HAL
open science

Contribution à la recherche d'outils pour l'étude et le suivi des réacteurs de méthanisation par voie sèche

Jeremy Guendouz

To cite this version:

Jeremy Guendouz. Contribution à la recherche d'outils pour l'étude et le suivi des réacteurs de méthanisation par voie sèche. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2008. Français. NNT : . tel-02824246

HAL Id: tel-02824246

https://hal.inrae.fr/tel-02824246v1

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.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Energétique et Génie des procédés

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

Jérémy GUENDOUZ
Ingénieur en Sciences et Technologies des Industries Alimentaires
Polytech'Montpellier

Le 11/06/2008

Titre :

Contribution à la recherche d'outils pour l'étude et le suivi des réacteurs de méthanisation par voie sèche

JURY

M.	**Jean-Philippe Delgenès**	**, Président**
M.	**Pierre Buffière**	**, Directeur de Thèse**
Prof.	**Fernando Fdz-Polanco**	**, Rapporteur**
M.	**Rémy Gourdon**	**, Rapporteur**
M.	**Jesus Cacho**	**, Examinateur**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en ce tout premier lieu
Mes compagnons de route de mille et cent une lieues.
Ma famille ainsi que mes amis de toujours,
De toute une vie, d'un an, d'un mois ou d'un jour.
Mon père pour m'avoir donné de follement rêver
De rechercher à tout prix à sauver le monde.
Ma mère pour m'avoir donné un monde à sauver
Et consolé d'échouer à chaque seconde.
Mon petit frère pour m'avoir appris à penser,
Ma petite sœur pour m'avoir appris à aimer.
Ma Caro, je t'aime. Tu as été si patiente,
De souffrir que cette thèse devienne mon amante.
Vous tous qui faites, dans le meilleur et le pire,
Que la révolte jamais n'efface le sourire.

Par leur disponibilité, leur patience et leur convivialité, Pierre Buffière, Jesus Cacho et Matthieu Carrère ont été les meilleurs encadrant que l'on puisse espérer. Théodore Bouchez, Nicolas Bernet et Charles Ghommidh ont constitué un comité intelligent et toujours de bon conseil pour le suivi de mes recherches. Merci à MM. Fdz-Polanco et Gourdon pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour leurs commentaires avisés, M. Delgenès pour avoir présider ma soutenance et pour m'avoir accueilli au sein du LBE. Le travail assidu d'Emmanuel Deschamps et Mélanie Palop, stagiaires, a permis d'obtenir des résultats pertinents pour l'élaboration de cette thèse. Merci à toutes les personnes qui ont relu le manuscrit.

Je remercie également tout le personnel du LBE-INRA et du CREED-Veolia qui ont contribué au bon déroulement de ce travail sur les plans techniques, administratifs et logistiques. Je salue toutes les personnes sympathiques que j'ai pu côtoyer, plus que professionnellement, dans ces deux structures, pour leur gentillesse. Salut aussi à l'Art Bar et à Max et Co, mes secondes maisons.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE **21**

I. ETAT DES CONNAISSANCES **27**

1 ELEMENTS DE CONTEXTE 27
1.1 Situation des déchets ménagers et assimilés *27*
1.1.1 Définition des déchets ménagers et assimilés 27
1.1.2 Production de déchets ménagers et assimilés 27
1.1.3 Composition des ordures ménagères 28
1.1.4 Réglementation du traitement des déchets 28
1.2 Contexte du traitement biologique des déchets solides *29*
1.2.1 Filières d'élimination des déchets ménagers et assimilés 29
1.2.2 Les traitements biologiques des déchets 29
1.2.3 Les enjeux du traitement biologique des déchets 30
1.3 Contexte de la méthanisation des déchets solides en France et en Europe *30*
1.3.1 Principe général de la méthanisation 30
1.3.2 Les principales filières de méthanisation 30
1.3.3 Intérêt de la méthanisation des déchets 31
1.3.4 Les avantages et inconvénients de la méthanisation des déchets 32
1.3.5 Contexte politico-économique 33
1.3.6 Le marché de la méthanisation 34
1.3.7 Historique 34
1.3.8 Installations industrielles 35
2 LA METHANISATION DES DECHETS SOLIDES PAR VOIE SECHE 39
2.1 Principes de la méthanisation *39*
2.1.1 Principe général 39
2.1.2 L'hydrolyse 40
2.1.3 L'acidogenèse 40
2.1.4 L'acétogenèse 40
2.1.5 La méthanogenèse 41
2.2 Les technologies de méthanisation *41*
2.2.1 Schéma de principe d'une installation 41
2.2.2 Paramètres du traitement mécanique et biologique 42
2.2.3 Digestion sèche, digestion humide 42
2.2.4 Digestion mésophile ou thermophile 43
2.2.5 Géométrie et mélange des réacteurs 44
2.2.6 Les digestions en une ou deux étapes 45
2.3 Spécificités de la voie sèche et des OMR *46*
2.3.1 Introduction 46
2.3.2 L'hydrolyse 46
2.3.3 Influence de la taille des particules 47
2.3.4 Mélange 47
2.3.5 Problématique de la spécificité de la digestion sèche d'OM 48
3 INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES 49
3.1 Introduction *49*
3.2 La température *49*
3.3 Le pH et l'alcalinité *50*
3.4 Les acides gras volatils (AGV) *51*
3.5 Les cations *52*
3.6 L'azote ammoniacal *53*

3.6.1 Mécanisme de formation de l'azote ammoniacal 53
3.6.2 Equilibre entre l'ammoniac et l'ammonium 54
3.6.3 Effet de l'azote ammoniacal sur la méthanisation 55
3.6.4 Sensibilité des différentes flores bactériennes à l'azote ammoniacal 55
3.6.5 Mécanismes de l'inhibition par l'azote ammoniacal 57
3.6.6 Interaction de l'azote ammoniacal et d'autres paramètres.....58
3.6.7 Adaptation/Acclimatation des micro-organismes à l'azote ammoniacal...59
3.6.8 Inhibition ammoniacale dans les ordures ménagères ou en voie sèche.....60
3.7 Autres inhibiteurs 61
3.7.1 Les acides gras à longue chaîne 61
3.7.2 Les métaux lourds 62
3.7.3 L'oxygène 62
3.7.4 L'hydrogène 62
3.7.5 Autres molécules organiques 62
3.8 Conclusion.....62
4 LA CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE 64
4.1 Introduction.....64
4.2 Potentiel méthanogène et biodégradabilité.....64
4.2.1 Le potentiel méthanogène (BMP).....64
4.2.2 La biodégradabilité 66
4.3 Caractérisation chimique et biochimique : méthodes classiques 66
4.3.1 Caractérisation chimique 66
4.3.2 Caractérisation biochimique 69
4.4 Autres méthodes de caractérisation chimique 72
4.4.1 Pyrolyse analytique.....73
4.4.2 Analyse par RMN^{13}C.....73
4.4.3 Analyse par méthode infra rouge à transformée de Fourier 73
4.5 Caractérisation physique des déchets 73
4.5.1 Influence de la taille des particules.....73
4.5.2 MODECOM™.....74
4.6 Conclusion.....74
4.6.1 Constitution des déchets : identification des fractions biodégradables 74
4.6.2 Lien entre caractérisation, potentiel méthane et biodégradabilité 75
5 LES PARAMETRES DE SUIVI ET DE CONDUITE DES METHANISEURS 77
5.1 Introduction.....77
5.2 Les paramètres usuels de suivi.....77
5.2.1 Suivi du biogaz 77
5.2.2 Dosage des composés intermédiaires.....78
5.2.3 Dosage des composés inorganiques.....79
5.2.4 Abattement en matière organique 80
5.3 Suivi de l'activité hydrolytique.....81
5.3.1 Introduction.....81
5.3.2 Distribution dans la cellule des enzymes 82
5.3.3 Activité hydrolytique 82
5.3.4 Amylases.....83
5.3.5 Cellulases 83
5.3.6 Protéinases 84
5.3.7 Lipases 84
5.3.8 L'activité enzymatique comme indicateur de performance 85
5.4 Conclusion.....86

II. MATERIEL ET METHODES 89

1 REACTEURS 89
1.1 Site pilote industriel 89
1.1.1 Contexte 89
1.1.2 Description du site pilote industriel 89
1.1.3 Suivi du réacteur industriel 91
1.2 Réacteur pilote de laboratoire 91
1.2.1 Description et fonctionnement du réacteur de laboratoire 91
1.2.2 Mesure et analyse du biogaz et du méthane 92
2 TESTS DE POTENTIEL ET D'ACTIVITE METHANOGENES 93
2.1 Mesure du biogaz et du méthane dans les tests en fiole 93
2.1.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) 93
2.1.2 Mesure du volume de biogaz 93
2.2 Potentiel méthane (BMP) 94
2.3 Activité méthanogène 94
3 CARACTERISATION DES DECHETS ET DES DIGESTATS 95
3.1 Préparation des échantillons 95
3.2 Matière sèche (MS) et matière volatile (MV) 95
3.3 Fractionnement selon Van Sœst 96
3.4 Dosage des glucides 97
3.5 Dosage des protéines 97
3.6 Dosage des lipides 97
3.6.1 Principe 97
3.6.2 Méthode 98
3.7 Demande chimique en oxygène (DCO) 99
3.8 Acides gras volatils (AGV) 99
3.9 Azote ammoniacal 99
4 MESURES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES 100
4.1 Extraction des enzymes 100
4.1.1 Principe 100
4.1.2 Méthode 100
4.2 Dispositif d'incubation 101
4.3 Activité amylasique 101
4.3.1 Principe 101
4.3.2 Méthode 102
4.4 Activité cellulasique 102
4.4.1 Principe 102
4.4.2 Méthode 102
4.5 Activité protéinasique 102
4.5.1 Principe 102
4.5.2 Méthode 102
4.6 Activité lipasique 103
4.6.1 Principe 103
4.6.2 Méthode 103

III. CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE 107

1 INTRODUCTION 107
2 ETUDE DU FRACTIONNEMENT SELON VAN SŒST 107
2.1 Introduction 107
2.2 Répartition des fractions de Van Sœst 108

2.3 Répartition des glucides et protéines *110*
2.3.1 Répartition des glucides dans les fractions de Van Sœst 110
2.3.2 Répartition des protéines dans les fractions de Van Sœst 111
2.4 Lien entre "SAS+IVS" et Biodégradabilité *112*
2.4.1 Biodégradabilité 112
2.4.2 Comparaison à la bibliographie 112
2.4.3 Effet du broyage 113
2.5 Synthèse *113*
3 FRACTIONNEMENT SOLUBLE ET NON SOLUBLE 113
3.1 Introduction *113*
3.2 Organisation de l'étude *114*
3.2.1 Matrice 114
3.2.2 Organisation générale 114
3.2.3 Protocole de solubilisation 115
3.2.4 Mesures 116
3.2.5 Expression des résultats 116
3.3 Résultats et discussion *116*
3.3.1 Influence du prétraitement sur la caractérisation des fibres (Van Sœst) . 116
3.3.2 Répartition de la matière après solubilisation 117
3.3.3 Potentiels méthanogènes des différentes fractions 119
3.3.4 Composition de la matière solubilisée 121
3.3.5 Demande chimique en oxygène 122
3.3.6 Matière grasse 122
3.3.7 Importance de la fraction soluble 122
3.3.8 Synthèse 123
4 CONCLUSION 124

IV. ETUDE DU REACTEUR PILOTE DE LABORATOIRE 127

1 INTRODUCTION 127
2 ESSAI DE DETERMINATION DU TEMPS DE MELANGE 128
3 FONCTIONNEMENT EN DISCONTINU : COMPARAISON A UN REACTEUR INDUSTRIEL . 129
3.1 Organisation de l'expérience *129*
3.2 Biogaz et Méthane *129*
3.2.1 Rendements en méthane 129
3.2.2 Evolution des productions cumulées 130
3.2.3 Vitesses spécifiques 131
3.3 Acides Gras Volatils *131*
3.3.1 AGV totaux 131
3.3.2 Détail des AGV 132
3.4 Ammoniac *132*
3.5 Synthèse *132*
4 FONCTIONNEMENT EN SEMI-CONTINU : COMPARAISON A UN REACTEUR INDUSTRIEL 136
4.1 Organisation de l'expérience *136*
4.2 Biogaz et Méthane *137*
4.2.1 Rendements en méthane 137
4.2.2 Vitesses de production de biogaz 137
4.3 Acides Gras Volatils *138*
4.3.1 AGV totaux 138
4.3.2 Détail des AGV 139
4.4 Ammoniac *140*

4.5 Synthèse *140*
5 COMPARAISON MESOPHILE / THERMOPHILE 141
5.1 Biogaz et méthane *141*
5.2 AGV *142*
6 ESSAIS DE CO-DIGESTION 144
6.1 Caractéristiques des déchets utilisés *144*
6.2 Biogaz et méthane *144*
6.3 AGV *146*
7 SYNTHESE 147
8 CONCLUSION 149

V. INHIBITION PAR L'AZOTE AMMONIACAL 153

1 INTRODUCTION 153
1.1 Objectifs de l'étude *153*
1.2 Organisation de l'étude *153*
1.2.1 Tests réalisés 153
1.2.2 Plan d'expérience et modèle mathématique 154
2 EFFET DE L'AMMONIAC SUR L'ACTIVITE METHANOGENE (TESTS EN FIOLE) 157
2.1 Introduction *157*
2.2 Qualité statistique du modèle mathématique *158*
2.3 Effets bruts des paramètres *158*
2.4 Effets conjoints de l'ammoniac et du pH pour trois MS différents *159*
2.5 Effet de la température *161*
2.6 Analyse des interactions entre les facteurs *161*
2.6.1 Azote ammoniacal et pH 161
2.6.2 Azote ammoniacal et température 162
2.6.3 Matière Sèche et azote ammoniacal 162
2.6.4 Matière Sèche et pH 163
2.6.5 Matière Sèche et Température 163
2.7 Synthèse *164*
3 ESSAI EN REACTEUR PILOTE 165
3.1 Introduction *165*
3.2 Concentration en ammoniac mesurée *165*
3.3 Effet sur le biogaz *165*
3.4 Effet sur la phase soluble *166*
3.4.1 DCO soluble et AGV totaux 166
3.4.2 Détail des AGV 166
4 COMPARAISON FIOLES / REACTEUR PILOTE 168
5 CONCLUSION 169

VI. ACTIVITES HYDROLYTIQUES 173

1 INTRODUCTION 173
2 OPTIMISATION DES PARAMETRES D'EXTRACTION 173
2.1 Introduction *173*
2.2 Elimination de la turbidité *173*
2.3 Influence de la congélation *174*
3 SUIVI ENZYMATIQUE DE METHANISATION EN DISCONTINU 175
3.1 Introduction *175*
3.2 Amylase *175*
3.3 Cellulase *177*
3.4 Protéinase *178*

3.5 Lipase *179*
4 SYNTHESE ET CONCLUSION 179

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 183

1 CONCLUSION GENERALE 183
1.1 Compartiments de la matière organique *183*
1.2 Equilibre entre hydrolyse/acidogenèse et méthanogenèse *185*
1.3 Effet des conditions opératoires *186*
1.4 Mises au point méthodologiques *187*
2 PERSPECTIVES 188

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 193

ANNEXES 211

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Répartition par mode de traitement des tonnages de déchets traités en 2004 en France (ADEME, 2004) 29

Figure 2. Méthanisation et effet de serre : le cycle du carbone, d'après Couturier, 2000 32

Figure 3. Évolution du traitement des DMA par méthanisation en Europe, d'après De Baere, 2006 35

Figure 4. Principaux processus de dégradation anaérobie de la matière organique. 39

Figure 5. Schéma de principe d'une installation de méthanisation. 42

Figure 6. Principales technologies de digestion sèche. 1 : à recirculation de digestat (Dranco) ; 2 : recirculation de biogaz (Valorga) ; digesteurs pistons horizontaux (Kompogas, BRV), d'après Buffière et Frederic, 2008 45

Figure 7 : Répartition des formes libre et ionisée de l'ammoniac en fonction du pH à 35 et 55°C 54

Figure 8 : Mécanismes possibles de l'inhibition par l'ammoniac dans les bactéries méthanogènes (adapté de Sprott et Patel, 1986) 57

Figure 9. Répartition de la matière des ordures ménagères 75

Figure 10. Schéma de l'installation pilote industrielle 90

Figure 11. Synoptique du site pilote industriel 91

Figure 12. Schéma du réacteur de laboratoire 92

Figure 13. Vue en perspective du mobile d'agitation du réacteur de laboratoire 92

Figure 14. Schéma du compteur à gaz 93

Figure 15. Organisation du traitement des échantillons. * : déchet uniquement ; ** : digestat uniquement 95

Figure 16. Schéma du montage de l'appareil de Soxhlet 98

Figure 17. Protocole d'extraction des enzymes 101

Figure 18. Dispositif d'incubation pour la mesure d'activité enzymatique 101

Figure 19. Rappel du fractionnement selon la méthode de Van Sœst. 108

Figure 20. Fractionnement de la matière totale selon la méthode de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat. 108

Figure 21. Fractionnement de la matière organique selon la méthode de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat. 109

Figure 22. Répartition des glucides dans les fractions de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat. 110

Figure 23. Répartition des protéines dans les fractions de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat. 111

Figure 24. Relation entre la biodégradabilité et la somme des fractions SAS et IVS de différents déchets 112

Figure 25 : Protocole expérimental. 115

Figure 26. Répartition de la MV dans les compartiments de Van Sœst pour les fractions concernant la solubilisation à 37°C. 117

Figure 27. Répartition de la MV dans les compartiments de Van Sœst pour les fractions concernant la solubilisation à 55°C. 117

Figure 28. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 37°C du déchet brut entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon A) et phase solide restante (échantillon B). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide. 118

Figure 29. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 37°C du déchet lyophilisé et broyé entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon C) et phase solide restante (échantillon D). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide. 118

Figure 30. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 55°C du déchet brut entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon A) et phase solide restante (échantillon B). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide. 118

Figure 31. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 55°C du déchet lyophilisé et broyé entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon C) et phase solide restante (échantillon D). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide. 119

Figure 32. BMP mésophiles (A : fraction hydrosoluble du déchet brut ; B : fraction non soluble du déchet brut ; C : fraction hydrosoluble du déchet lyophilisé et broyé ; D : fraction non soluble du déchet lyophilisé et broyé ; E : déchet lyophilisé et broyé)..... 120

Figure 33. BMP thermophiles (A : fraction hydrosoluble du déchet brut ; B : fraction non soluble du déchet brut ; C : fraction hydrosoluble du déchet lyophilisé et broyé ; D : fraction non soluble du déchet lyophilisé et broyé ; E : déchet lyophilisé et broyé)..... 120

Figure 34. Expérience de détermination du temps de mélange dans le réacteur de laboratoire : le ratio calculé est le rapport entre la concentration en billes mesurée dans l'échantillon et la concentration totale en billes dans le réacteur. Les moyennes glissantes ont été calculées sur des ensembles de 3 mesures et de 5 mesures. 128

Figure 35. Suivi des paramètres du fonctionnement en batch de trois installations de méthanisation d'échelles différentes. A : Biogaz et méthane de tests BMP en fiole ; B : Biogaz et méthane aux échelles de laboratoire et industrielle ; C : Vitesse spécifique de production de méthane aux échelles de laboratoire et industrielle ; D : AGV aux échelles de laboratoire et industrielle. 134

Figure 36. Concentration en différents AGV au cours du suivi du fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire 135

Figure 37. Concentration en azote ammoniacal total dans le réacteur de laboratoire et le réacteur industriel 135

Figure 38. "Débits" de montée en charge et d'alimentation du réacteur industriel et du réacteur de laboratoire fonctionnant en semi-continu. 136

Figure 39. Rendements en méthane en fonctionnement semi-continu du réacteur industriel et du réacteur pilote de laboratoire. 137

Figure 40. Débits de méthane normés en fonctionnement semi-continu du réacteur industriel et du réacteur de laboratoire 138

Figure 41. Concentration en AGV totaux (en équivalents DCO) pendant le démarrage et le fonctionnement en semi-continu du réacteur industriel et du réacteur de laboratoire. .. 139

Figure 42. Concentration des différents AGV (en équivalents DCO) pendant le démarrage et le fonctionnement en semi-continu du réacteur de laboratoire 140

Figure 43. Concentration en azote ammoniacal total pendant le démarrage et le fonctionnement en semi-continu du réacteur de laboratoire 140

Figure 44. Suivi du gaz dans le réacteur de laboratoire en conditions mésophiles et thermophiles dans des batchs de démarrage. A : vitesse spécifique de production de méthane en conditions mésophiles ; B : vitesse spécifique de production de méthane en conditions thermophiles ; C : productions cumulées de biogaz et de méthane en conditions mésophiles ; D : productions cumulées de biogaz et de méthane en conditions mésophiles. 142

Figure 45. Concentration en AGV totaux (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions mésophiles et thermophiles. 143

Figure 46. Concentration des différents AGV (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions thermophiles. 143

Figure 47. Suivi du gaz dans le réacteur de laboratoire en batchs en conditions de co-digestion d'OMR et de déchets carnés. A : vitesse spécifique de production de méthane en co-digestion normale ; B : vitesse spécifique de production de méthane en co-digestion avec surcharge en déchet carné ; C : productions cumulées de biogaz et de méthane en co-digestion normale ; D : productions cumulées de biogaz et de méthane en co-digestion avec surcharge en déchet carné. 145

Figure 48. Concentration en AGV totaux (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions de co-digestion avec un déchet carné et de co-digestion avec une surcharge en déchet carné. 147

Figure 49. Concentration des différents AGV (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions de co-digestion avec un déchet carné et de co-digestion avec une surcharge en déchet carné. 147

Figure 50. Répartition des points expérimentaux dans l'espace de Doehlert pour 1, 2 et 3 facteurs 155

Figure 51. Exemple de courbe de DCO dégradée en fonction du temps (jours) lissée et de détermination de l'activité maximale par calcul de la dérivée en fonction du temps de la DCO dégradée en fonction du temps. 157

Figure 52. Données statistiques sur la qualité du modèle mathématique..... 158

Figure 53. Effets des facteurs sur la réponse activité méthanogène, classés par importance 159

Figure 54. Surface de réponse : Activité méthanogène en fonction du pH et de l'azote ammoniacal. A : à 5 % de MS ; B : à 17,5 % de MS ; C : à 30 % de MS..... 160

Figure 55. Activité méthanogène en fonction de la température pour trois concentrations en azote ammoniacal total. MS = 17,8 % ; pH = 8,2. Intervalle : intervalle de confiance à 95 %..... 161

Figure 56. Interaction entre le pH et la concentration en azote ammoniacal. Activité méthanogène en fonction de la concentration en ammoniac pour les deux pH extrêmes. MS = 17,8 % ; T = 55°C 162

Figure 57. Interaction entre la température et la concentration en azote ammoniacal. Activité méthanogène en fonction de la température pour les deux concentrations en ammoniac extrêmes. MS = 17,8 % ; pH = 8,2 162

Figure 58. Interaction entre la matière sèche et la concentration en azote ammoniacal. Activité méthanogène en fonction de la matière sèche pour les deux concentrations en MS extrêmes. T = 55°C ; pH = 8,2 163

Figure 59. Interaction entre la matière sèche et le pH. Activité méthanogène en fonction de la matière sèche pour les deux concentrations en MS extrêmes. T = 55°C ; N_{ammo} = 3020 mgN/kg. 163

Figure 60. Interaction entre la matière sèche et la température. Activité méthanogène en fonction de la température pour les deux concentrations en MS extrêmes. pH = 8,2 ; N_{ammo} = 3020 mgN/kg 164

Figure 61. Evolution des paramètres dans le réacteur de laboratoire fonctionnant en semi-continu lors d'augmentations de la concentration en ammoniac. A : azote ammoniacal total visé et mesuré ; B : débit de méthane et biogaz et méthane cumulés ; C : pH, DCO soluble et AGV totaux (en équivalents DCO) ; D : détail des AGV (en équivalents DCO) 167

Figure 62. Comparaison de la l'activité méthanogène observée dans le réacteur de laboratoire lors de l'augmentation de la concentration en ammoniac et de l'activité méthanogène prédite à partir du modèle mathématique pour les mêmes conditions. Intervalle : intervalle de confiance à 95 %. 169

Figure 63. Evolution temporelle de l'activité amylasique lors des expériences 1 à 4. 175

Figure 64. Evolution temporelle de l'activité cellulasique lors des trois premières expériences 177

Figure 65. Evolution temporelle de l'activité protéasique lors de la deuxième expérience ... 179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractérisation des ordures ménagères de Paris réalisée par le Syctom 28

Tableau 2. Entreprises majeures de méthanisation des déchets ménagers, d'après TSM, 2006 36

Tableau 3. Avantages et contraintes de la méthanisation des déchets ménagers d'après Couturier, 2000..... 37

Tableau 4. Composition du biogaz de déchets organiques agricoles, d'après Wheatley, 1990 39

Tableau 5. Comparaison de la méthanisation par voie sèche et par voie humide..... 43

Tableau 6. Comparaison de la méthanisation mésophile et thermophile (De Baere, 2000 ; Hartmann et Ahring, 2006) 43

Tableau 7. Comparaison de la méthanisation en une étape et en deux étapes 45

Tableau 8. Effets du pH sur les différentes étapes de minéralisation anaérobie de la matière organique..... 50

Tableau 9. Concentrations en cations métalliques stimulatrices et inhibitrices de la méthanisation 52

Tableau 10 : Concentrations en azote ammoniacal au cours de la digestion anaérobie continue de FFOM 60

Tableau 11. Potentiel méthanogène de différents composés..... 65

Tableau 12. Teneur en eau et en matières volatiles des déchets ménagers et assimilés en France en 1993 (ADEME, , 1999) 67

Tableau 13. Teneur en carbone et en azote des déchets ménagers et assimilés en France en 1993 (ADEME, , 1999)..... 68

Tableau 14. Composition biochimique de déchets et fractions de déchets (en % de poids sec) 71

Tableau 15. Calcul des principaux paramètres des réacteurs..... 80

Tableau 16. Exemples de performance de méthaniseurs par voie sèche, d'après Mata-Alvarez *et al.*, 1993..... 81

Tableau 17. Méthodes des dosages effectués sur les différentes fractions obtenues 116

Tableau 18. Part du méthane produit due à la fraction soluble à l'eau, selon les différentes conditions opératoires 121

Tableau 19. Identification de la matière organique dans les fractions solubilisées 121

Tableau 20. Proportions de glucides et de protéines du déchet traité solubilisés 121

Tableau 21. DCO des fractions solubles ramenée à 1 g de MV du déchet solubilisé..... 122

Tableau 22. Dosage des graisses dans les solides 122

Tableau 23. Quantités de DCO et de CH_4 produit estimées et réelles pour les fractions solubles à 37°C..... 123

Tableau 24. Conditions initiales des expériences en batch 129

Tableau 25. Rendements finaux en méthane..... 130

Tableau 26. Composition biochimique des co-déchets utilisés..... 144

Tableau 27. Coordonnées centrées réduites de la matrice de Doehlert pour 4 facteurs..... 155

Tableau 28. Matrice des essais réalisés 156

Tableau 29. Moyennes et écarts-types des points réalisés en plusieurs réplicats..... 158

Tableau 30. Liste des effets des facteurs sur la réponse activité méthanogène..... 159

Tableau 31. Prédiction de l'activité méthanogène à partir des paramètres du réacteur en utilisant le modèle mathématique..... 168

Tableau 32. Optimisation de la vitesse de centrifugation lors de l'étape d'extraction enzymatique 173

Tableau 33. impact de la congélation sur l'activité enzymatique..... 174

INTRODUCTION GENERALE

Il faut rappeler aux nations croissantes qu'il n'y a point d'arbre dans la nature qui, placé dans les meilleures conditions de lumière, de sol et de terrain, puisse grandir et s'élargir indéfiniment.

[Paul Valéry]

INTRODUCTION GENERALE

Dans nos sociétés modernes, la recherche à tout prix de la croissance économique dépend d'une augmentation de la production et de la consommation (Goodwin *et al.*, 1997). Le travail et la consommation sont donc considérés comme des valeurs à encourager (Marx, 1844 ; Chomsky, 1999). Cependant, leur augmentation entraîne un accroissement de la consommation d'énergie et de ressources naturelles et génère des déchets ainsi que des pollutions, notamment des gaz à effet de serre (Georgescu-Roegen, 1979 ; EIA, 1997 ; Ryan et Durning, 1997 ; Rosnick et Weisbrot, 2006). L'augmentation soutenue de la démographie entraîne un accroissement de la consommation et de la pollution (Malthus, 1798). L'enrichissement des pays "émergeants" entraîne également un changement du régime alimentaire dans ces pays : d'un régime majoritairement végétal vers un régime basé sur la viande comme dans les pays "développés" (de Boer *et al.*, 2006). Ce régime nécessitant plus de production animale – qui n'est pas bénéfique pour la santé (ADA, 2007) – est source de plus de consommation de ressources et d'énergie et de production de davantage de déchets (notamment organiques) et de gaz à effet de serre (Pimentel, 2003 ; Reijinders et Soret, 2003).

Il en résulte qu'au cours des trois dernières décennies, un tiers des ressources de la terre ont été consommées (Hawken *et al.*, 1999). En 2003, l'empreinte écologique de l'humanité a dépassé la capacité biologique de la terre de plus de 25 % (Global Footprint Network, 2007). Dès la fin des années 60, le "rapport du Club de Rome" (Meadows *et al.*, 1972) et récemment le rapport du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat, ont mis en évidence la pollution liée à l'activité humaine (IPCC, 2007) et ont souligné l'urgence d'une réduction de la consommation de carburants fossiles et de l'émission de gaz à effets de serre (IPCC, 2007). La réduction de la pollution nécessite un changement radical, sur le long terme, du système socio-économique en même temps que du comportement individuel (Meadows *et al.*, 1972 ; Lehman, 1996 ; Giddings *et al.*, 2002 ; IPCC, 2007). Dans un récent et très intéressant article, Moriarty et Honnery (2008) montrent que le plus urgent est de réduire à la source les dépenses énergétiques et les productions de déchets par des changements sociaux. D'après leurs travaux, une fois que cela sera réalisé, des solutions technologiques tiendront également une place importante pour améliorer les rendements énergétiques, produire des énergies renouvelables et traiter les déchets. Il est donc nécessaire de rechercher, dès à présent, des améliorations technologiques dans cette voie.

Les déchets assimilés aux ordures ménagères, dont la production va croissante en France comme dans le reste du monde, contiennent une portion importante de matière organique (ADEME, 1999, 2006). Si aucun traitement ne leur est appliqué ils se décomposent lentement dans l'atmosphère, ce qui génère des gaz à effet de serre.

La méthanisation est un traitement biologique qui permet de convertir la matière organique des déchets en méthane et de le récupérer. Ainsi, le volume des déchets est réduit et ils sont rendus stables, c'est-à-dire qu'ils ne génèrent plus de gaz à effet de serre. De plus, le méthane produit par la réaction peut servir d'énergie renouvelable. Pour ces raisons, la méthanisation des déchets organiques solides est une technologie en plein essor qui pourrait contribuer à réduire l'impact de l'homme sur l'environnement (Braber, 1995 ; Couturier, 2000 ; IEA, 2004 ; Özeler *et al.*, 2006).

La méthanisation par voie sèche est une technologie particulière où le contenu du réacteur de méthanisation contient plus de 20 % de matière sèche. Comme nous le verrons, cette technologie présente un certain nombre d'intérêts et est de plus en plus répandue. Néanmoins, elle est encore mal maîtrisée, car elle est difficile à contrôler et son fonctionnement est mal connu. A l'heure actuelle, il existe peu d'études permettant de mieux

connaître les phénomènes entrant en jeu dans la méthanisation par voie sèche. Il existe également peu de mesures réalisables sur un méthaniseur industriel pour rendre compte de son état de fonctionnement biologique.

La méthanisation par voie sèche pourrait mieux se développer elle devenait plus fiable, donc mieux contrôlée et mieux connue. Le Centre de Recherche pour l'Environnement, l'Energie et le Déchet (CREED) du groupe Veolia Environnement et le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne ont donc participé au financement et à l'encadrement de cette thèse. Elle a pour but d'identifier les voies de recherche les plus pertinentes pour connaître les mécanismes de la méthanisation par voie sèche, être capable de prédire le comportement d'un déchet solide donné dans des conditions opératoires données, et être en mesure d'évaluer le fonctionnement des méthaniseurs en voie sèche.

