques d'hydrolyse

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

avec une baisse de la teneur en eau, le transfert de matière des gaz dissous produit dans le milieu réactionnel vers la phase gazeuse est un mécanisme clef dans le développement et le maintien d'une activité méthanogène, principalement à de fortes teneurs en MS. Cette hypothèse a été testée par l'utilisation du modèle ADM1. Ceci permet d'expliquer la chute importante de la production de méthane pour des teneurs en MS supérieures à 30%. Ce mécanisme de limitation par le transfert a également été clairement mis en évidence expérimentalement en faisant varier la surface spécifique d'échange «a» dans des fioles. De la limitation du transfert résulte l'augmentation du CO<sub>2</sub> dissous dans le milieu liquide qui intervient dans la baisse du pH du digestat, le pH étant un facteur inhibiteur de la DA. Une des phases limitantes en DA est la méthanogénèse, suite à l'inhibition de la méthanogénèse par AGV issus de l'acidogénèse. Les AGV en milieu acide se trouvent sous leur forme indissociée toxique pour les microorganismes.

Le coefficient volumique de transfert digestat/gaz et la surface spécifique d'échange sont étroitement liés à la nature du substrat et la taille des particules. Dans notre cas, le carton broyé très fin forme un milieu très compact ressemblant à du papier mâché, du fait de l'absorption de l'eau par le carton. La texture du digestat, son tassement ou sa viscosité dépendent du type de substrat et de sa granulométrie. Certes, dans le cas d'autres déchets, les conditions d'inhibition de la DA par voie sèche observées dans ces expériences peuvent évoluer.

La cible première de ce problème est, bien entendu, les micro-organismes impliqués dans ce processus de DA. Afin de comprendre l'influence de la concentration en MS sur le comportement des communautés bactériennes et archées et de faire le lien entre qualité et quantité des microorganismes et les performances de la digestion anaérobie par voie sèche, les communautés microbiennes ont été suivies dans les réacteurs batchs, avec des concentrations en MS comprises entre 10 et 35%. Les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

### III. INFLUENCE DU TRANSFERT DU BIOGAZ SUR LES PERFORMANCES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

---

#### ***IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE***

---

Cette seconde partie de résultats est centrée sur l'étude des communautés microbiennes (archées et bactéries) impliquées dans le processus de DA par voie sèche. L'influence de la concentration en MS sur la digestion anaérobie ainsi que le lien entre paramètres opératoires, performances et comportement des microorganismes de la méthanisation sont abordés.

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

##### IV.1. Avant-propos

La fonctionnalité et les performances de la Digestion Anaérobie (DA) sont étroitement liées aux microorganismes impliqués dans le processus de méthanisation. La digestion anaérobie met en œuvre des processus biologiques. Certes, cette réaction est influencée par les conditions initiales et les paramètres opératoires, mais il est important de souligner que ces paramètres influencent cette réaction par l'intermédiaire des microorganismes impliqués. Pour cette raison, il est important d'étudier les communautés microbiennes et leur comportement dans des milieux avec des contraintes opératoires telles que la concentration élevée en MS. Ce paramètre est spécifique à la DA par voie sèche.

Jusqu'à présent, les variables fréquemment utilisées pour le contrôle et le suivi de la DA restent des variables macroscopiques : la production et composition de biogaz, la concentration en AGV dans le milieu de digestion, le pH etc. Le lien entre les conditions environnementales telles que la concentration en AGV, le pH et les microorganismes a été étudié pour la digestion anaérobie en condition humide. Cependant la relation entre micro-organismes/fonctionnalité/performances de la digestion anaérobie par voie sèche n'a jamais été abordée, à l'exception de l'étude de Montero *et al.* (2008). Ces chercheurs ont démontré un meilleur démarrage de la DA par voie sèche en utilisant un inoculum riche en méthanogènes hydrogénotrophes. Cependant cette étude a abordé une seule concentration en MS (30%) et les auteurs ne se sont intéressés qu'aux deux grands groupes d'archées (les méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes) et aux eubactéries en général sans aller plus loin dans la classification.

L'influence de la concentration en MS sur les performances de la digestion anaérobie a été clairement démontrée dans l'article exposé dans le chapitre III. Les microorganismes sont à l'origine de la réaction de la digestion anaérobie, et leur comportement est une information capitale pour expliquer le fonctionnement et l'inhibition des processus biologiques.

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

Dans l'objectif de comprendre le lien entre la concentration en MS, les performances et les microorganismes impliqués dans le processus de DA par voie sèche, des prélèvements du milieu réactionnel ont été réalisés en fin d'expérimentation (jour 298) dans les réacteurs dont les performances ont été exposées dans le paragraphe « III.1.2 ». La structure des communautés microbiennes impliquées dans la réaction de méthanisation a été analysée en utilisant une technique d'empreinte moléculaire, la PCR-SSCP. La quantification de ces microorganismes a été réalisée par PCRq.

L'originalité de cette étude provient de la gamme de concentrations en MS allant de 10 à 35% et couvrant ainsi la plage de fonctionnement de la digestion humide et de la digestion sèche. Les espèces bactériennes et méthanogènes majoritaires impliquées pour chaque concentration en MS ont été identifiées. Les résultats obtenus sont présentés et discutés sous forme de publication. Cette publication a été soumise au journal FEMS Microbiology Ecology.

##### **IV.2. Influence of total solids on Bacterial and Archaeal communities in anaerobic digestion**

###### **Abstract**

---

Anaerobic Digestion (AD) is a process in which microorganisms degrade organic matter into biogas. In AD processes with high Total Solids (TS) content, the low amount of water can impact the microbial communities due to limited transfer. In this paper, the changes in bacterial and archaeal communities were investigated in batch tests within a range of TS from 10% to 35%. Between 10% and 25% TS, no structure specific to the bacterial community was observed. At a TS content between 30% and 35%, AD was inhibited and VFAs accumulated; three main dominant bacteria were identified corresponding to *Clostridium* sp. which are known for their ability to grow at a low pH. The archaeal community was more strongly impacted by the TS gradient, and three archaeal community structures were observed. Between 10% and 15% TS, *Methanobacterium* sp. was the most dominant *Archaea*; between 20% and 25% TS,

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

there was codominance of *Methanosarcina* sp. and *Methanobacterium* sp.. At TS between 30% and 35 %, a specific *Methanobacterium* sp. was identified, indicating its resistance to low pH. As the structures of the bacterial and archaeal communities were specific at high TS contents, these species were effective bio-indicators of inhibited AD.

---

##### IV.2.1. Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a technology which permits the transformation of organic matter into methane-rich biogas, and this methane constitutes a source of renewable energy. Depending on the water content in the anaerobic bioreactor, three types of digestion processes have been developed: “wet”, “semi-dry” and “dry”. The dominant technology is the “wet” digestion system where the proportion of total solids (TS) is less than 10%. This technology is devoted in the main to the AD of sludge produced in wastewater treatment plants. “Semi-dry” anaerobic digestion (SDAD) ( $10\% < \text{TS} < 20\%$ ) and “Dry” anaerobic digestion (DAD) ( $\text{TS} > 20\%$ ) are well-suited to the treatment of municipal solid waste (MSW) (Mata-Alvarez, 2000; Bolzonella *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Forster-Carneiro *et al.*, 2008; Guendouz *et al.*, 2008; Montero *et al.*, 2008). These last two technologies are attractive because they consume less water and energy during the AD process and they require a smaller digester. However, these two types of AD suffer from biological and technological drawbacks due to the excessive content of solids and the small amount of water.

Overall water content strongly affects AD performance. When TS content increases from 20% to 30%, the degradation of the substrate decreases (Forster-Carneiro *et al.*, 2008). In comparison to 20% TS, high TS content, at 30% TS, reduces methane production by about 17% (Fernandez *et al.*, 2008). Corroborating this result, Le Hyaric *et al.* (2011) showed that specific methanogenic activity increased linearly by a factor of 3.5 when the moisture content increased from 65% to 82%. Water content also affects the rheological behaviour of digested media (Garcia-Bernet *et al.*, 2011). However, little

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

researches have been devoted to clarifying the impact of TS content on microbial communities.

It has been shown that not only the abundance but also the composition of the biomass is an important factor in DAD. Montero *et al.* (2008) got a better start-up of DAD when using an inoculum rich in hydrogenotrophic methanogens. For this reason, monitoring the microbial community can be a good bio-indicator for an operational DAD. It is now well-documented that both the source of the inoculum and lower TS content are responsible for obtaining a rapid onset of a balanced microbial population (Forster-Carneiro *et al.*, 2008), and, consequently, better COD removal, cumulative methane production and a faster start-up under DAD. When focusing on methanogenic *Archaea* as linked to the performance of DAD (between 25-30% TS), a high hydrogenotrophic methanogenic content of about 23% in the inoculum showed a faster start-up because  $H_2$  was consumed by these micro-organisms during hydrolysis and acidogenesis (Montero *et al.*, 2008). A lower  $H_2$  concentration (<10 Pa) favours syntrophic *Bacteria*, whereas at a high  $H_2$  concentration, these *Bacteria* are inhibited (Paus et *al.*, 1990). Among syntrophic *Bacteria*, acetate-oxidizing *Bacteria* transform acetate into  $CO_2$  and  $H_2$  (Goberna *et al.*, 2009) but after this start-up period, a drop in the  $H_2$  production rate causes a decrease in hydrogenotrophic methanogens. This leads to an increase in acetotrophic methanogens with a consequent change of in the ratio of hydrogenotrophic/acetotrophic methanogens of 7:32 (Montero *et al.*, 2008). Under SDAD (11, 13.5 and 16% TS) conditions, VFA concentration increases as TS content increases (Li *et al.*, 2010). VFA concentration favours acetotrophic methanogens such as *Methanosarcinia* sp. which consume acetate faster (Karakashev *et al.*, 2006). This group of methanogenic archaeal bacteria takes advantage of high VFA concentrations specifically in particular acetic acid (Tenbrummeler *et al.*, 1991).

The aim of this work was to determine the effect of TS concentration on AD microbial (Bacterial and *Archaeal*) communities. Different levels of TS content, from semi-dry anaerobic digestion (SDAD) to DAD (10% to 35 % TS) were tested in batch condition and at mesophilic temperature.

## IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

### IV.2.2. Materials and methods

#### IV.2.2.1. Chemical analysis

The volume of biogas was measured by a water displacement method and then normalized according to the ambient temperature, as explained by Abbassi-Guendouz *et al.* (2012). Biogas composition was determined using a gas chromatograph (Varian  $\mu$ GC-CP4900) equipped with two columns: a Molsieve 5Å PLOT column for O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and CO and a HayeSep A column for CO<sub>2</sub> quantification. The sample volume injected was approximately 1 mL. The carrier gas was helium. Volatile Fatty Acids (VFA) were analysed at the end of each batch test. After centrifugation subsequent to a three-fold dilution with distilled water (13000 rpm, 15 min), VFA concentration was measured with a gas chromatograph (Varian  $\mu$ GC-CP3900), as described elsewhere by Ganesh *et al.* (2010). pH was measured directly on the digestate using a pH meter (Eutech Instruments pH510) and Mettler Toledo InLab® Expert Pt1000 pH electrodes.

#### IV.2.2.2. Microbial analysis

##### IV.2.2.2.1. DNA extraction and 16S rRNA gene amplification

Microbial diversity was analysed at the end of each batch test, i.e. after 298 days of experiment. 0.5 g of digestate were sampled and stored at -20°C. Total DNA was extracted using the QIAamp DNA stool (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. Partial amplification of the purified 16S rRNA gene was performed using primer pairs W49 – W104 for Bacteria and W274 - W275 for *Archaea* (Table au IV-1). Each reaction tube contained 0.5  $\mu$ M of each primer, 1  $\mu$ L of purified DNA, 0.5 U of Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene), 1 x Pfu Turbo DNA polymerase buffer, 200  $\mu$ M for each dNTP, adjusted with ultra-pure water (CDM Lavoisier, France) to a total volume of 50  $\mu$ L for Bacteria amplification and 25  $\mu$ L for *Archaea* amplification. The reaction mixture was placed in a Mastercycler ep gradient S thermal cycler (Eppendorf). After an initial denaturation step at 94°C for 2 min, 25 temperature cycles for Bacteria and 30 cycles for *Archaea* were carried out at 94 °C for 30 seconds, 51 °C for 30 seconds for Bacteria and 61°C for *Archaea*, 72 °C for 30

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

second, and 72 °C for 10 min. PCR products providing bands of the proper size were confirmed on a 2% agarose gel.

##### *IV.2.2.2.2. CE-SSCP DNA fingerprinting*

Capillary electrophoresis and fluorescent dye-labelled PCR products were used for CE-SSCP fingerprinting. One microliter of PCR products was diluted 5- to 500-fold and mixed with 18.8 mL of formamide and 0.2 mL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were denatured at 95 °C for 5 min and then immediately cooled in ice. CE-SSCP electrophoresis was carried out in an ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems) with 50-cm-long capillary tubes filled with a non-denaturing 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems). CE-SSCP data were analysed using GeneScan software (Applied Biosystems) and the StatFingerprints R library (Michelland *et al.*, 2009) in accordance with Quéméneur *et al.* (2011).

##### *IV.2.2.2.3. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene*

For identifying the CE-SSCP peaks, amplification of 16S rDNA partial gene was done with primer pairs W18–W31 for *Bacteria* and W274-W280 for *Archaea*. Each reaction tube contained 0.5 µM of each primer, 1 µL of purified DNA (0.5 µL for *Archaea*), 1 µL of Red Taq polymerase (Sigma), 5 µL of Red Taq buffer, 200 µM for each dNTP, adjusted with pure H<sub>2</sub>O to a total volume of 50 µL for *Bacteria* amplification and 25 µL for *Archaea*. The reaction mixtures were placed in a Mastercycler ep gradient S thermal cycler (Eppendorf). After an initial denaturation at 94°C for 2 min, 25 temperature cycles for *Bacteria* and 30 cycles for *Archaea* were carried out at 94 °C for 1 min, 50 °C for 30 seconds for *Bacteria* and 65°C for *Archaea*, 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min. The size of PCR products was checked on a 2% (w/v) agarose gel. Amplified DNA was then purified using the Qiaquick kit (Qiagen) according to Wery *et al.* (2010). Sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers ranging from HE613791 to HE613797.

# IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

**Tableau IV-1: Primers and quantification probes used for DNA amplification written in grey  
primers and probes for Archaeal 16S DNAr amplification and written in black primers and probes  
fo Archaeal 16S DNAr amplification**

|      | Sequence (5'-3')                                   | Position <sup>a</sup> (Escherichiacoli) | Reference                    |
|------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| W49  | ACGGTCCAGACTCCTACGGG                               | F330                                    | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W104 | FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-Tamra                      | R533                                    | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W274 | CCCTACGGGGCGCAGCAG                                 | F340                                    | Ovreas <i>et al.</i> (1997)  |
| W275 | FAM-TTACCGCGGCGGCTG-Tamra                          | R519                                    | Ovreas <i>et al.</i> (1997)  |
| W18  | GAGTTTGATCMTGGCTCAG                                | F9                                      | Brosius <i>et al.</i> (1981) |
| W31  | TTACCGCGGCTGCTGGCAC                                | R500                                    | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W280 | TTACCGCGGCGGCT                                     | R500                                    | Delbes <i>et al.</i> (2001)  |
| W208 | ACTCC TACGG GAGGC AG                               | F338                                    | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W209 | GACTA CCAGG GTATC TAATC C                          | R805                                    | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W210 | Yakima Yellow- TGCCA GCAGC CGCGG<br>TAATA C -Tamra | F516                                    | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W211 | ATTAG ATACC CSBGT AGTCC                            | F787                                    | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W212 | GCCAT GCACC WCCTC T                                | R1059                                   | Yu <i>et al.</i> (2004)      |
| W213 | FAM-AGGAA TTGGC GGGGG AGCAC-<br>Tamra              | F915                                    | Yu <i>et al.</i> (2004)      |

## IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

### IV.2.2.2.4. Quantitative PCR

The quantitative amplification reactions were carried out in a total volume of 25  $\mu$ L. All reaction mixtures contained 5  $\mu$ L of template DNA and 12.5  $\mu$ L of Express qPCR Supermix with Premixed ROX (Invitrogen) and primers and probe. For the quantification of the bacterial 16S rRNA gene, the primers used were W208 (250 nM) and W209 (250 nM) and probe was W210 (50 nM). For *Archaea*, the 16S rRNA gene primers were W211 (250 nM) and W212 (250 nM) and the probe was W213 (50 nM), according to Yu *et al.* (2005). The reactions were run on a Mastercycler realplex 2S (Eppendorf). The reaction sequence was 20 s at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1min at 60°C. All tests were performed in duplicate. Results were then compared with a standard curve to obtain the number of target copies in the sample. The standard DNA curves were generated by amplification of serial 10-fold dilutions of a reference clone (Snell-Castro *et al.*, 2005). The cycle threshold (CT) corresponded to the cycle number at which the reaction became exponential. The CT of each sample was compared with a linear standard curve corresponding to CT vs. number of gene copies. The total number of *Bacteria* or *Archaea* were finally expressed as the number of target copies per gram of VS. The total abundance of the population generating one CE-SSCP peak was obtained by multiplying the percentage of relative abundance, calculated from the CE-SSCP chromatogram, and the total number of gene copies obtained from qPCR data.

### IV.2.3. Results

#### ***IV.2.3.1. Performances Methanogenic performance of the microbial ecosystem in high solids batch tests.***

Table IV-2 presents the cumulated methane production monitored throughout the experiment and the VFA concentration measured at day 298. The methanogenesis performances were closely related to the TS concentrations. Higher water content

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

significantly enhanced methane production. The average cumulated methane production decreased from 141 to 129 mL gTS<sup>-1</sup> when TS increased from 10% to 25%. Two distinct behaviour patterns were observed at 30% TS. Two replicates (30%-a) showed performances similar to the 25% TS tests, with a methane yield of 109 mL gTS<sup>-1</sup>. The two remaining replicates (30%-b) were similar to the 35%-TS tests with a lower methane yield of 28 mL gTS<sup>-1</sup>, whereas at 35% TS the methane yield was 19 mL gTS<sup>-1</sup>. For all the 30%-b and 35% replicates, high VFA accumulation (between 29 g L<sup>-1</sup> and 36 g L<sup>-1</sup> of water in the digestate) was observed. Acetate was the main dominant VFA, followed by propionate (Table IV-2 ). Batch tests between 10% to 30-a% TS presented effective methanogenic activity and their pH remained neutral (pH 7.4 ± 0.3). When AD was rapidly inhibited (30-b and 35% TS), pH values were more acid due to VFA accumulation (pH 5.9 ± 0.1). On the basis of total methane yield, two groups were distinguished: group A corresponded to the batch tests with a completed AD methanogenic process (10, 15, 20, 25, 30-a% TS) while group B corresponded to the batch tests where AD was rapidly inhibited by VFA accumulation and a low pH value (30-b, 35% TS).

##### ***IV.2.3.2. Characterisation of the bacterial community based on CE-SSCP fingerprints analysis***

At the end of the experiments, DNA fingerprinting of the inoculum as well as of all batch samples was carried out. For each test, all CE-SSCP profiles of the replicates presented a high degree of similarity. Therefore, an average profile of the four replicates performed at the same TS concentration was built-up, and corresponded to the average relative abundance of each peak within the original profile. At 30% TS, where two different kinds of methanogenic behaviour were observed, the average profiles were assessed by gathering the CE-SSCP profiles according to AD performance (two replicates of 30-a% and two others of 30%-b).

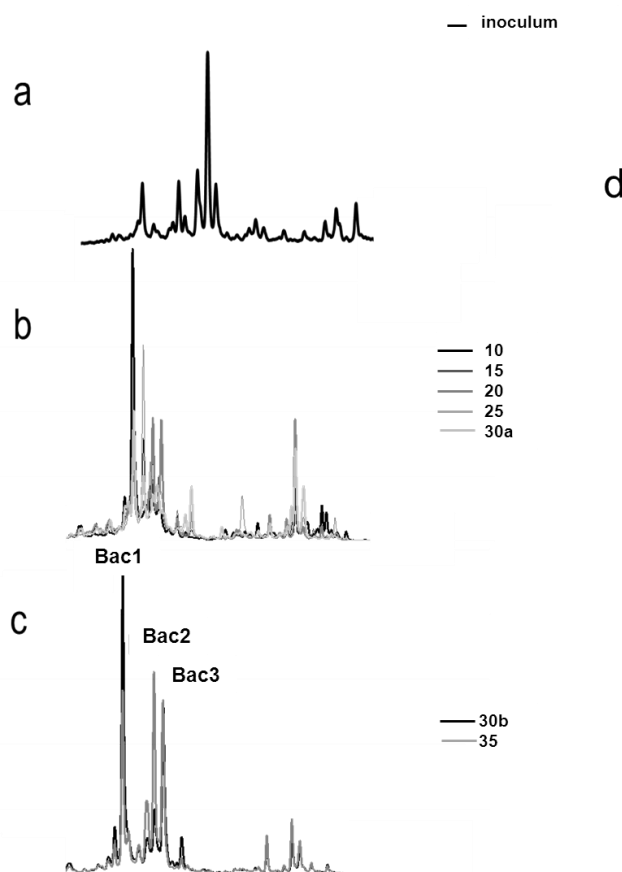
# IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

**Table IV-2 Main performance parameters characterizing the anaerobic digestion process. The tests were carried out in batch tests at 37°C, with cardboard as substrate. VFAs and pH were analysed at the end of the reaction (day 298). Biogas volume and methane content were monitored throughout the reaction**

| TS   | CH <sub>4</sub>         | CH <sub>4</sub> | Total VFA            | Acetate              | Butyrate             | Propionate           | Isopropiona          | Valerate             | Isovalerate          | pH  |
|------|-------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----|
| (%)  | (mL gVS <sup>-1</sup> ) | (% in biogas)   | (g L <sup>-1</sup> ) | (g L <sup>-1</sup> ) | (g L <sup>-1</sup> ) | (g L <sup>-1</sup> ) | (g L <sup>-1</sup> ) | (g L <sup>-1</sup> ) | (g L <sup>-1</sup> ) |     |
| 10   | 183±12                  | 51±2            | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 7,4 |
| 15   | 180±11                  | 58±5            | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 7.4 |
| 20   | 172±11                  | 58±2            | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 6.9 |
| 25   | 168±12                  | 60±1            | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 7.8 |
| 30-a | 142±1                   | 63±1            | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 0                    | 7.5 |
| 30-b | 37±9                    | 42±1            | 36±10                | 25±7                 | 2±0.5                | 8±2                  | 0.4±0                | 1±0                  | 0.2±0                | 5.9 |
| 35   | 24±3                    | 34±2            | 29±8                 | 18±4                 | 1±0.5                | 9±3                  | 0.3±0                | 1±0                  | 0.1±0                | 6.0 |

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

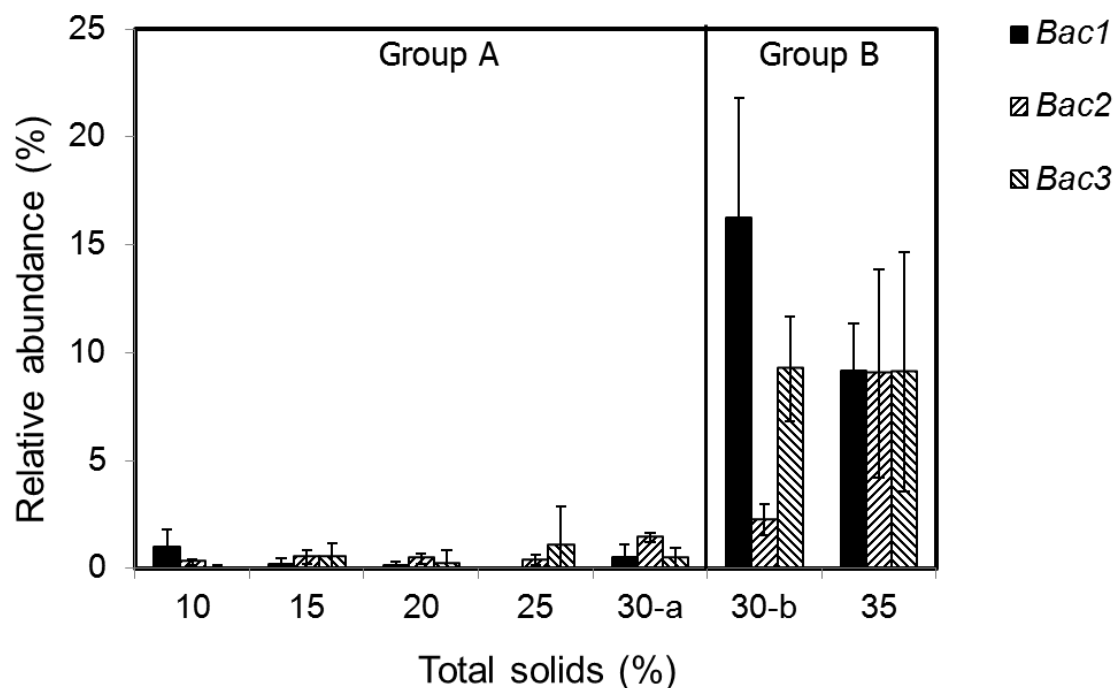
The average profiles are presented in figure IV-1. With regard to the profiles obtained for batch tests between 10% and 30% TS (group A), the diversity was high with many peaks, illustrating the great activity of the bacterial populations. No common peaks were identified due to a large number of peaks and their close migration position with peaks overlapping (Figure IV-1). Overall, within group A, which represented the most active methanogenic consortia, no link was found between individual population abundance and AD performance. The profiles obtained from the batch tests of group B, where anaerobic digestion was inhibited, i.e. 30% and 35-b% TS, the CE-SSCP profiles were highly similar, with a strict concordance of several dominant peaks (Figure IV-1). No peak overlapping was observed.



**Figure IV-1: Average CE-SSCP profile of bacterial communities for the inoculum (at the top), batch Methanogenic tests at 10, 15, 20, 25, 30a % TS (Group A) and batch tests at 30-b and 35% TS where methanogenesis was inhibited(Group B).**

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

The relative abundance of these peaks was calculated by considering the area of the peak divided by the total SSCP profile area (Figure IV-2). Three predominant peaks were distinguished within the batch tests of group B, and represented more than 24% in relative abundance of the sum of the three peaks, namely *Bac1*, *Bac2*, *Bac3*. Also present in group A batch tests, these three bacteria represented less than 5%. The abundance of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* was statistically higher in group B. These bacterial species were affiliated to *Clostridium* sp. A comparison of the CE-SSCP profile of the inoculum and the digestate showed that the dominant bacteria were different (Figure IV-2). In the inoculum, *Bac1* and *Bac2* occurred at a low relative abundance, less than 2.5%. Nevertheless, *Bac3* represented around 5.3 % of the total bacterial population in the inoculum. Although *Bac3* was not one of the most abundant bacteria, this result showed that *Bac3* was in a greater amount than *Bac1* and *Bac2* in the inoculum



**Figure IV-2: Relative abundance of peaks *Bac1*, *Bac2*, *Bac3* (non-functioning majority *Bacteria*) in batch tests for all TS concentrations. The error bars represents the standard deviation between profiles of the four replicates.**

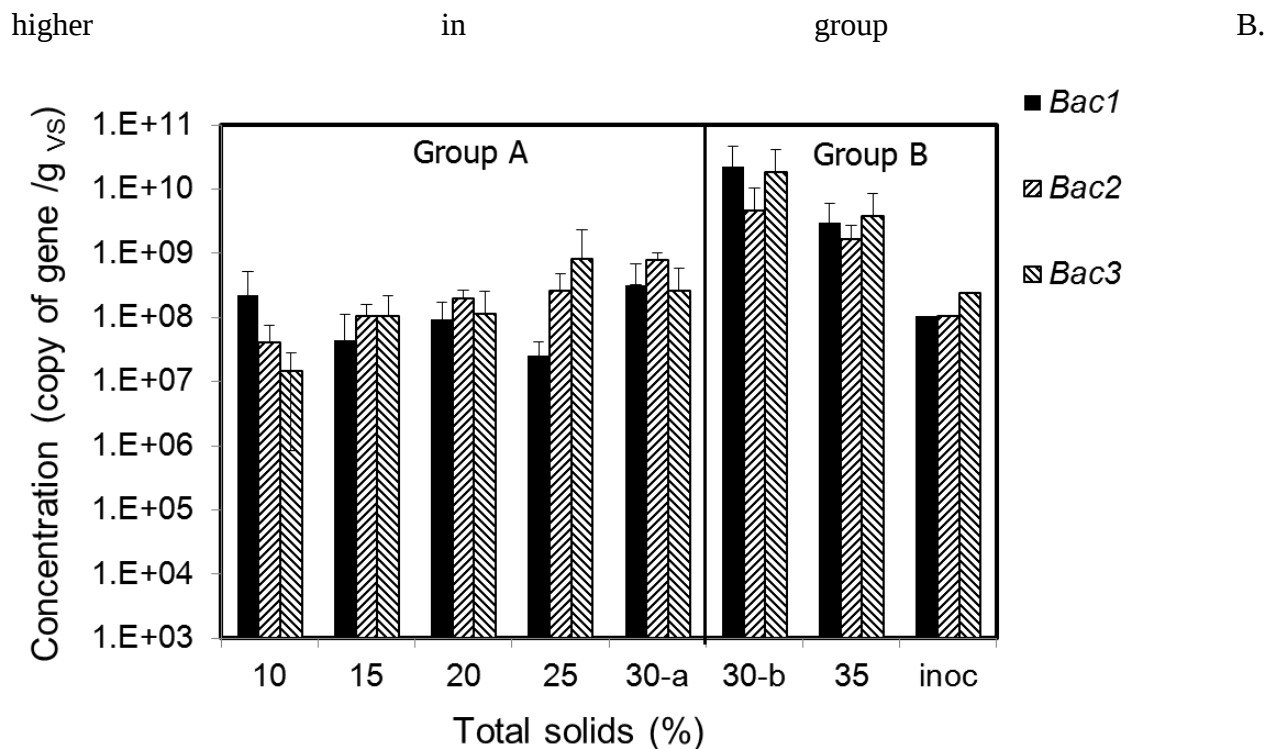
#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

Figure IV-2 summarizes specifically the relative abundance of the three peaks *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* within Group B. Each of these three peaks was present at less than 2.5% in group A and more than 9% in group B, except for *Bac2* present at only 2.2 % in 30%-b. Analyses of variance (ANOVA) between groups A and B were done on the basis of the relative abundances of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* peaks. Groups A and B were statistically very different, with p-value always lower than 0.001 for peaks *Bac1*, *Bac2* and *Bac3*. Similarly to the AD performances, the relative abundances of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* were significantly different between group A, where full AD occurred (high methane yield), and group B, where AD was inhibited (low methane accumulation). The quantification of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* showed that these bacteria were in fact the most numerous micro-organisms at the highest TS concentrations

This observation was strictly similar to the relative abundance, indicating a growth of specific micro-organisms in the medium. Growth of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* was even higher in group B.

(Figure IV-3). This observation was strictly similar to the relative abundance, indicating a growth of specific micro-organisms in the medium. Growth of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* was even

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

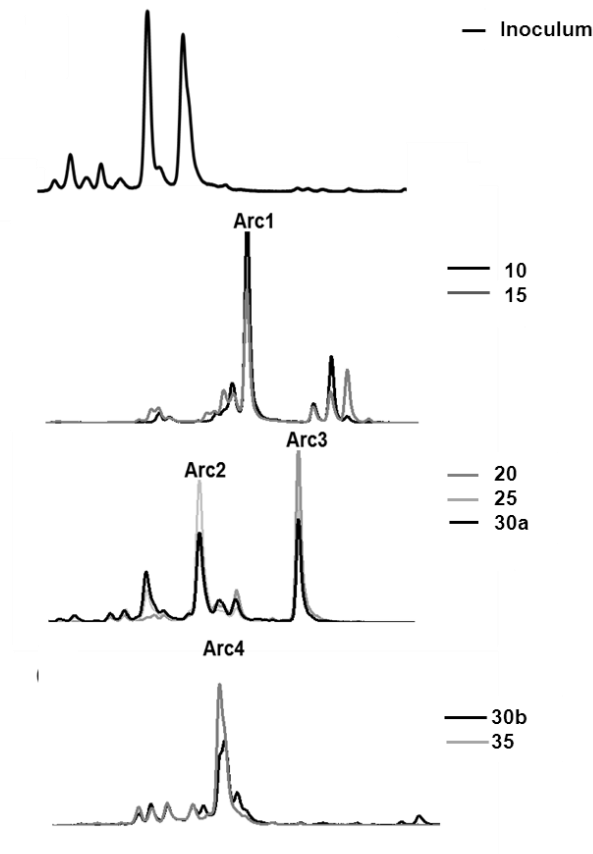


**Figure IV-3: Quantification of the most abundant Bacteria (of inhibited AD) according to total solid content. Quantification was performed by multiplication of relative abundance of every species by the total bacterial quantification (by qPCR)**

##### *IV.2.3.3. Characterisation of the archaeal methanogenic community based on CE-SSCP fingerprints analysis*

The archaeal diversity, represented by the number of peaks in the CE-SSCP profiles, was lower than for bacteria (with less than 10 peaks). Thus, higher percentages of relative abundance of the most abundant peaks were observed. By comparing the average CE-SSCP profiles, three groups were extracted (figure IV-4): Group A previously determined for the bacterial population was split into two groups: Group A1, which corresponded to 10% and 15% TS (semi-dry AD), and Group A2 for 20%, 25%, and 30-a % TS, corresponding to dry AD.

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE



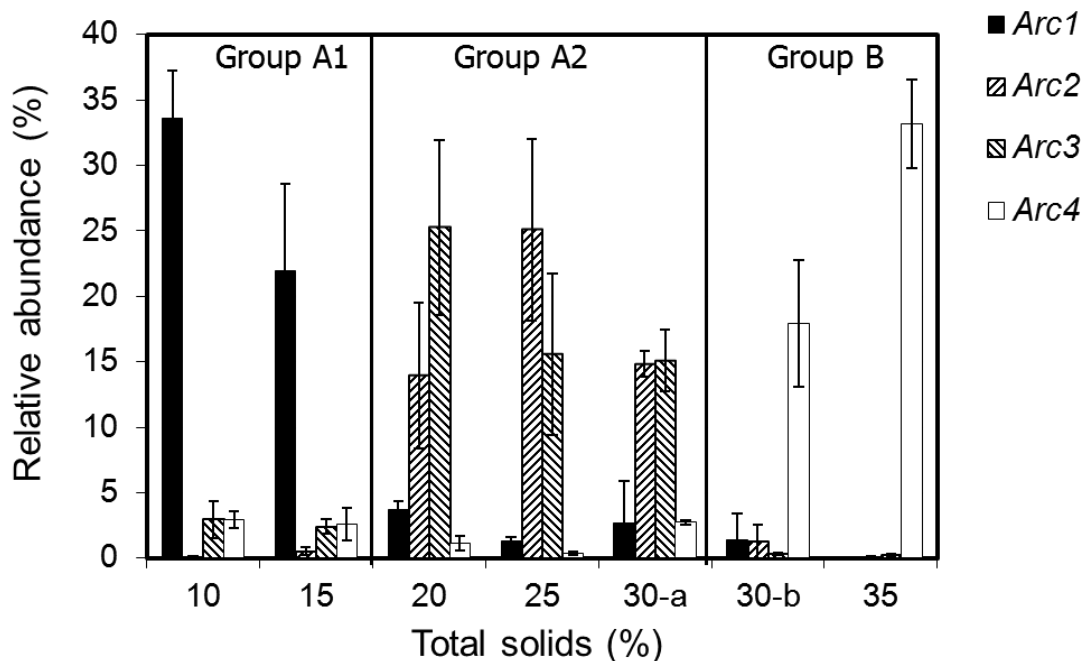
**Figure IV-4: Average CE-SSCP profile of Archaeal communities for the inoculum (at the top), batch methanogenic tests at 10, 15% TS (Group A1), batch methanogenic tests at 20, 25, 30a % TS (Group A2) and batch tests at 30-b and 35% TS where methanogenesis was inhibited (Group B).**

The third group, Group B (30-b, 35% TS), was similar to that found for bacteria and therefore corresponded to inhibited AD

The relative abundance of each peak was calculated using the area of the peaks divided by the total SSCP profiles area. Each most dominant Archaeal species was clearly identified and represented more than 10% in relative abundance. These peaks were named Arc1, Arc2, Arc3, Arc4 (Figure IV-4). Relative abundance of *Arc1* was 34% and 22%, respectively, in batch tests operating with 10% and 15% TS. For other TS contents, *Arc1* abundance was lower than 4%. In

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

addition, the average relative abundances of *Arc2* and *Arc3* ranged between 14% and 25% in batch tests operating with a TS concentration higher than 20%. *Arc2* and *Arc3* abundances were lower than 3% for the other TS contents. Finally, *Arc4* presented a relative abundance of 18% and 33% at 30-b% and 35% TS, respectively. *Arc4* abundance was lower than 3% for whatever other TS contents. Interestingly, the change in abundance of each species was gradual all along the TS contents (Figure IV-5).



**Figure IV-5: Relative abundance of peaks *Arc1*, *Arc2*, *Arc3* and *Arc4* in batch tests for all TS concentrations. The error bars represents the standard deviation between profiles of the four replicates**

The CE-SSCP profile of the archaeal community in the inoculum showed that the archaeal community found in the digestate at day 298 differed substantially from the inoculum. All of the most abundant *Archaea* identified at the end of the experiments in groups A1, A2 and B were in very low abundance in the inoculum, indicating the growth of the archaeal species whatever the

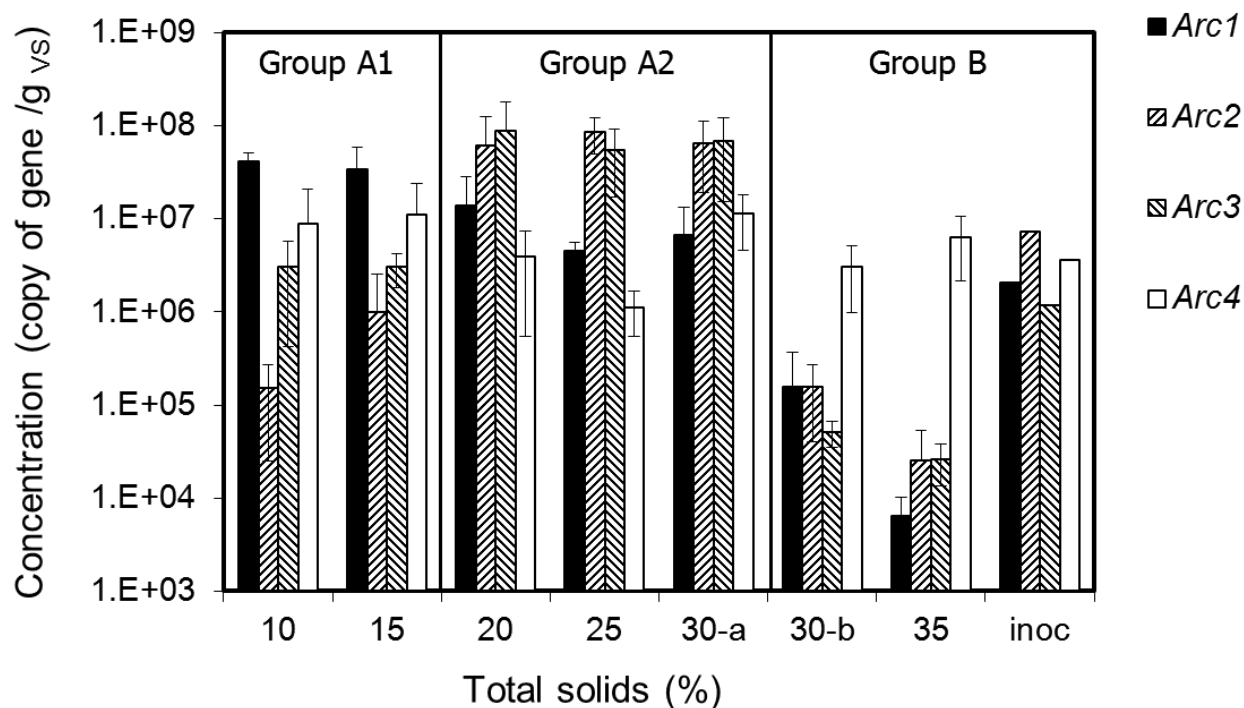
#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

operating conditions. In the first composition of the inoculum, peaks *Arc1*, *Arc2*, *Arc3* and *Arc4* represented only 0.6%, 2%, 0.3% and 2.8% of the total abundance, respectively.