Pour cela, les quatre principaux facteurs influençant le fonctionnement de la méthanisation par voie sèche ont été considérés :

- La qualité de la matière organique entrant dans le réacteur ;
- Les conditions physiques de l'opération de méthanisation (agitation, taille des particules, etc.) ;
- L'activité biologique responsable de la dégradation de la matière organique et de sa transformation en méthane, et en particulier l'activité hydrolytique ;
- Les conditions biochimiques de l'opération de méthanisation (inhibiteurs, intermédiaires de réaction, pH, etc.).

Cette thèse présente tout d'abord l'état des connaissances concernant le fonctionnement, les particularités, les avantages et les inconvénients de la méthanisation par voie sèche. Les connaissances sur l'influence des conditions physico-chimiques ainsi que des caractéristiques de la matière organique sont également exposées. Pour terminer ce premier chapitre, les paramètres usuels de suivi et de conduite des méthaniseurs ainsi que les activités biologiques d'hydrolyses sont présentés.

Après le deuxième chapitre, qui présente les matériels et méthodes utilisés au cours de la thèse, quatre chapitres présentent les études menées et les résultats obtenus :

- La matière organique des ordures ménagères a été étudiée en la séparant en différents compartiments de solubilité et de biodégradabilité différentes.
- Les mécanismes de la digestion par voie sèche ont été étudiés en régimes mésophile et thermophile ainsi que la co-digestion des ordures ménagères avec des déchets carnés, y compris dans le cas d'une surcharge en déchet carné. Les fonctionnements en mode discontinu et en mode continu ont également été testés. Cette étude a pu être menée grâce à la mise au point d'un réacteur de laboratoire qui reproduit fidèlement le comportement et les conditions réelles de la méthanisation par voie sèche à l'échelle industrielle.
- La faisabilité de mesures d'activité hydrolytique au cours d'opérations discontinues de méthanisation en conditions réelles a été étudiée. Dans le même temps, l'évolution de ces activités hydrolytiques a été étudiée au cours de la méthanisation et en fonction du déchet, afin de déterminer la pertinence d'effectuer de telles mesures pour suivre le fonctionnement d'un méthaniseur industriel mais également afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la méthanisation par voie sèche.
- L'effet de l'inhibition par l'ammoniac a été étudié en fonction du pH, de la température et de la concentration en matière sèche (voie humide à voie sèche). Cette étude a été menée

en conditions simplifiées de laboratoire. Puis, les résultats obtenus ont été comparés à l'effet observé en conditions réelles.

Ces quatre parties constituent une première tentative pour mieux comprendre les mécanismes spécifiques de la méthanisation par voie sèche pour, d'une part, améliorer leur connaissance et, d'autre part, identifier des indicateurs permettant d'anticiper ou d'apprécier le fonctionnement des installations. A ce titre, certaines orientations ont été guidées par la volonté d'apporter une réponse opérationnelle à la problématique du suivi et de l'optimisation de la méthanisation. Nous verrons également comment certaines techniques expérimentales ont du être développées spécifiquement dans le cadre de cette étude.

CHAPITRE I. ETAT DES CONNAISSANCES

Le déchet le plus facile à éliminer est celui que l'on n'a pas produit

[Anonyme]

Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme.

[Lavoisier]

I. ETAT DES CONNAISSANCES

1 Eléments de contexte

1.1 Situation des déchets ménagers et assimilés

1.1.1 Définition des déchets ménagers et assimilés

En application de dispositions législatives[1], les collectivités sont responsables de la gestion de l'ensemble des déchets ménagers et assimilés. De façon simplifiée, la gestion collective des déchets ménagers se décompose en deux phases majeures :

- La collecte proprement dite, depuis le lieu d'abandon jusqu'au lieu de regroupement, de traitements et/ou d'élimination
- Le traitement *stricto sensu*, opération qui s'effectue sur une installation classée pour la protection de l'environnement

Pour une collectivité donnée, le gisement de déchets ménagers et assimilés considéré est spécifique, compte tenu des habitudes de la population concernée en termes de consommation et de consignes de tri, mais également des moyens de collecte mis en œuvre.

Dans la loi du 15 juillet 1975, un déchet est défini comme "*tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien nuisible abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon*". Le terme de déchets ménagers et assimilés (DMA) désigne les ordures ménagères (OM) qui sont issues de l'activité domestique des ménages ainsi que les déchets provenant des commerces, artisans, agriculteurs, industries et collectivités.

La diversité des déchets d'origine ménagère et assimilés intègre :

- des ordures ménagères brutes (OMB)
- des ordures ménagères résiduelles (OMR) après collecte sélective du verre et des emballages (également désignés en France sous le terme d'OM "grises" en raison de la couleur des conteneurs utilisés)
- la fraction fermentescible des ordures ménagères triée à la source (FFOM) ou biodéchets.

Depuis janvier 2006, par arrêté du Ministère de l'écologie et du développement durable, les mots "déchets ménagers et assimilés" sont remplacés par "déchets non dangereux"…

1.1.2 Production de déchets ménagers et assimilés

Un suivi de la production des DMA en France a été mis en place par différents ministères et agences depuis 1975. En tenant compte de l'évolution des méthodes d'enquêtes au cours de ces trente dernières années, il semble que la production de déchets ménagers n'ait fait que croître jusqu'en 2000. La production annuelle d'ordures ménagères de chaque français a doublé en 40 ans : elle est passée de 175 kg/an en 1960 à 350 en 2000 (ADEME, 2006).

[1] L'article L2224-13 (section 3 : Ordures ménagères et autres déchets) du code général des collectivités territoriales stipule que « les communes ou les établissements publics de coopération intercommunale assurent, éventuellement en liaison avec les départements et les régions, l'élimination des déchets des ménages ».

Pour la première fois, elle se stabilise entre 2000 et 2004. Cette nouvelle tendance nécessitera d'être confirmée dans les années à venir. La production d'OM et de DMA en 2004 serait respectivement d'environ 26,5 et 40,5 millions de tonnes (ADEME, 2006).

1.1.3 Composition des ordures ménagères

Le Tableau 1 présente, à titre d'exemple, la caractérisation des ordures ménagères de Paris par la méthode dite MODECOM™ (*cf.* 4.5.2 MODECOM). La production unitaire d'ordures est de 488 kg/hab. On constate que la fraction putrescible y tient une place non négligeable. Cette proportion pourrait être considérablement augmentée avec un meilleur tri à la source ainsi qu'une réduction à la source de la production d'emballages.

Tableau 1. Caractérisation des ordures ménagères de Paris réalisée par le Syctom

	Sur brut	Humidité	Ratio	Sec	C	H	Col sél.	Résiduel (kg/hab)		C	H
	%	%	kg/hab	kg/hab	kg/hab	kg/hab	kg/hab	Sec	Humid	kg/hab	kg/hab
Putrescibles	18,8	65,1	92	32	15,0	0,15		32	92	15,0	0,2
Papiers	18,8	17,6	92	76	35,5	0,36	26	49	60	23,3	0,2
Carton	10,8	23,8	53	40	18,9	0,19	11	29	39	13,8	0,1
Complexes	1,0	25,8	5	4	1,7	,0,02		4	5	1,7	0,0
Textiles	2,4	21,0	12	9	4,3	0,04		9	12	4,3	0,0
Textiles sanitaires	5,8	51,9	28	14	6,4	0,06		14	28	6,4	0,1
Plastiques	11,2	22,5	55	42	32,3	3,50	4,2	38	49	29,1	3,2
Combustibles	3,2	20,0	16	12	5,9	0,06		12	16	5,9	0,1
Verres	10,5	1,5	51	50	0	0,00	35	15	16	0,0	0,0
Métaux	2,9	17,0	14	12	0	0,00	2,4	9	11	0,0	0,0
Incombustibles	0,9	1,5	4	4	0	0,00		4	4	0,0	0,0
Spéciaux	0,8	0,0	4	4	0	0,00		4	4	0,0	0,0
Fines	12,8	45,9	62	34	15,9	0,00		34	62	15,9	0,0
Bilan	**100**	**31,6**	**488**	**333**	**120**	**4,4**	**78**	**255**	**398**	**100**	**3,9**

1.1.4 Réglementation du traitement des déchets

Deux principaux textes législatifs réglementent la gestion des déchets ménagers en France. Le premier est la loi du 13 juillet 1992 (n°92-646) relative à l'élimination des déchets ainsi qu'aux installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE). C'est la loi la plus récente et la plus importante en ce qui concerne les déchets. Elle modifie la loi du 15 juillet 1975 (n°75-633), qui définissait la notion de déchets, instaurait la responsabilité des communes pour l'élimination des déchets ménagers et incitait les producteurs de déchets (particulier, professionnels, …) à diminuer le volume de déchets et à valoriser les matériaux. Cette loi modifie également la loi du 19 juillet 1976 (n°76-663), qui imposait déjà que toute installation d'élimination des déchets soit soumise au régime des ICPE.

La loi du 13 juillet 1992 (n° 92-646) introduit la notion nouvelle de déchets ultimes : "déchets qui ne sont plus susceptibles d'être traités dans les conditions techniques et économiques du moment", et donc la suppression à compter du 1er juillet 2002 d'installations de stockage de déchets bruts pour n'autoriser que des installations de stockage de déchets ultimes. Cette loi oblige donc à la valorisation des déchets notamment, par incinération ou par traitement biologique.

Le second texte important est la directive européenne 1999/31/CE du Conseil du 26 avril 1999 concernant la mise en décharge des déchets, qui précise qu'au plus tard en 2017, avec des objectifs et des échéanciers intermédiaires, la quantité de déchets municipaux

biodégradables mis en décharge doit être réduite à 35 % en poids de la totalité des déchets municipaux biodégradables produits en 1995.

Plus de dix ans après l'entrée en vigueur de la loi sur les déchets de 1992, les installations d'élimination de déchets ménagers continuent à se restructurer pour s'adapter à la rationalisation de la gestion des déchets. Cette restructuration se traduit par un net recul des installations hors normes, essentiellement des installations de stockage et des incinérateurs, ainsi que par un développement de la collecte sélective et des filières de recyclage, de tri et de traitement biologique. Le contexte réglementaire n'impose pas une filière d'élimination plutôt qu'une autre. Les quatre principales filières sont nécessaires à la gestion globale des flux de déchets : aucune filière ne peut, à elle seule, accepter la totalité des déchets.

1.2 Contexte du traitement biologique des déchets solides

1.2.1 Filières d'élimination des déchets ménagers et assimilés

Jusque dans les années 1980, peu d'attention était accordée au devenir des déchets ménagers qui étaient la plupart du temps enfouis dans de très nombreuses décharges non contrôlées, disséminées sur l'ensemble du territoire et dont l'impact sur l'environnement était mal évalué. La prise de conscience de la nécessité de préserver l'environnement a émergé et la réduction des impacts anthropiques sur le milieu naturel est devenue un enjeu de société. Les quatre principales filières d'élimination des DMA qui se sont développées en France sont le tri des matériaux recyclables, l'incinération, le stockage (décharges) et le traitement biologique qui englobe le compostage (traitement aérobie) et la méthanisation (Figure 1).

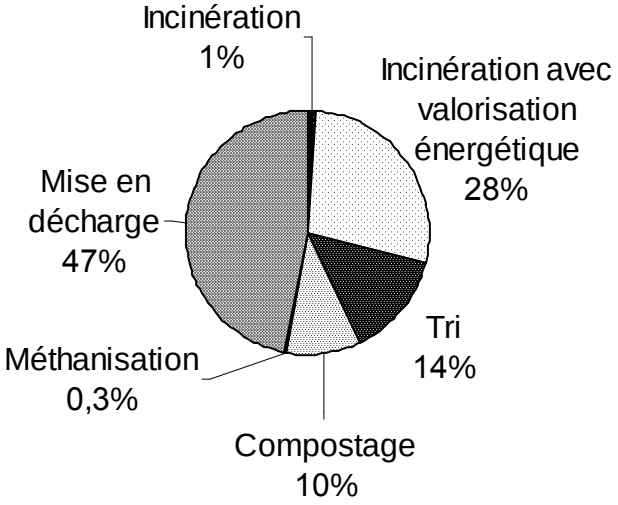


Figure 1. Répartition par mode de traitement des tonnages de déchets traités en 2004 en France (ADEME, 2004)

1.2.2 Les traitements biologiques des déchets

Le traitement biologique des déchets représente 10 % des filières d'élimination des DMA en France et est presque exclusivement représenté par le compostage (Figure 1). Le compostage est un traitement biologique aérobie des déchets en vue de les stabiliser et de les rendre valorisables en tant qu'amendement organique pour les sols en agriculture.

1,73 millions de tonnes de compost ont été produites en 2004 à partir des seuls déchets municipaux, à partir d'un gisement estimé de 2,5 millions de tonnes de déchets comprenant des déchets verts et des boues d'épuration (ADEME, 2006). A ces chiffres il faudrait également ajouter le compost produit par les particuliers.

1.2.3 Les enjeux du traitement biologique des déchets

Les fonctions et objectifs des traitements biologiques des déchets sont multiples et perçus différemment selon les points de vue : enjeux immédiats pour les opérateurs tels que les collectivités locales et sociétés de service (performances techniques, coût, solution concrète à un problème de traitement de déchets, …), enjeux de long terme pour l'ensemble de la société (bilan écologique, énergétique, risque sanitaire, principe de proximité, …).

Les traitements biologiques permettent de réduire la charge organique des déchets (stabilisation), de les désodoriser et de les hygiéniser (réduction des germes pathogènes). La stabilisation des déchets fermentescibles les rend plus aisément gérables (stockage, transport, manutention, …). L'épandage des déchets traités biologiquement crée moins de nuisances, le stockage en centre d'enfouissement ne génère plus de gaz et très peu de lixiviats, et les déchets issus de la digestion peuvent être plus facilement séchés pour l'incinération que des déchets humides (Mallard *et al.*, 2005).

Les traitements biologiques permettent de recycler et restituer au sol la matière organique exportée par les cultures. Cela est d'un intérêt certain car la baisse du taux d'humus est un phénomène ancien, longtemps sous-évalué, et la dégradation des sols devient un sujet de préoccupation qui devrait prendre de l'ampleur (Couturier, 2000).

1.3 Contexte de la méthanisation des déchets solides en France et en Europe

1.3.1 Principe général de la méthanisation

La méthanisation est un procédé biologique de dégradation de la matière organique par une flore microbienne, qui se déroule en l'absence d'oxygène. Elle est aussi appelée "digestion" ou "fermentation" anaérobie. C'est un processus trouvé à l'état naturel (marais, tractus digestif des ruminants, …) qui peut également être conduit dans des digesteurs, enceintes confinées à l'intérieur desquelles les réactions de fermentation sont optimisées et contrôlées.

La matière biodégradable est transformée en biogaz, composé majoritairement de méthane (environ 60 %), qui peut être converti en pratiquement toutes les formes d'énergie utile : eau chaude, vapeur, électricité, cogénération (production combinée d'électricité et chaleur), gaz naturel, gaz carburant, air chaud pour le séchage, froid.

1.3.2 Les principales filières de méthanisation

Un digesteur peut traiter des substrats homogènes (mono-substrat) ou des mélanges (on parle alors de co-digestion), ce qui offre des opportunités pour traiter à l'échelle d'un bassin de vie divers types de déchets organiques. Si l’objet de cette thèse est centré sur les déchets ménagers et assimilés, il faut souligner que la méthanisation est un traitement fréquent et performant pour de nombreux autres déchets et rejets (Andi-Aconsult, 2003-2004). Ainsi, la méthanisation est-elle fréquemment mise en œuvre pour réaliser l’épuration des eaux usées de nombreuses industries (papier, agroalimentaire, chimie, …) et également des déjections des animaux d’élevage (lisier, fumier, fientes, …). Enfin, la digestion des boues des stations d’épuration est une technique ancienne et très fréquemment pratiquée sur les installations des villes moyennes et importantes.

Concernant le traitement des boues, La première référence connue concerne la ville d’Exeter (Royaume-Uni) qui en 1895 valorise le biogaz produit pour l’éclairage urbain. En France, les plus anciens digesteurs sont probablement ceux de la station d’épuration de Seine-

Aval, à Achères. Certains, toujours en service, datent de 1940. Un peu plus d'une centaine de stations de capacité supérieure à 30 000 équivalent-habitants pratiquent la méthanisation. Elles représentent 30 % de la capacité totale du parc d'épuration et traitent les boues de quelques 20 millions d'équivalent-habitants. Ces digesteurs éliminent de l'ordre de 170 000 tonnes de matières sèches par an, qui sont transformées en 94 millions de m^3 de méthane (Couturier *et al.*, 2001).

1.3.3 Intérêt de la méthanisation des déchets

La méthanisation permet de produire une énergie renouvelable et locale. Elle contribue à préserver les ressources non renouvelables et améliore la balance énergétique du pays. Cet objectif, moins crucial lors des années 1990 que lors des chocs pétroliers des années 1973-1985, revient rapidement au premier plan compte tenu des tensions sur l'approvisionnement en énergie signalées par différents experts pour les prochaines décennies (IEA, 2004).

Au lieu de convertir le carbone en gaz carbonique uniquement, comme dans le cas du compostage, la méthanisation convertit du carbone en méthane. Ce biogaz se substitue à une énergie fossile, et évite le déstockage de carbone fossile, donc l'augmentation de la concentration de gaz carbonique dans l'atmosphère. De plus, contrairement à l'incinération, la méthanisation permet de stocker le carbone soit dans les sols sous forme d'amendement organique, soit en centre de stockage lorsque le digestat est destiné à l'enfouissement. Le carbone stocké n'est pas immédiatement transformé en CO_2, ce qui diffère les émissions de gaz à effet de serre dans le temps. C'est ce que l'on nomme l'effet "puits de carbone" (Chynoweth, 1996).

La Figure 2 illustre l'intégration de la méthanisation dans le cycle du carbone et explique ainsi pourquoi il s'agit d'une source d'énergie renouvelable et d'effet "puits de carbone" :

Le carbone fixé par la photosynthèse dans la biomasse (1) est transformé à l'issue de la chaîne de production – consommation – déchet (2, 3) par méthanisation (4), en biogaz d'une part (5), en digestat d'autre part (6). Le gaz carbonique produit par la combustion du biogaz (7) est recyclé par la biomasse (8). L'utilisation de cette source d'énergie permet d'éviter le déstockage d'énergie fossile (9), donc une augmentation de la concentration en gaz à effet de serre. C'est le cycle du carbone renouvelable : il y a au pire un équilibre (solde carbone nul), qui se réalise sur une durée courte (quelques années) entre la consommation de CO_2 par la biomasse et le rejet dans l'atmosphère.

De plus, le carbone qui subsiste dans le digestat n'est pas renvoyé dans l'atmosphère, mais stocké dans les sols, soit sous forme d'humus (10), soit en centre d'enfouissement (11), où il mettra des années pour se transformer en gaz carbonique. Le solde carbone est donc négatif : les quantités de gaz carbonique relarguées vers l'atmosphère (7) sont inférieures aux quantités consommées par la croissance de la biomasse (8).

Dans le cas de déchets putrescibles, environ 27 % du carbone initial sont transformés en compost, et 33 % en méthane. Le solde est constitué de gaz carbonique contenu dans le biogaz (25 %) ou généré lors de la post-maturation (15 %). 60 % du carbone initial sont donc soit stockés, soit substitués à une énergie fossile.

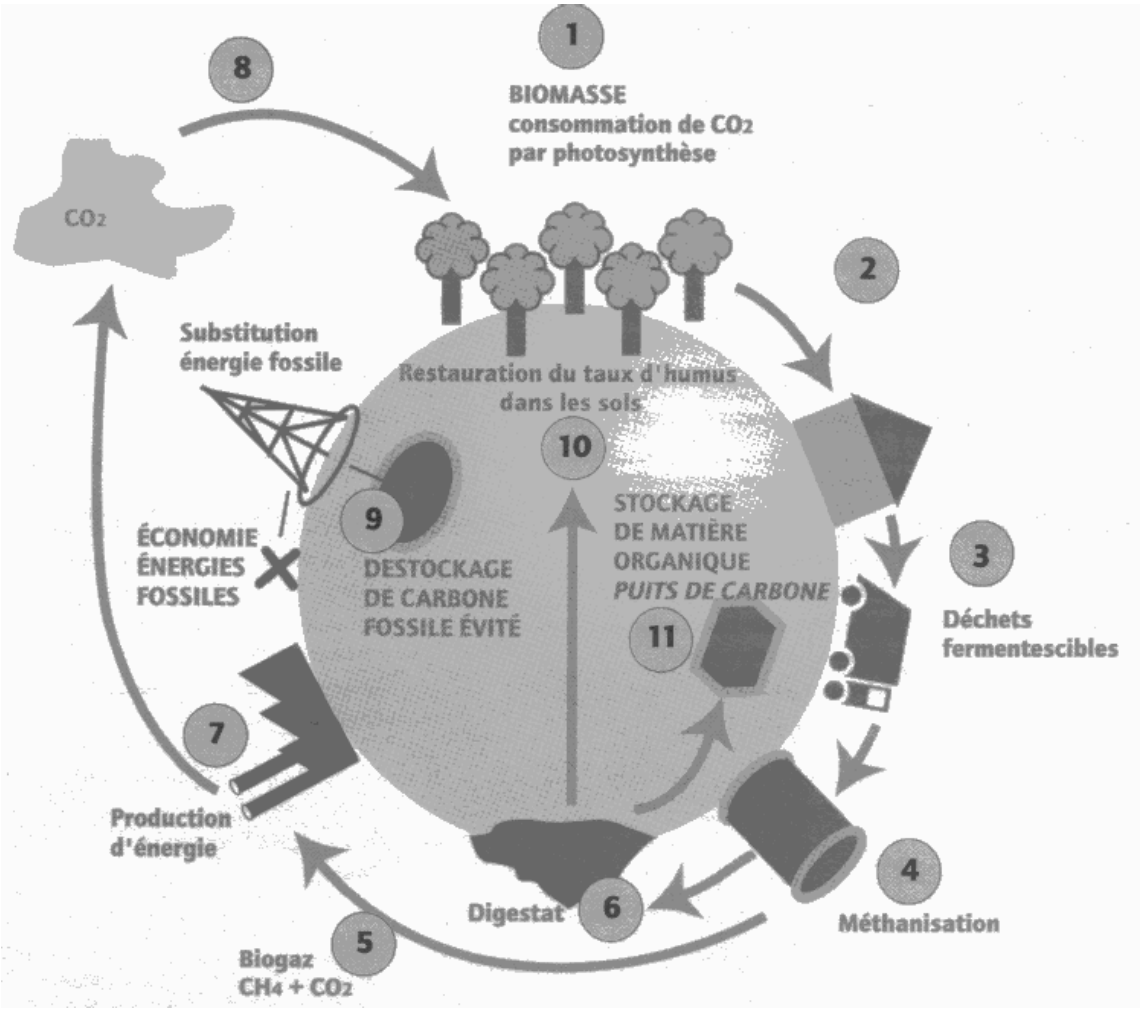


Figure 2. Méthanisation et effet de serre : le cycle du carbone, d'après Couturier, 2000

1.3.4 Les avantages et inconvénients de la méthanisation des déchets

a) Avantages par rapport au compostage

Comparée au compostage, la méthanisation se caractérise par (Couturier, 2000) :

- Une absence de rejets de poussières, des rejets très limités d'aérosols et de gaz : la nécessité de travailler en réacteur fermé supprime toute émission de poussières et aérosols dans l'air ambiant au cours de la phase active de fermentation. Les composés odorants contenus dans le biogaz sont détruits lors de la combustion (transformation des composés soufrés en SO_2). En sortie des digesteurs, l'ammoniac résiduel, qui peut générer des nuisances olfactives, est éliminé si nécessaire (traitement de l'air vicié).
- Une meilleure dégradation des composés organiques volatils (COV) : la digestion anaérobie permet d'éliminer de nombreux COV. Comme l'essentiel du procédé se déroule en réacteur fermé, seule la phase finale de post-fermentation est susceptible de libérer des COV dans l'atmosphère, en quantités bien moindres que dans un procédé de compostage.

b) Avantages par rapport à l'incinération

Comparée à l'incinération, la méthanisation se traduit par une absence de dégagement de fumées. Il n'y a pas de transformation thermochimique des produits, notamment des plastiques de synthèse, qui sont à l'origine des problèmes de nuisances et d'acceptation par les populations.

Par rapport à l'incinération, la réduction de l'impact "effet de serre" lié au recours à la méthanisation dépend du mode de valorisation de l'énergie. Le biogaz se prête à de multiples formes de valorisation, et les unités de méthanisation peuvent être implantées plus facilement à proximité des consommateurs d'énergie (Chynoweth *et al.*, 2001). Il est donc plus facile de trouver des valorisations optimales pour la méthanisation.

c) Avantages et inconvénients généraux

Le Tableau 3 présente les principaux avantages et inconvénients de la méthanisation des déchets ménagers. Ils sont à moduler en fonction de chaque situation locale.

1.3.5 Contexte politico-économique

Pour favoriser le développement de la méthanisation, l'Union européenne, au travers de son plan d'actions communautaire de 1997 avec le Livre Blanc "Energie pour l'avenir : les sources d'énergies renouvelables", a préconisé de doubler la part des énergies renouvelables dans son bilan énergétique d'ici 2010. En effet, comme nous l'avons vu, l'énergie produite par la méthanisation des déchets est une énergie renouvelable (*cf.* "1.3.3 Intérêt de la méthanisation des déchets", p.31).

Plusieurs actions ont ainsi été engagées dont le "programme cadre énergie" (arrivé à échéance fin 2002), suivi du programme "énergie intelligente pour l'Europe (2003-2006)", doté d'un budget de 215 M€. Appuyés par ce cadre communautaire, la majorité des pays européens se sont engagés dans le développement des énergies renouvelables et également de la réduction des gaz à effet de serre.

Mais, comme le souligne une récente étude (Moutet *et al.*, 2004), certains pays ont mis plus de moyens que d'autres avec le développement du concept "d'électricité verte", soit avec un tarif de rachat garanti pour le producteur (Allemagne, Suisse, Pays-Bas), soit avec un quota de production obligatoire (Danemark).

Les principaux textes officiels relatifs aux énergies renouvelables sont les suivants :

- Directive 2001/77/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 septembre 2001 relative à la promotion de l'électricité produite à partir de sources d'énergie renouvelables sur le marché intérieur de l'électricité ;
- Communication de la Commission au Parlement européen, au Conseil, au Comité économique et social et au Comité des régions concernant les carburants de substitution pour les transports routiers et une série de mesures visant à promouvoir l'utilisation des biocarburants ;
- Proposition de directive du Parlement européen et du Conseil visant à promouvoir l'utilisation des biocarburants dans les transports.

A propos de la réduction des émissions dans l'air, la directive 88/609/CEE du 24 novembre 1988 limite les émissions de certains polluants dans l'atmosphère en provenance des grandes installations de combustion. Les directives 89/369/CEE et 89/429/CEE de juin 1989 concernent les installations d'incinération des déchets existantes et nouvelles et ont été

complétées par la directive du 4 décembre 2002. Par des impositions sévères sur la qualité des rejets, ces mesures imposent un traitement poussé des fumées, ce qui augmente significativement le coût de l'incinération des déchets.

1.3.6 Le marché de la méthanisation

Le marché de la méthanisation industrielle porte sur un ensemble de services, travaux et matériels divers et variables. Sa dynamique est principalement liée à celle des marchés du traitement des eaux, des effluents industriels et des déchets ménagers et assimilés, et dans une moindre mesure à une dynamique d'offre portée par quelques fabricants d'équipements et experts de la conduite des digesteurs (International, 2003).

Cette situation est particulière. En effet, pour inciter les producteurs de déchets à adopter plus souvent cette technologie, généralement considérée comme plus "écologique et durable" que d'autres, certains pays Européens ont, dans une logique de soutien à la production d'énergie renouvelable, décidé de fixer des prix de reprise de l'électricité produite à partir de biogaz à un niveau permettant aux opérateurs de rentabiliser leurs investissements dans le contexte économique où ils évoluent, ou ont pris des dispositions pour favoriser l'utilisation de ce biogaz comme carburant pour véhicules ou comme combustible dans des chaudières alimentant des réseaux de chaleur collectifs. Sans ce type d'accompagnement, la valorisation énergétique n'est rentable que si le coût d'investissement et de fonctionnement de l'installation de valorisation énergétique donne un prix de revient de la thermie biogaz inférieur ou égal à celui de la thermie gaz naturel, ce qui est rarement le cas pour le moment.

Les possibilités d'écoulement marchand du digestat sont, elles aussi, limitées et, qui plus est, incertaines sur la durée probable de vie technique et économique des installations, rendant peu réaliste dans le contexte français actuel la possibilité de dégager un revenu d'appoint stable de la commercialisation de la fraction non digérée des matières sortant du digesteur.

Enfin, l'absence d'un véritable marché des matières organiques fermentescibles et le manque d'expériences concluantes d'externalisation du traitement des effluents et déchets ne facilitent pas l'émergence d'opérateurs spécialisés dans la production de biogaz, comme le montrent les difficultés rencontrées par tous les promoteurs de projets de co-digestion, dont le financement est le plus souvent bloqué, faute pour le promoteur de pouvoir garantir qu'il aura accès de façon durable à la matière dont il a besoin pour alimenter ses installations. L'existence d'un marché de ces matières ne constituerait pas en soi une solution, car de nombreuses autres considérations doivent être prises en compte, mais elle contribuerait à conforter les financiers en introduisant une possibilité réelle de substitution de flux de matières traitées pendant la durée de vie des installations, qui reste hautement aléatoire aujourd'hui.

1.3.7 Historique

La méthanisation est utilisée depuis plus d'un siècle pour traiter les boues de stations d'épuration. Dans les années 1940, puis à nouveau au cours de la crise du pétrole de 1973 à 1985, elle a été appliquée aux déjections d'élevage. Dans les années 1970, elle a été développée pour le traitement des effluents industriels organiques.

Depuis le milieu des années 1980, sont apparus les premiers pilotes industriels capables de traiter des déchets organiques solides, tels que les déchets ménagers et assimilés. Il a fallu une dizaine d'années pour que la technologie parvienne à un stade de maturité qui lui permette d'aborder son essor commercial (Couturier, 2000).

L'usine d'Amiens, construite dès 1988, est restée pendant plus de 10 ans l'unité de méthanisation de déchets municipaux la plus importante au monde. Mais les difficultés rencontrées lors de sa mise en service ont laissé une image négative durable, que ni dix années de bon fonctionnement, ni le fait que la ville d'Amiens a fait ajouter un quatrième digesteur en 1995, n'ont réussi à effacer. En France, ce n'est qu'en 2000 qu'un second projet voit le jour, exploité par le SIVOM de la vallée de Yerres et des Senarts à Varrennes-Jarcy (Essonne).

1.3.8 Installations industrielles

Selon une récente étude (IEA, 2004) menée sur 17 pays, une forte variabilité est observée dans le parc des installations (en fonctionnement) de traitement des déchets solides organiques par méthanisation. La gamme couverte par les 150 installations industrielles en matière de capacité de traitement (tonnes entrantes), de type de méthanisation (humide ou sec) et surtout de nature des déchets organiques admis, est grande.

Au niveau historique, la méthanisation des déchets solides a fait son apparition en France (Amiens, 1988) et en Italie où fonctionnent toujours les unités les plus anciennes. En 2004, la moitié des unités de méthanisation, soit 125 unités, se répartissent dans une quinzaine de pays. Le rythme de construction a longtemps stagné avec quelques unités par an, mais en 2001, année-charnière, une rapide évolution est notée avec plus d'une dizaine d'unités inaugurées annuellement. La capacité s'accroît ainsi d'environ 600 000 t/an en Europe comme l'illustre la Figure 3. En nombre, environ 70 % des unités du parc étudié traitent des biodéchets alors que le ratio est de 25 % pour les installations recevant des OMR. En revanche, en termes de capacité de traitement, les tonnages méthanisés sont équivalents en biodéchets (3 millions de tonnes) et en OM (3,3 millions de tonnes) (De Baere, 2006).

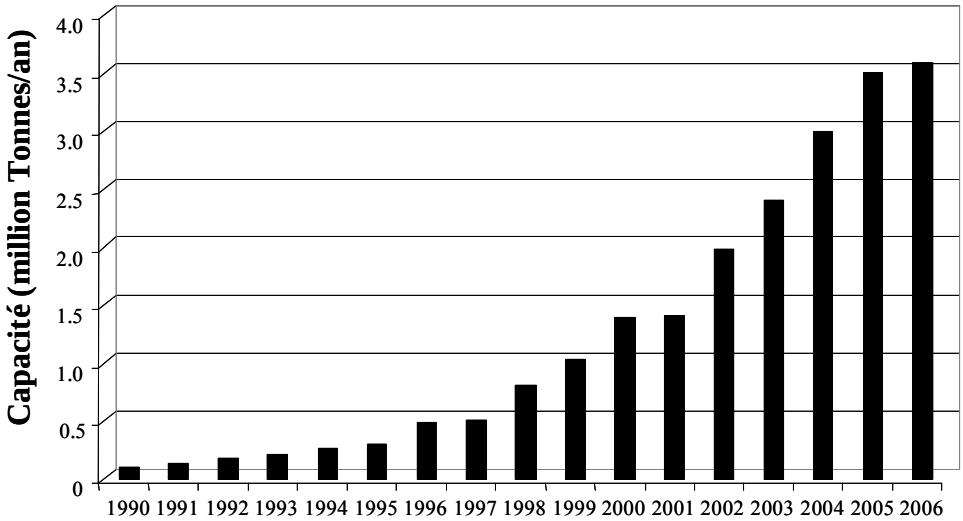


Figure 3. Évolution du traitement des DMA par méthanisation en Europe, d'après De Baere, 2006

Le parc se caractérise par un nombre élevé d'installations de méthanisation de biodéchets de petites capacités (90 % des unités biodéchets) comprises entre 3 000 et 40 000 t/an pour une méthanisation avec un seul gisement.