Statistical analyses were performed with an analysis of the variance (ANOVA) between groups A1, A2 and B, on the basis of relative abundances of *Arc1*, *Arc2*, *Arc3* and *Arc4*. The results showed that these groups were statistically different with an important confidence index ( $p < 0.001$ ). These results confirmed the coherence of the groups selected by observations based on CE-SSCP profiles. About peak identification, *Arc1*, *Arc2* and *Arc4* were affiliated to a hydrogenotrophic methanogen genus, *Methanobacterium* sp., with 100%, 100% and 99% of similarity, respectively. *Arc3* corresponded to an acetoclastic methanogen, *Methanosarcina* sp. (100% of similarity) (Figure IV-6).

*Arc1* was the most abundant *Archaea* for the lowest TS values of 10% and 15%. Thereafter, the total amount of this species gradually decreased as the TS concentration increased. The highest concentrations of *Arc2* and *Arc3* were observed at 20%, 25%, and 30-a% TS, which corresponded to dry anaerobic digestion. At other concentrations (10%, 15%, 30%-b and 35%), smaller quantities of *Arc2* and *Arc3* were recorded. The behaviour of *Arc4* was out of the ordinary, since *Arc4* showed the highest relative abundance when methanogenesis was inhibited but no significant difference in its total amount as a function of TS content (Figure IV-6).

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE



**Figure IV-6: Quantification of the most abundant (Arc1, Arc2, Arc3, Arc4) according to total solid content. Quantification was performed by multiplication of the relative abundance of every species by the total archaeal quantification (by qPCR)**

As to peak identification, *Arc1*, *Arc2* and *Arc4* were affiliated to a genus of hydrogenotrophic methanogens, *Methanobacterium sp.*, with respectively 100%, 100% and 99% similarity. *Arc3* corresponded to an acetoclastic methanogen, *Methanosarcina sp.* (100% similarity) (Figure IV-7).



#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

##### ***IV.2.4.2. Impact of high TS contents on methane production***

As observed, the anaerobic digestion performances were closely related to the TS concentration. Higher water content significantly enhanced methane production. This result is consistent with a previous study of Fernandez *et al.* (2008) which also observed better performances, *i.e.* the highest methane production and a shorter reaction time, at 20% TS as opposed to 30% TS. At higher TS concentration, two distinct behaviour patterns were observed at 30% in our study. One half (30%\_a) behaved as in the 25% TS reactors, and the second half (30%\_b) like the 35% TS reactors. For this second group, methanogenesis was inhibited. The difference between these replicates suggested that 30% TS corresponded to a threshold value where mass transfer limitation occurred, especially of inhibitory VFAs compounds, as discussed elsewhere in Abbassi-Guendouz *et al.* (2012). Staley *et al.* (2011) reported similar trends of threshold values around 30% TS for methane production in refuse.

When anaerobic digestion was blocked, high VFA accumulation was observed which was due to the inhibition of methanogenic bacteria. An insufficient amount of methanogenic *Archaea* may be the cause of such high concentration of VFAs: *Archaea* are indeed very sensitive to the accumulation VFAs. As is widely known, total VFAs specifically affect methanogens more than bacteria (Amani *et al.*, 2010). *Bacteria* are less sensitive to VFAs but except when amounts exceed about 10 g L<sup>-1</sup> (Amani *et al.*, 2010). High VFAs concentration induces acidification of the medium, and this itself leads to the presence of VFAs in their undissociated form which is more toxic for microorganisms (Amani *et al.*, 2010).

##### ***IV.2.4.2.1. Shift of the bacterial community structure when methanogenesis was inhibited***

In group B, where VFAs were highly concentrated and pH was lower, only three species were associated with low methane production and these were the most abundant bacteria. They were in all likelihood the bacteria most resistant to an acidic environment since the other species disappeared in the course of the experiment. The relative abundances of *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* showed that these bacteria were the most numerous microorganisms in group B. DNA

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

quantification showed that these bacteria were not only resistant to the acidic environment but could also grow in this “extreme” medium. This observation is in accordance with their affiliated genus, i.e. *Clostridium* sp. First, the persistence of these microorganisms throughout the experiments may be attributable to the readiness with which these bacteria sporulate. However, DNA quantification of these bacteria showed that the number of these *Bac 1*, *Bac2* and *Bac3* increased despite low pH and high VFA contents, meaning that these bacteria were in their vegetative and active form. More generally, the affiliation of such bacterial species to the *Clostridium* genus explains their resistance to acidic conditions. Indeed, many studies have shown the resistance of vegetative forms of the *Clostridium* sp. to acidic pH (Ye et al., 2007). The *Clostridium* genus maintains hydrolytic fermentative activity at low pH. Our results are backed up by Staley (2009) who identified very similar bacteria (*Clostridium* sp. GQ453533.1) in methanogenic dry AD of refuse with high solids content, presenting 99% and 97% similarity with *Bac1* and *Bac2*, respectively.

##### IV.2.4.2.2. TS content responsible of archaeal population shifts

Low methane production with the higher levels of TS content showed that the methanogenic *Archaea* were deactivated or inhibited. The total abundance of the methanogenic *Archaea* in group B was one log lower than that for other TS content. The most abundant *Archaea* at these TS concentrations (30-b% and 35% TS) was *Arc4* which corresponds to a hydrogenotrophic methanogen *Methanobacterium* sp.. In addition, *Arc4* had 100% similarity with the *Methanobacterium* sp. (GQ453588) identified by Staley (2009) and found in methanogenic environment at 31% TS with an acidic pH. Our results are consistent with Staley’s finding. According to Blume et al. (2009), *Methanobacteriales* have higher abundance compared to the families *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinaceae* and *Methanosaetaceae* in environments with high total acid concentrations and a low pH. *Methanobacteriales* are even able to grow at a pH of about 5 (Garritty and Holt, 2001). As our results bear out, McMahon et al. (2004) reported that, at high acetate concentrations up to 8 g L<sup>-1</sup>, *Methanosarcina* sp. and *Methanosaeta* sp. are strongly

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

inhibited, with a significant increase in *Methanobacteriales*. In the present experiments carried out at solid concentrations higher than 30% TS, *Methanobacterium* sp. was the most abundant *Archaea*, and despite resistance of this *Archaea* to environmental acidity, methanogenesis was inhibited. This inhibition no doubt resulted from VFA and acetate accumulation at concentrations above 29 g L<sup>-1</sup>. This may also be due to a lesser quantity of acetate-oxidizing bacteria transforming acetate into CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. These two bacteria form one metabolic pathway used by *Methanobacteriales* for methane formation. Methanogens were therefore highly influenced by TS concentration through VFA accumulation and the lowering of pH. In semi-dry AD (10% - 15% TS), the most abundant *Archaea* was *Arc1* and corresponded to *Methanobacterium*. Karakashev *et al.* (2006) showed a strong correlation between the absence of *Methanosaetaceae* (acetoclastic methanogens) and the involvement of bacteria in the acetate oxidation pathway. In solid waste refuse, Staley *et al.* (2012) showed that *Methanosarcinales* had relative abundances from 1.4 to 14 times lower in leachate than in the solid fraction. The authors suggested that many acetate-oxidative bacteria are motile and are less preferentially attached to particulate matter (McInerney *et al.*, 2008). In our study, this fact may explain why there is a significant dominance of hydrogenotrophic *Archaea* at 10% and 15% TS: more water led to a selective advantage for motile acetate-oxidative bacteria. Although no hydrogen was detected by the biogas analysis, this does not exclude the presence of dissolved hydrogen in a very localised bacterial environment. Dissolved hydrogen concentration plays a direct role in the predominance of the hydrogenotrophic methanogens (Hori *et al.*, 2006). More specifically, *Methanobacterium* sp. is in fact favoured compared to other hydrogenotrophic methanogens at high dissolved H<sub>2</sub> concentrations (Hori *et al.*, 2006). For dry AD, a shift was observed with a co-dominance of *Methanosarcina* and *Methanobacterium* genera. The coexistence of acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens has also been reported to occur in natural environmental ecosystems (Lueders and Friedrich, 2002; Kemnitz *et al.*, 2004) and especially in animal rumen (Kim *et al.*, 2011). Leclerc *et al.* (2004) studied 44 digesters located in eight different countries and treating different kinds of waste (effluent from agriculture, food processing, petro-chemical

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

industries, pulp and paper plants, breweries, slaughterhouses and municipal waste leachates). The authors showed that the most frequent archaeal sequences were close to *Methanosaeta* sp. and *Methanobacterium* sp. in 84% and 73% of the digesters, respectively. In this study, the acetoclastic *Archaea* corresponded to *Methanosarcina* sp.. Moreover, it has been generally reported that acetate cleavage is performed by *Methanosarcinaceae* at high acetate concentrations and by *Methanosaetaceae* at low acetate concentrations (Tenbrummeler *et al.*, 1991). In the present study, the acetate concentrations were very low but *Methanosarcina* sp. was the most dominant archaeal species, probably because: (1) *Methanosarcina* is the most metabolically-diverse methanogen (Garcia *et al.*, 2000) and could have another pathway for producing methane such as the hydrogenotrophic pathway (Kotsyurbenko *et al.*, 2004); or (2) although no acetate was measured at a macroscopic level, the localised bacterial environment was rather different, especially at the interface with the solid substrate. At this very localised level, acetate concentration can be much higher and pH values much lower than those measured, as already discussed (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). In a compact and unmixed medium, the existence of microenvironments with high VFA accumulation is the most probable explanation for the proliferation of *Methanosarcina* sp. which, at acetate concentrations above 1 mmol L<sup>-1</sup>, presents higher growth rate than the widespread *Methanosaeta* sp. which grows preferentially at lower acetate concentrations (Hori *et al.*, 2005). The presence of *Methanobacterium* (Arc2) confirmed this assumption since this *Methanobacterium* sp. (DQ677518) was detected by Kotsyubenko *et al.* (2007) at a pH below 4.5. Also, the predominance of *Methanosarcina* sp. in a dry anaerobic digestion environment was no doubt due to the resistance of this *Archaea* to high salt concentrations, as previously reported by Van Meenen *et al.* (1988), since the total amount of VFA accumulated at 30% TS was three times higher than at 10% TS.

##### **IV.2.5. Conclusion**

In conclusion, this work showed that TS concentrations have a very significant impact on microbial communities. The most numerous bacteria growing in the acidic environment resulting

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

from the presence of high solid concentrations (pH, VFA, salt...) are *Clostridium sp.* which are well known to grow at a low pH and high VFA concentrations. The archaeal community was also strongly influenced by the TS content. A shift of the most important *Archaea* between semi-dry and dry AD conditions was observed. The archaeal community was very sensitive to TS conditions, not only generally through VFA and pH, but also through very localised concentrations of soluble components. At the highest TS concentrations, and despite the presence of methanogens, environmental conditions do not allow the growth of methanoclastic methanogens or acetate-oxidizing bacteria on account of the attendant high VFA concentration and low pH values.

##### IV.3. Discussion

Dans ces travaux, nous avons clairement observé l'influence de la teneur en MS sur les communautés microbiennes impliquées dans le processus de DA par voie sèche.

A partir de l'abondance relative de quatre espèces majoritaires de méthanogènes, il est possible de diviser les réacteurs en 3 groupes qui dépendent uniquement de la teneur en MS

- (1) L'espèce majoritaire de 10 à 15% de MS (groupe A1) correspond à *Methanobacterium sp.*. Cette espèce est spécifique des conditions de DA semi sèche.
- (2) Pour des teneurs en MS de 20, 25, 30-a%, deux espèces majoritaires ont été identifiées et sont spécifiques de la DA par voie sèche (groupe A2). Il s'agit de *Methanobacterium sp.* (différente de la celle identifiée en condition DA semi sèche) et *Methanosarcina sp.*
- (3) La quatrième espèce majoritaire de méthanogènes identifiée, une troisième *Methanobacterium sp.*, correspond aux concentrations En MS très élevées et inhibitrices de la DA par voie sèche : 30-b et 35% de MS (groupe B).

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

Ces shifts entre les différentes espèces d'archées méthanogènes montrent que ces microorganismes sont très sensibles aux changements et aux variations de la teneur en MS. Les archées méthanogènes sont des microorganismes très sensibles à leur environnement (Vedrenne, 2007), ce que confirme cette étude.

La quantification par PCRq de la *Methanobacterium* spécifique du groupe B montre que contrairement aux autres espèces majoritaires identifiées, le nombre de cellules de cette archée méthanogène est quasiment le même pour toutes les teneurs en MS. Ceci montre que cette méthanogène se maintient contrairement aux autres espèces qui disparaissent, mais ne croît pas préférentiellement à de hautes concentrations en MS. Ces données sont en accord avec la littérature. En effet le genre *Methanobacterium* est réputé pour être le plus résistant au stress par rapport aux autres méthanogènes (Blume *et al.*, 2009). Les *Methanobacterium* sont des méthanogènes hydrogénotrophes, et les *Methanosarcina* sont des microorganismes à métabolismes multiples. Ces espèces peuvent être des méthanogènes acétoclastes en présence d'acétate.

La figure IV-8 montre le pourcentage des méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes parmi les quatre espèces identifiées. Les méthanogènes hydrogénotrophes sont les plus dominantes, hormis à 20% de MS. Le taux de méthanogènes acétoclastes est faible pour une teneur en MS de 10 et 15%. A plus fortes teneurs en MS, entre 10 et 30%-b, les méthanogènes acétoclastes sont présentes en quantité presque égale à celle des hydrogénotrophes. A ces teneurs en MS, il y a codominance de ces deux voies métaboliques. Pour des conditions très sèches, entre 30-b et 35% TS, une archée méthanogène hydrogénotrophe domine du fait du stress lié aux fortes concentrations en MS, AGV et au pH acide. Les méthanogènes acétoclastes sont des microorganismes moins résistants que les *Methanobacterium* qui sont des hydrogénotrophes (Blume *et al.*, 2009).

A la différence des archées méthanogènes, deux groupes ont pu être extraits à partir de l'abondance des bactéries majoritaires. Le groupe A comporte les teneurs en matière sèche de 10,

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

15, 20, 25 et 30-a. Ces teneurs en MS permettent des conditions favorables à une bonne production de méthane, et regroupent les groupes A1 et A2 identifiés à partir des archées méthanogènes. Le groupe B, identique à celui identifié à partir des archées, inclut les réacteurs possédant une faible production en méthane (MS de 30-a et 35%). Lorsque les conditions sont favorables, les bactéries du groupe A présentent une plus grande diversité.

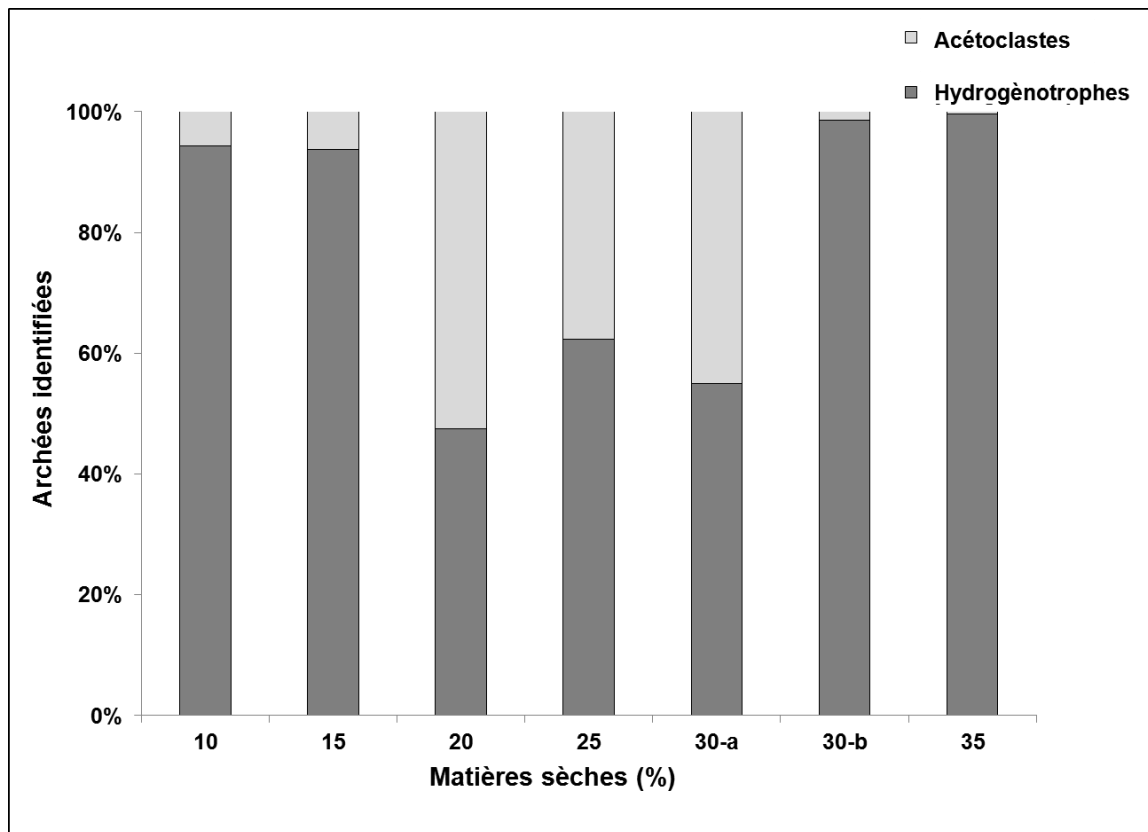


Figure IV-8 : Pourcentage des Archées hydrogènotrophes et acétoclastes identifiées

Cette étude ne nous a pas permis d'identifier des espèces bactériennes spécifiques de bonnes performances de la DA par voie sèche. Cependant lorsque la méthanisation est inhibée, les bactéries majoritaires du groupe B sont toujours les mêmes et cela pour les six réplicats issus des

#### IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA DIGESTION ANAEROBIE

deux teneurs en MS de ce groupe. Les bactéries majoritaires du groupe B correspondent toujours aux trois mêmes espèces du genre *Clostridium*.

La spécificité des bactéries liées à un fonctionnement dégradé de la DA est très intéressante mais ne s'applique qu'à un seul type d'inoculum. La présence des mêmes structures microbiennes et d'espèces majoritaires identiques dans des réacteursensemencés avec d'autres inocula permettrait d'identifier des bio-indicateurs liés au fonctionnement (ou au mauvais fonctionnement) de la DA par voie sèche. Ceci permettrait également de voir si l'origine de l'inoculum influence les performances de la digestion anaérobie. C'est l'objectif du chapitre V.

IV. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERES SECHES SUR LES  
COMMUNAUTES BACTERIENNES ET METHANOGENES IMPLIQUEES DANS LA  
DIGESTION ANAEROBIE

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

---

### *V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE*

---

Pour ce dernier volet de résultats, nous nous intéressons aux liens entre performances de production de biogaz et composition des populations microbiennes de la digestion anaérobie par voie sèche et cela pour différents inocula. Ce lien servira à identifier des bio-indicateurs microbiens liés au fonctionnement (ou au non fonctionnement) de la DA par voie sèche.

V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION  
ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

### V.1. Avant-propos

La digestion anaérobie est un système complexe qui peut subir des fluctuations environnementales. Jusqu'à présent, le suivi de l'état de fonctionnement d'un réacteur se fait par la mesure de variables macroscopiques telles que la production de biogaz, le pH ou les concentrations en AGV. Cependant, comme cela a été démontré dans le paragraphe « III.1.2 », l'accumulation des AGVs et les pH acides n'étaient pas les mécanismes du blocage de la digestion anaérobie par voie sèche, mais la limitation était liée aux difficultés de transfert de masse. Ce résultat a été confirmé par la suite dans le paragraphe « III.2.3 ». En effet à des concentrations de  $17 \text{ g L}^{-1}$  d'AGV, la réaction de méthanisation ne présentait pas de signes d'inhibition. Les AGV accumulés ont été dégradés par la suite. Ceci démontre que dans certains cas, et notamment en digestion anaérobie par voie sèche, des paramètres tels que les AGV et le pH ne peuvent pas constituer de bio-indicateurs « universel » de l'état de l'écosystème.

La recherche d'un lien entre la fonctionnalité de l'écosystème et la présence ou l'absence de microorganismes pourrait être utilisée pour éviter et/ou prévenir les conséquences d'un dysfonctionnement. Le suivi de bio-indicateurs microbiens est certes une technique plus contraignante et moins routinière et plus difficilement applicable sur site industriel que le suivi du pH, du biogaz ou des AGV mais pourrait se montrer plus efficace.

Dans ce cadre, le but de notre étude est de trouver des bio-indicateurs liés au fonctionnement du processus de digestion anaérobie par voie sèche. Pour cela, des expériences ont été réalisées en conditions batch. Différentes conditions ont été mises en place de façon à aboutir à des performances de digestion anaérobie contrastées et à faire le lien entre performances et microorganismes de la digestion anaérobie par voie sèche. Afin d'éliminer l'influence de la composition l'inoculum et de définir des bio-indicateurs inocula indépendants, en plus des expériences précédemment utilisées dans les chapitres III et IV, trois inocula complémentaires ont été testés. Le suivi des populations microbiennes a été réalisé par des techniques d'empreinte moléculaire (CE-SSCP) en fin de réaction.

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

Des populations microbiennes liées au fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche ont été identifiées. Une partie des résultats, présentée sous forme de publication, concerne l'analyse de la population bactérienne : cet article est en voie de finalisation pour être publié. La deuxième partie des résultats concerne l'analyse des archées méthanogènes.

### V.2. Omnipresence of bacterial tracers linked to dry anaerobic digestion inhibition

#### Abstract

---

Anaerobic digestion is a complex ecosystem involving several microorganisms. Differently to wet anaerobic digestion, dry one contains high concentrations of TS and low amount of water making anaerobic digestion difficult to control. Like any biological system, dry anaerobic digestion can be subject to environmental fluctuations. The first targets of these fluctuations are microorganisms. Malfunctioning of microbial populations involve a dysfunction of the anaerobic digestion. The aim of this study is to identify tracers related to the anaerobic digestion functioning. These tracers could be a parameter to control dry anaerobic digestion. To fulfill this objective, different stresses were performed in batch condition, and four inocula with different origins were tested. The link between the performances and microorganisms was investigated, and bacterial tracers related to anaerobic digestion inhibition were identified. These tracers correspond to three *Clostridium* species. The originality of this result is that the same *Clostridium* species were always found in all batches for which anaerobic digestion was inhibited and this independently of the inoculum origin.

---

#### V.2.1. Introduction

*Anaerobic Digestion (AD)* consists of the biodegradation of organic matter into a biogas rich in methane and carbon dioxide. This reaction is performed in four main stages: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis (Weiland, 2009). The first three steps are carried out by hydrolytic, acidogenic and acetogenic bacteria whereas the last step, methanogenesis,

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

involves only methanogenic *Archaea* (Garcia et al., 2000). Since growth rates of methanogens are usually lower than those of bacteria, the proportion of this population is relatively smaller in methanogenic reactors (Zinder, 1993). In addition, accumulation of metabolic intermediate products such as Volatile Fatty Acids (VFAs), which are consumed during the methanogenic stage, can occur if conditions are unfavorable for the growth of methanogens, such as presence of oxygen, high organic load,... (Mara and Horan, 2003). The VFA accumulation leads to a decrease of pH. For acid pH, VFA are present in their undissociated forms which are more toxic for microorganisms, especially for methanogens (Zehnder, 1978 ; Blume et al., 2009).

In anaerobic digestion bioprocesses, the microbial diversity is high for bacterial populations, and much lower for methanogens (Godon *et al.*, 1997). Nearly 90% of the archaeal and 60% of the bacterial diversity represent the anaerobic digestion system (Nelson, 2011). A more diverse microbial ecosystem is more stable when facing environmental fluctuations because of functional redundancy of microbial metabolisms: in this case, the same function can be carried by several different microbial populations (Zumstein *et al.*, 2000). Microbial richness allows maintaining ecosystem performances despite microbial populations shifts that could occur during the process (Fernandez *et al.*, 1999). For instance, Zumstein *et al.* (2000) observed previously a shift of the bacterial population but a relative stability of methanogenic archaea, under similar overall anaerobic performances. This might be explained by the low diversity of these last microorganisms making them more sensitive.

The link between the presence of specific microorganisms and a particular metabolic state of an ecosystem can lead to the identification of microbial indicators or tracers. Microbial tracers have been widely used to monitor particular states in soils (Wessen and Hallin, 2011), airbornes emitted by composting plants (Le Goff *et al.*, 2011), water quality (Kong et al., 2001), human health (Woutrina et al., 2005) and environment (Gadzała-Kopciuch et al., 2004). In anaerobic digestion ecosystem, the relation between bacterial tracers and anaerobic digestion performances has never been investigated. As an example, the identification of microbial tracers could be used to monitor anaerobic digestion processes and prevent technical failures of the system. Up to now, parameters commonly used to control and monitor AD systems remain macroscopic variables

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

such as biogas production and composition, VFA concentration in the digested medium, pH, temperature... However, the modification of one of these parameters may be resulting from a microbial dysfunctioning and the identification of microbial tracers could be useful, in particular in the case of earlier detection of the system failure, compared to metabolic by-product accumulation.

Investigations on the structures of microbial population in anaerobic digestion bioprocesses are supported by molecular biology methods. Compared to the culture techniques, molecular microbiology allows getting most of the most abundant microorganisms of the ecosystem (Amann *et al.* 1995). Among them, microbial fingerprint techniques such as single-strand conformational polymorphism (SSCP) can be used to determine the overall structure of the microbial community.

Even though dry anaerobic digestion processes, characterized by Total Solids (TS) contents higher than 20%, are operated nowadays at industrial scale, anaerobic digestion fundamentals have been mostly studied under wet conditions ( $TS \leq 10\%$ ). Consequently, only few data are available in the literature concerning the structure of microbial populations degrading organic matters under high solid concentrations. At 30% TS, Montero *et al.* (2008) showed a fast start-up by using an inoculum characterized by ratios of Eubacteria/Archaea and hydrogenotrophic methanogens/acetotrophic methanogens of 88:12 and 11:1, respectively. During the first days, the product of hydrolysis and fermentation are mainly  $CO_2$ ,  $H_2$  and short VFAs, such as acetate and butyrate. High partial pressure of  $H_2$  can inhibit the microbial activity. Hydrogenotrophic methanogens, which consume  $H_2$ , can thus promote a faster start-up.

In dry anaerobic digestion, when TS content increases, VFA concentration usually increases as well (Dong *et al.*, 2010) resulting in a decrease of pH. As a consequence, only some very specific microorganisms can resist to acidic pH. Staley *et al.* (2011) showed that members of *Clostridium* genus and *Methanosarcina barkeri* are resistant to acidic pH under operation conditions close to dry anaerobic digestion.

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

This work aims to identify microbial tracers related to the global methanogenic performance of dry anaerobic digestion processes treating organic solid waste. In order to obtain distinct degradation performances, ten various operating conditions were investigated, including the source of inoculum, the mixing mode, the total solid content or the quantity of digestate related to

the volume of the flask. The bacterial structure was thus analyzed using CE-SSCP fingerprinting method.

### V.2.2. Materials and methods

#### V.2.2.1. *Methane production batch test*

A compact cardboard branded “Cartonnages Michel” was used as a substrate model because cardboard represents one of the largest proportion of organic compounds in municipal solid waste (ADEME, 2009). This cardboard was shredded using cutting miller SM-100 and sieved at 2 mm.

Experiments were carried out in batch mode at a mesophilic temperature (35°C). Ten different operating conditions were tested (Table V-1): TS contents, source of inoculum, quantity of digestate in the flask (according to the flask size) and mode of mixing. Mixtures of cardboard, water, inoculum and a solution of oligo-elements (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012) were prepared and added to get six different TS contents which are characteristics of “wet” to “dry” AD systems (10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% TS). A substrate to biomass ratio (S/X) of 20 (w/w) was used to limit the influence of the initial inoculum composition on the microbial community structure and to study specifically the microorganisms that were growing. Four mesophilic inocula were used, corresponding to: (i) two different leachates of pressed digested municipal solid waste sampled from the same industrial dry anaerobic digestion reactors at two different seasons (summer and winter); (ii) anaerobic sludge sampled from anaerobic digestion plant treating wastewater sludge (inoculum specific to wet anaerobic digestion); (iii) cow rumen. Flasks of a volume of 0.6 L and 2 L were used with a working volume of 0.1 L and 0.5 L, respectively. Two

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

different modes of mixing were applied: whereas most of the flasks were unmixed during the whole experiments, some flasks corresponding to operating conditions G, I and J, were mixed using gentle mixing device. Three to four replicates per operating conditions were performed, corresponding to a total number of experiments of 37.

**Tableau V-1: Initial reactors conditions**

| Sample | Replicates | TS content (%) | Inoculum   | Mixing | Amount of digestate (g)/<br>volume of the flask ( mL) |
|--------|------------|----------------|------------|--------|-------------------------------------------------------|
| A      | 4          | 10             | Leachate a | No     | 0.17                                                  |
| B      | 4          | 15             | Leachate a | No     | 0.17                                                  |
| C      | 3          | 20             | Leachate a | No     | 0.17                                                  |
| D      | 4          | 25             | Leachate a | No     | 0.17                                                  |
| E      | 4          | 30             | Leachate a | No     | 0.17                                                  |
| F      | 4          | 35             | Leachate a | No     | 0.17                                                  |
| G      | 3          | 25             | Leachate b | Yes    | 0.25                                                  |
| H      | 3          | 25             | Leachate b | No     | 0.25                                                  |
| I      | 4          | 25             | Sludge     | Yes    | 0.25                                                  |
| J      | 4          | 25             | Rumen      | Yes    | 0.25                                                  |

### ***V.2.2.2. Chemical analysis***

The biogas volume was measured by a water displacement method, and then normalized according to ambient temperature (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Biogas composition was determined using a gas chromatograph (Varian  $\mu$ GC-CP4900) equipped with two columns: a Molsieve 5Å PLOT column for O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and CO and a HayeSep A column for CO<sub>2</sub> quantification. The sample volume injected was approximately 1 mL. The carrier gas was

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

Helium. Volatile Fatty Acids (VFA) were analysed at the end of each batch test. After a three-fold dilution with distilled water and centrifugation (13000 rpm, 15 min), VFA concentration was measured with a gas chromatograph (Varian  $\mu$ GC-CP3900), as described elsewhere (Ganesh *et al.*, 2010). pH was measured directly on the digestate using a pH meter (*Eutech Instruments pH510*) and Mettler Toledo InLab® Expert Pt1000 pH electrodes.

### V.2.2.3. *Microbial analysis*

#### V.2.2.3.1. *DNA extraction and 16S rRNA gene amplification*

Microbial diversity was analysed at the end of each batch test, i.e. after 298 days of experiment. For this, 0.5 g of digestate were sampled and stored at -20°C. Total DNA was extracted using the QIAamp DNA stool extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. Partial amplification of the purified 16S rRNA gene was performed using primer pairs W49 (50-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-30, *Escherichia coli* position F331) and W104 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', *E. coli* position E33) (Delbes *et al.*, 2001). Each reaction tube contained 0.5  $\mu$ M of each primer, 1  $\mu$ L of purified DNA, 0.5 U of Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene), 1 x Pfu Turbo DNA polymerase buffer, 200  $\mu$ M for each dNTP, adjusted with ultra-pure water (CDM Lavoisier, France) to a total volume of 50  $\mu$ L for Bacteria. The reaction mixture was placed in a Mastercycler ep gradient S thermal cycler (Eppendorf). After an initial denaturation step at 94°C for 2 min, 25 temperature cycles for Bacteria. PCR products providing bands of the proper size were confirmed on a 2% agarose gel.

#### V.2.2.3.2. *DNA fingerprinting*

Capillary electrophoresis and fluorescent dye-labelled PCR products were used for CE-SSCP fingerprinting. One microliter of PCR products was diluted 5- to 500-fold and mixed with 18.8 mL of formamide and 0.2 mL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were denatured at 95 °C for 5 min and then immediately cooled in ice. CE-SSCP electrophoresis was carried out in an ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems) with 50-cm-long capillary tubes filled with a non-denaturing 5.6% conformation analysis polymer

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

(Applied Biosystems). CE-SSCP data profiles were analysed and aligned using GeneScan software (Applied Biosystems) and the StatFingerprints R library (Michelland *et al.*, 2009) in accordance with Quéméneur *et al.* (2011). Peaks statistically different between profiles were identified using a SIMPER (SIMilarity PERcentage) test. The relative abundance, further called abundance, corresponds to the area of the peaks related to the total area of the profile.

SSCP profiles difference was correlated with operating conditions and performances (Pearson correlation) (Table V-1).

### V.2.2.3.3. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene

For identifying the CE-SSCP peaks, amplification of 16S rDNA partial gene was done with primer pairs W18 (GAGTTTGATCMTGGCTCAG) -W31 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Wery *et al.*, 2009) for *Bacteria* and W274-W280 for *Archaea*. Each reaction tube contained 0.5 µM of each primer, 1 µL of purified DNA (0,5 µL for *Archaea*), 1 µL of Red Taq polymerase (Sigma), 5 µL of Red Taq buffer, 200 µM for each dNTP, adjusted with pure H<sub>2</sub>O to a total volume of 50 µL. The reaction mixtures were placed in a Mastercycler ep gradient S thermal cycler (Eppendorf). After an initial denaturation at 94°C for 2 min, 25 temperature cycles were carried out at 94 °C for 1 min, 50 °C for 30 seconds, 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min. The size of PCR products was checked on a 2% (w/v) agarose gel. Amplified DNA was then purified using the Qiaquick kit (Qiagen) according to Wery *et al.* (2010). Sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers ranging from HE613791 to HE613793.

## V.2.3. Results

### V.2.3.1. Clustering bacterial populations according to methanogenic performances

Ten operating conditions were tested by applying different TS content, source of inoculum, quantity of digestate in the flask (according to the flask size) and mode of mixing (Table V-1). TableV-2 summarized the main physico-chemical analyses of the digested media sampled from the end of the 37 experiments.

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

The parameter “anaerobic degradation” corresponds to the amount of substrate converted into either VFA or CH<sub>4</sub>. Expressed into Chemical Oxygen Demand (COD) equivalent, a methanogenesis ratio can be extracted, corresponding to the ratio of the amount of methane produced and the total quantity of organic materials converted to VFAs:

$$\text{Methanogenesis ratio} = \frac{\text{methane}}{\text{methane} + \text{AGV}} \quad (1)$$

The methanogenesis ratio ranged 0 to 1: when the substrate was totally degraded into methane, the methanogenesis ratio was equal to 1; when the methanogenesis chain was fully inhibited, the whole degraded substrate was transformed into VFA, and methanogenesis ratio was lower. The functionality of the ecosystems in the 37 experiments was identified on the basis of this methanogenesis ratio.

From Table V-2, a first group of tests, related to operating conditions *A, B, C, D, E, G* and *I*, can be distinguished: In this case, most of the degraded COD of the substrate was converted into CH<sub>4</sub>, resulting in a methanogenesis ratio close to 1. The CH<sub>4</sub> production was ranging from 4.4 to 8.25 mol CH<sub>4</sub>. kgVS<sup>-1</sup> depending on the operating conditions. These batch tests were further denominated “Complete/Full Methanogenesis Group (CMG)”. A second group of batch tests, corresponding to the operating conditions *E\*, F, H* and *J*, was characterized by high VFA accumulation and inhibition of CH<sub>4</sub> production (Table V-2). In this case, only the acidogenic step occurred and methanogenesis was rapidly inhibited: in this case, the methanogenesis ratios ranged between 0.12 and 0.47. These tests were further denominated “Uncomplete Methanogenesis Group (UMG)”.

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

**Tableau V-2: Physico-chemical analysis results obtained at the end of reaction**

| Reactor | Total COD degraded<br>(g. L <sup>-1</sup> ) | pH        | Methane<br>(mol. Kg VS <sup>-1</sup> ) | VFA<br>(mol. Kg VS <sup>-1</sup> ) | Methanogenesis ratio<br>(mol. Kg VS <sup>-1</sup> ) | Group |
|---------|---------------------------------------------|-----------|----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
| A       | 487±32                                      | 7.41±0.09 | 7.6 ±0.5                               | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| B       | 479±30                                      | 7.36±0.34 | 75±0.5                                 | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| C       | 459±30                                      | 6.98±0.03 | 7.2±0.4                                | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| D       | 451±31                                      | 7.83±0.10 | 7.0±0.5                                | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| E       | 377±2                                       | 7.53±0.44 | 5.9±0                                  | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| E*      | 254±38                                      | 5.95±0.24 | 1.8±0                                  | 1.6±0.5                            | 0.54±0.07                                           | UMG   |
| F       | 157±24                                      | 6.06±0.05 | 0.9±0.1                                | 1.0±0.3                            | 0.49±0.10                                           | UMG   |
| G       | 313±19                                      | 7.05±0.04 | 4.9±0.3                                | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| H       | 76±14                                       | 5.68±0.05 | 0.1±0                                  | 0.7±0.2                            | 0.17±0.09                                           | UMG   |
| I       | 313±46                                      | 7.45±0.40 | 4.9±0.7                                | 0±0                                | 1±0                                                 | CMG   |
| J       | 130±18                                      | 5.17±0.04 | 0.7±0.3                                | 1.0±0.2                            | 0.40±0.13                                           | UMG   |

### ***V.2.3.2. Link between bacterial community structure and operating conditions***

Bacterial communities sampled from 37 experiments were compared by CE-SSCP fingerprinting. The genetic distances between the bacterial communities sampled from the different experiments were discriminated using a Principal Component Analysis (PCA). 42.2% of the genetic variations were represented by the two first principal components (Figure V-1). These genetic variations were correlated to the operating conditions for each experiment ( $R^2 = 0.857$ ; P value < 0.001) (Figure V-1). These operating parameters include the different sources of inoculum ( $R^2 = 0.524$ ), TS contents ( $R^2 = 0.554$ ), mode of mixing ( $R^2 = 0.671$ ) and the quantity of digestate relative to volume of flask ( $R^2 = 0.557$ ) (P value < 0.001 for all the parameters).

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

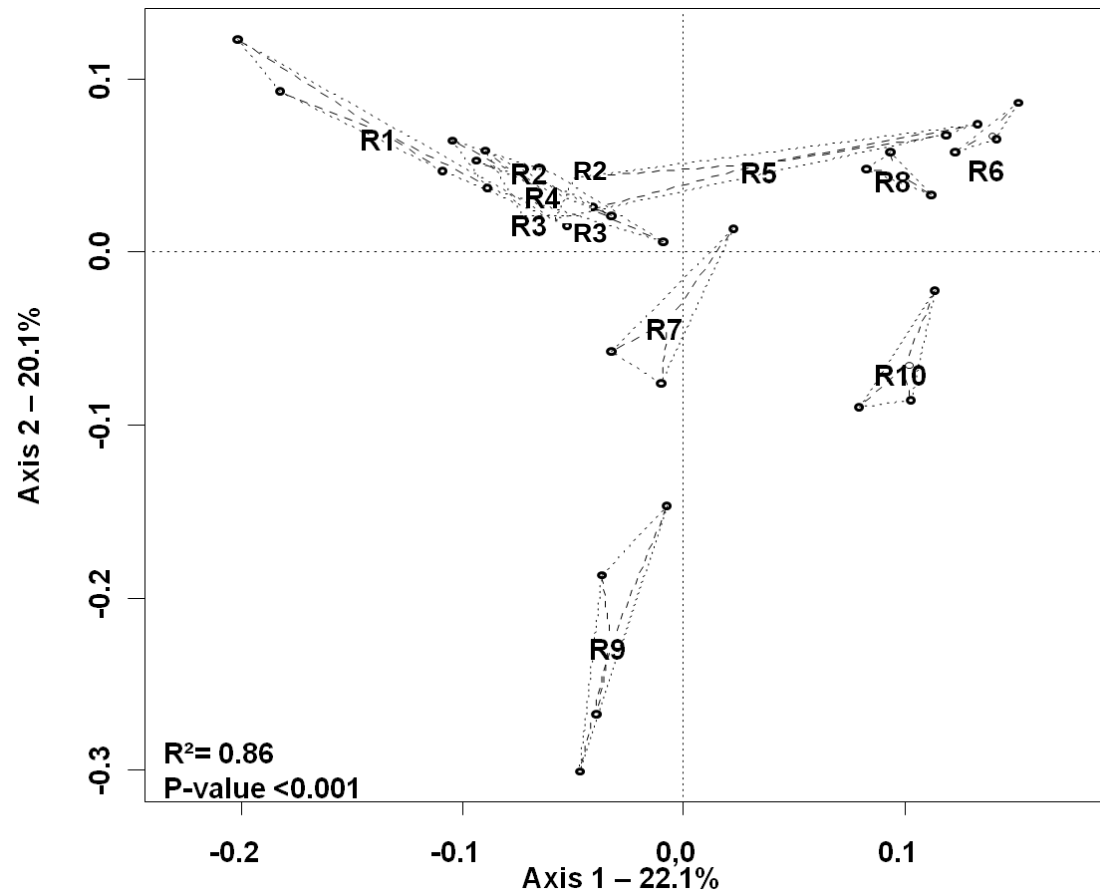
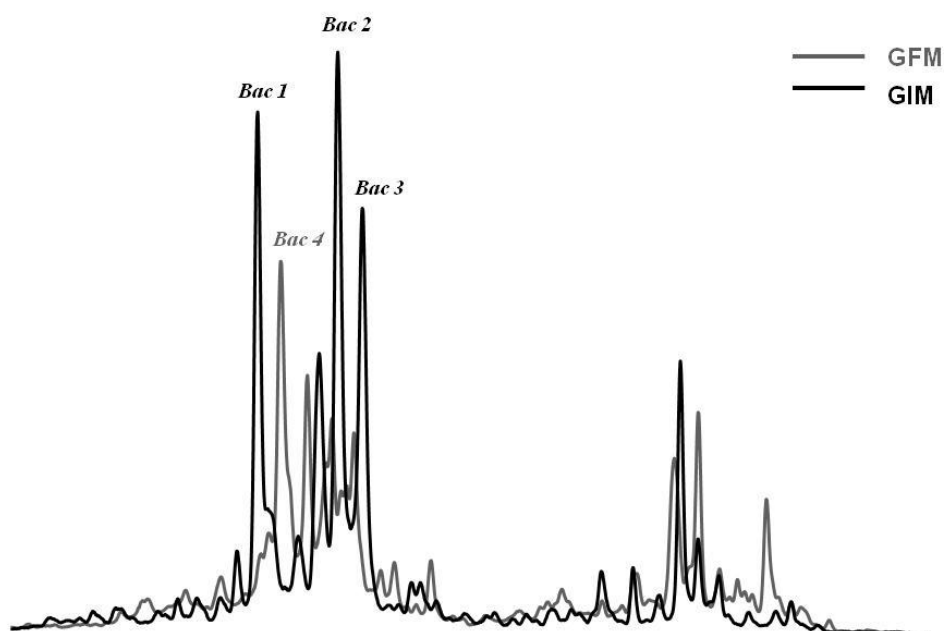


Figure V-1: CPA analysis of genetic Bacterial SSCP profiles and reactors positions

### *V.2.3.3. Link between bacterial community structure and anaerobic digestion performances*

According to the two groups (UMG and CMG) defined on the basis of the substrate degradation, a statically test (SIMPER - similarity percentage) was performed to identify specifically the peaks corresponding to the bacteria according to each group. Four CE-SSCP peaks, named *Bac1*, *Bac2*, *Bac3* and *Bac4*, contributed mostly to discriminate the CMG group from the UMG group ( $R^2$  of 0.566, 0.512, 0.691, 0.728, respectively,  $P$  value  $< 0.001$  for all correlations) (Figure V-2). *Bac1*, *Bac2*, *Bac3* were specific to the UMG group, whereas *Bac4* was specific to the CMG group. However, since *Bac4* was not found in all samples, it was concluded that *Bac4* could not be considered as a microbial tracer for full methanogenesis.