Au niveau géographique, l'Allemagne concentre plus de 40 % des unités, suivie par la Suisse (15 %), mais uniquement sur des biodéchets. La plus importante unité de méthanisation de biodéchets sera française avec Lille, dont la construction a débuté en 2006, et qui traitera 106 000 t/an de biodéchets et de déchets verts. Les plus grosses unités de méthanisation d'ordures ménagères en fonctionnement sont très récentes et sont localisées en Espagne, avec notamment les trois « Ecoparcs » de Barcelone qui cumulent une capacité de

traitement de 830 kt/an (entrée tri mécanique). D'autres usines récentes sont en activité à Cadix (210 kt/an), La Corogne (182 kt/an) et Pampelune (100 kt/an).

De grosses unités se trouvent également aux Pays-Bas à Groningen (230 kt/an) et Friesland (180 kt/an), en Allemagne à Hanovre (100 kt/an) et en France à Amiens (85 kt/an), Varennes-Jarcy (100 kt/an) et prochainement Montpellier (200 kt/an).

Il existe également, au Royaume-Uni et au Danemark, de très volumineuses unités (capacités supérieures à 130 kt/an) pratiquant la co-méthanisation (ou co-digestion) de biodéchets avec des déchets agroalimentaires et des effluents d'élevage.

Dans ce contexte varié, environ la moitié des unités de méthanisation, soit 64, sont réparties dans une quinzaine de pays pour environ 25 constructeurs (Tableau 2).

Tableau 2. Entreprises majeures de méthanisation des déchets ménagers, d'après TSM, 2006

Entreprise	Pays	Procédé	Nombre d'unités	Capacité (t/an)
Linde-KCA-Dresden GmbH	Allemagne	Linde BRV	20	990 000
Veolia Environnement	France	Krueger	14	950 000
Valorga International SAS	France	Valorga	11	850 000
Kompogas AG	Suisse	Kompogas	29	777 000
Ros Roca Internacional	Espagne	BioStab	13	528 000
Biotechnische Abfall. GmbH & Co KG	Allemagne	BTA	22	406 000
Citec Environement	Finlande	Wassa	10	288 000
Organic Waste Systems	Belgique	Dranco	13	195 000
Schmack Biogas AG	Allemagne	Euro/Coccus	170	N.R.

Le marché de la méthanisation en Europe est donc particulièrement dynamique et actif. Au niveau français, il se développe très vite puisque les installations de Lille et Montpellier devraient être mises en service en 2008, tandis que d'autres projets concernant des grandes villes sont à l'étude (Paris, Marseille). Cet essor commercial est principalement dû à une conjonction de facteurs contextuels favorables : coût de traitement, valorisation énergétique, prise de conscience écocitoyenne. La question se pose cependant de l'accompagnement technologique et scientifique de procédés et systèmes qui n'ont été proposés que relativement récemment, et dont les premiers retours d'expérience indiquent quelques limites.

Tableau 3. Avantages et contraintes de la méthanisation des déchets ménagers d'après Couturier, 2000

Types d'impacts	Avantage	Contrainte
Environnement		
Emprise au sol	Réduite par rapport au compostage	
Recyclage	Oui (amendement organique)	Collecte séparative ou tri poussé
Odeurs	maîtrisées	Traiter l'air vicié si nécessaire (ammoniaque)
Pollution des sols	Restauration teneur en humus	Veiller à la teneur en contaminants
Pollution des eaux	Faible consommation d'eau	Gestion des eaux excédentaires
Réduction des émissions de gaz à effet de serre	Substitution à une énergie fossile + effet de stockage de carbone	Le biogaz doit être valorisé
Production de résidus	Faible	Lorsque la collecte séparative est correcte (teneur en impuretés)
Emissions gazeuses	Excellente qualité de la combustion du méthane + Pas d'émission d'aérosols	
Rejets visibles	Aucune fumée	
Transport de déchets	Distances courtes (usines de moyenne capacité)	Nécessite une taille minimale (zone desservie d'environ 50 000 habitants)
Bruit	Faible à l'extérieur des locaux	
Impacts énergétiques		
Consommation d'énergie	Faible consommation	
Production d'énergie	Oui	Le bilan énergétique varie selon les usages de l'énergie
Gisement potentiel en France	Centaines de milliers de tep	
Applicabilité		
Possibilité de traiter d'autres types de déchets	Oui (déchets des IAA, d'espaces verts, de restauration, lisiers, boues de STEP, …)	Sous réserve de non contamination et d'aptitude à la fermentation
Possibilité de traiter des déchets humides	Oui	
Possibilité de traiter des déchets ligneux	En post-maturation (co-compostage avec les déchets verts)	Lignine non digestible, nécessité d'un broyage fin
Intérêt pour les communes rurales	Evite le transport des déchets sur de longues distances	Nécessité d'une taille minimale, ou opportunité pour traiter d'autres types de déchets
Intérêt pour les communes urbaines	Habitat pavillonnaire adapté à la collecte séparative des organiques Possibilité d'implantation en zone urbanisée	Difficultés pour organiser une collecte séparative en habitat urbain très dense ou vertical
Compatibilité avec le compostage	Oui (post maturation) Co-traitement avec les déchets verts ligneux	Concurrence possible
Compatibilité avec l'incinération	Oui (déchets humides détournés de l'incinération)	Concurrence possible
Compatibilité avec le stockage	Oui (pré-traitement avant stockage)	
Impacts économiques		
Coût de la collecte	Faible en zones avec une desserte fréquente, dans le cas d'une collecte en substitution	Elevé s'il est nécessaire d'ajouter une tournée spécifique
Nécessité de tri	Tri en usine réduit dans le cas d'une collecte séparative des organiques	Tri mécanique en usine complexe en absence de collecte séparative
Coût du traitement	Inférieur à celui de l'incinération Equivalent à celui d'un compostage "haut de gamme"	Le coût global (collecte + traitement) peut être plus élevé selon le coût de la collecte et le taux de déchets détournés de l'incinération Supérieur à celui d'un compostage simple
Investissement spécifique	Plus faible que pour l'incinération	Plus élevé que pour le compostage
Coûts d'exploitation	Coûts modérés	
Valorisation de l'amendement organique	Opportunité pour la commercialisation d'un amendement de qualité	Considérer un prix de vente nul en première approche
Valorisation du biogaz		Dépend du tarif d'achat de l'énergie, nécessité de mesures spécifiques en faveur des énergies renouvelables ou issues des déchets

2 La méthanisation des déchets solides par voie sèche

2.1 Principes de la méthanisation

2.1.1 Principe général

La méthanisation, ou digestion anaérobie, est la voie microbienne qui, en absence d'oxygène moléculaire, minéralise la matière organique en produisant un biogaz composé essentiellement de méthane et de dioxyde de carbone. Ce mécanisme implique une succession de microflores spécialisées et requiert des conditions bio-physico-chimiques adaptées à ces microflores. Le métabolisme anaérobie est mis en évidence par la production de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2) (Tableau 4). Presque tous les composés organiques naturels et certains d'origine synthétique peuvent être dégradés dans ces conditions (Wheatley, 1990).

Tableau 4. Composition du biogaz de déchets organiques agricoles, d'après Wheatley, 1990

Gaz produits en conditions anaérobie	Teneurs habituelles
CH_4	50 à 80 %
CO_2	30 à 50 %
H_2O	Saturation
NH_3	Traces
H_2S	0 à 1 %
N_2	0 à 1 %
CO	0 à 1 %

Le processus de biodégradation anaérobie de la matière organique se déroule en quatre étapes biochimiques réalisées par trois groupes de micro-organismes formant une chaîne trophique (Figure 4). Les quatre étapes sont : l'hydrolyse, l'acidogenèse, l'acétogenèse et la méthanogenèse. Nous détaillons ces quatre étapes ci-dessous.

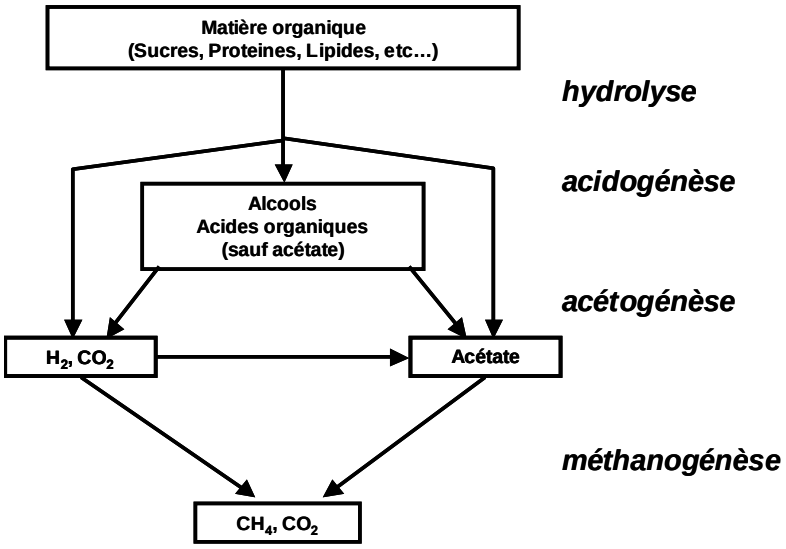


Figure 4. Principaux processus de dégradation anaérobie de la matière organique.

2.1.2 L'hydrolyse

L'hydrolyse est la première étape de conversion de la matière organique (Figure 4) durant laquelle des micro-organismes anaérobies et aérobies facultatifs produisent des enzymes extracellulaires qui hydrolysent les biopolymères (polysaccharides, lipides, protéines) en oligomères et monomères, hydrosolubles (Goel *et al.*, 1998). Les produits solubles issus des dépolymérisations s'ajoutent à la fraction déjà soluble de la matière organique. La réduction de la taille des particules et leur mise en solution permet leur assimilation par les micro-organismes (Rivers et Emert, 1988).

Selon le substrat utilisé, les produits d'hydrolyse sont différents. L'hydrolyse des lipides (lipolyse) libère du glycérol, des acides gras volatils (AGV) et des acides gras à longue chaîne (Zeeman et Sanders, 2001). Le glycérol est rapidement assimilé par les micro-organismes. L'hydrolyse des protéines libère des polypeptides, des acides aminés et de l'ammonium (Sanders, 2001). La cellulose et les hémicelluloses sont hydrolysées en leurs monosaccharides constitutifs : glucose, fructose, arabinose, … (Tong *et al.*, 1990). La lignine est non ou très faiblement consommée en digestion anaérobie (Peres *et al.*, 1992). Or, dans les composés d'origine végétale, la lignine incruste plus ou moins la cellulose et les hémicelluloses, ce qui peut limiter d'autant leur hydrolyse (Hindrichsen *et al.*, 2005).

2.1.3 L'acidogenèse

L'acidogenèse est la conversion intracellulaire des produits solubles d'hydrolyse en composés tels que l'eau, le dihydrogène, le dioxyde de carbone et les AGV (Figure 4). Dans le domaine de la digestion anaérobie, le terme d'acides gras volatils désigne les acides organiques à courte chaîne : les AGV sont donc des molécules simples avec un squelette de 1 à 6 atomes de carbone. Les sept principales espèces d'AGV sont respectivement les acides formique, acétique, propionique, butyrique, iso-butyrique, valérique et iso-valérique. Le biogaz produit au cours de cette phase, tout comme lors de l'hydrolyse, est principalement composé de CO_2. (80 %) et de H_2 (20 %) (Wheatley, 1990).

2.1.4 L'acétogenèse

L'acétogenèse est l'ensemble des réactions qui conduisent à la production d'acétate (Figure 4). Cette étape est réalisée par deux groupes microbiens consommant respectivement le CO_2 et les AGV :

- Les bactéries homoacétogènes ou acétogènes strictes produisent de l'acétate par la réduction du dioxyde de carbone selon la relation ci-dessous. Les bactéries peuvent également convertir les composés à un atome de carbone.

$$4H_2 + 2CO_2 \longrightarrow \underset{\text{acétate}}{CH_3COOH} + 2H_2O$$

- Les bactéries "acétogènes productrices obligées d'hydrogène" (APOH, OHPA en anglais) convertissent les acides gras volatils de haut poids moléculaire et les acides gras à longue chaîne, en acétate, dioxyde de carbone et hydrogène selon les relations ci-dessous. La voie métabolique utilisée est celle de la β-oxydation.

$$\underset{\text{valérate}}{CH_3(CH_2)_3CO_2^-} + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{acétate}}{CH_3CHO^-} + \underset{\text{propionate}}{CH_3CH_2CO_2^-} + 2H_2 + H^+$$

$$\underset{\text{propionate}}{CH_3CH_2CO_2^-} + 3H_2O \longrightarrow \underset{\text{acétate}}{CH_3CO_2^-} + HCO_3^- + 3H_2 + H^+$$

Ces réactions ne sont thermodynamiquement pas possibles dans les conditions standards ($\Delta G°>0$). Elles ne peuvent se produire que lorsque la pression partielle en hydrogène devient très faible. C'est pourquoi la β-oxydation n'est possible que lorsqu'il existe un moyen d'éliminer l'hydrogène produit. Il doit donc y avoir nécessairement une association entre espèces produisant l'hydrogène et les espèces qui le consomment (espèces méthanogènes). Le type de relation établie entre les espèces OHPA et les espèces consommant l'hydrogène est une relation de syntrophie (Ahring, 2003).

2.1.5 La méthanogenèse

Au cours de cette dernière étape de minéralisation de la matière organique, les molécules à un ou deux atomes de carbone sont converties en méthane (Wheatley, 1990). Deux voies métaboliques permettent la production de méthane, à partir de l'acétate et du couple CO_2/H_2 (Figure 4). Les micro-organismes responsables sont anaérobies strictes et appartiennent au domaine des Archæ (Ahring, 2003).

- Les méthanogènes dites acétotrophes convertissent l'acétate en dioxyde de carbone et en méthane.

$$\underset{\text{acétate}}{CH_3CO_2^- + H_2O} \longrightarrow CH_4 + HCO_3^-$$

- Les méthanogènes dites hydrogénotrophes réduisent le dioxyde de carbone, les carbonates et les bicarbonates avec le dihydrogène pour former du méthane et de l'eau.

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

La voie hydrogénotrophe est importante pour le processus général de la digestion anaérobie, puisqu'elle est responsable de la disponibilité en H_2 et du maintien d'une pression partielle en H_2 faible, requise pour la syntrophie avec les OHPA et la production d'acétate. Si la concentration en H_2 augmente trop, l'activité fermentative bactérienne s'oriente vers la formation d'AGV autres que l'acétate. Or, la voie acétotrophe produit du CH_4 par clivage de l'acétate, donc une diminution de la production du biogaz peut survenir (Ahring, 2003).

2.2 Les technologies de méthanisation

2.2.1 Schéma de principe d'une installation

La Figure 5 présente le schéma de principe général simplifié d'une installation industrielle de méthanisation. Une installation type est constituée de trois opérations unitaires importantes : le prétraitement, le méthaniseur, et un séparateur solide-liquide (il s'agit souvent d'un filtre presse). On notera que cette troisième phase de séparation solide-liquide est optionnelle et est de plus en plus souvent remplacée par d'autres post-traitements. Le bilan matière de l'installation est représenté par les principaux flux associés aux trois lignes (solide, eau, gaz). Les intrants sont principalement les déchets ainsi que l'eau qui peut, de manière facultative, être ajoutée aux déchets pour ajuster le taux de matière sèche dans le réacteur. Au niveau des sorties nous trouvons les refus de prétraitement, le rejet solide après séparation, la purge liquide et le biogaz (Buffière et Frederic, 2008).

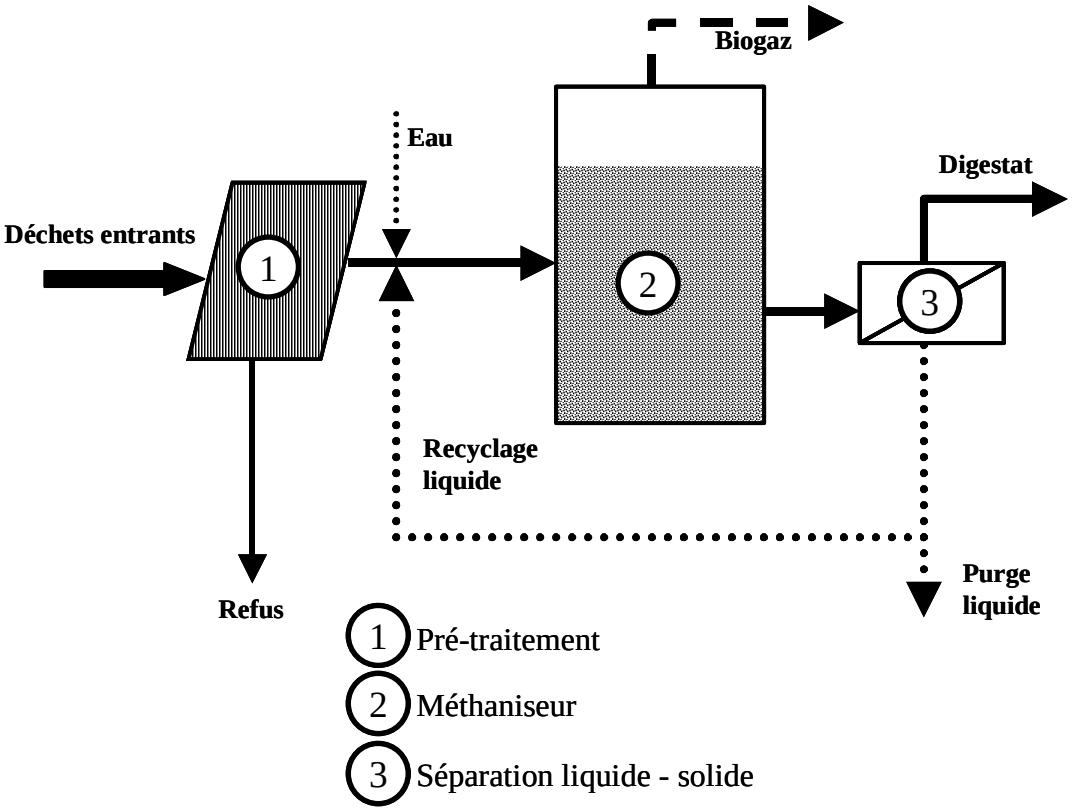


Figure 5. Schéma de principe d'une installation de méthanisation.

2.2.2 Paramètres du traitement mécanique et biologique

Dans un premier temps, certains paramètres définissent le traitement mécanique. Les différentes technologies se distinguent ainsi au niveau du traitement mécanique qui peut mettre en œuvre différentes variantes, en particulier au niveau des pré-traitements des déchets entrants : criblage, broyage éventuel, …

Les autres paramètres à prendre en compte sont ceux qui définissent le traitement biologique (humidité, température, temps de séjour, nombre de réacteurs en série, …). Ils sont détaillés dans les paragraphes suivants.

2.2.3 Digestion sèche, digestion humide

L'un des principaux paramètres influant dans le traitement biologique est l'humidité du substrat organique dans le méthaniseur. C'est en effet un élément clef qui permet de distinguer les procédés par voie sèche de ceux par voie humide. L'humidité est inversement liée à la teneur en matière sèche (MS) qui conditionne pour partie la viscosité du substrat et par conséquent, influe sur le mode d'homogénéisation et de mélange mis en œuvre dans le méthaniseur. Ce paramètre conditionne donc à la fois l'aspect mécanique et l'aspect biologique du traitement.

On considère généralement que la voie humide est caractérisée par un taux de MS inférieur à 20 % et que la voie sèche est caractérisée par un taux de MS de 20 à 40 %.

La voie sèche est le cas le plus répandu pour la méthanisation des ordures ménagères et est le cas étudié dans cette thèse. Le Tableau 5 illustre les différences entre méthanisation par voie sèche et humide

Tableau 5. Comparaison de la méthanisation par voie sèche et par voie humide

	Méthanisation par voie humide	Méthanisation par voie sèche
Avantages	Homogénéisation du substrat Optimisation du transfert de matière et de chaleur Temps de séjour réduit	Taille réduite du méthaniseur Taux de matière sèche proche de celui des déchets entrants Permet une charge organique plus élevée
Inconvénients	Flux de matière important (car dilution) Equipements de recirculation importants Coût de déshydratation du digestat	Plus difficile à maîtriser (voir "2.3. Spécificités de la voie sèche et des OMR")
Exemple de procédés	Linde KCA, Krueger, BTA, Wassa, Euro/Coccus, BioStab	Linde BRV, Kompogas, Dranco, Valorga

2.2.4 Digestion mésophile ou thermophile

La température de fermentation dans le méthaniseur est un autre paramètre essentiel. En effet, la méthanisation peut être mésophile (autour de 35°C) ou thermophile (environ 55°C). Les premières installations ont été conçues sur le mode mésophile puis le procédé thermophile s'est développé (Hartmann et Ahring, 2006).

Le chauffage des réacteurs s'effectue généralement par circulation d'eau chaude sous différentes formes (enveloppe périphérique, paroi chauffante ou serpentins immergés). L'énergie thermique nécessaire est fabriquée sur place à partir du méthane produit. Cependant, seule une faible fraction de la capacité de production d'énergie de l'installation permet d'assurer le maintien à température produite.

En comparant la méthanisation mésophile et thermophile par voie sèche de la FFOM, Cecchi *et al.* (Cecchi *et al.*, 1992a ; Cecchi *et al.*, 1992b) ont trouvé que la production de biogaz en condition thermophile avec un temps de rétention de 12 jours était d'environ le double de celle en condition mésophile avec un temps de rétention de 15 jours. Une étude économique montrait que cette production supplémentaire de biogaz était suffisante pour compenser l'énergie supplémentaire nécessaire pour chauffer le réacteur à 55°C au lieu de 35°C.

Le Tableau 6 illustre les différences entre méthanisation mésophile et thermophile. Le principal avantage de la digestion thermophile est la possibilité de travailler beaucoup plus rapidement, et donc de diminuer les temps de séjour des composés de manière significative. En revanche, le fonctionnement thermophile occasionne des besoins énergétiques supérieurs, ainsi que la nécessité d'une isolation thermique poussée de l'installation, en particulier dans le cas de conditions hivernales rigoureuses.

Tableau 6. Comparaison de la méthanisation mésophile et thermophile (De Baere, 2000 ; Hartmann et Ahring, 2006)

	Régime mésophile	Régime thermophile
Avantages	Faible énergie mise en œuvre Faible production d'ammoniaque	Degré d'hygiénisation élevé Fermentation rapide (2 à 3 semaines)
Inconvénients	Hygiénisation limitée Rendement de dégradation moyen Fermentation lente (4 à 6 semaines)	Consommation énergétique élevée Pilotage délicat

2.2.5 Géométrie et mélange des réacteurs

Pour assurer une fermentation efficace, le substrat doit être ensemencé de façon homogène en flore microbiologique. Il convient également, pour assurer une bonne dégradation de la matière, de maintenir un temps de séjour minimal. En sortie de méthaniseur, une partie du substrat peut être réintroduite en tête pour augmenter le temps de séjour et recycler la biomasse microbienne épuratrice.

Il existe autant de géométries et de modes d'agitation différents que de constructeurs. On distingue les réacteurs verticaux et horizontaux mais aussi différents modes de fonctionnement :

- En fonctionnement **discontinu** le substrat (déchet) est introduit au début de la réaction, en une seule fois : c'est donc un lot ("batch" en anglais) de substrat qui est traité. A la fin de la réaction le réacteur est vidé et l'opération est recommencée avec un nouveau lot de déchet non digéré.
- En alimentation **continue** le substrat est introduit tout au long de la réaction. Ce type de fonctionnement suppose une alimentation en substrat et un soutirage du milieu (à un même débit, afin que le volume reste constant). L'avantage d'un tel système est que la transformation du ou des substrats peut, en théorie, se poursuivre indéfiniment. L'installation est donc utilisée à plein temps (intérêt économique).
- En alimentation **semi-continue** ou **séquentielle**, comme en alimentation continue, le substrat est introduit tout au long de la réaction et un soutirage de milieu est effectué. Cependant, ces opérations d'alimentation et de soutirage ne sont pas effectuées en continu mais à des intervalles plus ou moins réguliers et plus ou moins espacés (par exemple : trois fois par semaine ; Lemaire *et al.*, 2005). Ce mode d'alimentation est particulièrement adapté à la digestion par voie sèche où le substrat à alimenter et le digestat à soutirer peuvent difficilement être pompés de façon continue régulière.

En ce qui concerne le mode de mélange, les réacteurs de méthanisation en continu se différencient généralement entre des fonctionnements en mode « **agité** » ou « **piston** ».

En mode **agité**, le contenu du réacteur est mis en mouvement (de manière continue ou non) dans l'optique d'atteindre une concentration homogène en tout point.

En mode **piston**, le milieu qui alimente le réacteur se déplace depuis l'entrée vers la sortie sans se mélanger avec le reste du contenu. Le déchet alimenté entre par une extrémité du réacteur (généralement un tube horizontal) et est soutiré à l'autre extrémité. La longueur du tube et l'absence d'agitation empêche le mélange total dans le réacteur. Il en résulte que l'avancement de la réaction est croissant tout au long du réacteur.

Dans la réalité, le comportement est légèrement différent de ces « modèles » agités et piston. Dans un réacteur mélangé, le déchet ne sera que partiellement homogénéisé sur tout le volume considéré. Dans le réacteur piston, un effet de mélange avec le reste du contenu du réacteur se produit immanquablement, ne serait-ce que pour permettre l'ensemencement du déchet frais avec des bactéries anaérobies.

L'agitation du milieu réactionnel peut être assurée par des pièces mécaniques (Kompogas, Linde, …), par pompage en bas et recirculation du digestat en haut du réacteur (Dranco) ou par injection de biogaz (Valorga) (Cecchi *et al.*, 1988). La Figure 6 illustre ces principales technologies de méthanisation par voie sèche.

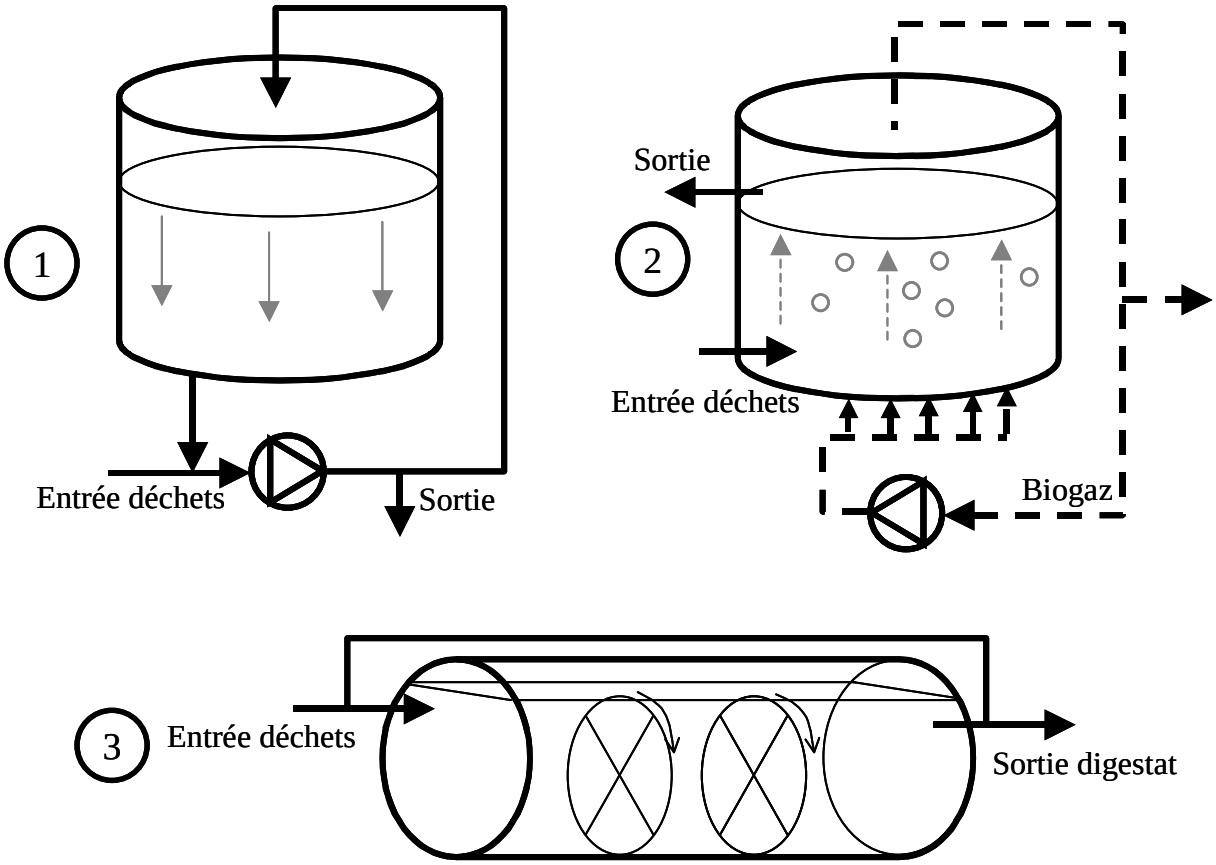


Figure 6. Principales technologies de digestion sèche. 1 : à recirculation de digestat (Dranco) ; 2 : recirculation de biogaz (Valorga) ; digesteurs pistons horizontaux (Kompogas, BRV), d'après Buffière et Frederic, 2008

2.2.6 Les digestions en une ou deux étapes

Enfin, la dégradation anaérobie de matières biodégradables peut être réalisée en une seule phase ou en dissociant les phases d'hydrolyse et de méthanogenèse (De Baere, 2000). Dans le cas d'une fermentation en deux phases, la cuverie est généralement conçue de manière à réaliser l'hydrolyse et la méthanogenèse dans deux réacteurs distincts en série. Ce dispositif permet, en théorie, d'optimiser les cinétiques biochimiques, c'est à dire d'augmenter la production de biogaz. Cependant, il semble que les performances observées réservent cet investissement additionnel pour des unités qui traitent des déchets susceptibles de provoquer des phénomènes d'inhibition, comme certains résidus agroalimentaires ou de restauration. Le Tableau 7 illustre les différences entre méthanisation en une ou deux étapes (Hartmann et Ahring, 2006).

Tableau 7. Comparaison de la méthanisation en une étape et en deux étapes

	Une étape	Deux étapes
Avantages	Procédé simple Investissement moins important (cuverie plus limitée)	Adaptation aux conditions du processus, optimisation de chacune des phases Réduction de séjour en méthanisation
Inconvénients	Difficulté de réunir dans le même méthaniseur toutes les conditions optimales pour l'ensemble des phases de méthanisation	Machines et équipements plus coûteux Contrôle commande du processus plus sophistiqué

2.3 Spécificités de la voie sèche et des OMR

2.3.1 Introduction

Le terme de déchet solide est régulièrement utilisé pour désigner l'ensemble des composés qui ne sont pas solubles, ou dont la majorité est sous forme insoluble. C'est pourquoi les boues d'épuration sont, par exemple, désignées comme des déchets solides, même si elles se présentent sous forme liquide. Nous définirons les déchets solides comme étant caractérisés par certains critères : faible teneur en eau et/ou caractère hétérogène (présence d'éléments de taille et de nature variées) et/ou leur difficulté à être pompés. Les OMR répondent à ces trois critères. Du point de vue de la méthanisation, les déchets solides nécessitent le développement de procédés et de techniques spécifiques et différents de ceux utilisés pour la digestion anaérobie des eaux résiduaires ou des boues (Buffière et Frederic, 2008).

Depuis les travaux pionniers de Jewell et ses collaborateurs à la fin des années 1970 et au début des années 1980 (Wujcik et Jewell, 1980), la digestion anaérobie par voie sèche est devenue une technologie attractive pour stabiliser les déchets agricoles, agroalimentaires et municipaux (Cecchi *et al.*, 1988 ; Rivard *et al.*, 1990 ; Poggi-Varaldo et Oleszkiewicz, 1992 ; Kayhanian et Tchobanoglous, 1993).

Toutefois, peu de connaissances sont disponibles quant aux effets potentiels d'inhibiteurs et de toxiques sur ce procédé (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b)

2.3.2 L'hydrolyse

L'hydrolyse est la première étape de la méthanisation de substrats organiques particulaires. Pendant l'hydrolyse, les polymères sont convertis en monomères et oligomères solubles (Zeeman et Sanders, 2001). Plusieurs auteurs décrivent l'hydrolyse avec une relation cinétique du premier ordre (Pavlostathis *et al.*, 1988). L'analyse des cinétiques d'hydrolyse et de dégradation des monomères montre que l'hydrolyse est la phase limitante (Ubukata, 1992).

Cette relation est empirique et ne permet pas de refléter l'effet de la taille des particules de polymères (Hills et Nakano, 1984). Des modèles ont donc été développés, basés sur les propriétés physiques des particules dans lesquels la vitesse d'hydrolyse est, par exemple, une constante par unité de surface des particules (Hills et Nakano, 1984 ; Siegriest *et al.*, 1993 ; Vavilin, 1996 ; Kiely *et al.*, 1997 ; Christ *et al.*, 2000). Dans tous les cas, la recherche expérimentale des paramètres cinétiques de ces modèles montre l'hydrolyse comme la phase limitante de la méthanisation (Sanders, 2001), y compris pour des ordures ménagères (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997a).

Des expériences sur la méthanisation des particules des boues primaires de station d'épuration montrent une absence d'accumulation de monomères (Eastman et Ferguson, 1981). Dans des expériences de culture pure continue avec de la cellulose comme substrat, les concentrations en sucres réducteurs sont négligeables en comparaison des quantités de cellulose dégradées (Pavlostathis *et al.*, 1988). Ces résultats montrent également des limitations par l'hydrolyse car, si l'hydrolyse était plus rapide que les réactions de dégradation des produits de l'hydrolyse, alors ces produits intermédiaires s'accumuleraient dans le milieu réactionnel.

2.3.3 Influence de la taille des particules

La taille des particules du déchet joue un rôle important dans la méthanisation des ordures ménagères. En effet, elle influe sur l'accessibilité au substrat des enzymes hydrolytiques et a donc un effet sur les cinétiques d'hydrolyse.

Dans le cas de la méthanisation d'effluents liquides, la formation de globules de protéines et de graisses ou la présence de structures lignocellulosiques diminue, de manière physique, la vitesse d'hydrolyse (Chandler *et al.*, 1980 ; Tong *et al.*, 1990 ; Sanders *et al.*, 2000). Ce type de phénomène sera d'autant plus prononcé dans le cas d'ordures ménagères dont les particules peuvent mesurer jusqu'à plusieurs centimètres. Autant dans la méthanisation d'effluents liquide il faut éviter la formation de globules, autant, pour les déchets solides, la réduction de la taille des particules est un problème spécifique de ce type de déchet. Cette réduction se fait au moyen de pré-traitements (tri, broyage, criblage, …).

La réduction de la taille des particules permet d'augmenter la surface spécifique des déchets, favoriser l'imprégnation par l'eau, homogénéiser la fraction biodégradable et supprimer les barrières constituées de matériaux imperméables (Sharma *et al.*, 1988).

Hansen *et al.* (2007) ont montré que, pour un même déchet, différents pré-traitements (presse à vis, écran à disques rotatifs, déchiqueteur + électroaimant) aboutissaient à des tailles de particules différentes et à des compositions différentes.

Palmowski et Müller (2000) ont montré qu'une réduction de la taille de déchets solides permet, d'une part, de rendre accessible une plus grande part de matière organique et donc d'améliorer le rendement en biogaz, et, d'autre part, d'accélérer l'étape d'hydrolyse et part là même l'ensemble du procédé. Sur des déchets de tomate, Hills et Nakano (1984) ont produit 0,81 m^3 de CH_4 par m^3 de réacteur et par jour avec des particules de 1,3 mm contre seulement 0,25 $m^3/m^3/j$ pour des particules de 20 mm. Dans une étude de Mshandete *et al.* (2006), une augmentation de la dégradation de fibres de sisal[2] de 31 à 70 % a été obtenue pour des fibres de 2 mm de long par rapport aux fibres non traitées.

D'autres études suggèrent que le broyage puisse induire un effet négatif sur la dégradation des déchets en favorisant une hydrolyse initiale excessive et la formation d'acides qui empêchent la méthanogenèse (Vigneron, 2005 ; voir 3.4. Les acides gras volatils (AGV)). De plus, un broyage trop fin peut entraîner des problèmes mécaniques suite à la formation d'un milieu pâteux trop compact.

A l'échelle industrielle il faut, de plus, trouver un compromis entre un prétraitement moins coûteux et une production de biogaz accrue et plus rapide par un broyage plus poussé. Ces problématiques liées à la taille des particules sont spécifiques aux déchets solides. De plus, les OMR qui peuvent contenir des éléments résistants (métaux, verres, plastiques rigides) sont plus difficiles à broyer que de simples déchets végétaux.

2.3.4 Mélange

Il a longtemps été considéré, par analogie avec la méthanisation de liquides, qu'il fallait fortement mélanger le contenu des méthaniseurs de déchets solides afin de permettre une bonne répartition des enzymes et des micro-organismes dans le substrat ainsi qu'améliorer les transferts de matière et de chaleur (Karim *et al.*, 2005).

Cependant, dans le cas de la méthanisation d'ordures ménagères, il a été démontré plusieurs fois que la réduction du niveau de mélange, ou un mélange discontinu dans le temps,

[2] sisal : agave du Mexique dont les fibres sont utilisées pour réaliser des matières textiles

permettait d'atteindre de meilleures performances (McMahon *et al.*, 2001 ; Stroot *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2002). Vavilin et Angelidaki (2004) ont émit l'hypothèse qu'un mélange moins poussé permet la formation de zones localisées de méthanogenèse dans le réacteur. En effet, la méthanogenèse peut être inhibée par les acides ou la baisse de pH produits par l'acétogenèse. Si le mélange est trop poussé, les micro-organismes méthanogènes sont mis directement en contact avec ces acides. A l'inverse, avec moins d'agitation, il peut se former des zones dans lesquelles la méthanogenèse a lieu et vers lesquelles les acides diffusent passivement et donc plus lentement ; laissant ainsi le temps aux méthanogènes de les dégrader au fur et à mesure.

D'autres auteurs ont observé qu'une plus faible vitesse d'agitation n'avait pas d'effet significatif sur les performances de la méthanisation (Rivard *et al.*, 1990 ; Gomez *et al.*, 2006). En particulier, sur une installation d'échelle industrielle (procédé Dranco), traitant des ordures ménagères par voie sèche (32 % de MS), Six et De Baere (1992) ont observé qu'une réduction de la fréquence d'agitation permettait d'atteindre les mêmes performances tout en consommant moins d'énergie pour l'agitation.

2.3.5 Problématique de la spécificité de la digestion sèche d'OM

Nous avons vu que la méthanisation des déchets solides par voie sèche présente un certain nombre d'avantages pour le traitement des ordures ménagères par rapport à d'autres technologies, biologiques ou non. Cependant, cette technologie a besoin de devenir plus fiable et mieux maîtrisée afin de devenir plus économiquement viable (De Baere, 2006). En particulier, à l'échelle industrielle, la relation entre les performances du digesteur et les caractéristiques du déchet est difficile à prédire (Cecchi *et al.*, 1988 ; Mata-Alvarez *et al.*, 2000). En conséquence, il peut en résulter des difficultés pour dimensionner et pour piloter les méthaniseurs industriels. C'est pourquoi des "outils" sont nécessaires pour la recherche fondamentale et appliquée afin d'obtenir une plus grande expertise de la méthanisation par voie sèche. Notamment, une meilleure connaissance des mécanismes d'hydrolyse, des effets de différents traitements et de la prédiction des performances serait utile (Mata-Alvarez, 2003).

La méthanisation par **voie sèche** entraîne de nombreux problèmes d'inhibition (Liu *et al.*, 2006b) et est plus difficile à contrôler. En particulier, il est impossible de séparer la biomasse microbienne des solides constituant le substrat et on ne peut donc pas connaître la quantité de micro-organismes dans le méthaniseur. Il faut extraire une fraction soluble du digestat avant que la plupart des dosages puisse être réalisée. Signalons également que nous ne sommes pas dans un milieu dilué et que la notion même de "concentration" est à adapter. Compte tenu de la présence de matériaux abrasifs (métaux, verre) dans le déchet, il est techniquement difficile de réaliser des mesures en ligne. Enfin, en plus de la complexité de l'écosystème microbien impliqué, les déchets solides eux même sont par nature hétérogènes en taille en composition et en structure (Rivard *et al.*, 1993) ; cette hétérogénéité se retrouve au niveau du digestat lors de la prise d'échantillon.

Peu d'études en laboratoire ont été réalisées sur la méthanisation par voie sèche des ordures ménagères (Kayhanian et Rich, 1995 ; Hartmann et Ahring, 2006). De plus, la plupart de ces études utilisent des déchets modèles et/ou broyés finement ou pulpés (Rivard *et al.*, 1990 ; Poggi-Varaldo et Oleszkiewicz, 1992). Nous reviendrons dans la suite aux principaux résultats de ces études.

3 Influence des conditions physico-chimiques

3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu (2.3 Spécificités de la voie sèche), la méthanisation par voie sèche semble sensible à certaines conditions physico-chimiques, en particulier pour ce qui concerne l'inhibition par certains composés. Paradoxalement, c'est pour cette voie qu'il existe le moins de données expérimentales sur l'influence des conditions physico-chimiques sur les performances des réacteurs.

Nous abordons dans cette partie, d'une part, l'influence de la température sur le déroulement de la réaction biologique, d'autre part, les équilibres de différents solutés importants dans le déroulement de la dégradation : les intermédiaires réactionnels (tels que les acides gras volatils), les produits de fermentation ayant un impact sur la cinétique et les équilibres (tel que l'azote ammoniacal), le pH, la concentration de certains cations. Il est clair que ces paramètres interagissent fortement : en particulier, les équilibres des solutés conditionnent la valeur du pH. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que ces solutés peuvent, dans un milieu concentré tel que celui de la digestion sèche, devenir des inhibiteurs potentiels de la réaction biologique.

A l'échelle industrielle, l'enjeu est de taille car les installations fonctionnent souvent avec un circuit de recirculation d'eau : certains composés, potentiellement inhibiteurs, sont donc susceptibles de s'accumuler (Wang *et al.*, 1997 ; Bilgili *et al.*, 2007). Il s'agit donc de mieux connaître les seuils tolérables et les gammes de fonctionnement de ces réacteurs (Hartmann et Ahring, 2005).

3.2 La température

La température est primordiale car elle conditionne la vitesse des réactions enzymatiques. Des microorganismes sont capables de se développer à de nombreuses températures différentes (Ananthanarayan et Jayaram Paniker, 1978). Trois gammes de température sont déterminées :

- Zone psychrophile pour des températures inférieures à 20°C
- Zone mésophile de 20 à 45°C avec un optimum à 35°C
- Zone thermophile de 45 à 65°C avec un optimum à 55°C

Toutefois, la croissance des méthanogènes est optimale pour une température supérieure à 30°C. Or, les réactions de dégradation anaérobie de la matière organique sont athermiques. Les conditions optimales de température ne peuvent donc pas être obtenues sans apport de chaleur extérieure.

Dans le cadre de la méthanisation des déchets solides à l'échelle industrielle, la température est généralement bien maîtrisée. En cas de chute de température, pour cause de panne par exemple, un ralentissement de la production de biogaz est observé. Toutefois, il est souvent réversible et la production de gaz reprend dès que la température atteint à nouveau des gammes proches de l'optimum. Cependant, il faut noter que la conversion en méthane de l'acétate est plus sensible à la température que la formation d'acétate (Speece, 1996). Une accumulation d'AGV (acétate) peut donc accompagner une chute de température, ce qui peut entraîner une baisse du pH (voir le chapitre "3.4. Les acides gras volatils (AGV)" pour plus de détails). En outre, la composition en principaux AGV produits (acétate, propionate et butyrate) change en fonction de la température (Nozhevnikova *et al.*, 2000). Cela est dû au

fait que le butyrate est le substrat préférentiel des micro-organismes qui dégradent les AGV et que cela est d'autant plus marqué à de plus faibles températures.

L'augmentation de la température a en général pour effet d'accroître la vitesse de dégradation sans toutefois modifier la production cumulée de méthane. Il ne faut toutefois pas que les températures varient trop rapidement afin de permettre à la flore microbienne de s'adapter aux conditions du milieu (Vigneron, 2005).

Par ailleurs, la température agit sur les équilibres des espèces chimiques en solution, notamment des formes de l'azote ammoniacal, des sulfures et des AGV.

3.3 Le pH et l'alcalinité

Une chute de pH est, en général, le signe de l'accumulation des AGV. L'alcalinité, exprimée en équivalents carbonate de calcium, joue le rôle de tampon pH du milieu (Dinamarca *et al.*, 2003). Les acides organiques et les sels d'acides faibles y contribuent.

La plupart des micro-organismes se développent de façon optimale dans les conditions de pH neutres (Ananthanarayan et Jayaram Paniker, 1978). Les milieux acides ou basiques altèrent l'équilibre chimique des réactions enzymatiques ou détruisent les enzymes.

Tableau 8. Effets du pH sur les différentes étapes de minéralisation anaérobie de la matière organique

Auteurs	Etape	Substrat	pH	Effet
He *et al.*, 2006	Hydrolyse	Protéines	≤ 8	Aucun effet sur l'hydrolyse
Ueno *et al.*, 2006		Polysaccharides	7	pH optimal
			≤6	Ralenti de moitié l'hydrolyse
Sanders *et al.*, 2000		Boues primaires	6,5	pH optimal
Elefsiniotis *et al.*, 1996		Déchets particulaires	6,1 – 5,1	Ralenti l'hydrolyse
			5,1 – 4,1	Pas d'effet sur l'hydrolyse
Veeken *et al.*, 2000		FFOM	7 – 5	Ralenti l'hydrolyse
Yu et Fang, 2002	Acidogenèse	Gélatine	5,9 à 6,0	pH optimal
Kim *et al.*, 2004	Acétogenèse	Butyrate	4,5 – 5	pH optimal
Kim *et al.*, 2004		Propionate	5 - 6	pH optimal
Boopathy, 1996	Méthanogenèse	Lisier	5,5 – 7,5	Gamme de croissance
			6,8	pH optimal
Costello *et al.*, 1991	Méthanogenèse acétotrophe	Glucose	7 – 7,2	pH optimal
Savant *et al.*, 2002	Méthanogenèse hydrogénotrophe	Eaux usées de distillerie	6,0	pH optimal

Le Tableau 8 présente l'effet du pH décrit dans la littérature sur les différentes étapes de la digestion anaérobie de la matière organique. Pour les différents substrats métabolisés, l'hydrolyse et l'acidogenèse semblent peu affectées par le pH même à des valeurs faibles. En revanche, la gamme de pH autorisant l'expression des métabolismes acétogènes et méthanogènes est plus restreinte et généralement strictement supérieure à une valeur de 6.

La valeur de pH peut ainsi limiter une activité microbienne ou induire au sein de la communauté microbienne des voies métaboliques anaérobies différentes (Kim *et al.*, 2004 ; Ueno *et al.*, 2006). Le pH peut également avoir un effet inhibiteur par son rôle indirect sur les équilibres chimiques en solution de l'azote ammoniacal, des sulfures et des acides organiques.

Lay *et al.* (1997a) ont montré, dans une étude en batch, que la vitesse spécifique de production de méthane maximale était obtenue pour un pH entre 7 et 8 alors que les temps de latence les plus courts étaient obtenus pour un pH entre 6 et 7.

Dans le domaine de la digestion des solides, les gammes de pH couramment rencontrées sont comprises entre 7 et 8 (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b ; Bolzonella *et al.*, 2003).

3.4 Les acides gras volatils (AGV)

Les AGV sont un des produits de l'hydrolyse de la matière organique des déchets (voir 2.1.2 L'hydrolyse). Ils sont d'importants intermédiaires métaboliques entre les populations fermentaires et acétogènes. Si leur consommation est moins rapide que leur production, alors ils peuvent s'accumuler dans le réacteur. L'accumulation d'AGV est observée dans les cas de surcharge en matière organique (notamment facilement biodégradable ; Borzacconi *et al.*, 1997), de changements de température (Nozhevnikova *et al.*, 2000) et d'inhibition de la méthanogenèse (par l'ammoniac par exemple ; Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b).

Veeken *et al.* (2000) ont évalué séparément les rôles du pH, des AGV totaux et des AGV non dissociés (AGVH) sur le processus de digestion anaérobie dans son ensemble. Les formes dissociées ou non des AGV sont directement reliées au pH du milieu selon l'équilibre acide base suivant :

$$\mathrm{AGVH} \leftrightarrow \mathrm{AGV}^- + \mathrm{H}^+$$

Un pH acide aura donc tendance à déplacer l'équilibre vers la gauche (AGV non dissociés majoritaires) tandis qu'un pH basique aura tendance à le déplacer vers la droite (AGV dissociés majoritaires). A 25°C, les pKa de l'acétate et du butyrate sont respectivement de 4,75 et de 4,81. Dans les conditions normales de la méthanisation, les formes dissociées des AGV prédominent très largement.

De fortes concentrations en AGV peuvent entraîner une baisse de la production de méthane (Ahring et Westermann, 1988 ; Fukuzaki *et al.*, 1990). Aguilar *et al.* (1995) observent une inhibition significative de la digestion anaérobie à partir de 10 g/ℓ de chaque espèce d'AGV. Le substrat d'origine et le procédé de méthanisation utilisé influent sur la stabilité et la résistance du processus lors de fortes teneurs en AGV. De plus, les AGV agissent sur l'ensemble de la chaîne microbienne (Vedrenne, 2007).

Les AGV affectent également l'hydrolyse des déchets particulaires (Veeken *et al.*, 2000). Or cette étape peut être limitante dans la digestion anaérobie, notamment pour les substrats solides. Lors de l'acidogenèse, le processus anaérobie tend à devenir auto-inhibiteur par l'accumulation d'AGV, ce qui peut induire une baisse du pH consécutive à la diminution de l'alcalinité du milieu. L'acidogenèse est cependant moins sensible aux fortes teneurs en AGV que l'hydrolyse (Siegert et Banks, 2005). Borzacconi *et al.* (1997) montrent également dans un milieu de fermentation reproduisant les conditions d'un centre de stockage de déchets, que la phase de méthanogenèse est plus touchée par l'accumulation d'AGV que les autres phases.

La chute de pH associée à l'accumulation des AGV est généralement considérée comme la cause principale d'inhibition de la méthanisation par les AGV. Mais le rôle spécifique de chaque AGV sur le processus global de dégradation anaérobie fait encore débat et n'est pas complètement compris (Hobson et Shaw, 1976 ; Barredo et Evison, 1991 ; Pullammanappallil *et al.*, 2001).

Considérée seule, chaque espèce d'AGV peut totalement inhiber l'étape de méthanogenèse. D'une façon générale, le propionate est l'AGV le plus toxique et le plus étudié (Barredo et Evison, 1991).

L'acidogenèse et l'acétogenèse conduisent à des teneurs variables d'AGV dans le milieu, ainsi qu'à une répartition différente entre les trois principaux acides. Les consommations de ces différentes espèces d'AGV peuvent alors être soumises à des inhibitions compétitives (Mösche et Jördening, 1999). Par exemple, la dégradation d'une concentration élevée de butyrate a un effet sur tous les autres AGV. En condition mésophile, l'augmentation de la concentration d'un AGV réduit le taux de consommation de l'autre. La consommation du propionate est sévèrement inhibée par l'acétate à 3 g/ℓ pour van Lier *et al.* (1993) et à 0,2 g/ℓ pour Gorris *et al.* (1989). La dégradation du propionate et du butyrate peut aussi être thermodynamiquement inhibée par des concentrations élevées en acétate (Ahring et Westermann, 1988 ; Hickey et Switzenbaum, 1991). Mais, pour Pind *et al.* (2003), la dégradation de l'acétate n'est inhibée par aucun des autres AGV jusqu'à des concentrations de 3 à 4 g/ℓ.

L'inhibition de la production de méthane survient également avec de faibles teneurs en AGV non dissociés. Mawson *et al.* (1991) relient l'inhibition de la consommation des différentes espèces d'AGV à la présence des formes AGVH à des concentrations de 10 à 60 mg/ℓ. Par ailleurs, la prise en compte des AGVH dans les modèles d'inhibition de la digestion anaérobie dans son ensemble (Mösche et Jördening, 1999) ou au niveau de l'hydrolyse (He *et al.*, 2006), permet de rendre compte des défauts en production de biogaz.

L'accumulation des AGV lors de processus de digestion anaérobie peut aussi être le résultat de déséquilibres entre les différentes étapes microbiennes et ne pas être liée à des inhibitions causées par les AGV eux-mêmes (Nielsen *et al.*, 2007), mais plutôt, par exemple, à une inhibition par un autre composé. **La présence de certains AGV est alors la conséquence d'une inhibition et non sa cause.** Le suivi des AGV lors de la dégradation anaérobie est essentiel pour la détection d'un problème éventuel de stabilité du processus. En effet, de nombreux auteurs ont montré que lors d'une inhibition du système, les AGV s'accumulent (Bolzonella *et al.*, 2003). Pour plus de détails, se référer aux chapitres "3.6.4. Sensibilité des différentes flores bactériennes à l'azote ammoniac" et "5.2.2. Dosage des composés intermédiaires".

3.5 Les cations

Les cinq cations les plus communs sont l'ammonium, le calcium, le magnésium, le potassium et le sodium. Ils peuvent avoir un impact significatif sur la méthanisation ; positif ou négatif selon leur concentration. Ils peuvent provenir du déchet ou de l'eau ajoutée au procédé. Le Tableau 9 liste les concentrations susceptibles d'avoir un effet sur la méthanisation d'après les travaux de Kugelman et McCarty (1965). Ils peuvent avoir des effets inhibiteurs synergiques ou antagonistes les uns avec les autres (Kugelman et Chin, 1970). L'ion ammonium fait l'objet d'un chapitre à part ci-dessous.

Tableau 9. Concentrations en cations métalliques stimulatrices et inhibitrices de la méthanisation

Cation	Concentration stimulatrice (mg/ℓ)	Concentration modérément inhibitrice (mg/ℓ)	Concentration fortement inhibitrice ou toxique (mg/ℓ)
Ammonium	50 – 200	1000 – 1500	3000
Calcium	100 – 200	2500 – 4500	8000
Magnésium	75 – 150	1000 – 1500	3000
Potassium	200 – 400	2500 – 4500	12000
Sodium	100 - 200	3500 - 5500	8000

3.6 L'azote ammoniacal

3.6.1 Mécanisme de formation de l'azote ammoniacal

L'azote organique est l'azote lié au carbone pour former des molécules complexes. Dans les êtres vivants, l'azote organique se trouve principalement dans les protéines, les acides nucléiques (ADN, ARN), dans certains polysaccharides comme la chitine (carapace des arthropodes) ou encore le peptidoglycane (paroi des microorganismes).

La minéralisation est le processus de transformation des composés organiques en composés minéraux. Ce processus résulte des réactions cataboliques des microorganismes hétérotrophes et permet de fournir l'énergie nécessaire à la croissance microbienne. Ce processus transforme une partie de l'azote organique en azote ammoniacal : c'est l'ammonification. Au cours de ce processus, l'hydrolyse enzymatique des protéines se traduit par le relargage d'acides aminés qui sont assimilés ou catabolisés pour la croissance. Les acides aminés sont alors transformés, par fermentation, par des microorganismes anaérobies en dioxyde de carbone, en azote ammoniacal et en acides gras volatils (Jorgensen et Halling-Sorensen, 1993). L'azote ainsi minéralisé peut alors être utilisé par les bactéries pour leur croissance. L'excès de composés azotés, non nécessaires à la croissance bactérienne, est excrété par les processus de déamination ou d'ammonification en un mélange d'ammoniac (NH_3) et d'ion ammonium (NH_4^+) dont l'équilibre est fonction du pH et de la température.

L'azote ammoniacal provient également de la mort puis de la lyse cellulaire des microorganismes. Les microorganismes capables de minéraliser les composés organiques sont particulièrement nombreux et peu spécifiques.

La principale voie de conversion de l'azote contenu dans les déchets est l'ammonification, puis la solubilisation dans la phase liquide. Si l'on excepte les besoins des microorganismes pour leur croissance, l'azote ammoniacal en conditions anaérobies ne peut théoriquement pas être transformé par les voies classiques de dégradation de l'azote. Signalons néanmoins le cas particulier de la réaction anammox (oxydation anaérobie de l'ammonium ; Graaf *et al.*, 1995) qui nécessite la présence de nitrite dans le milieu. Cette réaction très spécifique ne peut généralement pas avoir lieu au cours d'une opération de méthanisation classique.

Les besoins en azote pour la croissance des bactéries méthanogènes sont plutôt limités, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. A l'échelle industrielle, le digestat sortant est pressé et les jus de presse sont recyclés dans le procédé afin d'économiser de l'eau. Lorsque l'azote est en excès par rapport aux besoins pour la croissance de la biomasse (et c'est généralement le cas pour les déchets ménagers), la majeure partie de l'azote ammoniacal se retrouve en solution dans les jus de presse, ce qui peut entraîner une accumulation d'azote ammoniacal dans le réacteur.

3.6.2 Equilibre entre l'ammoniac et l'ammonium

En milieu aqueux, l'azote ammoniacal est présent sous deux formes en équilibre[3] : NH_4^+ et NH_3. L'équilibre entre les deux formes est relié au pH du milieu selon l'équilibre acide base suivant :

$$NH_4^+ \leftrightarrow NH_3 + H^+$$

Un pH acide aura donc tendance à déplacer l'équilibre vers la gauche (ion ammonium majoritaire) tandis qu'un pH basique aura tendance à le déplacer vers la droite (ammoniac libre majoritaire).

Ka est la constante d'équilibre acido-basique de l'ammonium, qui vaut $10^{-9,25}$ à 25°C (298 K). Cette constante varie avec la température selon l'équation **(1)** :

$$\textbf{(1)} \qquad \ln(Ka_{T2}) = \ln(Ka_{T1}) + \frac{\Delta rH°}{R}\left(\frac{1}{T1} - \frac{1}{T2}\right)$$

Dans laquelle ΔrH° est l'enthalpie standard de réaction ($\Delta rH°_{NH3/NH4+}$ = 51965 J/mol), R est la constante des gaz parfaits (8,3145 $J.mol^{-1}K^{-1}$) et T est la température en Kelvin. Rappelons que pKa = $-\log_{10}(Ka)$.

$$\textbf{(2)} \qquad [NH_3] = \frac{N_{ammo}}{1 + 10^{pKa - pH}}$$

Ces relations montrent qu'une baisse de la température entraîne une augmentation de la valeur de pKa du couple NH_4^+/NH_3. A température ambiante, à un pH de 9,25, 50% de l'azote ammoniacal est sous forme de NH_3. Pour chaque diminution d'une unité pH, il y a une diminution d'un facteur dix de la concentration en NH_3. Ainsi, à pH = 7, la forme NH_4^+ prédomine largement. Cependant, une augmentation de la valeur de pH de 7 à 8 provoque une augmentation de la teneur en ammoniac libre de huit fois (Figure 7). A 35 et 55°C, le pKa est respectivement de 8,95 et 8,41. Une élévation de la température entraîne donc un déplacement de l'équilibre favorable à la formation de NH_3.

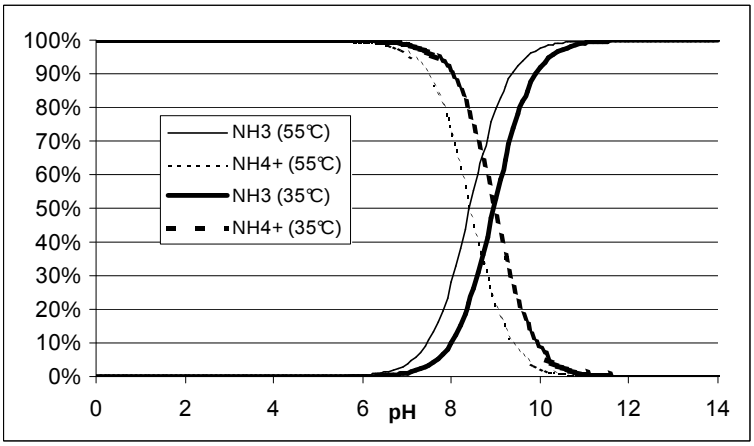


Figure 7 : Répartition des formes libre et ionisée de l'ammoniac en fonction du pH à 35 et 55°C

[3] : $N\text{-}NH_4^+$: azote ammoniacal sous forme ion ammonium

$N\text{-}NH_3$: azote ammoniacal sous forme libre

N_{ammo} : azote ammoniacal total ($N\text{-}NH_4^+ + N\text{-}NH_3$)

3.6.3 Effet de l'azote ammoniacal sur la méthanisation

L'azote ammoniacal est indispensable aux métabolismes microbiens et stimule l'activité méthanogène. Etant donné que la formule empirique de la biomasse est $C_5H_7O_2$**N**, suivant le taux de croissance des microorganismes, il faudrait 3 à 6 kg d'azote pour 1000 kg de DCO consommée ou 0,5 à 1 kg d'azote pour 60m^3 de méthane produit. Ainsi, il faut 3,3mg de N_{NH4+} pour dégrader 1g d'acétate (Takashima et Speece, 1989). Il est considéré d'une manière générale que jusqu'à des concentrations de 200 mg/ℓ, l'azote ammoniacal est bénéfique aux procédés anaérobies (Liu et Sung, 2002). De plus, il a été noté que la concentration en N-NH_4 dans un réacteur en phase liquide doit être maintenue en excès de 40 à 70 mg/ℓ pour éviter toute diminution de l'activité de la biomasse (Speece, 1996). En effet, cet azote est nécessaire à la croissance car les cellules microbiennes sont composées de 10 à 20 % de protéines pour 80 à 85 % d'eau (Hu, 2003) et la teneur des protéines en azote est comprise dans une plage allant de 15 à 18 % d'azote.

Toutefois, les composés azotés qui sont apportés par le déchet entrant sont une source importante de problèmes opérationnels rencontrés dans la digestion anaérobie des ordures ménagères ; et en particulier l'azote ammoniacal (Fricke *et al.*, 2007). A l'échelle industrielle, l'ammoniac est le principal facteur de perturbation des installations de méthanisation (Angeladiki *et al.*, 2005). **Des concentrations trop élevées en azote ammoniacal peuvent entraîner d'importantes inhibitions de la méthanisation et sont un des principaux problèmes liés à la digestion anaérobie par voie sèche** (Liu *et al.*, 2006b). Par exemple Kroeker *et al*. (1979) trouvent, pour la méthanisation de lisier de porc, qu'une inhibition apparaît à partir de 2 000 mg/ℓ et augmente jusqu'à atteindre une inhibition totale à 7 000 mg/ℓ.

Les effets inhibiteurs de l'ammonium (NH_4^+) et de l'ammoniac libre (NH_3) sont distingués dans de nombreuses études (Kroeker *et al.*, 1979 ; Wujcik et Jewell, 1980 ; Braun *et al.*, 1981 ; Koster, 1986 ; Lay *et al.*, 1997b ; Jewell *et al.*, 1999). Pour la plupart d'entre eux ce serait la forme libre (NH_3) qui serait la forme toxique. Elle serait capable de dénaturer les protéines membranaires et de se diffuser passivement dans les cellules des micro-organismes. **Toute augmentation de pH devrait donc augmenter la toxicité** (Koster et Koomen, 1988).

Toutefois, une autre étude (Lay *et al.*, 1997b ; Lay *et al.*, 1998) accorderait plus d'importance à la concentration en ion ammonium (NH_4^+). La concentration en NH_3 aurait un effet sur le temps de latence de l'inhibition et non pas sur l'inhibition en elle-même. De plus, dans le cas d'une acclimatation préalable des micro-organismes à de fortes concentrations en azote ammoniacal, la forme toxique serait le NH_4^+, alors que pour des micro-organismes non adaptés à l'azote ammoniacal, ce serait la forme NH_3. Cette étude est toutefois la seule à aller à l'encontre de la première théorie définissant le NH_3 comme la forme toxique de l'azote ammoniacal. Au vu des résultats, nous pouvons supposer que c'est un effet du pH optimal de la méthanisation qui a été observé plutôt que l'impact du pH sur l'ionisation de l'ammoniac.