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

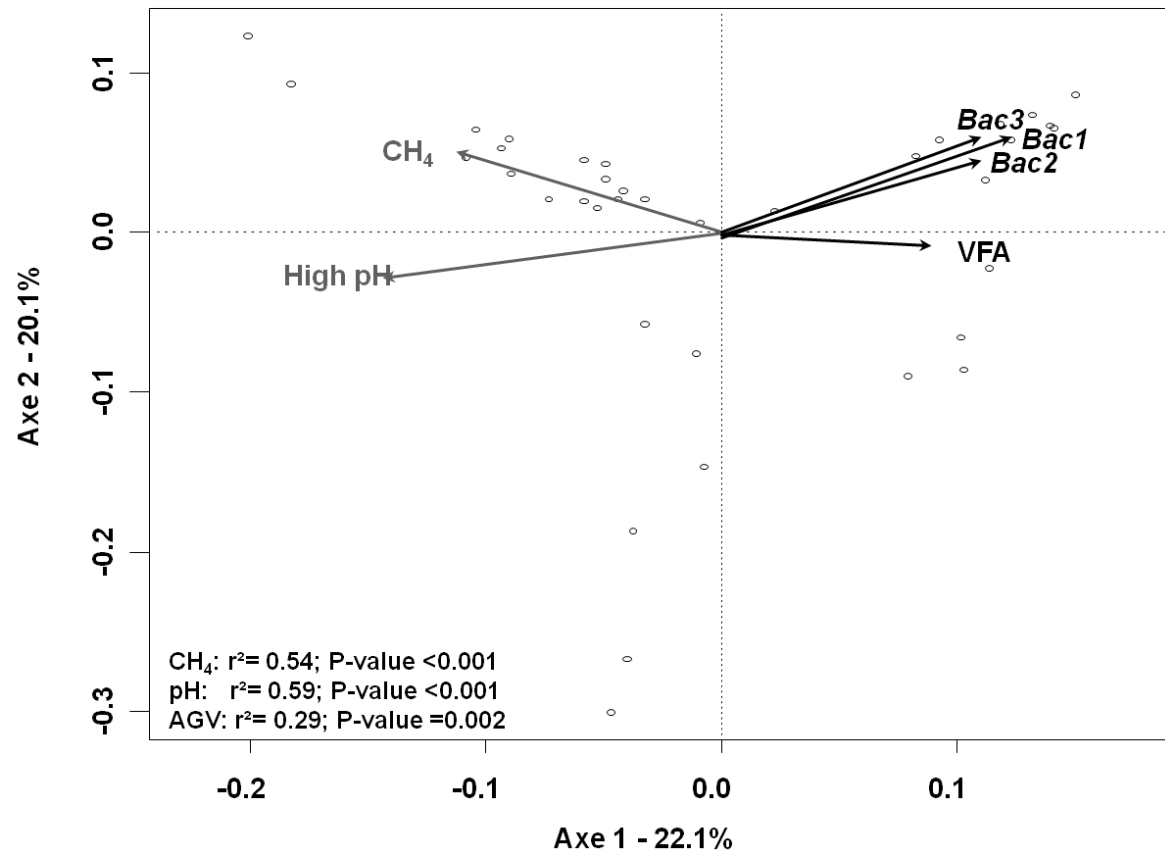


**Figure V-2: Static analysis using SIMPER ( similarity percentage) based on SSCP profiles of the two groups (GIM and GFM) and identification of four bacteria specific for each group.**

The genetic distances between the microbial communities were also significantly correlated to the functionality of the experiments (Figure V-3): pH ( $R^2 = 0.591$ ;  $P$  value  $< 0.001$ ),  $CH_4$  ( $R^2 = 0.544$ ;  $P$  value  $< 0.001$ ) and VFA ( $R^2 = 0.289$ ;  $P$  value  $= 0.002$ ). Fluctuations of the abundance of the most discriminant CE-SSCP peaks were found to be related to the performances. In Figure V-3, the direction of the arrows suggests that *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* significantly correlated with low pH (spearman correlation of 0.523, 0.557, 0.506 respectively;  $P$  value  $< 0.001$ ), whereas these

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

three bacteria were associated with the UMG group and high concentration of VF



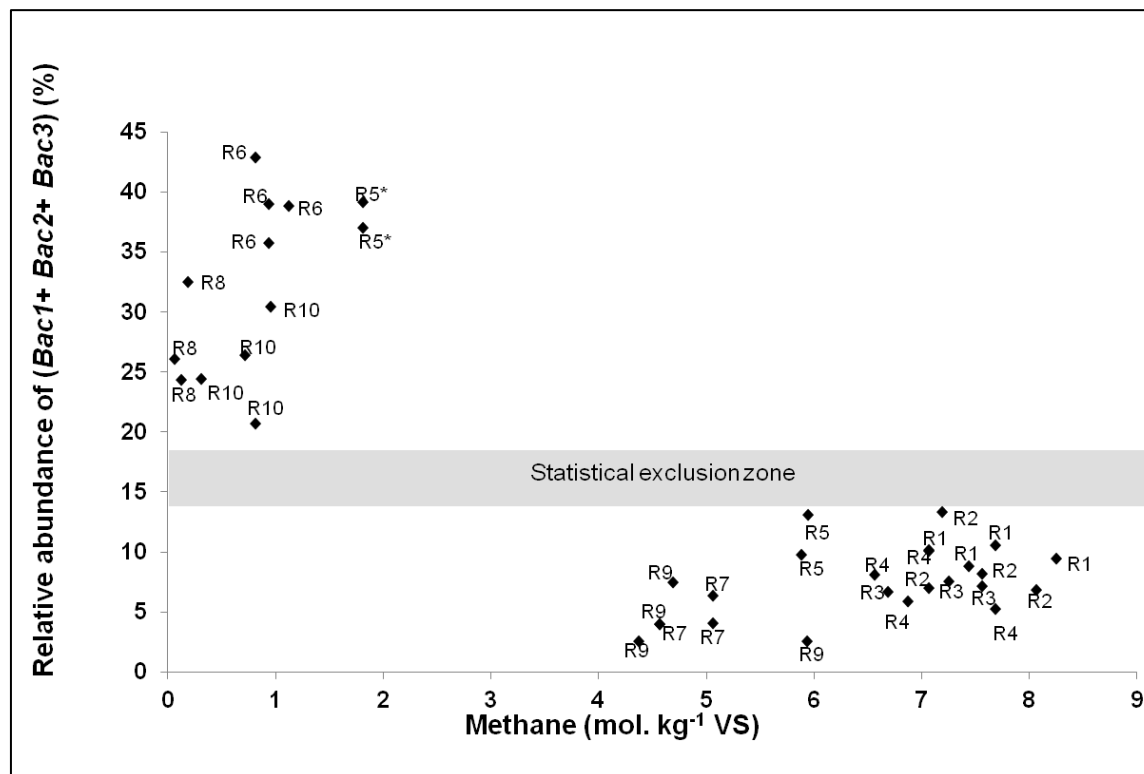
**Figure V-3: Relative abundance of the most discriminant bacterial specie of UMG according to the total methane produced PCA analysis of genetic bacterial SSCP profiles according to AD performances and relative abundance of *Bac1*, *Bac2*, *Bac3*, *Bac4*.**

The sum of peaks -*Bac1*+*Bac2*+*Bac3*- was presented according to the methane yield (Figure V-4). In this Figure, the abundance of UMG-related bacteria is plotted as a function of the methane production for all the experiments. When methane production was lower than 1.81 mol. kg<sub>VS</sub><sup>-1</sup>, the abundance of UMG-related bacteria was greater than 20%, whereas when methane production was greater than 4.4 mol. kgVfS<sup>-1</sup>, this abundance was lower than 13.3%.

Statistical exclusion zones can also being distinguished (in gray in Figure V-4). The upper limit corresponded to the average of the abundance of *Bac1*, *Bac2*, *Bac3* of UMG on which was added twice the value of the standard error. The lower limit corresponded to the average abundance of *Bac1*, *Bac2*, *Bac3* of UMG on wich was subtracted twice the value of the standard error. This

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

absence of experiments within the statistical exclusion zone showed that the sum of the abundance of these three bacteria can be used to discriminate the experiments of both groups UMG and CMG.



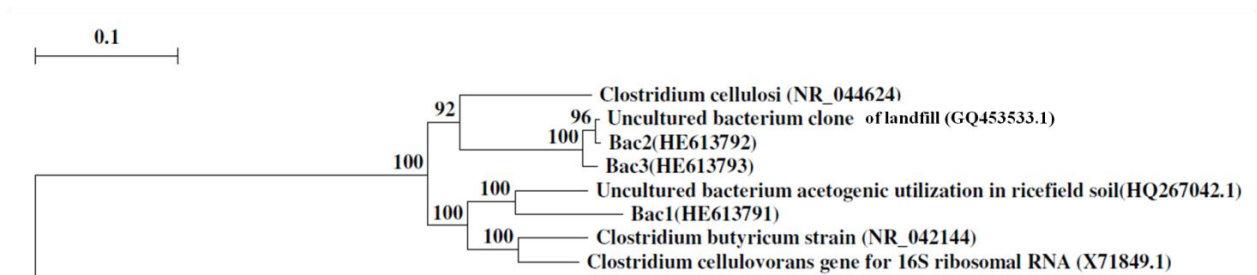
**Figure V-4: Relative abundance of the most discriminant bacterial specie of UMG according to the total methane produced. In gray the statistical exclusion zone, upper limit is the average of the relative abundance of Bac1, Bac2, Bac3 of GIM + standard deviation multiplied by 2 and the lower limit is the average of the relative abundance of Bac1, Bac2, Bac3 of GIM + standard deviation multiplied by 2.**

### V.2.3.4. Identification of the bacterial tracers:

The three bacteria, *Bac1*, *Bac2* and *Bac3* were affiliated to clostridial species (Figure V-5). They presented a genetic proximity with: (i) cellulose consumer *Clostridium* (*Clostridium cellulovorans* and *Clostridium cellulosi*), (ii) acid-tolerant bacteria (*Clostridium butyricum*), and (iii) bacteria found in landfill (*Clostridium* GQ453533) where the low level of water

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

concentration is consistent with the conditions operated in the present study. In addition, *Bac2* and *Bac3* were more related to *C. cellulosi* (84%), *Clostridium* of cluster IV, and *Bac1* was more related to *C. butyricum* (82%) and *C. cellulovorans* (85%) corresponding to the cluster I according to the classification of Colin et al. (1994). *Bac2* and *Bac3* had a close DNA similarity of 98%, and were significantly distinguished to *Bac1*, with only 77% of similarity.



**Figure V-5: Neighbour-joining phylogenetic tree of *Bac1*, *bac2*, *Bac3*, bacteria specific of the GIM. The tree was generated using TREECON and a neighbour joining distance method using a Jukes-Cantor algorithm. *Pseudomonas stutzeri* was used as root outgroup. The size bar indicates the Jukes-Cantor evolutionary distance.**

### V.2.4. Discussion

In this study, ten different operating conditions were tested to obtain a gradient of methanogenic performances. Independently to inoculum source and operating conditions, three bacteria corresponding to genus *Clostridium* sp. were identified as dominant species within the UMG group, where methanogenesis was rapidly blocked. However, despite the fact that the inoculum of some reactors differed, the same substrate was used, cardboard and could have led to the emergence of this particular species. The cardboard used contained a high proportion of cellulose. Cellulose is the most abundant polysaccharide in the natural world (Nikolov *et al.*, 2004) and so is widely found in urban or agricultural waste. Many previous studies have shown the property of several *Clostridium* to biodegrade cellulose (Lamed *et al.*, 1991, 1987; Kelly *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1990)

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

Moreover, despite the difference of the inoculum and high diversity of the *Clostridium* genus in the environment, always the same species were found as dominant in the UMG batch tests. This suggests that these bacteria were the most abundant in the ecosystem mainly because of their extreme tolerance to the environmental conditions (low pH, high VFA) that are unfavorable for methanogenesis.

The persistence and growth of bacterial members of the *Clostridiales* order at low pH conditions have been observed in other studies, under similar conditions. Staley *et al.* (2011) showed that during the initial stages of refuse decomposition characterized by high VFA concentration, 90% of cDNA sequences recovered at pH 5.6 were of the *Clostridiales* order (*Firmicutes* phylum), compared to 62% and 48% of sequences at pH 6.2 and 7, respectively. In the study of Staley *et al.* (2011), TS content of the digested media were between 28 and 30%, corresponding to the environment of dry anaerobic digestion. In addition, under wet AD conditions, Delbes *et al.* (2000) observed a significant increase in abundance of *Clostridium*-related species after an acidic shock at pH = 6. At good anaerobic digestion conditions, studies showed that only approximately 8% of total microbial populations were assigned to the class Clostridia (Nelson *et al.*, 2011). The growth of these bacteria is particularly promoted in acid environments.

Four microbial consortia were used to inoculate the flasks: (i) leachates of pressed digestate municipal solid waste sampled from the same industrial reactors, but at two different seasons. Cardboard usually represents one of the largest proportions of the organic compounds in municipal solid waste (21.5%) (ADEME, 2009), (ii) sludge sampled from anaerobic digestion plant wastewater sludge; wastewater sludge may be contains a high fraction of cellulose, and (iii) the rumen of a cow stomach where the fermentation of grass rich in cellulose takes place. Many *Clostridium* are known for their cellulolytic capacities and were identified in different environments: soils, sewages, rumen, wood fermenters (Lamed *et al.*, 1991, 1987; Kelly *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1990).

Cellulose degradation is not a source of energy for bacteria which are responsible to cellulolytic enzymes production. Bacteria had to transform the soluble products to VFA in order to gain the

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

energy needed for cell maintenance and reproduction (Desvaux *et al.*, 2000; Madden, 1983; Miller and Wolin, 1995; Petitdemange *et al.*, 1984; Weimer and Odt, 1995). The VFA accumulation and the occurrence of three bacteria may suggest that, in addition to being cellulose solubilisers, cellulolytic bacteria are likely to be the dominant acidogens compared to non-cellulolytic acidogens. This hypothesis is consistent with the study of O'Sullivan *et al.* (2005).

The specificity of the present result is the omnipresence of the same three *Clostridium* species during the inhibition of methanogenesis regardless the inoculum source. These bacteria can thus be considered as tracers of inhibition of dry AD. In addition, the presence of these tracers might lower the pH through VFA accumulation but their emergence might also be due to their tolerance to low pH. In this case, any system failure would be indicated by pH lowering, as pH may be faster to monitor. Nevertheless, early detection of these bacteria when there is a difference between the local pH felt by the microorganisms and that measured may be given quicker information about the possibility of system failure of an anaerobic ecosystem.

### V.3. Discussion

Le lien entre les bactéries et les performances de la digestion anaérobie par voie sèche a été mis en évidence. Ce lien a permis l'identification de bio-indicateurs bactériens liés à l'inhibition et à un fonctionnement dégradé de la digestion anaérobie par voie sèche.

Pour les réacteurs contenant une concentration élevée en AGV et un pH acide, la production de méthane est faible et inférieure à  $29\text{g kgMV}^{-1}$ . Pour ces réacteurs où la méthanisation présente des signes d'inhibitions, trois bactéries du genre *Clostridium* ont été identifiées. La présence de ce genre dans cet environnement spécifique est en accord avec la littérature. En effet, les *Clostridium* sont des bactéries connues pour leur tolérance au pH acide (Ye *et al.*, 2007). Dans les milieux proche de digestion anaérobie par voie sèche, Staley *et al* (2011) ont mis en évidence le maintien des *Clostridiales* dans des conditions de pH acide et à fortes concentrations en AGV.

Il est clair que la résistance de *Clostridium* dans un milieu anaérobie en condition acide n'est pas en soit un résultat nouveau. Cependant l'originalité de notre travail vient du fait que, malgré

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

L'utilisation de quatre inocula d'origines différentes, trois espèces indentiques de *Clostridium* sont à chaque fois retrouvées dans les réacteurs pour lesquels la méthanisation a été inhibée. Il est possible que l'utilisation d'un même substrat ait contribué à la sélection de ces espèces. En effet, les *Clostridium* sont connues pour leur capacité à hydrolyser la cellulose (Lamed *et al.*, 1991; Kelly *et al.* 1987). Le substrat utilisé dans cette étude, contient 66% de cellulose. Malgré l'origine distincte des inocula, tous les inocula sont issus d'écosystèmes qui traitent des substrats contenant de la cellulose : l'herbe pour le rumen, le papier toilette pour les boues digérées de station d'épuration et le carton voire d'autres composés cellulosiques pour les deux jus de presse de digestat de déchets ménagers.

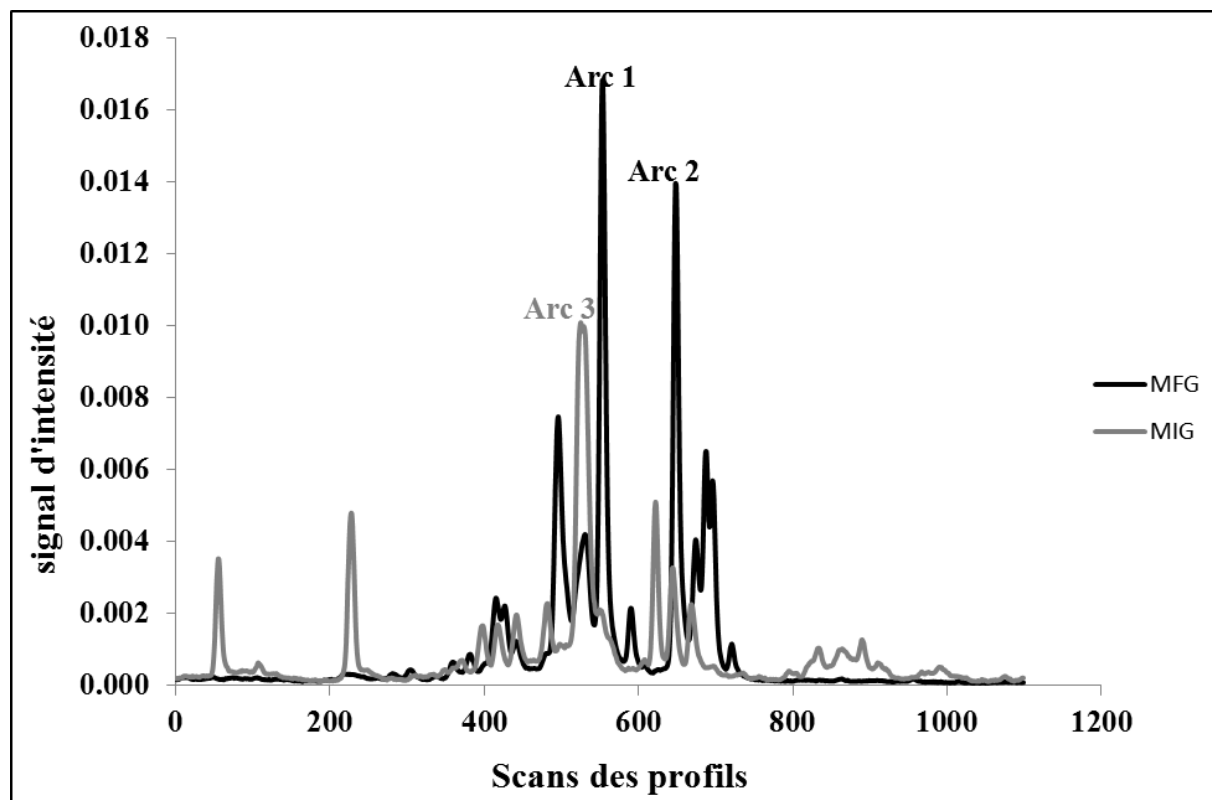
L'hydrolyse n'étant pas une réaction qui génère de l'énergie aux cellules, les bactéries hydrolytiques doivent transformer l'hydrolysate en AGV afin de produire assez d'énergie pour la maintenance et reproduction cellulaire (Desvaux *et al.*, 2000; Madden, 1983; Miller and Wolin, 1995). Il est également probable que l'un des facteurs de sélection de ces trois espèces soit lié aux concentrations élevées de MS caractéristiques de la digestion anaérobie par voie sèche.

Dans la première partie de ce chapitre (publication), nous nous sommes intéressés principalement à la recherche et l'identification de bio-indicateurs bactériens. Les archées méthanogènes sont également des microorganismes très importants dans la chaîne trophique de la digestion anaérobie. La sensibilité de ces microorganismes vis-à-vis des conditions environnementales peut en faire de bons candidats pour être des bio-indicateurs de fonctionnement de la digestion anaérobie. La même démarche que celle suivie pour la recherche de bio-indicateurs bactériens a été réalisée dans le but d'identifier des bio-indicateurs « archées » liés au fonctionnement (ou au mauvais fonctionnement) de la digestion anaérobie par voie sèche. Deux groupes ont été séparés selon les critères mentionnés dans le paragraphe « Groups functionality definition » : le UMG (groupe d'inhibition de la méthanisation) et CMG (groupe favorisant la méthanisation) (table V-2).

La région V3 du 16S de l'ADN des archées a été amplifiée puis une CE-SSCP a été réalisée sur ces échantillons. Une analyse SIMPER (Clarke, 1993) en utilisant StatFingerprints dans la

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

bibliothèque de R a été effectuée afin d'avoir les pics correspondant à des espèces d'archées qui contribuent le plus à distinguer l'un au l'autre des deux groupes (UMG et CMG). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure V-6.

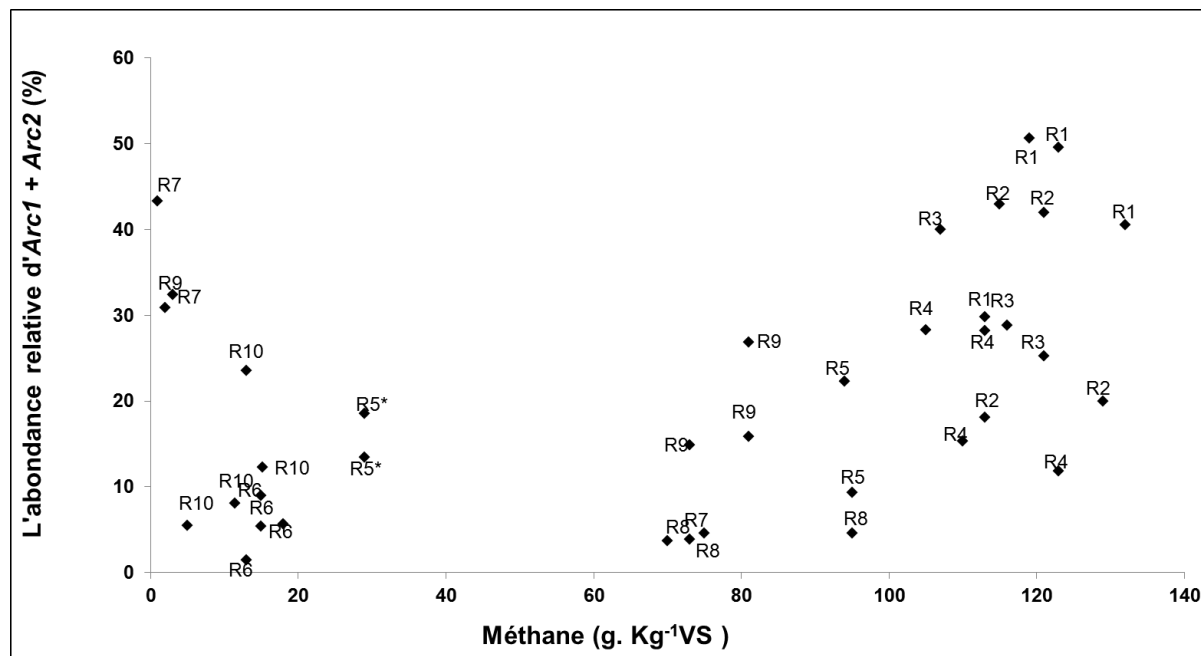


**Figure V-6 : Analyse SIMPER entre les profils SSCP des deux groupes (CMG et UMG) et identification d'*Arc1*, *Arc2*, *Arc3* comme les espèces qui contribuent le plus à distinguer les deux groupes CMG et UMG.**

Trois archées ont été identifiées comme étant les trois espèces qui contribuent le plus à distinguer les deux groupes. *Arc1* et *Arc2* sont les deux espèces les plus représentatives des réacteurs pour lesquels la digestion anaérobie fonctionne relativement bien (groupe CMG). *Arc3* est l'espèce qui représente et qui distingue le plus le groupe UMG dans lequel la méthanisation est inhibée.

Par la suite, l'abondance relative des pics identifiés par SIMPER a été calculée en utilisant le rapport aire de pic/aire totale du profil SSCP.

## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE



## V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

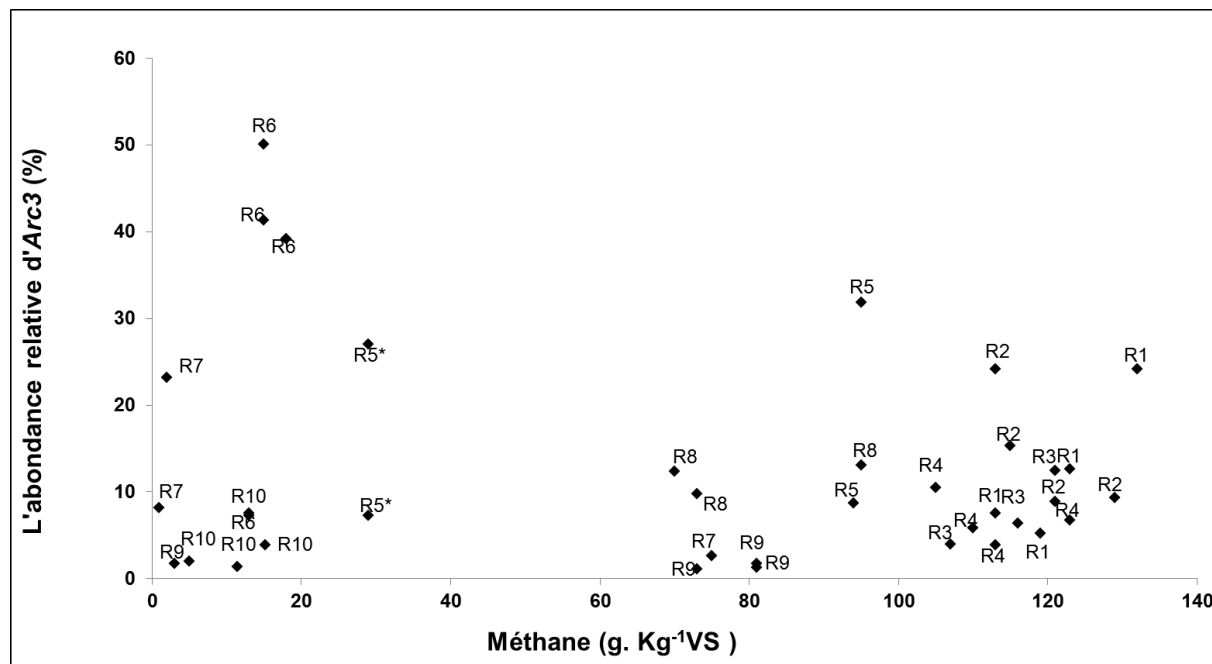


Figure V-8: L'abondance relative d'*Arc3* en fonction de la production finale de méthane.

Ces résultats montrent qu'aucun bio-indicateur ne peut être identifié parmi les archées méthanogènes. Ceci est probablement dû au fait que les archées sont très sensibles à leur environnement. Selon la composition de l'inoculum et les paramètres opératoires, une espèce peut être plus favorisée qu'une autre. Ceci est en accord avec ce qui a été démontré dans le chapitre IV.

V. BIO-INDICATEURS MICROBIENS LIES AU FONCTIONNEMENT DE LA DIGESTION  
ANAEROBIE PAR VOIE SECHE

---

---

***CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES***

---

---

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Malgré l'importance de la digestion anaérobie par voie sèche dans le traitement des déchets solides, cette technologie présente plusieurs points d'ombre. Comme le démontre la recherche bibliographique présentée au début de ce manuscrit, et contrairement à la digestion anaérobie par voie humide, la digestion anaérobie sèche a encore été très peu étudiée d'un point de vue académique. L'objectif de cette thèse était d'améliorer les connaissances des processus mis en jeu dans ce domaine. Pour cela, nous avons fait varier des paramètres opératoires spécifiques à cette technologie. La variation de ces paramètres permet de connaître leur influence sur les performances de la digestion anaérobie qui sont contrôlées par la composante biologique. Pour cette raison, les populations microbiennes impliquées dans la digestion anaérobie par voie sèche ont été étudiées.

La teneur en matières sèches (MS) est le paramètre opératoire principal qui change par rapport à la digestion anaérobie par voie humide. La variation de ce paramètre spécifique a permis de mettre en évidence que les performances de la digestion anaérobie sont fortement influencées par la teneur en MS. Dans le cadre de cette expérimentation, une dégradation des performances de la méthanisation a été observée à partir de 30 % de MS. Lorsque la digestion anaérobie est inhibée, une accumulation d'AGV et des pH acides ont été observés. Une investigation plus approfondie des causes de l'inhibition de la digestion anaérobie à partir 30% MS a été réalisée. La modélisation des données expérimentales par le modèle ADM1 a permis de mettre en évidence le rôle du transfert de masse milieu réactionnel/gaz dans la limitation et l'inhibition de la digestion anaérobie par voie sèche de hautes concentrations en solides. Des teneurs élevées en MS rendent le milieu compact et donc le transfert du biogaz dissous du milieu réactionnel vers le ciel gazeux est limité.

Le transfert du gaz dissous vers le ciel gazeux est contrôlé par deux variables qui sont :  $k_L$  (coefficient de transfert de masse liquide gaz) et  $a$  (la surface spécifique d'échange). Afin de confirmer l'influence du transfert sur la digestion anaérobie par voie sèche, nous devons faire varier un de ces deux paramètres. Notre choix s'est porté sur la surface spécifique d'échange  $a$ , ce facteur étant le plus facile à maîtriser. Afin d'avoir différentes surfaces  $a$ , deux tailles de fioles différentes ont été utilisées. Les résultats expérimentaux montrent que la digestion anaérobie par voie sèche est très affectée par la surface spécifique d'échange. Les hypothèses émises lors de la

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

simulation par ADM1 peuvent être ainsi validées. Lorsque le transfert est limité, le biogaz dissous est maintenu dans le milieu réactionnel (notamment le CO<sub>2</sub> et le H<sub>2</sub>), pouvant générer des sursaturations locales de ces composés. Ces deux composés rendent l'environnement toxique pour les microorganismes et notamment pour les méthanogènes. L'accumulation de CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel peut, par exemple, provoquer une acidification locale plus importante et inhibitrice de la digestion anaérobie.

Les paramètres opératoires affectent les performances de la digestion anaérobie par l'intermédiaire des microorganismes impliqués dans ce processus. Pour cette raison, une seconde partie de cette thèse s'est intéressée au comportement des microorganismes dans les milieux de digestion par voie sèche. Le comportement des populations microbiennes (bactériennes et archées) a été étudié à différentes teneurs en MS.

En ce qui concerne les archées, les résultats montrent une très grande sensibilité de ces microorganismes à leur environnement. En effet, des shifts entre les espèces majoritaires d'archées ont été observés en fonction de la teneur en MS. En digestion anaérobie semi-sèche (MS ≤ 15%), l'espèce méthanogène majoritaire est une *Methanobacterium*. En digestion anaérobie sèche (20 ≤ MS ≤ 30%), deux archées sont majoritaires, une autre *Methanobacterium* (hydrogénotrophe) et une *Methanosarcina* (actétoclaste). Lorsque la digestion anaérobie est inhibée (MS ≥ 30%), l'espèce majoritaire est une *Methanobacterium* encore différente des deux premières. Les *Methanobacterium* étant connues pour être les plus résistantes des archées (Blume *et al.*, 2009), ces microorganismes pourraient présenter de bons bio-indicateurs. Cependant en testant la présence de ces microorganismes en milieu de DA par voie sèche en utilisant d'autres inocula, il s'est avéré que ces archées spécifiques étaient dépendantes de l'inoculum.

En ce qui concerne les bactéries, les résultats montrent que lorsque la DA est « fonctionnelle », une diversité d'espèces plus importante est impliquée dans le processus de méthanisation. Cependant lorsque la DA est inhibée, trois bactéries du genre *Clostridium* ont toujours été identifiées comme étant les bactéries majoritaires. La digestion anaérobie étant un écosystème très diversifié et riche en bactéries, l'émergence de ces trois bactéries du même genre montre que ces microorganismes sont les plus résistants à ces conditions environnementales. Ces bactéries

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

pourraient être des traceurs microbiologiques à suivre pour prévenir l'inhibition de la digestion anaérobie. Afin d'élargir la présence de ces biotraceurs à d'autres conditions environnementales, des inocula d'origines différentes (rumen, boues de station d'épuration digérées, jus de presse de digestat) ont été testés. Les résultats obtenus montrent que ces trois *Clostridium* sont des bio-indicateurs de non fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche et cela quel que soit l'origine de l'inoculum. Ce sont des bio-indicateurs inoculum-indépendants.

Les résultats de thèse offrent d'intéressantes perspectives de recherche pour l'amélioration de la digestion anaérobie par voie sèche. D'un côté, deux paramètres opératoires majeurs ont pu être identifiés : la concentration en MS et le transfert de matière de composés dissous du milieu réactionnel vers le biogaz. Une investigation plus approfondie de l'influence du transfert de matière aiderait à mieux maîtriser ce paramètre. Cependant, la nature du substrat et la teneur en MS sont également des paramètres à prendre en compte en combinaison avec la surface spécifique d'échange. En effet, les résultats obtenus et les gammes de fonctionnement sont valables dans nos conditions expérimentales et avec le substrat testé (carton broyé). Il serait intéressant de tester d'autres substrats pour voir le lien entre le substrat et le transfert de matière. D'un point de vue opérationnel, le mélange est un paramètre opératoire qui permet d'augmenter la surface spécifique d'échange. Il serait intéressant de tester différents types de mélange en digestion anaérobie par voie sèche. A plus long terme, l'amélioration des transferts de matière pourrait déboucher à de nouvelles conceptions de réacteurs, en termes de mélange, de conditions opératoires ou de design.

D'un autre côté, l'étude de la composante microbiologique nous a permis d'identifier des bio-indicateurs bactériens liés à l'inhibition et au mauvais fonctionnement de la digestion anaérobie. Cependant, cette étude n'a été appliquée encore une fois qu'à un seul type de substrat. Une perspective de recherche intéressante pourrait être de tester l'ubiquité de ces bio-indicateurs à d'autres substrats lignocellulosiques.

Ces résultats sont également issus de prélèvements en fin d'expérimentation. Afin de pouvoir utiliser ces traceurs bactériens pour prévenir une éventuelle inhibition de la digestion anaérobie, une étude de leur dynamique d'apparition semble indispensable. L'objectif serait de mettre en

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

évidence l'émergence de ces biotraceurs par rapport à des paramètres macroscopiques tels que le pH ou les AGV.

L'étude du comportement des archées méthanogènes a mis en évidence l'association de méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes en condition sèche. Ce résultat mérite d'être approfondi. La recherche de microorganismes de ces groupes trophiques en condition sèche en utilisant des inocula d'origine différente permettrait de renforcer ce résultat.

Une autre perspective de recherche pour l'amélioration du processus de digestion anaérobie par voie sèche est la compréhension de la répartition spatiale des microorganismes. En effet, comme il est indiqué dans la partie bibliographique, les microorganismes peuvent être répartis en cellules libres ou attachées sous forme de biofilm au substrat. Dans un milieu où la concentration en MS est très élevée (entre 20 et 40%), cette notion de répartition est encore plus importante. Lors de cette thèse, l'étude de la répartition était difficile du fait des propriétés d'absorption du carton. En effet, il n'a pas été possible d'avoir assez de phase liquide pour étudier les cellules libres et les séparer des cellules en biofilm. Il faudrait ainsi élaborer un protocole de séparation de ces deux phases. Dans le cadre de l'utilisation d'autres substrats moins absorbants, ces deux phases pourraient être plus facilement extractibles. Cette étude permettrait de comprendre le rôle de chacune de ces phases dans la digestion anaérobie par voie sèche.

Les axes de recherche ainsi définis permettront une meilleure compréhension et ainsi une meilleure maîtrise de la digestion anaérobie en condition sèche. La compréhension du mode d'action des paramètres opératoires sur les performances de la digestion anaérobie ainsi que le comportement microbien dans ces milieux secs permettraient un meilleur contrôle de ce procédé.