3.6.4 Sensibilité des différentes flores bactériennes à l'azote ammoniacal

D'une façon générale, les auteurs s'accordent pour dire que la flore thermophile supporte mieux les fortes concentrations en NH_3 que la flore mésophile (Jarrell *et al.*, 1987). Par exemple, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (thermophile) résiste à des doses d'ammoniac total deux fois plus élevées que *Methanobacterium formicicum* et *Methanosarcina barkeri* (mésophiles) et des doses cinq fois plus élevées que *Methanospirillum hungatei* (mésophile).

Parmi le consortium de micro-organismes de la digestion anaérobie, les méthanogènes sont les espèces dont le taux de croissance est le plus bas : elles sont donc plus sujettes à

cesser de produire suite à divers types de stress environnementaux, tels que des surcharges en acides gras ou en ammoniaque (Koster et Lettinga, 1984 ; Krylova *et al.*, 1997 ; Hansen *et al.*, 1998).

Toutefois, une étude de Calli *et al.* (2005) montre le contraire à partir d'observations microscopiques avec identification des différentes populations de micro-organismes (technique de FISH[4]). Ils ont observé une accumulation de propionate et une diminution des bactéries acétogènes dans le cas d'ajouts d'ammoniac à un milieu contenant de l'acétate comme substrat. Toutefois, lorsque le substrat était du butyrate, les bactéries acétogènes consommatrices de butyrate n'étaient pas inhibées, ce qui révèle la résistance des bactéries acétogènes consommatrices de butyrate.

Ceci est très important car la consommation des acides gras par les méthanogènes doit coïncider avec la production d'acides gras par les acétogènes. En effet, **dans le cas d'une inhibition de la consommation des acides gras qui continueraient à être produits, il y a un risque d'accumulation des AGV et de baisse du pH**.

Selon certaines études, les méthanogènes acétotrophes seraient plus sensibles aux fortes concentrations en ammonium que les méthanogènes hydrogénotrophes (Koster et Lettinga, 1984 ; Sprott et Patel, 1986 ; Bhattacharya et Parkin, 1989 ; Robbins *et al.*, 1989 ; Angeladiki *et al.*, 1993 ; Borja *et al.*, 1996) alors que d'autres soulignent le contraire (Wiegant et Zeeman, 1986).

Wiegant et Zeeman proposent un mode d'action de l'inhibition de la méthanisation thermophile par l'ammoniac d'après leurs mesures des taux de croissance des différents micro-organismes du consortium. Selon eux, l'ammoniac agit comme un puissant inhibiteur de la formation du méthane à partir de H_2 et de CO_2. Il a seulement un effet mineur sur la formation de méthane à partir d'acétate, ce qui est indiqué par l'indépendance du taux de croissance spécifique des méthanogènes acétotrophes vis à vis de la concentration en ammoniac (jusqu'à 4500 mg N_{ammo}/ℓ). Sur la base de considérations thermodynamiques, ils montrent que l'inhibition de la consommation d'hydrogène conduit à l'inhibition de la dégradation du propionate. L'accumulation de propionate, à son tour, agit comme un inhibiteur des méthanogènes acétotrophes. Cela explique la différence entre les accumulations d'acétate observées dans les méthaniseurs thermophiles industriels avec de hauts niveaux d'ammoniac ainsi que les différences vis à vis de la méthanogenèse acétotrophe sous forte concentration d'ammoniaque telle qu'elle est observée en laboratoire. **Il serait donc intéressant de pouvoir effectuer des expériences d'ajout d'ammoniac dans des conditions reflétant les conditions de l'échelle industrielle.**

Des études en cultures pures de *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* et *Methanospirillum hungatei*, réalisées à un pH de 6,5, ont permis d'obtenir des seuils d'inhibition de 50% de la méthanogenèse pour des concentrations en NH_4^+ respectivement de 11,9 g N/ℓ, 19,8 g N/ℓ et 4,2 g N/ℓ (Jarrell *et al.*, 1987), ce qui constitue des valeurs relativement élevées en concentration.

Toutefois au sein d'une même espèce, comme *Methanobacterium*, des différences de tolérance ont également été observées : une inhibition totale pour une exposition à 4 g N_{ammo}/ℓ (Hobson et Shaw, 1976) et une inhibition de 50% de la méthanogenèse pour une concentration de 10,5 g N_{ammo}/ℓ (Jarrell *et al.*, 1987).

[4] FISH : Fluorescence par Hybridation In Situ

3.6.5 Mécanismes de l'inhibition par l'azote ammoniacal

Les mécanismes biochimiques de l'inhibition par l'ammoniac sont encore mal connus (Kayhanian, 1999). Quelques études en culture pure menées par Sprott et Patel (1986) ont montré que l'ammoniac pouvait affecter les bactéries méthanogènes de deux manières :

- L'ion ammonium peut inhiber directement le système enzymatique synthétisant le méthane ;
- La molécule d'ammoniac, hydrophobe, peut diffuser passivement vers l'intérieur de la cellule, causant un déséquilibre protonique et/ou une carence en potassium.

Ces hypothèses sont illustrées dans la Figure 8. Sur cette figure, les molécules d'ammoniaque diffusent passivement dans les cellules des méthanogènes où la différence de pH intracellulaire en transforme certaines en ammonium (NH_4^+), absorbant ainsi des protons (H^+). Les cellules doivent ensuite utiliser de l'énergie pour maintenir l'équilibre en protons en utilisant un antiporteur à potassium (K^+) (Sprott *et al.*, 1984). La diffusion des molécules d'ammoniac à travers les parois de la cellule dépend de la physiologie des méthanogènes.

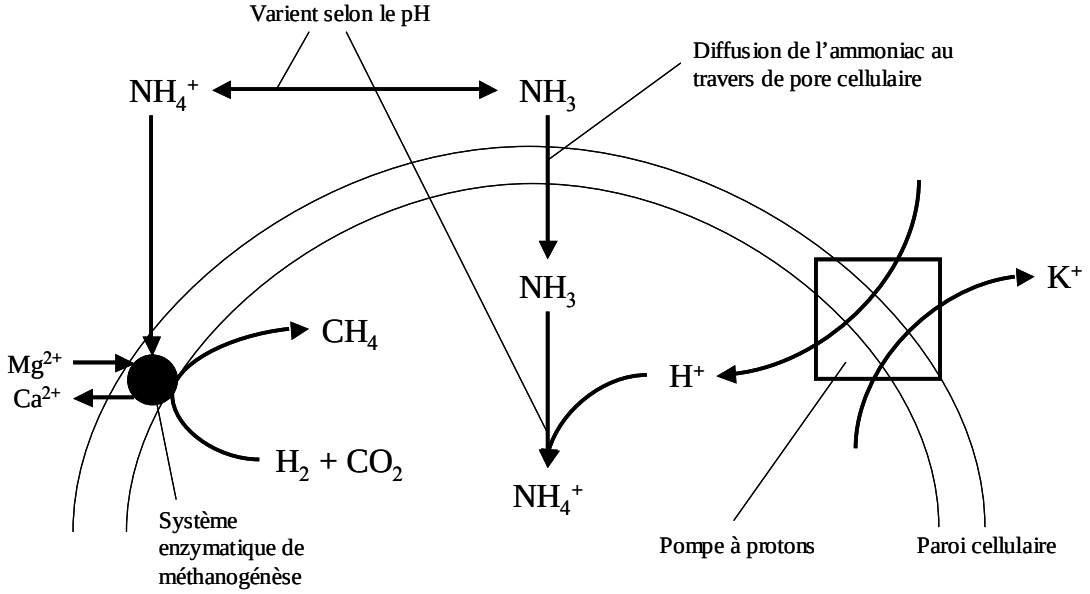


Figure 8 : Mécanismes possibles de l'inhibition par l'ammoniac dans les bactéries méthanogènes (adapté de Sprott et Patel, 1986)

Une étude (Wiegant et Zeeman, 1986) indique que

- Une élévation de la concentration en azote ammoniacal total affecte sévèrement les taux de croissance des méthanogènes hydrogénotrophes ;
- De l'acétate apparaît rapidement suite à une augmentation de l'azote ammoniacal total, bien que les archæ acétotrophes soient plus résistantes à l'inhibition par l'azote ammoniacal, en opposition avec d'autres observations, comme nous l'avons vu précédemment (3.6.4).

L'hypothèse proposée est qu'un composé intermédiaire s'accumule pendant l'inhibition de la consommation d'hydrogène et que cela pourrait affecter la conversion de l'acétate en méthane. Le(s) composé(s) impliqué(s) pourrai(en)t être l'hydrogène et/ou le propionate.

Une des raisons pour laquelle la forme ionisée (NH_4^+) est moins nocive que la forme libre est que l'hydroxyde produit par la réaction (3) réagit avec le CO_2 produit pendant la

digestion anaérobie pour former du bicarbonate (réactions (4) et (1)). Cette production de bicarbonate augmente le pouvoir tampon du milieu réactionnel. Le procédé en devient plus stable car moins enclin à être affecté par des fluctuations mineures de l'équilibre entre les acétogènes et les méthanogènes (Kayhanian, 1999). La présence des formes ammoniacales rajoute donc un effet tampon dans les milieux de digestion.

(3) $$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$$

(4) $$CO_2 + HOH \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

(5) $$H_2CO_3 + OH^- \Leftrightarrow HCO_3^- + HOH$$

3.6.6 Interaction de l'azote ammoniacal et d'autres paramètres

a) pH et Acides Gras Volatils

Comme nous l'avons vu précédemment, toute hausse du pH entraîne une augmentation de la toxicité de l'ammoniaque. Plusieurs auteurs préconisent de maintenir le pH entre 7,0 et 7,5 pour éviter de tels problèmes (Kroeker *et al.*, 1979 ; Bhattacharya et Parkin, 1989 ; Chen *et al.*, 2007). D'autres auteurs conseillent de diminuer le pH pour empêcher la toxicité de l'ammoniaque lors d'une hausse éventuelle de celui-ci (Braun *et al.*, 1981 ; Koster, 1986).

Comme nous l'avons vu précédemment, **une inhibition de la méthanogenèse par l'ammoniaque peut causer une accumulation d'AGV et donc une chute du pH qui, si elle n'est pas corrigée, peut aboutir à une faillite totale du digesteur** (Kayhanian, 1999). En outre, il a été déterminé que c'est la toxicité de l'ammoniaque qui entraîne une accumulation des AGV et non l'inverse. Il peut arriver également que la baisse du pH due à l'accumulation d'AGV entraîne une baisse de la concentration en NH_3 en faveur du NH_4^+, et donc une diminution de l'inhibition**. L'interaction entre l'ammoniaque, le pH et les AGV peut donc conduire à un « état d'équilibre inhibé » où le procédé est stable mais avec un rendement en méthane amoindri** (Angeladiki *et al.*, 1993).

b) Température

Bien que la flore thermophile soit moins sensible à l'ammoniac que la flore mésophile, plusieurs auteurs ont trouvé qu'en prenant le procédé dans son ensemble, les procédés thermophiles présentaient plus de risques d'inhibition par l'ammoniaque que les mésophiles (Braun *et al.*, 1981 ; Parkin *et al.*, 1983). Une température élevée a un effet positif sur les vitesses métaboliques mais conduit par là même à une concentration en ammoniaque plus élevée du fait d'une dégradation des protéines plus rapide. De plus, la température fait baisser le pKa et donc augmenter la teneur en ammoniaque libre (NH_3) qui est la forme la plus inhibitrice.

Angelidaki et Ahring (1994) ont trouvé que des concentrations plus élevées en azote ammoniacal réduisaient la température maximale tolérée. Elles ont en effet montré que lorsque la concentration en azote ammoniacal était élevée, la réduction de la température en dessous de 55°C permettait une augmentation du rendement en biogaz et une meilleure stabilité du procédé, qu'indiquait une baisse de la concentration en AGV. La concentration en acétate diminuait de 2400 à 900 mg/ℓ pour une réduction de la température de 55 à 40°C, tandis que le propionate augmentait dans un premier temps de 1800 à 3700 mg/ℓ puis diminuait finalement à 740 mg/ℓ. De même, une augmentation de température de 55 à 64°C

provoquait une chute de la production de gaz. Toutefois le procédé arrivait à s'adapter aux plus hautes températures lorsque la concentration en azote ammoniacal était faible.

c) Autres ions

Certains ions tels que Na^+, Ca^{2+} et Mg^{2+} sont antagonistes de l'inhibition par l'ammoniac. Il s'agit d'un phénomène dans lequel la toxicité d'un ion est amoindrie par la présence d'un ou plusieurs autre(s) ion(s) (Hendriksen et Ahring, 1991).

Les sulfites, produits par la réduction des sulfates, peuvent agir en synergie avec l'ammoniac dans l'inhibition de la méthanisation. Hansen *et al.* (1999) ont trouvé qu'à une concentration de 4,6 g N_{ammo}/ℓ, de faibles additions de sulfites (23 mg S^{2-}/ℓ) provoquaient une inhibition de la production de biogaz tandis que, sans sulfites, la méthanisation était possible même à 6 g N_{ammo}/ℓ. L'ajout de chlorure de fer ($FeCl_2$) pour précipiter les sulfites permettait de lever cette inhibition.

En revanche, Heinrichs *et al.* (1990) ont trouvé que les effets inhibiteurs de l'ammoniac étaient moins sévères dans des réacteurs en batch supplémentés en sulfates. Cela montre une action antagoniste des bactéries sulfatoréductrices vis à vis de l'inhibition par l'ammoniac.

3.6.7 Adaptation/Acclimatation[5] des micro-organismes à l'azote ammoniacal

De nombreux auteurs ont prouvé qu'une adaptation de la biomasse permettait une plus grande tolérance des populations microbiennes aux fortes concentrations en azote ammoniacal. Cette adaptation peut se faire soit par une introduction graduelle d'azote ammoniacal (Borja *et al.*, 1996 ; Lopez *et al.*, 2006), soit en acclimatant la biomasse aux fortes concentrations en azote ammoniacal (De Baere *et al.*, 1984 ; Omil *et al.*, 1995 ; Lay *et al.*, 1997b). Cette dépendance entre la tolérance et l'adaptation de la biomasse permet d'expliquer les différences observées dans la littérature : 50% d'inhibition de la méthanogenèse observée pour une concentration de 365 mg N-NH_3/ℓ pour un biofilm méthanogène à 37°C dans un effluent de poissonnerie à pH = 7,5 (Sossa *et al.*, 2004) ou pour une concentration de 9,2 g N_{ammo}/ℓ lors d'une digestion anaérobie réalisée dans un milieu standard entre 30 et 35°C (De Baere *et al.*, 1984). Un exemple classique de l'adaptation des microorganismes est la dégradation anaérobie du lisier de porc qui a classiquement lieu en présence de fortes concentrations en azote ammoniacal (>5 N_{ammo}/ℓ, Van Velsen, 1979). Aucune étude ne permet de dire s'il s'agit plutôt d'un mécanisme d'adaptation ou d'acclimatation.

Grâce à des comptages de bactéries, Fujishima *et al.* (2000) ont trouvé que les méthanogènes acétotrophes s'acclimataient à des hausses d'azote ammoniacal alors que ce n'était pas le cas pour les bactéries consommatrices de glucose.

Sung et Liu (2003) ont observé que dans des cultures pures la dose d'azote ammoniacal causant une inhibition totale passait de 8 g/ℓ pour des microorganismes non adaptés à 13 g/ℓ après adaptation. Cela variait en fonction des modalités de la phase d'adaptation.

Koster et Lettinga (1988) définissent un "potentiel d'adaptation" qui permet de caractériser la capacité de chaque inoculum donné à s'adapter à des doses accrues

[5] Adaptation : évolution par sélection naturelle, dans une espèce, sur beaucoup de générations. Modification du génotype. Souvent non réversible

Acclimatation : changement physiologique, biochimique, anatomique, dans un individu, dû à l'exposition à un environnement nouveau. Souvent réversible

d'ammoniac. Ainsi, l'inoculum qu'ils ont étudié avait un potentiel d'adaptation de 6,2. C'est à dire, qu'après le procédé d'adaptation, l'inoculum avait acquis la capacité de produire du méthane jusqu'à des concentrations 6,2 fois plus élevées que le seuil de toxicité initial.

Parkin *et al*. (1983) ont montré que l'inhibition par l'ammoniac était réversible. Une fois que l'ammoniac était retiré du milieu réactionnel par stripping, le système retrouvait sa production de méthane non inhibée.

3.6.8 Inhibition ammoniacale dans les ordures ménagères ou en voie sèche

a) Etudes à faible teneur en matière sèche

Dans des digesteurs traitant la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) des valeurs de 600 à 1400 mg N_{ammo}/ℓ sont rapportées (Tableau 10). Mais compte tenu de l'effet du pH, les concentrations en $N\text{-}NH_3$ peuvent être beaucoup plus variables (de 6,5 à 1930 mg $N\text{-}NH_3$/ℓ). Cependant, les teneurs en matière sèche rencontrées dans ces réacteurs sont en deçà de celles utilisées en digestion sèche. Dans la digestion d'ordures ménagères brutes, des quantités d'ammoniaque similaires à celle rencontrées dans la digestion de la FFOM peuvent être attendues étant donné que la majeure partie de l'ammoniaque solubilisée provient de la fraction putrescible facilement biodégradable des OM (Jokela et Rintala, 2003).

Tableau 10 : Concentrations en azote ammoniacal au cours de la digestion anaérobie continue de FFOM

Référence	MS	T (°C)	pH	N_{ammo} (mg/ℓ)	$N\text{-}NH_3$ (mg/ℓ)
Mata-Alvarez *et al.*, 1993	15 %	55	6,4	676 - 806	6,52 – 7,77
Vermeulen *et al.*, 1993	9 %	55	8,5	3500	1930
Pavan *et al.*, 1999	9 %	55	7,7	806 – 1200	131 – 195
Gallert et Winter, 1997	voie humide	55	6,7 - 7,5	1390	26,5 – 151,6
		37	6,7 - 7,5	1000	19,1 – 109,6

Dans une étude bibliographique récente, Chen *et al.* (2007) ne dénombrent pas moins de 26 articles donnant des valeurs de concentrations en ammoniaque causant une réduction de 50% de la production de méthane. Ces concentrations varient entre 1,7 et 14 g/ℓ (Kroeker *et al.*, 1979 ; Van Velsen, 1979 ; Parkin *et al.*, 1983 ; De Baere *et al.*, 1984 ; Hashimoto, 1986 ; Jarrell *et al.*, 1987 ; Koster et Koomen, 1988 ; Bhattacharya et Parkin, 1989 ; Angeladiki *et al.*, 1993 ; Borja *et al.*, 1996 ; Gallert et Winter, 1997 ; Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b ; Gallert *et al.*, 1998 ; Hansen *et al.*, 1998 ; Bujoczek *et al.*, 2000 ; Sung et Liu, 2003). Il faut noter que parmi les valeurs citées, une seule concerne la FFOM, et une seule les OMR (Ordures ménagères résiduelles).

Ces différences peuvent être attribuées aux différences entre les substrats, les inocula, la température, le pH et les périodes d'adaptation (Van Velsen, 1979 ; De Baere *et al.*, 1984 ; Hashimoto, 1986). Malheureusement, la grande majorité des études sur l'inhibition de la digestion anaérobie par l'ammoniaque portent sur la digestion de déjections animales et d'eaux usées. Une seule étude porte précisément sur l'inhibition par l'ammoniaque de la méthanisation des déchets solides par voie sèche.

b) Etude en voie sèche

Poggi-Varaldo *et al.* (1997b) ont étudié l'effet d'ajouts d'azote ammoniacal sur la méthanisation mésophile (39°C) par voie sèche (31 % de MS) d'ordures ménagères et de boues secondaires de station d'épuration en co-digestion. Cette étude a été menée dans 4 réacteurs semi-continus de 3 ℓ. Ils ont fixé les alimentations de ces réacteurs à des ratios de DCO/N de 90, 80, 65 et 50 respectivement. Les performances des réacteurs ont été évaluées en termes d'abattement de matières volatiles (MV), de productivité en biogaz, de concentration en méthane dans le biogaz, de pH et de concentrations en AGV.

Les résultats montrent que les performances du procédé se détériorent avec des doses croissantes d'azote ammoniacal. L'inhibition devient quasiment totale pour le rapport COD/N = 50. L'inhibition se caractérise par une baisse de l'abattement en MV, une diminution de la production de biogaz ainsi qu'une chute plus brutale de la concentration en méthane et du pH. Pour les deux plus fortes doses d'azote ammoniacal, une hausse des concentrations en acides propionique, butyrique et valérique est observée. Cela suggère une inhibition des bactéries syntrophes présentes dans le consortium bactérien. **Une concentration critique d'inhibition totale du procédé de 2800 mg/kg d'azote ammoniacal total a été déterminée avec un pH de départ à 8,5 qui a chuté à 5,5 avec l'inhibition et l'accumulation d'AGV**.

Bujoczek *et al.*, (2000) ont étudié la digestion anaérobie par « voie sèche » de fumier de poulet mais la concentration maximale en matière sèche n'était que de 10 %. Les caractéristiques n'étaient donc pas comparables à celles d'un méthaniseur par voie sèche.

c) Etude en décharge

Vigneron (2005) a étudié l'effet de l'ammoniac dans la recirculation des lixiviats de décharge de déchets putrescibles. Ces essais se situent dans une zone de pH où la forme NH_4^+ est quasi-exclusive. Ils ont permis de démontrer que pour des microorganismes acclimatés à des concentrations de 2 g N-NH_4^+/ℓ, il n'y avait pas d'inhibition de la méthanogenèse lorsque la concentration était inférieure. En augmentant les concentrations au-dessus de 2 g N-NH_4^+/ℓ, l'inhibition apparaît et s'accroît avec l'augmentation de la concentration en ammonium. Ces résultats varient néanmoins d'un réacteur à l'autre, mais les tendances observées sont conservées.

3.7 Autres inhibiteurs

3.7.1 Les acides gras à longue chaîne

La digestion anaérobie de déchets graisseux pose souvent des problèmes liés aux acides gras à longue chaîne, qui sont les produits de l'hydrolyse des graisses (Chipasa et Medrzycka, 2006). Les méthanogènes peuvent être inhibées par ces composés (Lalman et Bagley, 2000). Ils sont toxiques pour les consortiums anaérobies par adsorption sur la membrane/paroi cellulaire, par interférence avec les phénomènes de transport ou par protection des autres substrats (Chen *et al.*, 2007).

Angelidaki et Ahring (1992) ont étudié l'effet d'acides gras à longue chaîne sur la méthanisation thermophile de déjections bovines. La phase de latence augmentait à partir de concentrations en oléate et en stéarate de 0,2 et 0,5 g/ℓ respectivement, et l'inhibition était totale à partir de 0,5 et 1,0 g/ℓ. L'effet toxique était irréversible, même en diluant le milieu de culture. Aucune adaptation n'a été observée en augmentant progressivement la dose d'acides gras à longue chaîne.

3.7.2 Les métaux lourds

Les métaux lourds peuvent être présents en grandes quantités dans les déchets municipaux. Ceux qui posent le plus de problème sont le chrome, le fer, le cobalt, le cuivre, le zinc, le cadmium et le nickel (Jin *et al.*, 1998). Une particularité des métaux lourds est que, contrairement à beaucoup d'autres inhibiteurs, ils ne sont pas biodégradables et peuvent s'accumuler jusqu'à des taux toxiques.

3.7.3 L'oxygène

Les bactéries méthanogènes sont les organismes les plus sensibles à l'oxygène que nous connaissions. Cependant, dans le cas d'entrées ponctuelles d'oxygène dans des digesteurs anaérobies, l'oxygène est rapidement consommé ou éliminé, notamment par les espèces acidogènes (certaines sont aérobies facultatives), et aucun problème d'inhibition n'est observable.

3.7.4 L'hydrogène

La pression partielle en hydrogène doit être maintenue à un niveau très faible afin de permettre la production exergonique du H_2 à partir de la dégradation des alcools et des AGV, tout en restant suffisamment élevée, pour permettre la consommation exergonique du H_2 (Kramer et Conrad, 1993). Cet équilibre entre la production d'hydrogène et sa consommation est un indicateur du bon déroulement du procédé de dégradation. Si le H_2 s'accumule, il peut provoquer l'inhibition de la dégradation (Liu *et al.*, 2006a).

3.7.5 Autres molécules organiques

Diverses molécules organiques inhibitrices ou toxiques sont susceptibles de se retrouver dans les déchets municipaux. Il peut s'agir, entre autres, des chlorophénols, des molécules aliphatiques halogénées, des cycles aromatiques N-substitués, d'aldéhydes, etc… (Chen *et al.*, 2007).

3.8 Conclusion

Comme nous l'avons vu, les problèmes d'inhibition sont un point clef de la méthanisation par voie sèche. Une meilleure connaissance de ces phénomènes, dans le cadre particulier de la voie sèche, est donc un enjeu majeur pour une meilleure maîtrise de cette technologie. C'est pourquoi cette thèse aborde ces questions, et en particulier l'inhibition par l'azote ammoniacal dans la digestion par voie sèche, car, comme nous l'avons vu, c'est l'inhibiteur posant le plus de problèmes dans notre cas.

Il ne semble pas possible de prévoir a priori à partir de quel seuil de concentration en azote ammoniacal l'inhibition de la méthanisation par voie sèche pourrait avoir lieu. La recirculation des jus de presse sans traitement intermédiaire est susceptible de faire augmenter progressivement la concentration en azote ammoniacal et donc de permettre une acclimatation ou une adaptation dans une certaine mesure. Nous pourrions ainsi penser que l'inhibition est peu probable pour des déchets qui ne seraient pas exceptionnellement riches en azote et en conditions normales de pH. Toutefois, l'interdépendance des espèces méthanogènes et acidogènes provoque la proximité de ces deux types de microorganismes. Puisque l'ammonification est réalisée par les espèces acidogènes et qu'elle conduit à la production locale de fortes concentrations en azote ammoniacal, compte tenu du mélange qui n'est pas complet, certaines zones très localisées peuvent contenir des concentrations très importantes en azote ammoniacal.

De plus, dans le cas de la voie humide, il est possible d'exprimer les concentrations par rapport à des volumes (g/ℓ) alors que ce n'est pas le cas en voie sèche où l'on ne peut mesurer que des "concentrations massiques" (g/kg). Or, c'est la concentration d'un inhibiteur dans la phase liquide qui détermine la force de l'inhibition et, en pratique, on ne peut pas vraiment accéder à cette valeur de concentration dans le cas de la voie sèche.

Il n'y a pas de raison majeure qui justifierait que les mécanismes d'inhibition par les formes ammoniacales de l'azote soient différents dans la digestion sèche par rapport à des milieux dilués mieux décrits dans la bibliographie. Cependant, il nous semble clair, en raison de l'état particulier des milieux de digestion sèche (forte teneur en solide, peu d'eau libre) et, surtout, en l'absence de données exhaustives sur l'inhibition dans les réacteurs par voie sèche, que les seuils de concentrations sensibles doivent être établis de manière beaucoup plus précise, afin de proposer le paramètre « azote ammoniacal » comme outil de surveillance des réacteurs de méthanisation.

En outre, nous avons vu qu'il serait intéressant de pouvoir effectuer des expériences d'ajout d'ammoniac dans des conditions reflétant les conditions de l'échelle industrielle. Or, il est difficile techniquement et économiquement de tester des ajouts d'ammoniaque sur des méthaniseurs de taille industrielle. Il serait donc utile de disposer d'un réacteur de faible volume mais reproduisant néanmoins les conditions des méthaniseurs industriels. Des résultats différents sont attendus entre des tests en fiole sur des substrats simples et des expériences dans un tel réacteur.

4 La caractérisation de la matière organique

4.1 Introduction

La description des déchets devant être traités est un point important pour une bonne gestion d'une installation de méthanisation. Le but est de pouvoir estimer, à partir de cette caractérisation, comment le déchet va se décomposer et quelle quantité de biogaz et de méthane il est susceptible de produire lors du traitement.

Il est important d'avoir des moyens de connaître la quantité de matière organique présente dans le déchet. Il faut également savoir si elle est facilement biodégradable, avec quelle cinétique, si une part est réfractaire, si sa dégradation va générer des molécules inhibitrices ou si des inhibiteurs sont déjà présents.

Toutefois, dans le cas des OMR, qui sont très hétérogènes, il n'existe aucune mesure simple à réaliser que l'on puisse relier facilement à la performance attendue du digesteur (Buffière et Frederic, 2008).

Les modèles de la digestion anaérobie, tels que l'ADM1 (Anaerobic Digestion Model n°1), utilisent la composition du déchet en certaines fractions (sucres, protéines, graisses) et considèrent des étapes d'hydrolyse spécifique de chacune de ces fractions pour prédire la production de biogaz (Batstone *et al.*, 2000 ; Christ *et al.*, 2000). Cependant ce modèle considère également la matière organique comme une substance homogène, dont la composition est toujours la même, et dont la cinétique d'hydrolyse ne dépend pas de la composition. Il est cependant clair que la dégradation de la matière organique contenue dans les déchets dépend de sa composition biochimique, mais aussi de sa nature et de ses caractéristiques physiques.

Nous aborderons donc dans un premier temps une notion associée classiquement à la caractérisation des déchets : le potentiel méthanogène (ou BMP en anglais, pour Biochemical Methane Potential). Nous verrons également comment associer cette propriété (souvent mesurée expérimentalement) à la biodégradabilité.

Nous aborderons ensuite les différentes approches développées pour tenter de relier la caractérisation des déchets au potentiel méthanogène et à la biodégradabilité.

4.2 Potentiel méthanogène et biodégradabilité

4.2.1 Le potentiel méthanogène (BMP)

Le potentiel méthanogène est la quantité de méthane susceptible d'être produite lors de la dégradation de la matière organique. Il se mesure en Nm^3 de CH_4 par kg de matière volatile.

La valeur théorique du potentiel méthanogène peut être déduite de la composition élémentaire (CHONS) à partir de l'équation de Buswell (Buswell et Mueller, 1952) :

$$C_nH_aO_bN_cS_d + \left(n - \frac{a}{4} - \frac{b}{2} + 3\frac{c}{4} + \frac{d}{2}\right)H_2O \rightarrow \left(\frac{n}{2} - \frac{a}{8} + \frac{b}{4} + 3\frac{c}{8} + \frac{d}{4}\right)CO_2 + \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - 3\frac{c}{8} - \frac{d}{4}\right)CH_4 + \mathrm{cNH_3} + \mathrm{dH_2S}$$

Ainsi, par exemple, pour le glucose de formule $C_6H_{12}O_6$, on obtient $3CO_2 + 3CH_4$, donc 0,373 ℓ de CH_4/g de glucose. Pour une protéine de formule $C_5H_7NO_2$ on obtient de même 0,496 et pour des lipides de formule $C_{57}H_{104}O_6$ on obtient 1,0 ℓ de CH_4/g.

Cependant, la matière organique des déchets est plus complexe qu'un substrat simple. Non seulement elle contient des glucides, protéines et lipides très variés mais elle contient également d'autres molécules organiques dont certaines ne sont pas biodégradables. De plus, certains mécanismes physiques liés notamment à la taille des particules peuvent empêcher une partie de la matière organique d'être dégradée. Du fait du temps de dégradation élevé de certains composants et de temps de rétention courts, le potentiel calculé par la formule de Buswell est plus élevé que ce qui est observé au niveau industriel (Hansen *et al.*, 2007). Ainsi la connaissance de la formule brute de la matière organique ne permet pas de savoir si elle est effectivement biodégradable. La mesure du potentiel méthanogène, qui est une mesure directe de la capacité à produire du méthane d'un déchet, présente donc un intérêt certain pour évaluer la biodégradabilité d'un déchet.

La mesure du potentiel méthanogène a fait l'objet de différents protocoles, dont on peut trouver une excellente synthèse dans un article d'Angelidaki et Sanders (2004). D'une façon générale, ces protocoles visent à produire les conditions optimales de la méthanisation de la matière organique afin d'exprimer la totalité, ou le maximum, du potentiel méthanogène du déchet. Les méthodes restent à standardiser afin de pouvoir mieux comparer les résultats entre eux (Hansen *et al.*, 2004).

Le potentiel méthanogène d'un déchet est fonction de sa composition. Le Tableau 11 donne les valeurs de BMP trouvées pour différents types de substrats. D'après une étude de Davidsson *et al.* (2007), des FFOM collectées différemment mais de même composition ont des valeurs de BMP similaires.