# ***LISTES DES FIGURES***

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure I-1 : Progression de la production d'OM par habitant en provenance stricte des ménages (ADEME, 2007). ---                                                                                                                                                   | 3   |
| Figure I-2: Mode de traitement des OM (ADEME 2007). -----                                                                                                                                                                                                          | 10  |
| Figure I-3: Principaux processus et étapes de dégradation anaérobie de la matière organique.-----                                                                                                                                                                  | 11  |
| Figure II-1: Photographie de l'agitateur utilisé pour certaines expérimentations -----                                                                                                                                                                             | 52  |
| Figure III-1: Cumulated methane production from cardboard according to the TS content. The insert corresponds to the first 40 days of the experiment. -----                                                                                                        | 72  |
| Figure III-2: Influence of TS content on Maximum methane production rate. -----                                                                                                                                                                                    | 74  |
| Figure III-3: Influence of TS content on final methane yield (at the end of the experiment)-----                                                                                                                                                                   | 75  |
| Figure III-4: Influence of TS content on pH and VFA concentration at the end of the experiment. -----                                                                                                                                                              | 76  |
| Figure III-5: Experimental and simulated cumulative CH <sub>4</sub> production at 10% TS, with calibrated values for $k_T$ and $k_{hyd,Xch}$ . -----                                                                                                               | 78  |
| Figure III-6: Experimental and simulated cumulative CH <sub>4</sub> production at 30% TS, with calibrated values for $k_T$ and $k_{hyd,Xch}$ . -----                                                                                                               | 78  |
| Figure III-7: Influence of the first-order hydrolysis rate constant for carbohydrates on anaerobic digestion of cardboard for unlimited mass transfer as predicted by the ADM1. -----                                                                              | 80  |
| Figure III-8: Influence of the overall mass transfer coefficient $k_T$ on anaerobic digestion of cardboard as predicted by the ADM1. -----                                                                                                                         | 82  |
| Figure III-9: Photographie montrant 2 tailles de fioles, leurs surfaces spécifiques d'échange et le système de sacs reliés aux fioles. -----                                                                                                                       | 87  |
| Figure III-10: Volume de méthane produit pour les deux surfaces spécifiques d'échange ainsi que pour le témoin négatif-----                                                                                                                                        | 88  |
| Figure III -11 : Cinétique de production de biogaz pour les deux différentes surfaces spécifiques d'échange ainsi que pour le témoin négatif-----                                                                                                                  | 89  |
| Figure III-12 : Cinétique de production d'AGV pour les deux différentes surfaces spécifiques d'échange -----                                                                                                                                                       | 90  |
| Figure IV-1: Average CE-SSCP profile of bacterial communities for the inoculum (at the top), batch Methanogenic tests at 10, 15, 20, 25, 30a % TS (Group A) and batch tests at 30-b and 35% TS where methanogenesis was inhibited(Group B).-----                   | 106 |
| Figure IV-2: Relative abundance of peaks <i>Bac1</i> , <i>Bac2</i> , <i>Bac3</i> (non-functioning majority <i>Bacteria</i> ) in batch tests for all TS concentrations. The error bars represents the standard deviation between profiles of the four replicates. - | 107 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure IV-3: Quantification of the most abundant Bacteria (of inhibited AD) according to total solid content.<br>Quantification was performed by multiplication of relative abundance of every species by the total bacterial quantification (by qPCR) -----                                                                                                                                                                                                           | 108 |
| Figure IV-4: Average CE-SSCP profile of Archaeal communities for the inoculum (at the top), batch methanogenic tests at 10, 15% TS (Group A1), batch methanogenic tests at 20, 25, 30a % TS (Group A2) and batch tests at 30-b and 35% TS where methanogenesis was inhibited (Group B). -----                                                                                                                                                                          | 109 |
| Figure IV-5: Relative abundance of peaks <i>Arc1</i> , <i>Arc2</i> , <i>Arc3</i> and <i>Arc4</i> in batch tests for all TS concentrations. The error bars represents the standard deviation between profiles of the four replicates -----                                                                                                                                                                                                                              | 113 |
| Figure IV-6: Phylogenetic tree of most important Archaea ( <i>Arc1</i> , <i>Arc2</i> , <i>Arc3</i> , <i>Arc4</i> ) identified in batches with different TS content. -----                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 113 |
| Figure IV-7: Quantification of the most abundant ( <i>Arc1</i> , <i>Arc2</i> , <i>Arc3</i> , <i>Arc4</i> ) according to total solid content.<br>Quantification was performed by multiplication of the relative abundance of every species by the total archaeal quantification (by qPCR) -----                                                                                                                                                                         | 112 |
| Figure IV-8 : Pourcentage des Archées hydrogénotrophes et acétoclastes identifiées -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 120 |
| Figure V-1: CPA analysis of genetic Bacterial SSCP profiles and reactors positions -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 135 |
| Figure V-2: Statistically analysis using SIMPER ( similarity percentage) based on SSCP profiles of the two groups (GIM and GFM) and identification of four bacteria specific for each group. -----                                                                                                                                                                                                                                                                     | 136 |
| Figure V-3. Relative abundance of the most discriminant bacterial specie of UMG according to the total methane produced PCA analysis of genetic bacterial SSCP profiles according to AD performances and relative abundance of <i>Bac1</i> , <i>Bac2</i> , <i>Bac3</i> , <i>Bac4</i> -----                                                                                                                                                                             | 137 |
| Figure V-4: Relative abundance of the most discriminant bacterial specie of UMG according to the total methane produced. In gray the statistical exclusion zone, upper limit is the average of the relative abundance of <i>Bac1</i> , <i>Bac2</i> , <i>Bac3</i> of GIM + standard deviation multiplied by 2 and the lower limit is the average of the relative abundance of <i>Bac1</i> , <i>Bac2</i> , <i>Bac3</i> of UMG + standard deviation multiplied by 2 ----- | 138 |
| Figure V-5 : Neighbour-joining phylogenetic tree of <i>Bac1</i> , <i>Bac2</i> , <i>Bac3</i> , bacteria specific of the UMG. The tree was generated using TREECON and a neighbour joining distance method using a Jukes-Cantor algorithm. <i>Pseudomonas stutzeri</i> was used as root outgroup. The size bar indicates the Jukes-Cantor evolutionary distance. -----                                                                                                   | 143 |
| Figure V-6 : Analyse SIMPER entre les profils SSCP des deux groupes (CMG et UMG) et identification d' <i>Arc1</i> , <i>Arc2</i> , <i>Arc3</i> comme les espèces qui contribuent le plus à distinguer les deux groupes CMG et UMG. -----                                                                                                                                                                                                                                | 143 |
| Figure V-7 : L'abondance relative d' <i>Arc1</i> + <i>Arc2</i> en fonction de la production finale de méthane. -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 144 |
| Figure V-8: L'abondance relative d' <i>Arc3</i> en fonction de la production finale de méthane. -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 145 |

# ***LISTE DES TABLEAUX***

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau I-1: The characteristics of the main industrial technologies -----                                                                                                                                                                                                                                                              | 22  |
| Tableau I-2: Summary of pretreatments -----                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32  |
| Tableau II-1: Amorces et sondes utilisées pour l'amplification par PCR du gène de l'ADNr 16S. En gris les amorces<br>utilisées pour l'amplification de l'ADN des archées, et en noir celles utilisées pour l'amplification de l'ADN<br>bactérien -----                                                                                  | 55  |
| Tableau IV-1: Primers and quantification probes used for DNA amplification written in grey primers and probes for<br>Archaeal 16S DNAr amplification and written in black primers and probes fo Archaeal 16S DNAr<br>amplification -----                                                                                                | 101 |
| Tableau IV-2: : Main performance parameters characterizing the anaerobic digestion process. The tests were<br>carried out in batch tests at 37°C, with cardboard as substrate. VFAs and pH were analysed at the end of the<br>reaction (day 298). Biogas volume and methane content were monitored throughout the <i>reactio</i> .----- | 104 |
| Tableau V-1: Initial reactors conditions -----                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 129 |
| Tableau V-2: Physico-chemical analysis results obtained at the end of reaction -----                                                                                                                                                                                                                                                    | 134 |

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ADEME** (2004, 2007, 2009), les déchets en chiffres en France
2. **Abbassi-Guendouz A., Brockmann D., Trably E., Dumas C., Delgenès J-P., Steyer J-P., Escudé R.** Moisture content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresource Technology*. (2012), 111:55-61.
3. **Aguilar A., Casas C., Lema J.M.** Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: Kinetics and inhibition. *Water Research*. (1995), 29 : 505-509.
4. **Ahring B.K. et Westermann P.** Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Applied and Environmental Microbiology*. (1988), 54 : 2393-2397.
5. **Ahring B.K.**, Biomethanisation, Springer-Verlag. (2003), Berlin Heidelberg New York.
6. **Alastair J.W., Phil J.H., Peter J.H., David L. J.** Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. (2008), 99: 7928-7940
7. **Amani T., Nosrati M., Sreekrishnan TR.** Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - a review. *Environmental Review*. (2010), 18:255-278.
8. **Amann Rüdiger I., Lu W., Schleifer K.H.** Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiology Review*. (1995), 59: 143-169.
9. **Mara D., Horan N.J.** Anaerobic digestion treatment processes. Anderson G.K., Sallis P.J., Uyanik S. Chapter in The Handbook of Water and Wastewater Microbiology, ed., (2003), N.J., Academic Press.
10. **Angelidaki I. et Sanders W.** Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. (2004), 3: 117-129.
11. **Angelidaki I., Alves M., Bolzonella D., Borzacconi L., Campos J.L., Guwy A.J., Kalyuzhnyi S., Jenicek P., van Lier, J.B.** "Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays". *Water Science and Technology*. (2009), 59: 927-934.
12. **Arora D.S., et Sharma R.K.** Enhancement in in vitro digestibility of wheat straw obtained from different geographical regions during solid state fermentation by white rot fungi. *BioResource* (2009a), 4: 909-920.
13. **Arora D.S. et Sharma R.K.** Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. *Journal of Animal Feed Science*. (2009b), 18: 151-161
14. **Baeten D. et Verstraete W.** In-reactor anaerobic digestion of MSWorganics. In: Hoitink, H.A.J. & Keener, H.M. (eds): Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects. (1993), Renaissance Publications, Worthington, OH, p:111-129.
15. **Battistoni P., Fava G., Stanzini C., Cecchi F., Bassetti A.** Feed Characteristics and Digester Operative Conditions as Parameters Affecting the Rheology of Digested Municipal Solid-Wastes. *Water Science Technology*. (1993), 27: 37-45.
16. **Battistoni P.** Pre-treatment, measurement execution procedure and waste characteristics in the rheology of sewage sludges and the digested organic fraction of municipal solid wastes. *Water Science and Technology*. (1997), 36: 33-41.
17. **Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W., Siegrist H., Vavilin V.A.** The IWA anaerobic digestion model n°1 (ADM1). (2002), 45: 65-73.
18. **Batstone D.J., Keller J.** Industrial applications of the IWA anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Water Science and Technology*. (2003), 47 : 199-206.
19. **Bauer A., Bösch P., Friedl A., Amon A.** Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology*. (2009), 142: 50-55.
20. **Benbelkacem H., Bayard R., Abdelhay A., Zhang Y., Gourdon, R.** Effect of leachate injection modes on municipal solid waste degradation in anaerobic bioreactor, *Bioresource Technology*. (2010), 101: 5206-5212

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

21. **Blume F., Bergmann I., Nettmann E., Schelle H., Rehde G., Mundt K., Klocke M.** Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of Applied Microbiology*. (2009), 109: 441-450,
22. **Bolzonella D., Pavan P., Mace S., Cecchi F.** Dry anaerobic digestion of differently sorted organic municipal solid waste: a full scale experience. *Water Science and Technology*. (2006), 53: 23-32
23. **Bolzonella D., Battistoni P., Susini C., Cecchi F.** Anaerobic codigestion of waste activated sludge and OFMSW: the experiences of Viareggio and Treviso plants (Italy). *Water Science & Technology*. (2006), 53 : 203–211.
24. **Bouallagui H., Torrijos M., Godon J.J., Moletta R., Ben Cheikh R., Touhami Y., Delgenes J.P., Hamdi M.** Two-phase anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: Bioreactor performance. *Biochemical Engineering Journal*. (2004), 21: 193-197.
25. **BOUGRIER C., DELGENES J-P., CARRERE H.** Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge, *Biochemical Engineering Journal*. (2007), 34 : 20–27
26. **Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D., NOLLER H.F.** Gene organisation and primary structure of ribosomal RBA from *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology*. (1981), 148: 107-127
27. **Burrell P.C., O'Sullivan C., Song H., Clarke W.P., Blackall L.L.** The identification, detection and spatial resolution of *Clostridium* populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*. (2004), 70:2414–2419.
28. **Buffiere P., Frederic S., Marty B., Delgenes J.-P.** A comprehensive method for organic matter characterization in solid wastes in view of assessing their anaerobic biodegradability. *Water Science and Technology*, (2008), 58: 1783-1788.
29. **Buffiere P., Loisel D., Bernet N., Delgenes J.P.** Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology*, (2006), 53: 233-241.
30. **Cecchi F., Pavan P., Musacco A., Mata-Alvarez J., Vallini G.** Digesting the organic fraction of municipal solid waste: Moving from mesophilic (37°C) to thermophilic (55°C) conditions. *Waste Management and Research*. (1993), 11: 403-414.
31. **Charles W., Walker L., Cord-Ruwisch R.** Effect of pre-aeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. (2009), 100: 2329–2335
32. **Clarke K.R.** Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology*. (1993), 18(1): 117-143
33. **Collins M.D., Lawson P.A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow J.A.E.** The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International journal of systematic bacteriology*. (1994), 44: 812-826
34. **Datta, R.** Acidogenic fermentation of lignocellulose – acid yield and conversion of components. *Biotechnology and Bioengineering*, (1981), 23, 2167-2170.
35. **De Baere L.** Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the art. In *II Int. Symp. Anaerobic Dig. Solid Waste*, held in Barcelona, June 15-17, (eds. J. Mata-Alvarez, A. Tilche and F. Cecchi), Int. Assoc. Wat. Qual. vol. 1, (1999). p290-299,
36. **De Baere L., Mattheeuws B., Velghe F.,** State of the art of anaerobic digestion in europe. 12th International Congress on Anaerobic Digestion. (2010), Guadalajara, Mexico, IWA.
37. **Delbes C., Moletta R., Godon J.-J.** Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction–single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*. (2000), 2:506–515
38. **Delbes C, Leclerc M, Zumstein E, Godon JJ & Moletta R** (2001) A molecular method to study population and activity dynamics in anaerobic digesters. *Water Science and Technology* 43: 51-57.
39. **Desvaux M, Guedon E, Petitdemange H. (2000).** Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Applied Environmental Microbiology*, 66:2461–2470.
40. **Dong L., Zhenhong Y., Yongming S.** Semi-dry mesophilic anaerobic digestion of water sorted organic fraction of municipal solid waste (ws-ofmsw). *Bioresource Technology*. (2010), 101: 2722-2728.
41. **El-Fadel M., Findikakis A.N., Leckie, J.O.** Temperature effects in modelling solid waste biodegradation. *Environmental Technology*. (1996), 17: 925–935.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

42. **Elnekave M., Tufekci N., Kimchie S., Shelef G.** Tracing the mixing efficiency of a primary mesophilic anaerobic digester in a municipal wastewater treatment plant. *Fresen. Environmental Bull.* (2006), 15:1098–1105.
43. **Eurostat**, 2010, communiqué de presse 43/2010., <http://ec.europa.eu/eurostat>
44. **Fernandez -Guelfo, L.A., Alvarez-Gallego, C., Sales, D., Romero, L.I.** The use of thermochemical and biological pretreatments to enhance organic matter hydrolysis and solubilization from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Chemical Engineering Journal*, (2011), 168: 249-254.
45. **Fernandez A., Huang S., Seston S., Xing J., Hickey R., Criddle C., Tiedje J.** How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* (1999), 65: 3697–3704.
46. **Fernandez J., Perez M., Romero L.I.** Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (ofmsw). *Bioresource Technology*. (2008), 99: 6075-6080.
47. **Fernández J., Pérez M., Romero L.I.** Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: influence of initial total solid concentration. *Bioresource Technology*. (2010), 101:6322-6328.
48. **Forster-Carneiro T., Perez M., Romero L.I.** Anaerobic digestion of municipal solid wastes: Dry thermophilic performance. *Bioresource Technology*. (2008), 99: 8181-8184.
49. **Forester J., Pérez M., Romero L.I.** Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresource Technology*. (2008), 99: 6974-7002.
50. **Forster-Carneiro T., Perez M. et Romero L.I.** Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresource Technology*. (2008), 99: 6994-7002.
51. **Frigon J-C., Guiot S.R.** production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review . *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. (2010), 4: 447–458
52. **Gadzala-Kopciuch R, Bereck B, Bartoszewicz J, Buszewski B.** Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring. *Polish Journal of Environmental Studie*. (2004), 13: 453-462
53. **Ganesh R., Rajinikanth R., Thanikal J.V., Ramanujam R.A., Torrijos M.** Anaerobic treatment of winery wastewater in fixed bed reactors. *Bioprocess Biosystem Engineering* . (2010), 33: 619-628.
54. **Garcia J-L, Patel B.K.C., Ollivier B.** Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe*. (2000), 6: 205-226.
55. **Garcia-Bernet D., Buffière P., Latrille E., Steyer J.P., Escudé R.** Water distribution in biowastes and digestates of dry anaerobic digestion technology. *Chemical Engineering Journal*. (2011a), 72: 924-928.
56. **Garcia-Bernet D., Loisel D., Guizard G., Buffière P., Steyer J.P., Escudé R.,** Rapid measurement of the yield stress of anaerobically-digested solid waste using slump tests. *Waste Management*. (2011b), 31: 631-635.
57. **Garrity G.M. et Holt J.G.** The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1* (Boone DR & Castenholz RW, eds), (2001) G.M. Garrity,, New York. p: 427-446,G.M.
58. **Gavala H.N., Yenal U., Ioannis V., Skiadas, Westermann P., Ahring B.K.** Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of the pretreatment at 70jC. *Water Research*. (2003), 37:4561– 4572.
59. **Gerardi M.H.**(2003), Hoboken, NJ: John Wiley & sons, Inc.
60. **Gijzen H.J.** Anaerobic digestion for sustainable development: a natural approach. *Waterscience and technology*. (2002), 45: 321-328.
61. **Goberna M., Insam H., Franke-Whittle I. H.** Effect of biowaste sludge maturation on the diversity of thermophilic bacteria and archaea in an anaerobic reactor. *Applied and environmental microbiology*. (2009), 75: 2566–2572
62. **Godon J-J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R.** Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*. (1997), 63: 2802–2813
63. **Gomez D., Cuetos M.J., Cara J., Moran A., Garcia A.I.** Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes: conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. *Renewable Energy*. (2006), 31: 2017-2024.
64. **Guendouz J.,** (2008). Contribution à la recherche d'outils pour l'étude et le suivi des réacteurs de méthanisation par voie sèche. Montpellier, Montpellier II. *Energétique et Génie des procédés*: 250
65. **Guendouz J., Buffière P., Cacho J., Carrère H., Delgenes J.P.** High-solids anaerobic digestion: Comparison of three pilot scales. *Water Science and Technology*. (2008), 58: 1757-1763.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

66. **Guendouz J., Buffière P., Cacho J., Carrère M., Delgenes J-P.** Dry anaerobic digestion in batch mode: Design and operation of a laboratory-scale, completely mixed reactor. *Waste Management*. (2010), 30: 1768–1771.
67. **Hansen T.L., Schmidt J.E., Angelidaki I., Marca E., Jansen J.I.C., Mosbaek H., Christensen T.H.** Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*. (2004), 24: 393-400.
68. **Hartmann H. et Ahring B. K.** A novel process configuration for anaerobic digestion of source sorted household waste using hyper-thermophilic post-treatment. *Biotechnology and bioengineering*. (2005), 90: 830-837.
69. **Hartmann H. et Ahring B.K.** Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. *Water Research*. (2005), 39: 1543-1552.
70. **Hattori S., Kamagata Y., Handa S. and Shoun H.** Thermacetogenium phaeum gen. nov., sp nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (2000), 50: 1601-160.
71. **Hendriks A., Zeeman G.** Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. (2009), 100: 10-18.
72. **Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y.** Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied Environmental Microbiology* (2006), 72:1623-1630.
73. **Izumi K., Okishio Y.K., Nagao N., Niwa C., Yamamoto S., Toda T.** Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *International Biodeterioration and Biodegradation*. . (2010), 64: 601-608.
74. **Jacobi H.F., Moschner C.R., Hartung E.** Use of near infrared spectroscopy in monitoring of volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. (2009), 60: 339–346.
75. **Jayasinghe P., Hettiaratchi J.P.A., Mehrotra A.K., Kumar S.** Effects of enzyme additions on methane production and lignin degradation of landfilled sample of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. (2011), 102: 4633-4637
76. **Karim K., Hoffmann R., Klasson K.T. et Al-Dahhan M.H.** Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mode of mixing. *Water Research*. (2005), 39: 3597-3606.
77. **Karim K., Klasson K.T., Hoffmann R., Drescher S.R., DePaoli D.W., Al-Dahhan M.H.** Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mixing. *Bioresource technology*. (2005), 96 :1607–1612
78. **Kaparaju P., Buendia I., Ellegaard L., Angelidaki I.** Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Labscale and pilot\_scale studies. (2007), 99: 4919–4928
79. **Karakashev D.B., Batstone D.J., Trably E., Angelidaki I.** Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. (2006), 72: 5138-5141.
80. **Koch K., Lübken M., Gehring T., Wichern M., Horn H.** Biogas from grass silage - Measurements and modeling with ADM1. *Bioresource technology*. (2010), 101: 8158-8165.
81. **Kelly W.J., Asmundson R.V., Hopcroft D.H.** Isolation and characterization of a strictly anaerobic, cellulolytic spore former: Clostridium chartatabidum sp. nov. *Arch Microbiology*. (1987), 147: 169-173
82. **Kemnitz D., K J Chin., Bodelier P., Conrad R.** Community analysis of methanogenic Archaea within a riparian flooding gradient. *Environmental Microbiology*. (2004), 6: 449–461.
83. **Kim M., Morrison M., Yu Z.** Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *Fems Microbiology Ecology*. (2011), 76: 49-63
84. **Knappert D., Grethlein H., Converse A.** Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymic hydrolysis. *Biotechnolgy Bioengy*. (1980), 22: 1449–1463.
85. **Kong R., Lee SK, Law TW, Law SH, Wu RS.** Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research*. (2002), 36: 2802–2812
86. **Kotsyurbenko O.R., Glagolev M.V., Nozhevnikova A.N. et Conrad R.** Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*. (2001), 38: 153-159.
87. **Kotsyurbenko O.R., Chin K-J., Glagolev M.V., Stubner S., Simankova MV, Nozhevnikova A.N., Conrad R.** Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology*. (2004), 6: 1159-1173.
88. **Kotsyurbenko O.R., Friedrich M.W., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Golyshin P.N., Timmis K.N., Conrad R.** Shift from acetoclastic to H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis in a west Siberian peat bog at low pH