Tableau 11. Potentiel méthanogène de différents composés

Composé	BMP (Nm^3CH_4/kgMV)	Référence
Sucre simple (glucose)	0,373	Maximum théorique
Protéines ($C_5H_7NO_2$)	0,496	Maximum théorique
Lipides ($C_{57}H_{104}O_6$)	1,014	Maximum théorique
Déchets de cuisine	0,546	Cho *et al.*, 1995
Déchets verts (feuilles, branches, écorces)	0,143	Owens et Chynoweth, 1993
Papier de bureau	0,369	Owens et Chynoweth, 1993
Carton	0,343	Owens et Chynoweth, 1993
Ordures ménagères	0,2 – 0,24	Chynoweth *et al.*, 1993
Biodéchets (collecte sélective ou tri manuel)	0,36 – 0,40	Mace *et al.*, 2003
Biodéchets (tri mécanique)	0,23 – 0,26	Mace *et al.*, 2003

Le principal inconvénient de la mesure du potentiel méthanogène d'un déchet pour le caractériser est le temps que prend ce test (Vedrenne *et al.*, 2007). En effet, si mesurer le potentiel méthane d'un déchet prend quasiment autant de temps que de le méthaniser directement, alors il y a moins d'intérêt à effectuer cette mesure. De plus, les tests BMP visent à connaître le potentiel maximal du déchet et se déroulent donc dans des conditions idéales qui ne sont pas représentatives de la réalité industrielle.

4.2.2 La biodégradabilité

La biodégradabilité correspond à la fraction de matière organique réellement dégradée par voie biologique. Notons que cette définition se réfère donc à des conditions de dégradations.

Dans la suite, nous définirons la biodégradabilité de manière plus précise, c'est-à-dire dans les conditions de fonctionnement d'un réacteur de méthanisation. Il s'agit donc de comparer la fraction de matière organique pouvant au maximum être dégradée en méthanisation à celle qui est réellement dégradée.

La biodégradabilité anaérobie peut être calculée comme le rapport entre la quantité de méthane produite lors de la dégradation de la matière organique considérée (mesurée comme le potentiel méthanogène) et la quantité théorique maximale (calculée par exemple à partir de l'équation de Buswell).

En pratique, malheureusement, l'obtention de la composition élémentaire de substances aussi complexes que les déchets est problématique. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser un moyen détourné pour mesurer la biodégradabilité : en utilisant la demande chimique en oxygène du déchet considéré.

La DCO est définie comme la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation complète de la matière organique. Si l'on se réfère à une substance dont la composition élémentaire CHONS est connue, on peut calculer cette quantité d'oxygène :

$$C_nH_aO_bN_cS_d + \left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2} - \frac{3c}{4} - \frac{d}{2}\right)O_2 \rightarrow nCO_2 + \left(\frac{a}{2} - \frac{3c}{2} - d\right)H_2O + cNH_3 + dH_2S$$

On remarque qu'il y a proportionnalité entre la quantité d'O_2 et la quantité de méthane produit (équation de Buswell). Le ratio CH_4/DCO est donc toujours le même et égal à 0,35 Nm^3/kg d'O_2.

4.3 Caractérisation chimique et biochimique : méthodes classiques

4.3.1 Caractérisation chimique

a) Teneur en eau, matière sèche et matières volatiles

Des méthodes simples, par séchage, permettent de connaître la teneur en eau et en matière sèche (MS) d'un déchet. Au sein de la matière sèche, une distinction est faite entre la matière minérale et la matière volatile (MV), sous-entendu, volatile à 550°C.

La MV est parfois associée à la matière organique (MO). Cette méthode d'estimation de la MO est néanmoins jugée, par certains auteurs, comme étant très approximative (Degrémont, 1989). Cependant, elle est souvent utilisée dans l'industrie pour avoir une première estimation de la quantité de MO contenue dans un déchet et, par extension, de sa biodégradabilité. Une distinction est faite au sein de la MO entre la matière organique synthétique (MOS ; les plastiques par exemple) et la matière organique non synthétique (MONS).

Le Tableau 12 présente la teneur en eau et en matières volatiles de chaque catégorie de déchets recensée par l'Ademe en 1993[6]. Des différences apparaissent entre les catégories. On

[6] Une nouvelle campagne de recensement est en cours dont les résultats seront disponibles au cours de l'année 2008

notera que certaines substances comme les plastiques ou le caoutchouc contiennent énormément de matière volatile alors qu'ils ne sont pas biodégradables.

La teneur en eau du déchet global est dépendante de celle de chaque catégorie de déchets et de leur proportion dans le déchet global. De ce fait, des teneurs en eau de déchets ménagers très différentes peuvent être trouvées dans la littérature variant de 40 à 85 % (Vigneron, 2005).

La teneur en MV dépend également de la proportion des différentes catégories composant le déchet global. Les plages de valeurs trouvées dans la littérature sont donc très larges : de 34 à 91 % (Vigneron, 2005).

Tableau 12. Teneur en eau et en matières volatiles des déchets ménagers et assimilés en France en 1993 (ADEME, , 1999)

Catégories	Teneur en eau (% masse humide)	Teneur en MV (% masse sèche)
Déchets putrescibles (déchets de cuisine, déchets verts…)	63,3	82,2
Papiers (emballages, journaux, magazines…)	26,7	82,1
Cartons (cartons plats, ondulés, autres…)	34,1	86,9
Complexes (emballages complexes type Tetra brick)	24,8	85,8
Textiles (emballages textiles, autres…)	23,5	92,9
Textiles sanitaires (couches, coton hygiénique…)	59,9	90,7
Plastiques (PE, PVC, PET, polystyrène…)	23,7	91,8
Combustibles non classés (bois, caoutchouc)	20,1	83,7
Verres	0,6	0,9
Métaux (aluminium, métaux ferreux, cuivre…)	8,7	0,9
Incombustibles non classés (pierres, gravats…)	9,9	8,3
Déchets spéciaux (chiffons souillés, piles…)	-	15,6
Déchet global	35	59,2

b) Carbone organique total (COT), Demande chimique en oxygène (DCO)

Mesurer la quantité de matière organique en entrée et en sortie du méthaniseur peut refléter l'efficacité du procédé. La mesure de la MS puis de la MV prennent du temps et ne sont pas satisfaisantes. Des méthodes indirectes plus rapides ont donc été développées.

Pour la matière organique soluble à faible concentration, la mesure du carbone organique total (COT) est utilisable (Degrémont, 1989). La mesure de COT détermine la quantité de MO en évaporant toute l'eau puis en oxydant chimiquement tout le carbone en CO_2 qui est mesuré par un analyseur à infrarouges. Récemment des méthodes ont été mises au point pour mesurer le COT sur des solides. Elles commencent à être utilisées sur les déchets solides mais aucune donnée n'est accessible pour l'instant. De plus, sur les ordures ménagères des problèmes de précision sont rencontrés à cause de la faible quantité d'échantillon analysé à la fois compte tenu de l'hétérogénéité des ordures ménagères.

La demande chimique en oxygène (DCO) est une autre manière d'estimer la totalité de la matière organique par oxydation chimique à température destructrice (Degrémont, 1989). La DCO est définie comme la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation complète de la matière organique. L'avantage de la mesure de DCO est sa conversion en production de méthane maximale théorique (350 ℓ de CH_4/kg de DCO) d'après les équations présentées précédemment (voir 4.2.2 La biodégradabilité). La DCO comprend également de la matière organique qui n'est pas biodégradable dans les procédés anaérobies (Ahring, 2003). Pour le

moment, la mesure de la DCO est rarement utilisée sur les ordures ménagères. Toutefois, il serait intéressant de la faire plus systématiquement dans le but de pouvoir comparer les biodégradabilités de différents déchets (Buffière *et al.*, 2006).

c) Azote total et azote organique

La méthode par distillation de Kjeldahl permet de doser la quantité d'azote (N) totale et la quantité d'azote organique (azote des protéines surtout) contenue dans un déchet. Le principal intérêt d'un tel dosage est en tant qu'indicateur de la teneur en protéines. En effet, certains auteurs ont autrefois pensé que la dégradation des déchets pouvait être limitée par une trop faible quantité d'azote (Pfeffer, 1974). Toutefois, aujourd'hui, les micro-organismes se développant dans les méthaniseurs de déchets solides ne sont généralement pas considérés comme limités par l'azote (Angeladiki *et al.*, 2006).

Une autre utilité de la mesure de l'azote est de déterminer le rapport C/N. Le rapport C/N est important pour la stabilité du procédé. Un rapport C/N de 25 à 32 a un effet positif sur le rendement en méthane (Ahring, 2003). A des rapports C/N plus faibles apparaît le risque d'excès d'azote qui ne serait pas utilisé pour la synthèse cellulaire des micro-organismes et donc d'accumulation jusqu'à atteindre des concentrations inhibitrices. A l'opposé, un rapport C/N trop élevé entraînerait un manque d'azote pour la synthèse de la biomasse. Des déchets à forte DCO et faible concentration en azote, tels que les effluents de production d'huile d'olive, ne sont pas biodégradables seuls. L'ajout d'azote ou la co-digestion avec des déchets à plus faible rapport C/N est nécessaire pour les digérer (Gomez *et al.*, 2006).

L'azote est principalement retrouvé dans les textiles et les déchets de cuisine (Tableau 13). Le carbone est présent dans l'ensemble des catégories de déchets, exception faite des métaux et des déchets spéciaux. Il en résulte qu'en fonction de la part de chaque catégorie dans un gisement donné, le rapport C/N pourra varier fortement.

Tableau 13. Teneur en carbone et en azote des déchets ménagers et assimilés en France en 1993 (Ademe, 1999)

Catégories	Teneur carbone (% masse sèche)	Teneur en azote organique (% masse sèche)
Déchets putrescibles (déchets de cuisine, déchets verts…)	41,3	1,79
Papiers (emballages, journaux, magazines…)	43,8	0,32
Cartons (cartons plats, ondulés, autres…)	42,1	0,33
Complexes (emballages complexes type Tetra brick)	49,0	0,33
Textiles (emballages textiles, autres…)	51,4	3,34
Textiles sanitaires (couches, coton hygiénique…)	50,4	0,67
Plastiques (PE, PVC, PET, polystyrène…)	65,7	0,43
Combustibles non classés (bois, caoutchouc)	46,7	1,66
Verres	0,4	0,02
Métaux (aluminium, métaux ferreux, cuivre…)	-	0,38
Incombustibles non classés (pierres, gravats…)	1,9	0,18
Déchets spéciaux (chiffons souillés, piles…)	-	0,49
Déchet global	33,4	0,73

En fonction des données Ademe (1999), le rapport C/N des déchets ménagers en France serait de 46. Le rapport $C_{organique}/N$ diminue au cours de la digestion anaérobie car le carbone est transformé en biogaz tandis que l'azote n'est que très peu utilisé pour le métabolisme des micro-organismes.

4.3.2 Caractérisation biochimique

a) Glucides

Les **glucides**, aussi nommés par abus de langage "sucres", sont habituellement répartis entre oses (monosaccharides et disaccharides regroupés sous l'appellation sucres simples) et polysaccharides (polymères d'oses).

Les **sucres simples** sont constitués de chaînes aliphatiques ou de formes cycliques saturées et ont pour formule brute ($C_nH_{2n}O_n$). Ils possèdent plusieurs fonctions alcool (*R*-OH) et une fonction carbonyle (*R*-CHO avec liaison C=O). Les sucres simples sont très présents dans les végétaux et donc dans la fraction organique des OM. Abondants dans la matière en décomposition, ils sont à la fois synthétisés et détruits par les micro-organismes.

Les **polysaccharides** constituent la forme principale des glucides dans la matière organique en décomposition. Ce sont des homopolymères qui résultent de la condensation entre elles d'un grand nombre de molécules de sucres simples. Leur masse moléculaire est très élevée. Les polysaccharides sont d'origine végétale ou microbienne. Dans la matière organique ayant un niveau de décomposition avancé, les polysaccharides sont principalement issus du métabolisme microbien. Les polysaccharides d'origine végétale les plus abondants sont la cellulose et l'hémicellulose.

La **cellulose** est un polyholoside homogène de glucoses liés par une liaison $\beta(1\rightarrow4)$. Il s'agit d'une macromolécule constituée de l'enchaînement *n* fois répété ($n \approx 1500$) de cycles gluco-pyranose ($(C_6H_{12}O_6)_n$). Elle constitue la paroi des cellules végétales, est fibreuse, résistante et insoluble dans ℓ'eau. Il s'agit de ℓ'un des principaux constituants du bois. Elle est associée à d'autres polysaccharides comme l'hémicellulose (Lynd *et al.*, 2002).

Les **hémicelluloses** sont définies comme étant des polysaccharides alcalino-solubles. Elles peuvent être linéaires ou ramifiées et constituées de 2 à 6 des monomères suivants : xylose, galactose, glucose, mannose et acides glucuroniques. Les hémicelluloses sont des constituants végétaux qui accompagnent la cellulose dans la constitution du bois.

Les sucres réducteurs peuvent être dosés par différentes méthodes dont certaines seront détaillées dans la partie Matériel et Méthodes. Les fractions cellulose et hémicellulose peuvent être mesurées par la méthode de Van Sœst (voir ci-dessous).

Pendant la digestion anaérobie, les glucides simples et les polysaccharides les plus courts sont rapidement solubilisés et assimilés par les micro-organismes. Les glucides complexes, quant à eux, ne sont pas solubilisés immédiatement et doivent d'abord être hydrolysés à l'extérieur des cellules microbiennes avant de pouvoir être absorbés sous forme de monomères. Il en résulte que leur dégradation est retardée.

b) Lignines

Les **lignines** sont des polymères aromatiques de poids moléculaire élevé, obtenus à partir de trois monomères phénoliques : les p-coumaryles, les coniféryles et les alcools sinapiques. Ces unités de base sont reliées selon plus de 12 combinaisons via des liaisons C-O et C-C. La biopolymérisation de la lignine se fait dans les parois cellulaires des végétaux par oxydation enzymatique.

La fraction lignine est mesurée par la méthode de Van Sœst (voir ci-dessous).

La diversité de leurs liaisons et leur nature aromatique confèrent aux lignines une importante résistance face à la dégradation microbienne. La dégradation biologique des lignines est réalisée uniquement par des champignons. Elles ne peuvent donc pas être

dégradées en conditions anaérobies. De plus, dans la matière végétale, la lignine protège une part de la cellulose et des hémicellulose de l'attaque des micro-organismes. En effet, dans les plantes, se forment des structures tridimensionnelles de lignine et de cellulose, appelées lignocellulose, dans lesquelles la cellulose est protégée de l'attaque des micro-organismes (Malherbe et Cloete, 2002).

Dès 1980, Chandler *et al.* mettent en évidence une relation linéaire négative entre la biodégradabilité et la teneur en lignine de déchets végétaux et de déjections animales. Cette relation a été confirmée depuis (Moller *et al.*, 2004) et affinée à une relation négative à la fraction "lignine + cellulose" pour pouvoir être adaptée aux ordures ménagères également (Buffière *et al.*, 2006).

c) Fractionnement selon la méthode de Van Sœst

L'analyse proximale selon la méthode de Van Sœst a été mise au point pour prédire la digestibilité des fourrages (Van Soest, 1963 ; Van Soest et Wine, 1967). Elle permet, par extractions et hydrolyses successives dans des détergents de plus en plus forts, de séparer quatre fractions constitutives de la paroi des végétaux : les hémicellulose, la cellulose, la lignine, le résidu minéral.

Cette méthode est applicable aux déchets solides (Chandler *et al.*, 1980 ; Peres *et al.*, 1992). Toutefois, il convient de noter que les fractions ainsi obtenues ne sont pas purement les quatre indiquées par la méthode originelle, surtout dans le cas des ordures ménagères. En effet, la fraction "lignine" contiendra également des matières plastiques, par exemple. De plus, nous ne savons pas actuellement dans quelle fraction se retrouvent les protéines.

Le Tableau 14 donne la composition, selon le fractionnement de Van Sœst, de différents déchets. Certaines catégories de déchets, comme le papier de bureau, contiennent une forte proportion en cellulose, tandis que d'autres catégories, comme les feuilles végétales, contiennent une plus grande quantité de lignine. Ces proportions varient également en fonction de l'état de dégradation du déchet. En effet, en se dégradant, la proportion de cellulose d'un papier de bureau ou d'un journal diminue.

La composition moyenne de déchets ménagers et assimilés serait comprise entre 30 % et 50 % de cellulose, 5 et 12 % d'hémicellulose et entre 10 et 15 % de lignine (Peres *et al.*, 1992). Cette composition varie également en fonction de l'état de décomposition du déchet (déchets excavés ; Tableau 14).

Tableau 14. Composition biochimique de déchets et fractions de déchets (en % de poids sec)

Type de déchets	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)	MV (%)	Référence
Herbe	26,5	10,2	28,4	85,0	Eleazer *et al.*, 1997
	25,6	14,8	21,6	87,8	
Feuilles	15,3	10,5	43,8	90,2	Eleazer *et al.*, 1997
Branches	35,4	18,4	32,6	96,6	
Aliments	55,4	7,2	11,4	93,8	
Papier	42,3	9,4	15,0	74,3	
Papier de bureaux	87,4	8,4	2,3	98,6	
Vieux journaux	48,5	9,0	23,9	98,5	
Papier de bureau dégradé	36,2	6,9	4,8	-	Chen *et al.*, 2004
Journaux	48,3	18,1	22,1	-	
Journaux dégradés	35,1	16,0	32,3	-	
Déchets frais de poubelles ménagères	55,4	7,2	11,4	93,7	Wang *et al.*, 1997
Déchets excavés	18,3	3,7	22,1	42,2	Wang *et al.*, 1997
	23,4	4,7	22,5	48,2	Eleazer *et al.*, 1997
	39-42	11	-	-	Barlaz *et al.*, 1989
Déchets municipaux	34,7	7,7	17,0	70,0	Kylefors *et al.*, 2003
	28,8	9,0	23,1	75,2	Eleazer *et al.*, 1997

d) Protéines

Les **protéines** sont des chaînes linéaires ou cycliques d'acides aminés, de liaison peptidique –CO–NH. Les acides aminés sont des composés réunissant une fonction amine, dérivée de l'ammoniac NH_3 où 1 à 3 atomes d'hydrogène sont substitués par des groupes hydrocarbonés, et une fonction acide carboxylique (RCOOH).

Outre les glucides, les protéines sont les principaux composés utilisés par les micro-organismes durant la digestion anaérobie (Habig, 1985). Les protéines sont très solubles et sont donc rapidement disponibles. Elles sont également très biodégradables. Il en résulte qu'elles sont très rapidement dégradées dans la digestion anaérobie, cela présentant le risque d'une accumulation d'ammoniac menant à une inhibition dans le cas d'un apport trop massif de protéines (voir 3.6 L'azote ammoniacal et 4.3.1c) Azote total et azote organique).

La présence de glucides et de lipides ralentit la dégradation des protéines (Tommaso *et al.*, 2003). D'autres auteurs tirent des conclusions différentes du même type d'observation : l'adaptation des micro-organismes à la dégradation des glucides les rend moins aptes à dégrader les protéines (Sanders, 2001)

Notons que les micro-organismes utilisent une partie des protéines dégradées pour se constituer leurs propres protéines. Une partie des protéines dégradées est donc remplacée par d'autres protéines. Il en résulte qu'on observe, en batch, une rapide diminution de la concentration en protéines dans le milieu, puis cette concentration reste à un niveau de base non nul pendant le reste de l'expérience (Pichler et Kögel-Knaber, 2000).

La composition moyenne de déchets ménagers et assimilés serait comprise entre 4 et 10 % de protéines (Peres *et al.*, 1992).

e) Lipides

Le terme lipides ne désigne pas un type spécifique de composés mais un ensemble hétérogène de molécules neutres et polaires ayant une propriété commune : elles sont solubles dans les solvants organiques. Les structures moléculaires des lipides sont très variables mais contiennent généralement toutes des acides carboxyliques linéaires à longue chaîne hydrocarbonée appelés acides gras.

Les **lipides dits simples** représentent l'essentiel, sur le plan quantitatif, des lipides naturels. On trouve au sein de cette classe les glycérides. Ils sont solubles dans le chloroforme, l'éther, le benzène, l'alcool à chaud et l'acétone mais insolubles dans l'eau. Ils peuvent être hydrolysés par les lipases aboutissant à un mélange de glycérol et d'acides gras.

Les **lipides dits complexes** sont les phospholipides.

Les lipides jouent un rôle important dans la nature, tant chez les animaux que chez les végétaux. La biodégradabilité des lipides est variable. La plupart sont rapidement décomposés par les micro-organismes mais certains, comme les cires, sont partiellement résistants. Dans la matière en décomposition, les lipides peuvent être synthétisés par les micro-organismes.

Les lipides impliqués dans la digestion anaérobie sont surtout les **glycérides**. Leur hydrolyse est lente (Vidal *et al.*, 2000) et a libère des acides gras à longue chaîne (AGLC ; Fernandez *et al.*, 2005) qui peuvent provoquer des problèmes d'inhibition (voir 3.7.1. Les acides gras à longue chaîne). La dégradation des glycérides commence par une étape d'adsorption sur la paroi des cellules microbienne suivie par la dégradation à proprement parler (Hwu *et al.*, 1997). Les lipides sont mieux dégradés en conditions thermophiles que mésophiles : des abattements organiques de 66 à 73 % contre 44 à 69 % respectivement (Chipasa et Medrzycka, 2006).

La teneur en lipides des ordures ménagères est très variable et nous ne connaissons pas de valeur moyenne fiable. Toutefois, elle peut être considérée comme négligeable vis à vis des problèmes d'inhibition pour les ordures ménagères normales. Il est important, cependant, de rester vigilant lors du traitement d'ordures spéciales qui pourraient avoir une teneur en graisses supérieure à la normale ou dans le cas d'une co-digestion avec d'autres déchets riches en matière grasse.

f) Matière organique réfractaire ou inerte

Dans les déchets ménagers et assimilés, nous trouvons une part non-négligeable de matière organique non biodégradable. Il est difficile de savoir de quelles matières il s'agit mais les matières plastiques sont fortement soupçonnées d'en être la source principale en plus des lignines.

Ces matières organiques réfractaires sont un problème pour l'estimation de la biodégradabilité d'un déchet à partir de la quantité de matière organique car elles sont comptées dans la matière volatile mais ne donneront pas lieu à production de méthane.

4.4 Autres méthodes de caractérisation chimique

Les trois méthodes présentées ci-dessous sont des méthodes modernes, récentes, pour caractériser la matière organique des déchets. Elles n'ont pas, ou peu, été utilisées dans le cadre de la digestion anaérobie. Toutefois, elles ont été utilisées dans le cadre du compostage ou du stockage en décharge et l'on peut imaginer, par analogie, qu'elles puissent avoir un intérêt pour la méthanisation. Si ces méthodes permettent d'établir une caractérisation spectrale (donc liée à la composition biochimique) des matrices étudiées, elles ne permettent

toutefois pas d'obtenir d'information sur la classification des composés, ni de prédire les propriétés de dégradation biologique ; elles sont mentionnées ici à titre d'exemple.

4.4.1 Pyrolyse analytique

La pyrolyse analytique consiste en une dégradation thermique, entre 650 et 750°C, des matières organiques en absence d'oxygène. Couplée à un chromatographe en phase gazeuse et/ou à un spectromètre de masse (pyrolyse GC/MS), elle permet la caractérisation de nombreuses macromolécules organiques. Sur les pyrochromatogrammes les différents pics correspondent aux composés produits lors de la pyrolyse. Cette technique permet une approche semi-quantitative. Cependant les résultats de la pyrolyse ne sont pas toujours représentatifs de l'échantillon du fait de leur forte sensibilité à la présence de composés plus volatils, comme les composés lipidiques. L'application de cette technique à l'étude des ordures ménagères est récente et encore peu développée. Elle a été utilisée dans quelques cas sur des ordures ménagères mais dans le cas du compostage (Dignac *et al.*, 2005 ; Franke *et al.*, 2007).

4.4.2 Analyse par RMN^{13}C

La résonance magnétique nucléaire (RMN) consiste à soumettre l'échantillon à l'action conjointe de deux champs électromagnétiques, l'un intense et constant, l'autre faible et oscillant. L'absorption par certains noyaux atomiques de l'échantillon de fréquences présentes dans la source électromagnétique servant à générer le champ oscillant conduit au spectre RMN. Cette propriété est liée aux spins des atomes. Seuls les atomes qui n'ont pas un nombre de protons et un nombre de neutrons pairs tous les 2 sont détectables en RMN : ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N par exemple. Cette technique a surtout été utilisée pour suivre les substances humiques dans les compost mais elle a aussi été appliquée à la caractérisation de la matière organique d'ordures ménagères en décharge (Bäumler et Kögel-Knabner, 2008).

4.4.3 Analyse par méthode infra rouge à transformée de Fourier

La spectrométrie infrarouge est une méthode d'identification et de dosage non destructive. Elle regroupe en fait plusieurs techniques basées sur l'absorption ou la réflexion par l'échantillon étudié des radiations électromagnétiques dans la gamme des infrarouges. Les absorptions dans ce domaine forment une sorte d'empreinte digitale des principales classes de groupes chimiques qui composent la matière organique et permet d'obtenir des informations sur la nature et les arrangements des groupes fonctionnels des acides humiques. La spectrométrie infrarouge est utilisée depuis une soixantaine d'années, mais son utilisation s'est considérablement développée depuis l'apparition vers 1970 de spectromètres à transformée de Fourier. Cette méthode est largement utilisée pour l'étude des substances humiques du sol. Son application à l'étude de la stabilisation de la matière organique des composts est plus récente, et complète souvent les analyses en RMN. Elle a également été utilisée pour caractériser la matière organique des déchets d'une façon générale (Smidt *et al.*, 2002 ; McClure, 2003 ; Smidt et Meissl, 2007 ; Smidt *et al.*, 2007)

4.5 Caractérisation physique des déchets

4.5.1 Influence de la taille des particules

Comme nous l'avons vu précédemment (2.3.3. Influence de la taille des particules), la taille des particules du déchet joue un rôle important dans la digestion anaérobie des ordures ménagères en accroissant leur biodégradabilité et leur vitesse d'hydrolyse. Toutefois, la taille des particules n'est pas un paramètre facile à quantifier, surtout compte tenu de l'hétérogénéité des ordures ménagères. Une étude à l'aide de tamis est envisageable mais ne prend pas en

compte la forme des particules. Or, la forme des particules a de l'importance car elle conditionne la surface offerte à la colonisation par les micro-organismes.

En pratique, on influe sur la taille des particules par le choix du prétraitement (broyage, criblage, …) et c'est souvent la taille des mailles du crible qui est utilisée pour qualifier rapidement la taille des particules.

4.5.2 MODECOM™

Il est possible de caractériser les ordures ménagères par une observation macroscopique c'est à dire par sa composition en différentes classes de déchets. La procédure la plus couramment utilisée est la procédure MODECOM™ (méthode de caractérisation des ordures ménagères), qui a été développée par l'Ademe en 1993 (ADEME, 1993). Elle propose une procédure d'échantillonnage aléatoire des déchets et recommande une prise d'échantillon d'au moins 500 kilogrammes. Un tri à la main permet de séparer les constituants de l'ordure en 12 catégories présentées par le Tableau 1. Ce tableau donne la composition moyenne des ordures ménagères de Paris en 1993.

Forster-Carneiro *et al.* (2008) ont montré l'influence de la composition macroscopique de la FFOM sur sa biodégradabilité. Cette étude met également en évidence l'influence directe de la composition en chaque catégorie de déchets sur la composition du déchet global. Cela entraîne une grande variabilité géographique et temporelle de la composition des ordures ménagères. Toutefois, la connaissance de la composition en chaque catégorie de déchet ne permet pas de connaître la composition biochimique du déchet ni sa biodégradabilité. Tout au plus, elle permettrait d'orienter les investigations.

4.6 Conclusion

La caractérisation des déchets est essentielle pour la compréhension des processus de dégradation ayant lieu en méthanisation ainsi que pour un meilleur contrôle de la méthanisation par voie sèche. Cette étude bibliographique a permis d'une part, d'identifier les fractions biodégradables parmi les différents constituants des ordures ménagères, et, d'autre part, d'observer un lien entre la caractérisation de la matière organique, le potentiel méthane et la biodégradabilité des déchets.

4.6.1 Constitution des déchets : identification des fractions biodégradables

Nous avons vu dans ce chapitre qu'il était possible de séparer la matière constitutive des ordures ménagères en matière organique et matière inorganique. Il est surtout intéressant de la séparer en matière biodégradable et matière non biodégradable afin de pouvoir connaître son comportement en méthanisation. Malheureusement, ces deux dichotomies ne se chevauchent pas. En effet, il existe de la matière organique non biodégradable. C'est ce qui est illustré par la Figure 9. Certaines substances, comme les glucides et les protéines, sont connues pour être biodégradables et d'autres ne le sont jamais, comme les métaux et le plastique. La lignine n'est pas non plus biodégradable en méthanisation et elle empêche la dégradation d'une partie de la cellulose. Bien que les protéines soient presque totalement biodégradables, elles ne disparaissent jamais totalement car elles sont remplacées par les protéines de micro-organismes.

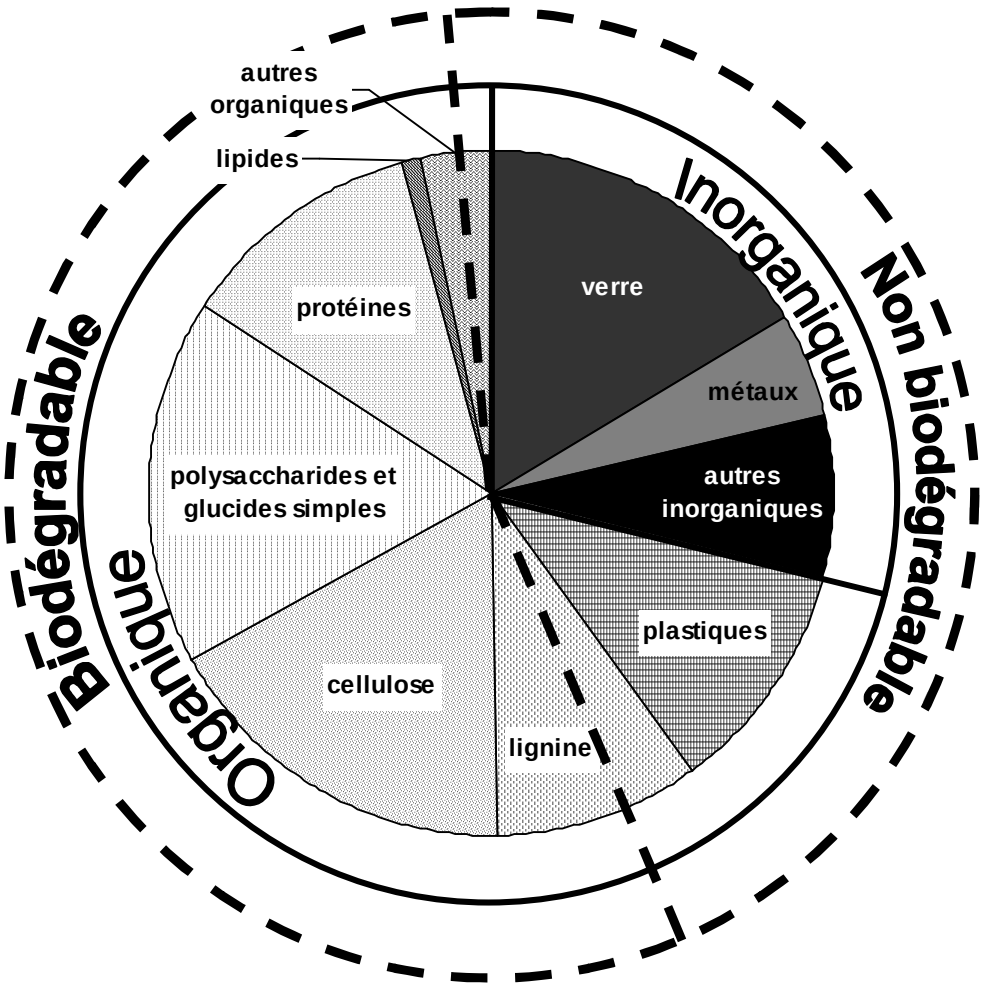


Figure 9. Répartition de la matière des ordures ménagères

4.6.2 Lien entre caractérisation, potentiel méthane et biodégradabilité

Le point central de la méthanisation est la conversion de matière organique en méthane et en dioxyde de carbone. Une caractérisation efficace de la matière organique devrait donc permettre de connaître à l'avance le comportement d'un déchet dans un méthaniseur, notamment combien de biogaz et de méthane il produira et à quelle vitesse.

Nous avons identifié le potentiel méthane (BMP) comme un moyen de mesurer directement la production de biogaz. Ce test est trop long pour être utilisé pour caractériser les déchets mais il peut servir de référence afin d'évaluer d'autres méthodes.

Comme nous l'avons vu, c'est seulement une fraction de la matière organique qui est dégradée. C'est ce qui a mené les chercheurs à définir la notion de biodégradabilité et à chercher des moyens de la prédire. Premièrement, Chandler *et al.* (1980) ont montré la corrélation négative entre la teneur en lignine d'un déchet et sa biodégradabilité. En 1997, Eleazer *et al.* ont étudié différents composants des déchets municipaux (papiers, végétaux et aliments) et ont montré que le potentiel méthanogène augmentait avec la teneur en hémicellulose et en cellulose et diminuait avec la teneur en lignine, sans toutefois parvenir à établir de relation mathématique.

En 2004, Nallathambi Gunaseelan a commencé à établir une base de données de valeurs de BMP pour différentes parties de végétaux représentatives des poubelles indiennes dans le but d'établir une relation avec leur composition. En 2007, en effectuant des calculs de régression linéaire, il a montré qu'il n'était pas possible d'établir de relation entre la valeur de

BMP et la teneur en un seul constituant (MV, COT, azote, glucides solubles, protéines et fractions de la méthode de Van Sœst). En revanche, de bonnes corrélations purent être établies, par régression linéaire multiple, lorsque plusieurs de ces paramètres étaient pris en compte : glucides solubles, cellulose, lignine, azote et MV.

Enfin, en 2006, Buffière *et al.* ont introduit le concept de biodégradabilité tel que défini précédemment (4.2.2. La biodégradabilité). Ils ont également montré une corrélation linéaire négative simple entre cette biodégradabilité et le produit des teneurs en cellulose et en lignine. Ces travaux ont pris en compte des données de Moller *et al.* (2004) ainsi que des mesures effectuées sur des ordures ménagères qui se sont bien intégrées aux observations effectuées sur des déchets simples.

Nous avons donc identifié le fractionnement Van Sœst comme une réponse sans doute cohérente dans le cadre de la caractérisation des OMR en plus des dosages des glucides solubles et de la matière volatile.

5 Les paramètres de suivi et de conduite des méthaniseurs

5.1 Introduction

Comme tout traitement biologique, le traitement par méthanisation des déchets organiques repose sur l'utilisation par les micro-organismes de la matière organique constitutive des déchets. La matière qui fait l'objet d'un traitement par méthanisation peut être assimilée à un milieu biphasique (solide – liquide), le **solide** baignant dans le **liquide** constitué d'eau et de **matière organique dissoute**. Une troisième phase, **gazeuse**, se trouve principalement dans le ciel gazeux au-dessus du milieu réactionnel mais également sous forme de **gaz dissout** ou de bulles. Des échanges ont lieu entre ces trois phases. Compte tenu des besoins métaboliques des micro-organismes, la phase liquide, ainsi que l'interface entre le solide et le liquide (biofilm), sont supposés être le siège de l'essentiel de l'**activité microbiologique**.

Afin de suivre et de contrôler la bonne marche d'un procédé de méthanisation il est nécessaire d'observer ces différentes parties : fraction solide, fraction liquide/dissoute, biogaz et activité hydrolytique microbiologique.

5.2 Les paramètres usuels de suivi

5.2.1 Suivi du biogaz

Les mesures sur des gaz peuvent être réalisées plus facilement que sur des liquides ou des solides. Dans une opération de méthanisation stable, le rapport entre CO_2 et CH_4 dans le biogaz sera quasiment constant et la production de biogaz total reflètera donc l'activité et le rendement du procédé. Des surcharges organiques ou des inhibitions peuvent causer une accumulation de composés intermédiaires, tels que les AGV, entraînant une production de gaz plus faible. Une inhibition causerait une baisse directe de la production de gaz tandis qu'une surcharge provoquerait d'abord une augmentation de la production suivie d'une diminution, une fois que les AGV se seraient accumulés. La production de gaz est donc le premier et le plus utilisé des paramètres de suivi et de contrôle de la méthanisation. La mesure en ligne de la production de gaz est très répandue (Ahring, 2003).

Le méthane peut être utilisé pour la production d'énergie et le rendement en méthane est donc intéressant. Normalement, le degré d'oxydation moyen du carbone dans la matière organique contrôle le rapport entre CH_4 et CO_2 produits. Toutefois, le pH, l'alcalinité dans le réacteur et la température contrôlent l'équilibre du CO_2 entre la phase liquide et la phase gazeuse (Pfeffer, 1974). Des variations de pH et d'alcalinité feront donc varier le rapport CH_4/CO_2. Ce rapport n'est pas considéré comme un bon indicateur de contrôle de la méthanisation, notamment en raison de son caractère fluctuant. Il est donc plus intéressant de mesurer la production de méthane seule car elle n'est pas soumise à ces perturbations.

La température a également un effet sur la composition en eau du biogaz (Pfeffer, 1974). En effet, une augmentation de température augmente la pression de vapeur d'eau. A 60°C le biogaz contient 19,6 % de vapeur d'eau. Quand le gaz est séché, cette eau est retirée et cela change le pourcentage en CH_4 et CO_2 dans le gaz sec. Cependant, comme la température est habituellement maîtrisée et connue dans le réacteur, il est possible de corriger ces erreurs par le calcul.

5.2.2 Dosage des composés intermédiaires

La dégradation des glucides solubles et insolubles, des protéines et de lipides produit une large gamme de composés intermédiaires, qui sont ensuite transformés en d'autres intermédiaires ou en produit finaux (CO_2 et CH_4). Il peut être très utile de suivre ces composés intermédiaires pour obtenir de l'information sur l'activité des micro-organismes.

Le dosage des glucides insolubles et des polymères très ramifiés, tels que la cellulose, nécessite des méthodes de pré-traitement des échantillons très complexes. Le dosage des glucides solubles est en principe aisé à l'aide de l'HPLC mais nécessite une élimination de tous les solides en suspension, ce qui n'est pas très adapté à la digestion par voie sèche. L'analyse des protéines, des acides aminés, des lipides et des acides gras à longue chaîne nécessite également une purification ou une extraction préalable.

Les **acides gras volatils (AGV)** sont parmi les composés intermédiaires les plus intéressants. Il est connu que le suivi des AGV peut donner de l'information importante sur le statut du procédé (Mösche et Jördening, 1999 ; Pind *et al.*, 2003). Souvent, l'acétate et le propionate sont prédominants. En conséquence il a été cru que le rapport entre ces deux AGV pouvait être utilisé comme indicateur d'un déséquilibre du système dans les réacteurs en phase liquide (Russell et Jeraci, 1984). Cependant, il a ensuite été démontré que ce rapport ne pouvait pas être utilisé de façon générale (Pullammanappallil *et al.*, 2001).

Une des principales raisons pour laquelle il est difficile d'interpréter de façon générale les concentrations en AGV de procédés stables, est que la composition du substrat a une grande influence sur les voies métaboliques impliquées dans la production de méthane. Comme la composition des déchets ménagers est très variable, la répartition de la concentration entre les différents acides organiques ne constitue pas un indicateur très fiable.

Très souvent une concentration élevée en AGV est la conséquence d'une inhibition et non sa cause (Ahring *et al.*, 1995 ; *cf.* "3.6.4. Sensibilité des différentes flores bactériennes à l'azote ammoniac"). Ainsi la concentration en AGV est largement considérée comme un indicateur de problème dans le procédé. Une surcharge organique est souvent accompagnée d'une accumulation d'acétate. Toutefois, si la production de méthane augmente avec l'augmentation de la concentration en acétate, le procédé peut très bien trouver un nouveau point d'équilibre entre la production et la consommation d'acétate, à un niveau de concentration plus élevé (Ahring *et al.*, 1995). Une concentration accrue d'AGV ne devrait donc pas être considérée comme un signe infaillible de défaillance, mais plutôt comme un changement d'équilibre du système qui pourrait potentiellement conduire à une défaillance.

L'accumulation de propionate et de butyrate est souvent vue comme un déséquilibre entre l'hydrolyse/acidogenèse et l'acétogenèse. Le propionate, le butyrate et les AGV plus longs nécessitent de très faibles concentrations en hydrogène pour que leur dégradation soit énergétiquement favorable. La dégradation du propionate nécessite une concentration en hydrogène 5 à 6 fois inférieure que pour le butyrate (Ozturk, 1991). Ainsi, une accumulation de propionate est souvent observée lors de changement de composition du substrat ou de rythme d'alimentation, à cause d'augmentations de courte durée des niveaux d'hydrogène dissout (Ahring *et al.*, 1995 ; Mösche et Jördening, 1999). Si l'augmentation d'hydrogène est plus sévère, une augmentation de butyrate sera également observée (Ozturk, 1991). Si le facteur de stress est supprimé et que le système parvient à se stabiliser, il sera souvent observé que le butyrate est dégradé avant le propionate en conséquence de la différence de sensibilité à l'hydrogène (Ozturk, 1991).

Certaines études ont montré que les formes *iso-* du butyrate et du valérate sont de meilleurs indicateurs de modifications de l'équilibre du procédé (Ahring *et al.*, 1995). Le

butyrate existe sous deux formes : *n*-butyrate et *iso*-butyrate. Le *n*-butyrate est considéré comme le produit principal de la dégradation de molécules plus grandes. La formation d'*iso*-butyrate résulte surtout de la dégradation de la valine, un acide aminé ramifié (Allison, 1978). La concentration en *iso*-butyrate devrait donc rester très faible. Cependant, la transformation entre l'*iso*- et le *n*-butyrate a été établie (Matthies et Schink, 1992). Ainsi, l'*iso*-butyrate peut agir comme un stockage temporaire du butyrate. L'*iso*-butyrate prévaut sur la forme *n*-butyrate en conditions de stress ainsi qu'en condition de plus faible température (Nozhevnikova *et al.*, 2000).

5.2.3 Dosage des composés inorganiques

a) Potentiel redox

Une des mesures les plus simples est celle du potentiel redox qui peut refléter des changements au niveau des agents oxydants ou réducteurs. Des tentatives ont été faites pour suivre le potentiel redox en milieu liquide mais l'applicabilité de cette mesure est limitée à la détection de l'inhibition par l'oxygène (Chynoweth *et al.*, 1994).

b) Ammoniac

Pour les déchets contenant beaucoup d'azote ou de protéines il est important de s'intéresser à la concentration en ammoniac dans le réacteur afin d'éviter les problèmes d'inhibition. Nous avons développé la problématique de l'inhibition par l'ammoniac plus haut (*cf.* "3.6. L'azote ammoniacal"). Rappelons que les concentrations inhibitrices n'ont pas encore été déterminées pour la méthanisation par voie sèche.

c) pH

L'activité protonique, reflétée par le pH, reflète l'ensemble des cations et anions dans le milieu réactionnel et est fonction de nombreux composants chimiques incluant les acides organiques et les bases. Ainsi, le pH peut donner des indications sur d'éventuelles modifications de l'équilibre chimique, c'est-à-dire quand des acides, des bases, des anions ou des cations sont produits ou consommés en résultat de l'activité métabolique.

De plus, l'activité microbienne est dépendante du pH (*cf.* "3.3. Le pH et l'alcalinité"). Et le suivi du pH est donc nécessaire si celui-ci n'est pas régulé.

L'interprétation de la mesure de pH est toutefois compliquée. Les tampons principaux, tels que le bicarbonate, l'ammoniac et les AGV, peuvent stabiliser le pH, ou tout au moins l'affecter considérablement. Ces composés sont également des inhibiteurs potentiels de la méthanisation, à des degrés divers en fonction de leur état chimique (dissocié ou non). Les mesures de pH ne peuvent donc pas être utilisées comme des mesures indirectes de composés spécifiques ou d'activités, mais devrait être utilisées comme une mesure supplémentaire significative pour la description de l'état du réacteur.

d) Alcalinité

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les changements de pH ne reflètent pas nécessairement l'activité métabolique, à cause de la présence de tampons forts tels que le bicarbonate, l'ammoniac et les AGV. Pour dépasser ce manque d'information, les mesures d'alcalinité sont devenues une façon commune d'estimer le pouvoir tampon en milieu liquide. L'alcalinité reflète la capacité du milieu à résister à la baisse de pH. Elle est exprimée en mg $CaCO_3$/ℓ.

5.2.4 Abattement en matière organique

Une manière élémentaire de contrôler un méthaniseur est de suivre ses performances. Les performances d'un méthaniseur concernent la dégradation de la matière organique entrante et la production de biogaz, comme nous l'avons vu plus haut. Pour suivre la dégradation de la matière organique, le plus difficile reste de mesurer la quantité de matière organique dans le déchet entrant et dans le digestat sortant, comme nous l'avons vu au chapitre "4. La caractérisation de la matière organique".

Les définitions et calculs des principaux paramètres de performance des méthaniseurs sont repris dans le Tableau 15. Toute la difficulté réside dans le fait de l'interprétation des paramètres d'abattement, en particulier par rapport à ce que devraient être les performances "maximales" de digestion. Par exemple, un abattement de 30 % sur la matière volatile peut sembler modeste mais il est maximal si seulement 30 % de cette matière volatile est biodégradable.

Tableau 15. Calcul des principaux paramètres des réacteurs

Paramètres	Calcul	Notations
Charge volumique appliquée CVA (kg_{MV}/m^3réacteur/j)	$CVA = \frac{F_E \times \tau_{MVe}}{V_R}$	F_E : débit massique entrant (kg/j) τ_{MSe} : taux de MS entrante (kgMS/kg) τ_{MVe} : taux de MV entrante (kgMV/kg M V_R : volume du réacteur (m^3)
Temps de séjour hydraulique TSH (jours)	$TSH = \frac{V_R}{Q_E}$	Q_E : débit volumique entrant (m^3/j)
Temps de séjour des solides TSS (jours)	$TSS = \frac{M_R \times \tau_{MSr} \times \tau_{MVr}}{F_S \times \tau_{MSs} \times \tau_{MVs}}$	M_R : masse du réacteur (kg) r, s : indices relatifs au réacteur et à la so F_s : débit massique sortant (kg/j)
Abattement des matières sèches R_{MS} (sans dimension)	$R_{MS} = 1 - \frac{F_S \times \tau_{MSs}}{F_E \times \tau_{MSe}}$	
Abattement des matières volatiles R_{MV} (sans dimension)	$R_{MV} = 1 - \frac{F_S \times \tau_{MSs} \times \tau_{MVs}}{F_E \times \tau_{MSe} \times \tau_{MVe}}$	
Production spécifique de gaz SGP (Nm^3/m^3réacteur/j)	$SGP = \frac{Q_G}{V_R}$	Q_G : Débit de biogaz (Nm^3/j)
Rendement apparent en méthane R_{CH4} (Nm^3CH_4/kgMV)	$R_{CH_4} = \frac{Q_{CH_4}}{F_E \times \tau_{MSs} \times \tau_{MVs}}$	Q_{CH4} : Débit de méthane (Nm^3/j)
Avancement de la réaction η (sans dimension)	$\eta = \frac{R_{CH_4}}{BMP}$	BMP : potentiel méthanogène du déchet entrant (Nm^3CH_4/kgMV)

a) Charge appliquée et temps de séjour

La charge volumique appliquée (CVA) est définie comme la quantité de matières volatiles entrant dans l'unité, par m^3 de réacteur et par jour. A l'échelle industrielle, les charges appliquées varient entre 5 et 15 kgMV/m^3/j (Buffière et Frederic, 2008). Cet important paramètre de dimensionnement dépend de la nature des composés à traiter et du type de technologie utilisée.

La notion de temps de séjour correspond au temps moyen pendant lequel un composé séjourne dans le réacteur. On distingue le temps de séjour hydraulique du temps de séjour des solides (Tableau 15). Le temps de séjour hydraulique (TSH) n'a de sens que lorsque le milieu de fermentation est liquide (cas de la méthanisation par voie humide). Pour les déchets

solides, il est préférable de se référer au temps de séjour des solides (TSS), qui varie entre 15 et 30 jours, selon le type de solide et la technologie utilisée.

b) Les critères de performance

Le premier critère de performance est le rendement d'élimination. Dans des procédés fonctionnant en continu, il est exprimé comme la fraction de solide éliminée entre l'entrée et la sortie du réacteur. Cet abattement peut s'exprimer par rapport à la matière sèche ou par rapport à la matière volatile.

Un autre critère de performance utilisé est la production de biogaz, qui donne une indication sur l'activité réelle de la dégradation. Nous trouvons également souvent comme donnée de fonctionnement des installations le rendement en méthane, défini comme la quantité moyenne de méthane produit rapportée à la masse de matières volatiles introduites. Cependant, si ces deux critères globaux sont de bons indicateurs pour connaître le fonctionnement du réacteur, ils ne permettent pas pour autant de dire si ce dernier fonctionne de manière optimale ou non. Buffière et Frederic (2008) préconisent d'utiliser une définition du rendement basée sur les performances de production de méthane de l'installation par rapport à la production maximale définie donnée par le potentiel méthanogène.

c) Exemples

Le Tableau 16 donne des exemples de performances de méthaniseurs par voie sèche

Tableau 16. Exemples de performance de méthaniseurs par voie sèche, d'après Mata-Alvarez *et al.*, 1993

référence	Dranco, Belgique	Marseille, France	Valorga, France	Venise, Italie	
T (°C)	50 – 60	55	60	55	55
MS (%)	15 – 20	35	30	16	22
TSH (j)	18 - 21	10	9	12	8
CVA (kg/m^3)	10 – 13	16,5	19	7	14
SGP (m^3/m^3j)	5 – 8	5,6	6,5 – 8	2,8	4,1
R_{CH4} ($Nm^3/kgMV$)	0,5 – 0,6	0,34	0,39	0,41	0,30
% CH_4	55	60	56	62	53

5.3 Suivi de l'activité hydrolytique

5.3.1 Introduction

Les mesures que nous avons présentées jusqu'ici sont des paramètres externes ou des produits de l'activité cellulaire : il ne s'agit que d'indicateurs indirects. En fait, le but habituel du contrôle des procédés de méthanisation est d'optimiser l'activité métabolique. C'est pourquoi il est important de pouvoir estimer l'activité métabolique (Ahring, 2003).

Or, comme nous l'avons vu précédemment (*cf.* "2.3.5. Problématique de la spécificité de la digestion sèche d'OM"), il n'est pas possible de mesurer la quantité de micro-organismes dans un réacteur de digestion par voie sèche. De nombreux auteurs se sont intéressés à mesurer l'activité métabolique au travers d'indicateurs biochimiques produit par les micro-organismes, et notamment les enzymes (Palmisano *et al.*, 1993 ; Frolund *et al.*, 1995 ; Goel *et al.*, 1998).

Le dosage des enzymes extracellulaires dans la digestion sèche n'est pas encore très répandu. Mais, s'il était possible d'adapter les méthodes de dosages pour obtenir une mesure fiable, cela serait très utile pour suivre l'activité métabolique dans les méthaniseurs par voie sèche.

5.3.2 Distribution dans la cellule des enzymes

Les bactéries sont des micro-organismes producteurs importants d'enzymes de deux catégories : Les **endoenzymes** sont contenues dans le corps cellulaire et peuvent être relâchées dans le milieu de culture lors de la lyse des bactéries. La plupart sont liées de manière plus ou moins réversible à la membrane cellulaire.

Les **exoenzymes** diffusent dans le milieu extérieur et sont facilement extractibles à partir de ce milieu. En présence des substrats macromoléculaires, la cellule se trouve dans l'incapacité de les absorber et de les utiliser directement dans son métabolisme. Face à cette contrainte, les bactéries synthétisent puis excrètent des exoenzymes. Ces dernières, habituellement des enzymes hydrolytiques, sont mises en œuvre pour digérer et convertir les composés polymériques de haut poids moléculaire en produits simples, aptes à diffuser à travers la paroi et la membrane bactérienne. Certaines exoenzymes sont collées à la surface externe de la membrane alors que d'autres se trouvent à l'état libre dans le milieu.

5.3.3 Activité hydrolytique

Les enzymes les plus faciles à doser sont les enzymes extracellulaires que les micro-organismes sécrètent dans le milieu réactionnel. En effet, elles peuvent être extraites du milieu sans avoir à recourir à des opérations de lyse cellulaire et de purification du milieu. Elles sont généralement en quantité suffisamment importante pour ne pas avoir à les concentrer après leur extraction. De ce fait, ce sont les enzymes les plus souvent mesurées (Parawira *et al.*, 2005).

De plus, comme ce sont les enzymes extracellulaires qui sont impliquées dans l'hydrolyse, et que l'hydrolyse est considérée comme l'étape limitante de la méthanisation des déchets solides et particulaires (Maunoir *et al.*, 1991), la mesure de l'activité hydrolytique apparaît comme un paramètre particulièrement pertinent en digestion sèche.

Les enzymes hydrolytiques sont des enzymes qui catalysent la réaction de rupture de l'enchaînement covalent de 2 atomes d'une molécule avec fixation des éléments d'une molécule d'eau sur les valences rendues disponibles.

La liaison rompue peut être entre 2 atomes de carbone ou entre un atome de carbone et un hétéroatome (N, O, …). La liaison catalysée informe sur la nature de l'enzyme mise en jeu (liaisons peptidiques, esters, amines, …). La réaction d'hydrolyse peut être schématisée comme suit :

$$C - X + H_2O \longleftrightarrow C - OH + X - H$$

Bien que théoriquement réversibles, ces réactions ont leur équilibre déplacé plutôt dans le sens de l'hydrolyse en raison de la présence excessive des molécules d'eau. La réaction inverse (de synthèse) suit généralement *in vivo* d'autres voies métaboliques.

Il existe 3 groupes majeurs d'enzymes hydrolytiques classées selon qu'il s'agit de l'hydrolyse des **glycosides** (amidon, cellulose), des **substrats azotés** (protéines, peptides) ou des **esters** (lipides). Les enzymes étudiées habituellement en méthanisation sont de quatre grands groupes, qui correspondent aux principaux substrats organiques polymères : les **cellulases**, les **amylases**, les **protéases** et les **lipases** (Jones et Grainger, 1983).

5.3.4 Amylases

L'hydrolyse de l'amidon est réalisée par un mélange d'amylases qui est capable d'hydrolyser les liaisons α-1,4 et α-1,6 de l'amylose et de l'amylopectine et libère des monomères de glucose :

- L'α-amylase intervient au niveau des polysaccharides composés d'au moins trois unités glucosidiques.
- La β-amylase permet la formation de maltose (dimère de glucose) en hydrolysant une liaison sur deux à partir de l'extrémité non réductrice.
- L'amyloglucosidase hydrolyse les liaisons terminales et libère ainsi du glucose.

La production de cellulases est inhibée par de fortes concentrations en glucose et est stimulée par de faibles concentrations en glucose. Aucun effet de la concentration en acides aminés n'a été rapporté (Glenn, 1976).

5.3.5 Cellulases

a) Description

La bioconversion de la cellulose par les cellulases transforme ce produit en disaccharide (le cellobiose) mais aussi en monosaccharide (le glucose). Les cellulases sont en fait un cocktail d'enzymes : les exoglucanases, les endoglucanases et les β-glucosidases :

- Les exoglucanases démarrent leur attaque de la cellulose à partir des extrémités non réductrices. Certaines libèrent des résidus de cellobiose et d'autres du glucose. Elles sont très peu actives sur la carboxyméthylcellulose (CMC) en raison de la présence des groupements substitués qui altèrent la structure du polymère ;
- Les endoglucanases se manifestent par une attaque aspécifique au niveau des liaisons glucosidiques au sein des chaînes cellulosiques. Leur activité est mise en évidence sur des dérivés solubles de la cellulose comme la CMC ;
- Les β-glucosidases achèvent la dégradation des résidus de cellobiose ou de dextrines de faible poids moléculaire pour les convertir en substrat métabolisable, le glucose.

La cellulolyse est un phénomène relativement lent dont le déroulement suit plusieurs étapes (Percival Zhang *et al.*, 2006) :

- Il y a d'abord fixation des cellulases à la surface de la molécule formée par des microfibrilles cristallisées aboutissant à la formation d'un complexe enzyme-substrat qui entraîne une forte hydrolyse ;
- Les cellulases diffusent ensuite dans les espaces situés entre les microfibrilles et se fixent à la surface de ces dernières. Dès lors, l'hydrolyse est ralentie
- Les cellulases se détachent au fur et à mesure du déroulement de la réaction tout en entraînant la perte de tous les sites d'adsorption ;
- Enfin, les produits de l'hydrolyse inhibent la réaction et participent au détachement des enzymes, signalant la diminution du taux d'hydrolyse.

b) Comportement

La production de cellulases est inhibée par de fortes concentrations en glucose et est stimulée par de faibles concentrations en glucose. Aucun effet de la concentration en acides aminés n'a été rapporté (Glenn, 1976). L'ammonium peut inhiber l'hydrolyse de la cellulose (Zeeman et Sanders, 2001).

Petre *et al.* (1981) ont suivi la cinétique d'apparition, dans un fermenteur, d'une trinitrophénylcarboxyméthyl-cellulase chez l'espèce C*lostridium thermocellum*. Ils ont pu distinguer deux phases : une phase précoce où la vitesse d'hydrolyse de la cellulose est plus rapide que l'apparition de l'activité endo-glucanase ; une fraction importante de l'activité cellulolytique reste associée au substrat insoluble. Puis une seconde phase où l'activité augmente de manière linéaire correspondant, après observation au microscope, à une lyse des cellules bactériennes.

Les travaux de Forsberg *et al.* (1981), concernant les activités hydrolytiques des bactéries dans le rumen, montrent que les cellulases se trouvent d'abord liées aux cellules pendant la phase exponentielles. Ensuite, elles sont relarguées dans le milieu au cours de la phase stationnaire. Les enzymes seraient probablement fixées sur des vésicules pendant la croissance bactérienne.

5.3.6 Protéinases

Les protéines sont hydrolysées par les protéases ce qui mène à la formation de peptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés par les peptidases. Le groupe des protéases et peptidases est appelé protéinases.

Des expériences en culture pure montrent que les micro-organismes commencent à produire des protéinases quand la concentration en acides aminés et en nutriments inorganiques dans la phase soluble est faible ou que la concentration en protéines et peptides est élevée (Glenn, 1976). La production de protéinases par les bactéries peut être inhibée par des composés tels que les acides aminés, le phosphate inorganique et le glucose (Glenn, 1976).

Cela implique que, pour atteindre un niveau élevé d'activité protéinolytique, les acides aminés ne doivent pas s'accumuler pendant la digestion. Les acides aminés peuvent être dégradés soit par oxydation anaérobie couplée à la production d'hydrogène, soit fermentés par la réaction de Stickland.

De plus, pendant la méthanisation, la protéolyse peut être inhibée par le glucose (Tommaso *et al.*, 2003). D'autres auteurs tirent des conclusions différentes du même type d'observation : l'adaptation des micro-organismes à la dégradation des glucides les rend moins aptes à dégrader les protéines (Sanders, 2001).

5.3.7 Lipases

La plupart des lipides présents dans les déchets sont sous la forme de triglycérides, un ester de glycérol avec trois acides gras à longue chaîne (AGLC). Pendant l'hydrolyse, ces composés sont hydrolysés en glycérol et les trois acides gras à longue chaîne. Cette réaction enzymatique est réalisée par les lipases (Sztajer et Maliszewska, 1988).

Les lipases sont plus actives envers les substrats non solubles. L'activité des lipases augmente quand la concentration du substrat atteint sa solubilité maximale et commence à former une seconde phase. Les lipases s'adsorbent à l'interface lipides-eau de cette seconde phase et l'activité enzymatique mesurée est fortement corrélée à la quantité de lipase adsorbée.

L'hydrolyse de la plupart des lipides ne conduit pas à la formation de monomères solubles. Dans le cas des lipides faiblement solubles, les AGLC représentent la majeure partie des produits de la réaction. Les AGLC libres s'adsorbent partiellement aux micro-organismes, s'accumulent à la surface de l'émulsion lipidique ou forment des micelles.

5.3.8 L'activité enzymatique comme indicateur de performance

La mesure de l'activité enzymatique hydrolytique a déjà été utilisée pour suivre l'activité métabolique dans des réacteurs de traitement biologique. Dans un réacteur aérobie de traitement d'eau usée, Le Bihan et Lessard (2000) ont suivi l'activité de diverses enzymes, dont les protéases, au moyen de tests simples et rapides. Ils ont observé que l'activité protéasique était linéairement corrélée à la charge organique mais également qu'une augmentation de l'activité protéasique pouvait accompagner une baisse de performance épuratoire. Dans ce cas, **les enzymes ne sont pas la cause de la baisse de performance mais reflètent la réaction des micro-organismes envers un substrat plus difficile à dégrader**.

Le suivi des activités hydrolytiques a également été réalisé dans des conditions anaérobies de méthanisation. Jones et Grainger (1983) ont déterminé que la mesure des enzymes extracellulaires était adaptée pour évaluer l'activité microbienne dans des décharges, mais pas pour quantifier les vitesses d'hydrolyse des polymères. **Les activités protéasique et amylasique étaient élevées au début de la dégradation des déchets. L'activité cellulasique était faible et l'activité lipasique n'a pas été détectée**. Les activités protéasique et amylasique augmentaient avec la teneur en eau du déchet jusqu'à atteindre un maximum à partir de 60 % d'humidité. Les variations d'activité enzymatique n'étaient pas corrélées aux dénombrements de micro-organismes de différents groupes microbiens.

Très récemment, Zhang *et al.* (2007) ont mesuré les activités protéasique, amylasique et cellulasique dans un méthaniseur de déchets de légumes, à 9,5 % de MS. Ils ont observé que **les activités amylasique et protéasique apparaissaient dès le début de la réaction puis disparaissaient brusquement** en 3 ou 4 jours. **L'activité cellulasique n'apparaissait que plus tard**, au bout de 8 jours, juste avant que l'expérience ne soit arrêtée. Cela est semblable aux observations de Jones et Grainger. Ils ont également observé qu'une augmentation du taux de dilution augmentait l'activité enzymatique, surtout pour la cellulase.

Richards *et al.* (1984) ont mesuré les activités protéase et amylase dans 14 stations d'épuration à boues activées. Ils ont pu établir une **corrélation entre ces activités et la vitesse d'épuration de la DCO** des eaux usées. Ils ont également observé, lors d'une surcharge accidentelle, l'augmentation rapide de ces deux activités, puis leur baisse dès que le problème fut réglé. **Ces activités paraissent donc adaptées à surveiller des installations de traitement biologique pour détecter d'éventuels problèmes de surcharge**.

Rivard *et al*. ont montré que, dans des méthaniseurs d'ordures ménagères (contenant beaucoup de papiers et déchets verts), l'activité cellulasique était constante pour une quantité de matière organique donnée. Elle apparaissait donc plus élevée, quand exprimée par rapport au volume du réacteur, dans un méthaniseur en voie sèche (30 % de MS) que dans un méthaniseur en voie humide (7,3 % de MS). Ils ont également observé, au moyen de dénombrements microbiologiques, que le nombre de micro-organismes était plus important dans le méthaniseur en voie humide. Cela montre que **l'activité enzymatique reflète l'activité biologique effective et non la quantité de biomasse microbienne** comme l'ont également montré Jones et Grainger. Cela n'est pas surprenant car **l'activité enzymatique est fonction de trois paramètres différents** : le nombre de micro-organismes capables de les produire, leur vitesse de production par cellule et l'inhibition des enzymes par les constituants du milieu réactionnel.

En raison de la variabilité des protocoles d'extraction et de dosage des enzymes, il est impossible de comparer quantitativement les résultats obtenus par différents auteurs. Les valeurs d'activité enzymatique gardent néanmoins un rôle qualitatif d'analyse des phénomènes au sein d'une étude. Au point de vue de la fiabilité des résultats, on notera que Rivard *et al*. sont les seuls à fournir des écarts-types pour leurs valeurs mesurées, et ceux-ci sont grands : jusqu'à 77 % de la valeur mesurée. Jones et Grainger soulignent la faible sensibilité de leur mesure d'activité protéasique mais considèrent néanmoins que la mesure des activités enzymatiques est un bon moyen d'étudier l'activité microbienne dans la méthanisation des déchets ménagers, en tous cas plus pertinent que le recensement ou le dénombrement des bactéries présentes.

5.4 Conclusion

Comme nous l'avons vu au cours de ce chapitre, il existe des méthodes de suivi des performances des méthaniseurs couramment utilisées pour leur pilotage. Le **suivi du biogaz et du méthane** sont simples à mettre en place et donnent une information globale sur la performance du méthaniseur. Ils sont un outil plus efficace quand il est possible de connaître la production attendue et pour cela il faut de bonnes méthodes de **caractérisation de la matière organique des déchets**.

Le **suivi de la matière organique** au cours du procédé pourrait s'avérer efficace à conditions de développer des **méthodes adaptées**. Les intermédiaires de réaction que sont les **AGV** paraissent être des indicateurs intéressants de l'état du système biochimique, mais ne suffisent pas à eux seuls. Le dosage des inhibiteurs, notamment l'**ammoniac**, permettraient de **détecter un éventuel problème d'inhibition**. Les mesures de pH et d'alcalinité peuvent apporter des informations complémentaires.