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain. *Applied Environmental Microbiology*. (2007), 73: 2344-2348.
89. **Kumar, P., Prasad B., Chand S.** Treatment of desizing wastewater by catalytic thermal treatment and coagulation. *Journal of Hazard. Mater.* (2009), 163: 433-440
  90. **Lalman, J.A. et Bagley, D.M.**, (2000), Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Water Research* 34: 4220-4228.
  91. **Lamed R., Naimark J., Morgenstern E., Bayer E.A.** Specialized surface structure in cellulolytic bacteria. *Journal of Bacteriology*. (1987), 169: 3792-3800
  92. **Lamed R., Morag E., Moryosef O., Bayer E.A.** Cellulosome-like entities in *Bacteroides cellulosolvens*. *Current Microbiology*. (1991), 22: 27-34
  93. **Laubie, B., Buffière, P., Benbelkacem, H. and Bayard, R.**, 2010, Anaerobic digestion in dry conditions: Influence of the moisture content on the specific methanogenic activity. 12th International Congress on Anaerobic Digestion. (2010), Guadalajara, Mexico, IWA.
  94. **Lay J.J., Li Y.Y., Noike T.** Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Research*. (1997), 31: 1518-1524.
  95. **Lay J.J., Li Y.Y., Noike T.** Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory scale landfill reactor. *Water Research*. (1998), 32 : 3673-3679.
  96. **Lay J.J., Li Y.Y., Noike T.** The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion process. *Water Environment Research* . (1998), 70 : 1075-1082.
  97. **Le Goff O., Godon J-J., Steyer J-P., Wéry N.** New specific indicators for qPCR monitoring of airborne microorganisms emitted by composting plants. *Atmospheric Environment*. (2011), 45: 5342-5350
  98. **Le Hyaric R., Chardin C., Benbelkacem H., Bollon J., Bayard R., Escudié R. et Buffière P.** Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. *Bioresource Technology*. (2011), 102: 822-827.
  99. **Leclerc M., Delgenes J-P., Godon J-J.** Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*. (2004), 6: 809-819
  100. **Lesteur M., Bellon-Maurel V., Gonzalez C., Latrille E., Roger J.M., Junqua, G. et Steyer, J.-P.**, (2010), Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochemistry* 45: 431-440.
  101. **Li D., Yuan Zh.H., Sun Y.M.**, 2010. Semi-dry mesophilic anaerobic digestion of water sorted organic fraction of municipal solid waste (WS-OFMSW). *Bioresource and Technology*. 101: 2722-2728.
  102. **Li L., Li D., Sun Y., Ma L., Yuan Z., Kong X.** Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. *international journal of hydrogen energy*. ( 2010), 35: 7261-7266
  103. **Liebetrau J., Kraft E., Bidlingmaier W.** The influence of the hydrolysis rate of co-substrates on process behaviour. In: Guiot, S.G. (Ed.), Proceedings of the Tenth World Congress on Anaerobic. Canadian Association on Water Quality, Montreal, pp: 1296-1300.
  104. **Liu T. et Sung S.** Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Science and Technology*. (2002), 10: 113-120.
  105. **López-Torres M. et Espinosa-Lloréns, M.d.C.** Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Manage*. (2008), 28: 2229-2234.
  106. **Lu S.G., Imai T., Ukita M., Sekine M.** Start-up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes. *Journal of environmental Sciences*. (2006), 19: 416-420.
  107. **Lueders T. et Friedrich M. W.** Effects of Amendment with Ferrihydrite and Gypsum on the Structure and Activity of Methanogenic Populations in Rice Field Soil. *Applied Environmental Microbiology*. . (2002), 68: 2484-2494.
  108. **Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S.** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. (2002), 66: 506-577.
  109. **Ma, J., Duong, T.H., Smits M., Verstraete W., Carballa M.** Enhanced biomethanation of kitchen waste by different pre-treatments. *Bioresource and technology*. (2011), 102: 592-599
  110. **Madden R.H.** Isolation and characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., cellulolytic thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology*. (1983), 33: 837-840.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

111. **Mata-Alvarez J., Cecchi F., Pavan P., Bassetti A.** Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of fresh and pre-composted organic fraction of MSW. *Water Sci.ences & Technology*. (1993), 27: 87-96.
112. **Mata-Alvarez J., Macé S., Llabrés P.** Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievement and perspectives. *Bioresource Technology* . (2000), 74, 3-16.
113. **McMahon K.D., Stroot P.G., Mackie R.I. et Raskin R.**, Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions ii: Microbial population dynamics. *Water Research*. (2001), 35: 1817-1827.
114. **McMahon K.D., Zheng D., Stams A.J.M., Mackie R.I., Raskin L.** Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge, *Biotechnol Bioengineering* . (2004), 87: 823-834.
115. **McInerney M.J., Struchtemeyer C.G., Sieber J., Mouttaki H., Stams A.J.M., Schink B., Rohlin L., Gunsalus R.P.** Physiology, ecology, phylogeny and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*. (2008), 1125: 58-72.
116. **Menardo S., Gioelli F., Balsari P.** THE METHANE YIELD OF DIGESTATE: effect of organic loading rate, hydraulic retention time and plant feeding. *Bioresource Technology*. (2011), 103: 2348-2351
117. **Michelland R.J., Dejean S., Combes S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L.** StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*. (2009), 5: 1359-1363
118. **Miller T.L. et Wolin M.J.** Bioconversion of cellulose to acetate with purecultures of *Ruminococcus albus* and a hydrogen-using acetogen. *Applied Environmental Microbiology*. (1995), 61: 3832-3835.
119. **Moletta R.** La méthanisation. (2008), Editions Tec & Doc Lavoisier.p: 532.
120. **Montero B., García-Morales J.L., Sales D., Solera R.** Evolution of microorganisms in thermophilic dry anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. (2008), 99: 3233-3243.
121. **Montero B., García-Morales J.L., Sales D., Solera R.** Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: Use of fluorescent in situ hybridization. *Waste Management*. ( 2009), 29: 1144-1151.
122. **Montero B., García-Morales J.L., Sales D., Solera R.** Evolution of butyric acid and the methanogenic microbial population in a thermophilic dry anaerobic reactor. *Waste Management*. (2010), 30: 1790-1797.
123. **Mora-Naranjo N., Meima J.A., Haarstrick A. and Hempel D.C.** Modelling and experimental investigation of environmental influences on the acetate and methane formation in solid waste. *Waste Management*. (2004), 24: 763-773
124. **Mshandete A; Bjornsson L.; Kivaisia A. K., Rubindamayugi M. S. T., Mattiasson B.** Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable Energy*. 2006, 13 :2385-2392
125. **Nelson MC., Morrison M., Yu Z.** A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*. (2011), 102: 3730-3731.
126. **Nsereko V.L., Morgavi D.P., Rode L.M., Beauchemin K.A., McAllister T.A.** Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Animal Feed Science and Technology*. (2000), 88: 153-170.
127. **Nikolov T, Bakalova N, Petrova S, Benadova R, Spasov S, Kolev D.** An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresourceand technology*. (2000), 71:1-4
128. **Oleszkiewicz J.A. et Poggi-Varaldo H.M.** High-solids anaerobic digestion of mixed municipal and industrial waste. *Journal of Environmental Engineering* . (1997), 123: 1087-1092.
129. **Oksanen J.** Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: vegan tutorial. University of Oulu. (2005), pp: 38.
130. **O'Sullivan CA., Burrell PC., Clarke WP., Blackall LL.** Structure of a Cellulose Degrading Bacterial Community During Anaerobic Digestion. *Biotechnology and Bioengineering*. (2005), 92: 871-878
131. **Ovreas L., Forney L., Daae F.L., Torsvik V.** Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. (1997), 63: 3367-3373.
132. **Palmowski L. M. et Muller J. A.** Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science Technology*. (2000 ), 47:231-238.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

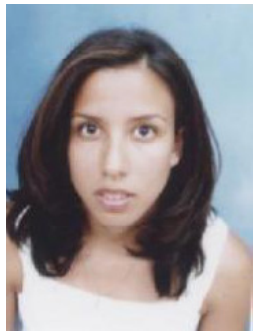
133. **Pauss A., Andre G., Perrier M. et Guiot S.R.** Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Applied and Environmental Microbiology*. (1990), 56: 1636-1644.
134. **Petitdemange E., Caillet F., Giallo J., Gaudin C.** *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic, mesophilic species from decayed grass. *International Journal of Systematic Bacteriology*. (1984), 34:155–159.
135. **Poggi Varaldo H.M. and Oleszkiewicz J.A.** Anaerobic co-composting of municipal solid waste sludge at high total solid level. *Environmental Technology*. (1992), 13: 409-421
136. **Poggi-Varaldo H.M., Valdés L., Esparza-Garcia F., Fernandez-Villagomez G.** Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids, and municipal solid waste. *Water Science and Technology*. (1997), 35: 197-204.
137. **Poggi-Varaldo H.M., Rodriguez-Vazquez R., Fernandez-Villagomez G., Esparza-Garcia F.** Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (1997), 47: 284-291.
138. **Polprasert C.** Organic Waste Recycling, Asian Institute of Technology. ( 1989), Bangkok. John Wiley and Sons London. p: 357.
139. **Pommier S., Chenu D., Quintard M. et Lefebvre X.** A logistic model for the prediction of the influence of water on the solid waste methanization in landfills. *Biotechnology and Bioengineering*. (2007), 97: 473-482.
140. **Pommier S., Manas Llamas A., Lefebvre X.** Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials. *Bioresource Technology*. (2010), 101: 463-468.
141. **PRIEST F.G. et Thirunavukkarasu M.** Purification and characerization of an extracellular and a cellular alpha-glucosidase from bacillus-licheniformis, *Journal of General microbiology*.(1984), 130: 3135-3141.
142. **Qu X., Vavilin V.A., Mazéas L., Lemunier M., Duquennoi C., He P.J., T. B.** Anaerobic biodegradation of cellulosic material: Batch experiments and modelling based on isotopic data and focusing on aceticlastic and non-aceticlastic methanogenesis. *Waste Management*. (2009), 29: 1828-1837.
143. **Quémeneur M., Hamelin H., Latrille E., Steyer J-P., Trably E.** Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing Bacterial populations in dark fermentation cultures. *International Journal of Hydrogen energy*. (2011), 36: 3870-3879
144. **Raposo, F., de la Rubia, M.A., Borja, R., Alaiz, M.** Assessment of a modified and optimised method for determining chemical oxygen demand of solid substrates and solutions with high suspended solid content. *Talanta*, (2008), 76: 448-453.
145. **Rapport J., Zhang R., Jenkins B.M., Williams R.B.** Current Anaerobic Digestion Technologies Used for Treatment of Municipal Organic Solid Waste. (2008), California Integrated Waste Management Board
146. **Rosen C., Jeppsson U.** Aspects on ADM1 Implementation within the BSM2 Framework. Technical report. Dept. of Industrial Electrical Engineering and Automation. (2006), Lund University, Lund, Sweden.
147. **Schievano A., D’Imporzano G., Malagutti L., Fragali E., Ruboni G., Adani F.** Evaluating inhibition conditions in high-solids anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. (2010), 101: 5728-5732.
148. **Shahriari H., Warith M., Hamoda M., Kennedy K.J.** Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. *Waste Management*, (2012), 32: 41-52.
149. **Sharma S.K., Mishra I.M., Sharma M.P., Saini, J.S.** Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. *Biomass*. (1988), 17: 251–263.
150. **Sanders W.** Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates. Wageningen, Wageningen University. (2001), p: 101
151. **Smith S.A. et Stöckle C.O.** Self-consistent liquid-to-gas mass transfer calculations. *Bioresource Technology*. (2010), 101: 9361-6365.
152. **Snell-Castro R., Godon J.-J., Delgenes J.-P., Dabert P** Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequenceanalysis. *FEMS Microbiology and Ecology*. (2005), 52: 229-242
153. **Staley B.F.** Environmental and spatial factors affecting microbial ecology and metabolic activity during the initiation of methanogenesis in solid waste. North Carolina State University, Raleigh North Carolina. Thèse de doctorat. (2009), p: 219

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

154. **Staley B.F., de los Reyes F.L. III., Barlaz M.A.** Comparison of *Bacteria* and *Archaea* communities in municipal solid waste, individual refuse components, and leachate. *FEMS Microbiology and Ecology*. (2011), 79: 465-473.
155. **Staley B.F., de los Reyes F.L., III, Barlaz M.A.** Comparison of *Bacteria* and *Archaea* communities in municipal solid waste, individual refuse components, and leachate. *FEMS Microbiology Ecology*. (2012), 79: 465-473.
156. **Stroot, P.G., McMahon, K.D., Mackie, R.I. et Raskin, R.,** (2001), Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions i: Digester performance. *Water Research*. 35: 1804-1816.
157. **Ten Brummeler E. et Koster I.W.** Enhancement of dry anaerobic batch digestion of the organic fraction of municipal solid waste by an aerobic pretreatment step. *Biological Wastes*. (1990), 31: 199-210.
158. **Ten Brummeler E., Horbach H.C.J.M., Koster I.W.** Dry anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Resources Conservation Recycling*. (1990), 3: 19-32.
159. **Ten Brummeler E., Aarnink M. M. J., Koster I. W.** Dry anaerobic digestion of solid organic waste in a Biocel reactor at pilot-plant scale. *Water Science and Technology*. (1992), 25: 295-300
160. **Ten Brummeler E., Horbach H. C. J. M., Koster I. W.** Dry anaerobic batch digestion of the organic fraction of municipal solid waste. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnolgy*. (1991), 50: 191-209.
161. **Thirunavukkarasu M., Priest F.G.** Purification and characterization of an extracellular and a cellular  $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of General Microbiology*, (1984), 130:3135-3141
162. **Ueno Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi Y.** Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *Journal of applied Microbiology*. (2006), 101: 331-343.
163. **Van Soest P.J.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal Association Off Agriculture Chemistry*. (1963), 46: 825-835.
164. **Van Meenen P., Vermeulen J., Verstraete W.** Fragility of Anaerobic SSF Consortia. In: Proceedings of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion, May 22-26, Bologna, Italy. (1988), p: 345-356.
165. **Vandevivere P., De Baere L., Verstraete W.** Types of anaerobic digesters for solid wastes. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. J. Mata-Alvarez, *IWA Publishing*. ( 2003),p: 111-137.
166. **Vavilin V.A. Shchelkanov M.Yu., Rytov S.V.** Effect of mass transfer on concentration wave propagation during anaerobic digestion of solid waste. *Water Research*. (2002), 36: 2405-2409.
167. **Vavilin V.A. et Angelidaki, I.** Anaerobic degradation of solid material: Importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2d distributed model. *Biotechnology and Bioengineering*. (2004), 89: 114-122.
168. **Vavilin V.A., Fernandez B., Palatsi J., Flotats X.** Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*. (2008), 28: 939-951.
169. **Vavilin V.A., Lokshina L.Y., Jokela J.P.Y., Rintala J.** Modeling solid waste decomposition. *Bioresource Technology*. (2004), 94: 69-81.
170. **Vaxelaire, J.** Moisture sorption characteristics of waste activated sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (2001), 76: 377-382
171. **Vedrenne F.** Etude des processus de dégradation anaérobie et de production de méthane au cours du stockage des lisiers. Science de l'Environnement. Rennes, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie. Thèse de doctorat. (2007), p: 210
172. **Veeken A., Kalyuzhnyi S., Scharff H., Hamelers B.** Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *Journal of Environmental Engineering*. (2010), 120: 1076-1081.
173. **Veenstra S.** *Wastewater Treatment I*. Delft: International Institute for Infrastructure, Hydraulics and Environmental Engineering. (2000). (IHE Delft)
174. **Wang Y., Zhang Y., Wang J., Meng L.** Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass & Bioenergy*. (2009), 33: 848-853
175. **Weimer P.J., Stevenson D.M., Mantovani H.C., Man S.L.C.** Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *American Dairy Science Association*. (2010), 93:5902-5912.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

176. **Weimer P.J., Odt C.L.** Cellulose degradation by ruminal microbes:Physiological and hydrolytic diversity among ruminal cellulolytic bacteria. *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*.Washington. *American Chemical Association*. (1995), 291–304.
177. **Weiland P.** Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2009), 85:849–860
178. **Wery N., Monteil B., Pourchen A.M., Godon J-J.** Human-specific faecal *Bacteria* in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*. (2009), 44: 1873-1883
179. **Wessen E., Hallin S.** (2011). Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers - Possible bioindicator for soil monitoring. *Ecological indicators*, Volume: Pages: 1696-1698 DOI: 10.1016
180. **Woutrina A Miller, Edward R Atwill, Ian A Gardner, Melissa A Miller, Heather M Fritz, Ronald P Hedrick, Ann C Melli, Nicole M Barnes, Patricia A Conrad.** Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contaminationwith *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. In freshwater ecosystems in California. *International Journal for Parasitology*. (2005), 35: 673–684
181. **Yabu H., Chikako S., Tomoko F., Naomichi N., Yutaka N.** Thermophilic two-stage dry anaerobic digestion of model garbage with ammonia stripping. *Biosciences and Bioenergy*. (2011), 111:312-9
182. **Yang J.C., Chynoweth D.P., Williams D.S., Li A.** *Clostridium aldrichii* sp. nov., a cellulolytic mesophile inhabiting a wood-fermenting anaerobic digester. *International Journal of Systematic Bacteriology*. (1990), 40: 268-272
183. **Ye N.F., Lu F., Shao L-M., Godon J.J., He P.J.** Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology*. (2007), 103: 1364-5072
184. **Yu Y., Lee C, Kim J., Hwang S.** Group-specific primer and probe Sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology Bioengineering*. . (2005), 89: 670-679.
185. **Zehnder A.J.B.** Ecology of methane formation. *Water pollution Microbiol* . (1978), 2: 349- 376
186. **Zhang B., He P.-J., Lü F., Shao L.-M., Wang P.,** Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic waste. *Water Research*. (2007), 41: 4468-4478.
187. **Zinder S.H.,** Physiological ecology of methanogens. *Methanogenesis : Ecology, physiology, biochemistry and genetic*. J.G. Ferry, Chapman & Hall. (1993), p:128-206.
188. **Zumstein E., Moletta R., Godon J.J.** Examination of two years ofcommunity dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*. (2000), 2: 69–78.



## Abstract

Anaerobic digestion is the transformation of organic matter into biogas rich in methane. Solid waste is treated by dry anaerobic digestion process with a total solid content higher than 20%. The high solids content make the process difficult to control. The aim of this work is to study the influence of operating parameters specific to dry anaerobic digestion on performances and behavior of microbial communities. The results show that increasing the solids content higher than 30% and decreasing the specific surface area of change have a negative effect on the anaerobic digestion process. Indeed, when the solids content exceeds 30%, the transfer of dissolved gas from the reaction mixture to the headspace can limit anaerobic digestion. The analysis of microbial populations demonstrates the presence of bacterial bio-indicators related to no-functioning anaerobic digestion. These bio-indicators correspond to the clostridium genus and are present regardless of the inoculum source. The study of methanogenic Archaea shows a sensitivity of these microorganisms. Shifts in the methanogenic populations related to the concentration of total solids were observed. This work has improved the fundamental knowledge of dry anaerobic digestion which can help improve the performance of this process.

**(PhD thesis in French including journal articles in English)**

Defended on April 06<sup>th</sup>, 2012 at : 

with the financial support of : 



**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement UR50

Avenue des Etangs F-11100 NARBONNE – France

Tel. +00 33 (0)468 425 151 · Fax +00 33 (0) 468 425 160 Email: [lbe.contact@supagro.inra.fr](mailto:lbe.contact@supagro.inra.fr)

<http://www.montpellier.inra.fr/narbonne/>