La mesure des **activités enzymatiques** est prometteuse pour évaluer instantanément l'**activité hydrolytique** au sein du réacteur. Elle permettrait également de **détecter rapidement d'éventuels problèmes de surcharge organique**. Les activités enzymatiques pourraient donc constituer une famille d'indicateurs particulièrement pertinents pour le suivi de la méthanisation des déchets. Cependant, les méthodes de mesures existantes doivent être adaptées, et surtout validées sur les matrices complexes que sont les milieux de digestion par voie sèche.

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

Vivre simplement pour que d'autres puissent simplement vivre.

[Ghandi]

II. MATERIEL ET METHODES

1 Réacteurs

1.1 Site pilote industriel

1.1.1 Contexte

Depuis 2004, le CREED – Veolia Environnement exploite une unité pilote de méthanisation à l'échelle semi-industrielle (1/250ème environ). Cette unité pilote est utilisée pour approfondir les connaissances de la méthanisation par voie sèche des déchets et développer un savoir faire pour l'exploitation de ce type d'unités à l'échelle industrielle.

Dans le cadre d'un projet Life Environnement appelé « METHAPI-Expertise », ce pilote a été utilisé afin de réaliser des essais en parallèle d'une unité industrielle située à Valladolid, exploitée par la société FCC Medio Ambiante. Le LBE – INRA était associé au projet pour la réalisation et l'interprétation d'analyses sur différents produits et sous-produits du traitement, prélevés au cours des différents essais menés.

Depuis Septembre 2007, le projet METHAPI-Expertise est terminé mais l'exploitation de ce pilote est poursuivie par le CReeD. Dans le cadre de cette thèse, des données issues du fonctionnement de cette unité pilote ont été utilisées en lieu et place de celles pouvant être issues d'une unité industrielle afin de les comparer à celles obtenues au cours des travaux menés au laboratoire.

1.1.2 Description du site pilote industriel

La Figure 10 et la Figure 11 présentent le schéma général du site pilote industriel. L'installation de méthanisation est constituée d'un prétraitement, du digesteur, d'un ensemble de déshydratation du digestat, d'un gazomètre et d'une torchère. La capacité de traitement est de 100 t/an. L'installation est implantée sur une superficie d'environ 1000 m², que l'on peut diviser en 3 aires principales :

a) Réception et préparation des déchets

Les déchets broyés et criblés à 4 cm sont réceptionnés dans des alvéoles de stockage et préparés. C'est-à-dire que les déchets sont débarrassés des éléments métalliques grâce à un aimant. Les déchets sont ensuite pesés avant leur introduction dans la trémie d'alimentation du méthaniseur.

b) Méthanisation

Le méthaniseur fonctionne selon le procédé Dranco fourni par OWS. Le volume total du méthaniseur est de 21 m^3. Il peut fonctionner en conditions mésophiles ou thermophiles grâce à un réseau d'eau chaude parcourant la paroi du réacteur afin d'y maintenir la température voulue.

Le réacteur de méthanisation peut également fonctionner en mode discontinu ou en mode semi-continu. En mode semi-continu, des déchets frais sont introduits dans le réacteur environ 3 fois par semaine en étant déposés dans la trémie d'alimentation équipée d'une vis sans fin. La vis sans fin permet de pousser les déchets frais vers une double vis disposée à angle droit et dont le rôle est l'impulsion d'un mouvement de l'ensemble de la masse contenue dans le réacteur. La double vis horizontale, localisée dans le fond du réacteur, prend

en charge les déchets frais dans une zone où se rejoignent également le digestat déjà présent et la source d'humidité (eau ou jus recirculés permettant d'adapter la teneur en MS du produit aux conditions optimales de réaction). Ces différents produits se retrouvent alors mélangés et poussés vers un côté du réacteur En arrivant à ce niveau, la pression imposée dans cette zone rend possible, par effet piston, la remontée du produit dans une première moitié du réacteur. En arrivant au niveau de la communication supérieure (« entrejambe ») entre les deux parties du réacteur, le produit retombe alors par gravité. Ainsi, la mise en route du système horizontal de double vis produit un mouvement circulaire du digestat. Afin de conserver une quantité de digestat constante dans le réacteur, chaque alimentation est précédée d'une extraction au cours de laquelle une partie du digestat est dirigée vers une presse à vis pour être déshydratée.

Ce pilote a été dimensionné pour traiter les déchets en voie sèche (MS du digestat entre 30 et 40 %) et a une capacité de traitement de 2 tonnes/semaine (données constructeur). Le pilote industriel simule à échelle réduite le fonctionnement d'une unité de méthanisation et permet d'effectuer des essais sur différents types de déchets.

c) Recyclage des effluents

La phase solide extraite lors du pressage est mélangée avec un structurant carboné (déchets verts) et compostée en andains ventilés. Les jus extraits sont acheminés vers un réservoir de stockage. Une partie des jus est introduite dans le digesteur au moment de l'alimentation afin d'ajuster l'humidité du déchet entrant.

Le biogaz formé est extrait et dirigé vers le gazomètre. Il est composé majoritairement de méthane et de dioxyde de carbone. Le volume du gazomètre est de 10 m^3. Le biogaz est par la suite brûlé dans une chaudière. La chaleur produite sert à chauffer l'eau du circuit de maintien en température du digesteur.

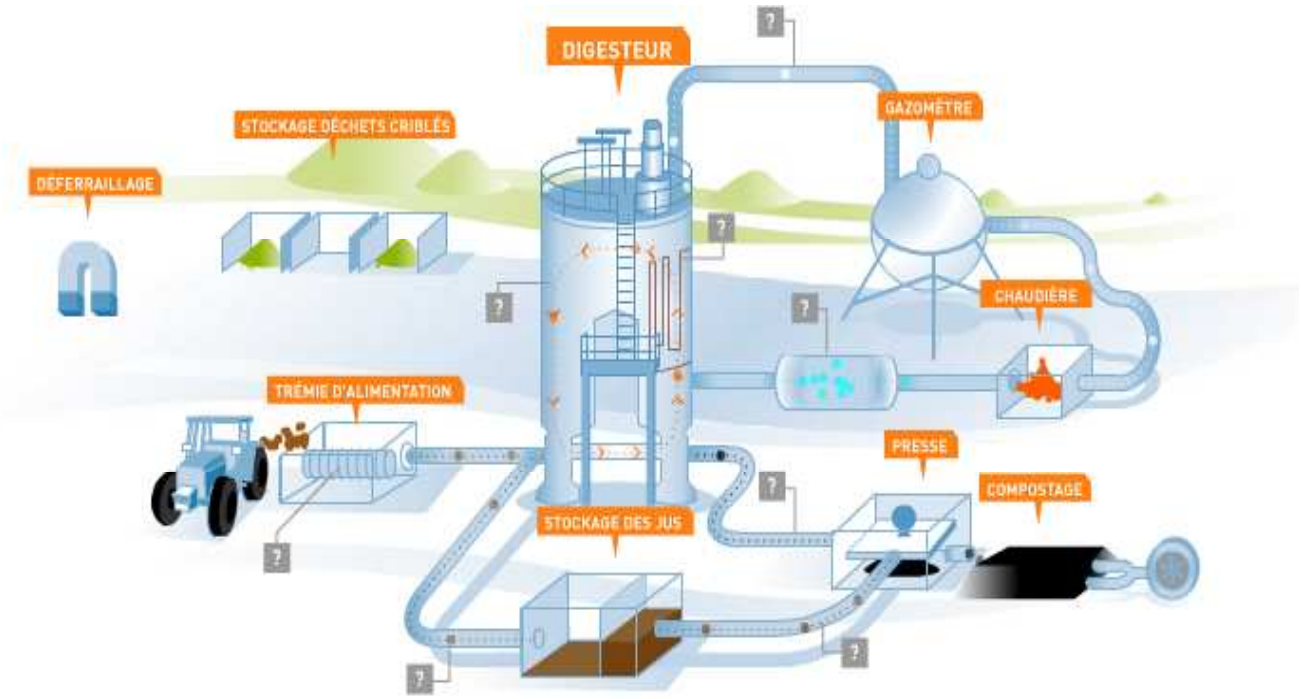


Figure 10. Schéma de l'installation pilote industrielle

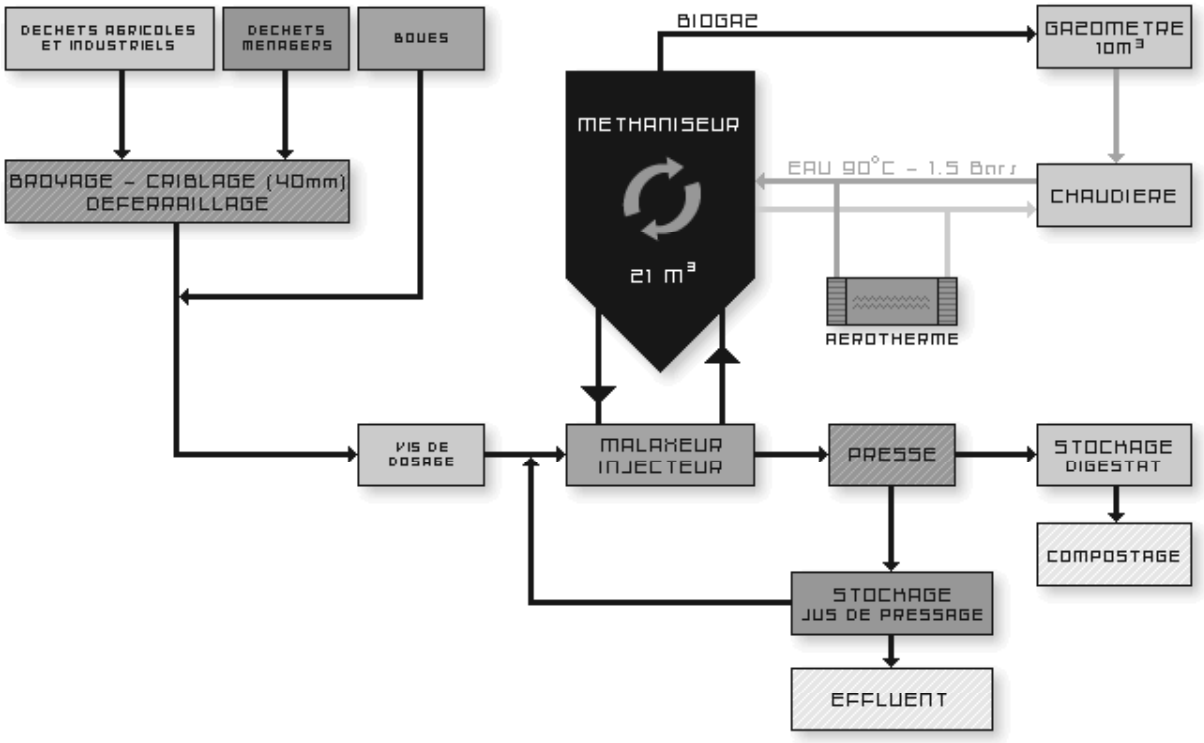


Figure 11. Synoptique du site pilote industriel

1.1.3 Suivi du réacteur industriel

Le réacteur pilote industriel est agité régulièrement (environ 1h30 les mardi et jeudi et environ 3h30 les lundi, mercredi et vendredi). Il est équipé d'un système de carottage permettant d'effectuer des prélèvements réguliers (1 fois par jour) de 1 à 1,5 kg d'échantillon. Les échantillons sont en partie analysés sur place et en partie analysés au LBE après congélation et envoi en glacière. Les productions de biogaz et de méthane sont suivies en ligne sur le méthaniseur.

1.2 Réacteur pilote de laboratoire

1.2.1 Description et fonctionnement du réacteur de laboratoire

Le réacteur pilote de laboratoire qui a été développé pour cette thèse est présenté à la Figure 12. Il a d'abord été conçu pour fonctionner en mode discontinu puis adapté pour fonctionner en mode continu. Il a un volume total de 40 ℓ avec un volume utile de 20 à 30 ℓ. La concentration en MS est entre 25 et 35 % (digestion sèche). L'humidité du déchet entrant est ajustée avec de l'eau du robinet.

Le réacteur a été construit en acier inoxydable et sa forme est celle d'un cylindre horizontal avec un diamètre de 35 cm et une longueur de 40 cm. L'agitation se fait à l'aide d'un système de brassage mécanique composé d'un mélangeur excentrique à 16 pales avec un diamètre de 27 cm et une longueur de 30 cm (Figure 13). Le mobile d'agitation est entraîné par un moteur d'une puissance de 1,1 kW avec un couple de 683 Nm à une vitesse de 3,2 trs/min. Il est actionné automatiquement toutes les 2 heures durant 5 minutes. Au sein du réacteur, la température est maintenue par circulation d'eau chauffée dans une double enveloppe. Le réacteur est isolé thermiquement avec une mousse néoprène de 50 mm d'épaisseur.

Une bouteille mise à température ambiante a été installée à la sortie de biogaz pour y piéger l'humidité. Un compteur électronique à déplacement volumétrique d'eau a été utilisé pour mesurer la production de biogaz sans interruption. Le réacteur est aussi équipé d'entrées pour le remplir et prélever du digestat. Lors du fonctionnement en mode discontinu, un système de sas permet d'effectuer des prélèvements en évitant toute entrée d'air dans le système. Toutefois, ce système ne permet que des prélèvements de faible taille (200 g environ) et n'est pas pratique à utiliser. Ce point nécessite des améliorations pour l'emploi future de réacteurs de ce type. Pour le fonctionnement en semi-continu une trappe a été installée sur le flanc du réacteur afin de pouvoir effectuer des soutirages à l'aide d'une louche. La plaque de tête peut être démontée pour la vidange totale du réacteur.

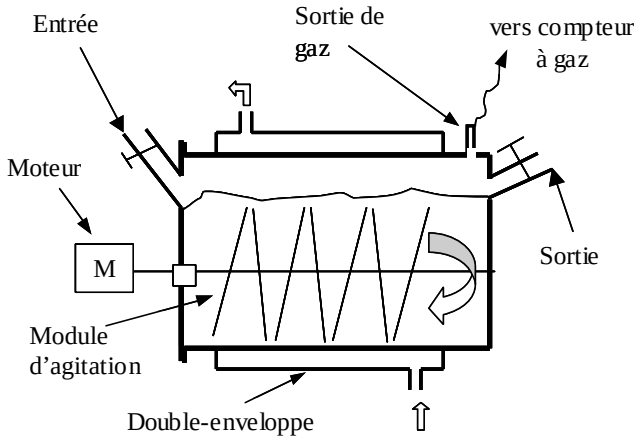


Figure 12. Schéma du réacteur de laboratoire

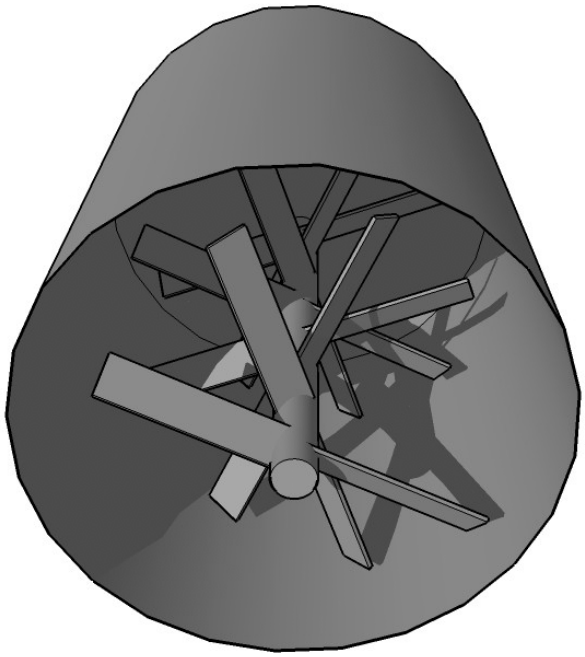


Figure 13. Vue en perspective du mobile d'agitation du réacteur de laboratoire

1.2.2 Mesure et analyse du biogaz et du méthane

La production de biogaz est mesurée continuellement à l'aide d'un compteur à gaz (Figure 14). Le principe de fonctionnement du compteur est basé sur la détection de niveau d'eau dans une cellule de mesure. Le gaz à mesurer est dirigé vers une électrovanne à 3 voies. En position normale (position 1 : fermée), la sortie de l'électrovanne est celle qui est

connectée à la cellule de mesure. La cellule de mesure est donc reliée directement au gaz à mesurer. Le gaz provoque un déplacement du liquide vers le bas dans la cellule de mesure et le liquide déplacé passe dans le récipient de réserve. Lorsque le niveau passe en-dessous de celui de l'électrode 2, l'électrovanne actionnée par le boîtier de commande s'ouvre. En position ouverte (position 2), l'arrivée de gaz est fermée, et la cellule de mesure est alors en contact avec l'évacuation du gaz. Le liquide remonte dans la cellule de mesure, évacuant le gaz. Lorsqu'il atteint le niveau de l'électrode 1, l'électrovanne se referme, et un compteur est incrémenté au niveau du boîtier. Le signal peut également être récupéré pour l'acquisition sur un micro-ordinateur.

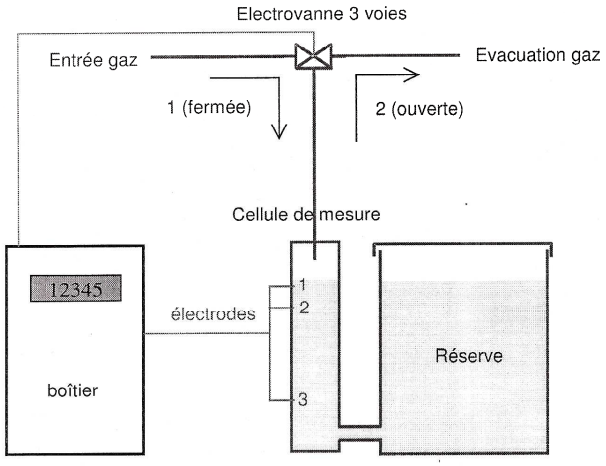


Figure 14. Schéma du compteur à gaz

A chaque cycle ouverture/fermeture de la vanne correspond un volume de gaz équivalent au volume compris entre les électrodes 1 et 2. Le compteur est donc un totaliseur et non un débitmètre direct. La concentration en méthane du biogaz est mesurée ponctuellement par prélèvement d'un échantillon de biogaz dans une seringue hermétique et analyse par chromatographie en phase gazeuse (voir ci-dessous).

2 Tests de potentiel et d'activité méthanogènes

2.1 Mesure du biogaz et du méthane dans les tests en fiole

2.1.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse du biogaz est réalisée par chromatographie en phase gazeuse après injection de 1 mℓ de gaz. L'échantillon est injecté simultanément dans 2 colonnes concentriques (colonne CTR I de Alltech). Le chromatographe SHIMADZU GC-14 équipé d'un intégrateur SHIMADZU C-R3A permet le dosage des gaz : CO_2, O_2, N_2, CH_4 et H_2.

Le gaz vecteur utilisé est l'Argon (2,8 bars). La température du four est de 35°C, celle de l'injecteur est de 100°C et celle du détecteur est de 80°C. La détection se fait sur un catharomètre dont l'intensité est de 80 mA. La calibration est préalablement réalisée avec un mélange étalon de gaz CO_2, O_2, N_2, CH_4 et H_2 en concentrations connues. L'erreur de mesure est de l'ordre de 5 %.

2.1.2 Mesure du volume de biogaz

Pour les tests en fioles à plasma (volume 575 mℓ), le volume de biogaz produit est mesuré par déplacement de liquide. Le dispositif de mesure du volume consiste en une

aiguille reliée par un tube à une éprouvette renversée remplie d'eau. L'eau utilisée dans ce dispositif est acidifiée (pH = 4) afin de minimiser la dissolution de dioxyde de carbone dans l'eau. L'aiguille est piquée dans le septum de la fiole. Par différence de pression, le biogaz produit est libéré dans le tube et déplace le niveau d'eau contenue dans l'éprouvette. L'erreur de mesure est d'environ 4 %.

2.2 Potentiel méthane (BMP)

Les mesures de BMP sont des tests de biodégradabilité anaérobie qui permettent de comparer les productions de gaz de différents substrats, sur un même inoculum. Pour ce test, il est nécessaire que l'inoculum ait une forte activité, une forte adaptabilité et une activité endogène faible. Dans le cas présent, l'inoculum utilisé provient d'un stock alimenté en déchets solides variés (aliments, herbe, papier, …).

Les tests ont été réalisés en fioles à plasma, en conditions anaérobies mésophiles ou thermophiles. Les fioles contiennent environ 200 g d'inoculum et environ 0,5 g de DCO à dégrader (nature du substrat diverse) par gramme de MV contenu dans l'inoculum. Pour ne pas perturber les conditions d'anaérobiose, le biogaz produit est prélevé par un système d'éprouvette renversée (voir ci-dessus). Les fioles sont placées sur une table agitante (180 trs/min) thermostatée à 37 ou 55°C.

Lors de ce test, un témoin négatif ne contenant pas de substrat à dégrader permet de quantifier la production de biogaz endogène.

2.3 Activité méthanogène

La mesure d'activité méthanogène spécifique est une technique utile et répandue pour évaluer l'effet de conditions opératoires sur la méthanisation (Koster, 1986 ; Lay *et al.*, 1998 ; Nopharatana *et al.*, 1998). Il s'agit de mesurer la vitesse maximale de production de méthane à partir d'un substrat simple par un inoculum donné dans des conditions données. Soto *et al.* (1993) ont fait une synthèse intéressante des variantes méthodologiques employées dans la bibliographie pour mesurer l'activité méthanogène. Ils ont analysé les bases théoriques des méthodes et ont proposé une méthodologie que nous avons suivie.

Les tests ont été réalisés en fioles à plasma, en conditions anaérobies thermophiles. L'inoculum est un digestat provenant du réacteur de laboratoire en fin de batch (stabilisé).

Les fioles contiennent environ 100 g d'inoculum et environ 0,5 g de DCO à dégrader, sous forme de glucose, par gramme de MV contenu dans l'inoculum. Le pH est fixé à la valeur voulue grâce à l'ajout de 3 mℓ de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 100 g/ℓ puis ajusté par ajout de soude ou d'acide chlorhydrique concentrés. La quantité désirée d'ammoniac est apportée sous forme de solution de chlorure d'ammonium (NH_4Cl). Enfin, de l'eau est ajoutée pour atteindre la concentration en MS désirée.

Pour ne pas perturber les conditions d'anaérobiose, le biogaz produit est prélevé par un système d'éprouvette renversée (voir ci-dessus). Les fioles sont placées sur une table agitante (180 trs/min) thermostatée à 37 ou 55°C. La production de biogaz et de méthane est mesurée deux fois par jour afin de pouvoir tracer une courbe de production de méthane en fonction du temps la plus précise possible. A l'aide d'un programme développé dans le logiciel R (cf. Annexe 1) la courbe est lissée et sa dérivée maximale est identifiée. Cette dérivée maximale est l'activité méthanogène. En la ramenant à la quantité de MV dans l'inoculum, il est possible d'obtenir l'activité méthanogène spécifique exprimée en g DCO dégradée/j/g MV dans l'inoculum.

3 Caractérisation des déchets et des digestats

3.1 Préparation des échantillons

Deux types d'échantillons sont analysés : des échantillons de déchet (à 50-60 % de MS environ) et des échantillons de digestat (à 30-40 % de MS environ). La préparation des échantillons varie en fonction des dosages à réaliser (Figure 15). Certains dosages nécessitent un échantillon totalement sec. Pour cela, les échantillons sont lyophilisés puis broyés à 1 mm afin d'obtenir une poudre assez fine et homogène. Certains dosages nécessitent un échantillon liquide. Pour cela une suspension est réalisée, à partir de la poudre lyophilisée, dans de l'eau distillée. Cette suspension est maintenue sous agitation lors du prélèvement à la pipette de la quantité demandée par la méthode de dosage concernée. Le problème de cette technique est qu'une importante variabilité et une mauvaise répétabilité sont apportées lors du prélèvement de la suspension sous agitation, du fait de la présence éventuelle d'amas non dispersés.

Enfin, certains dosages nécessitent un liquide exempt de particules. Une fraction soluble à l'eau doit alors être extraite des échantillons solides non lyophilisés. L'échantillon est dilué au quart (masse/masse) dans de l'eau distillée. Le mélange est placé sous agitation (barreau aimanté) à température ambiante pendant 30 minutes. Il est ensuite centrifugé à 25 000.*g* pendant 15 minutes. Le surnageant est considéré comme l'extrait de fraction soluble. Cette fraction ne représente, bien entendu, qu'une partie de l'échantillon de départ. Pour le dosage des AGV, on considère que tous les AGV sont extraits dans la fraction soluble. Pour le dosage de la DCO, on distingue la DCO totale et la DCO soluble.

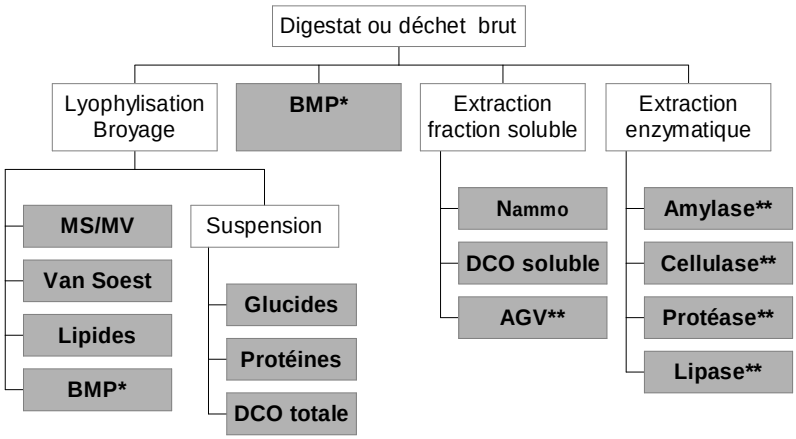


Figure 15. Organisation du traitement des échantillons. * : déchet uniquement ; ** : digestat uniquement

3.2 Matière sèche (MS) et matière volatile (MV)

La détermination des différentes fractions de la matière est réalisée par pesées et séchages des boues, selon la méthode normalisée NF T 90 105 (1972). L'écart de mesure est de l'ordre de 3 à 5 %.

Pour déterminer la teneur en matière sèche totale (MS) ou en matière volatile (MV), une masse connue d'échantillon est introduite dans un creuset en porcelaine, préalablement séché, de masse connue. Le creuset est mis à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. L'eau est ainsi évaporée, il ne reste dans le creuset que la matière sèche. Durant ce séchage, les composés volatils comme les AGV sont volatilisés. Ils ne sont pas comptés dans la mesure de la matière sèche. Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La différence de masses correspond donc à la matière sèche contenue dans l'échantillon. En considérant la masse

d'échantillon introduit, la mesure est alors exprimée en pourcentage massique (g de MS pour 100 g d'échantillon).

Le creuset est ensuite mis au four à 550°C pendant deux heures. Après refroidissement, le creuset est de nouveau pesé : il ne reste plus que la matière minérale. La masse de la matière volatile est obtenue par différence entre la masse de matière sèche et la masse de matière minérale. La matière volatile à 550°C est parfois assimilée à la masse de matière organique.

3.3 Fractionnement selon Van Sœst

La méthode de dosage utilisée est celle de Van Sœst (Van Soest, 1963). Cette méthode de fractionnement de la matière organique est basée sur des extractions successives. A chaque étape, les échantillons sont plongés dans des solutions (détergentes ou acides) afin d'extraire les composés à doser. Les échantillons sont ensuite séchés et pesés. Ainsi, par différences de masse, il est possible de quantifier chaque fraction.

Les échantillons de déchets solides sont préalablement lyophilisés, de façon à obtenir une masse la plus sèche possible, et broyés finement. Les quantités de MS et de MV sont déterminées sur ces échantillons séchés broyés. Ces mesures entrent dans les calculs des différentes fractions.

Un gramme d'échantillon (séché et en poudre) est introduit dans un sac Fiberbag (Gerhardt) préalablement séché et pesé avec un Becher de support. La masse d'échantillon est mesurée précisément.

Les sacs contenant les échantillons sont ensuite introduits dans une solution de détergent neutre (30 g de dodécylhydrogénosulfate de sodium + 6,81 g de tétraborate de sodium + 18,61 g d'acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique EDTA + 4,56 g de disodium hydrogénophosphate anhydre, dilués dans un litre d'eau distillée) portée à ébullition. Il est impératif que la solution pénètre bien dans tous les sacs. Le temps de contact est d'une heure. La fraction soluble au détergent neutre (NDS) est extraite par le détergent neutre. Les sacs sont ensuite rincés abondamment à l'eau distillée chaude, séchés à l'étuve à 105°C et pesés.

Les sacs sont ensuite introduits dans une solution de dédétergent acide (20 g de bromure d'hexadécyltriméthylammonium + 28,8 mℓ d'acide sulfurique à 96 %, dilués dans un litre d'eau distillée). Le tout est porté à ébullition pendant une heure. La fraction soluble au détergent acide mais pas au détergent neutre (ADS) est extraite par le détergent acide. Les sacs sont ensuite rincés abondamment à l'eau distillée chaude, séchés à l'étuve à 105°C et pesés.

Les sacs sont ensuite immergés dans un volume d'acide sulfurique à 72 % pendant 3 heures. La fraction solubilisable uniquement par l'acide sulfurique (SAS) est extraite par l'acide tandis que la fraction de MV insoluble (IVS) reste dans le sac avec la fraction minérale. Les sacs sont ensuite rincés abondamment à l'eau distillée chaude, séchés à l'étuve à 105°C et pesés. Puis les sacs sont placés à l'étuve à 550°C pendant 2 heures et, de nouveau, pesés. La fraction IVS est volatilisée dans le four à 550°C et seule la fraction minérale reste dans le sac après calcination.

Chaque résidu est calculé comme la différence entre la masse après séchage et la masse après calcination. Les différentes fractions (NDS, ADS, SAS et IVS) sont calculées à partir de ces résidus. Les résultats sont exprimés en fraction massique de matière volatile totale (% de la MV). Dans le cas de déchets riches en fibres, comme les OM, l'erreur de mesure peut être de l'ordre de 3 à 5 %

3.4 Dosage des glucides

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

1 mℓ d'échantillon est introduit dans un tube à essai, ainsi que 2 mℓ de réactif à l'anthrone (2 % d'anthrone dans H_2SO_4). Le mélange est réalisé alors que les tubes à essai sont plongés dans de la glace, afin de bloquer la réaction. Les échantillons sont ensuite plongés dans un bain marie d'eau bouillante pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes à nouveau dans un bain d'eau glacée. L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 625 nm, grâce à un spectrophotomètre DV-640 (Beckman). Afin de connaître la concentration en sucres, une gamme étalon est réalisée en utilisant du glucose, entre 20 et 100 mg/ℓ. Les résultats sont donc exprimés en gramme équivalent de glucose (g eqGlc/ℓ).

L'intérêt de cette méthode est que les protéines, les acides gras ou l'acétate n'interagissent pas au cours du dosage (Raunkjaer *et al.*, 1994)

3.5 Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Cette technique permet de quantifier les liaisons peptidiques. D'après Raunkjaer *et al.* (1994), c'est la méthode la plus juste et la plus précise pour mesurer la teneur en protéines dans les eaux usées domestiques.

1 mℓ d'échantillon est introduit dans un tube à hémolyse, ainsi que 3 mℓ d'une solution mélange de bicarbonate de sodium, de sulfate de cuivre et de tartrate double de sodium et de potassium, et de soude (solution mélange : 50 mℓ d'une solution de Na_2CO_3 à 2 % préparée dans de la soude NaOH à 0,1 N + 1 mℓ d'une solution à 1 % de $CuSO_4$ et 2 % de $C_4H_4KnaO_6$). 0,3 mℓ de réactif de Folin (solution commerciale diluée deux fois) sont ensuite ajoutés.

En milieu alcalin, les protéines réagissent avec les ions Cu^{2+} : complexation des ions Cu^{2+} et des atomes d'azote des liaisons peptidiques et donc réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} et oxydation des acides aminés. Les ions formés réduisent ensuite le complexe acide phophotungstique/acide phosphomolybdique contenu dans le réactif de Folin. Le réactif de Folin ainsi réduit donne une coloration bleue.

La réaction dure deux heures à l'obscurité (protection de la coloration). L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 750 nm, grâce à un spectrophotomètre DV-640 (Beckman). Afin de connaître la concentration en protéines, une gamme étalon est réalisée en utilisant de la sérum albumine bovine (BSA), entre 20 et 100 mg/ℓ. Les résultats sont donc exprimés en gramme équivalent de BSA par litre (g éqBSA/ℓ).

3.6 Dosage des lipides

3.6.1 Principe

Le dosage des lipides dans les échantillons solides se fait par extraction par solvant à chaud à l'appareil de Soxhlet. Le solvant utilisé est l'éther de pétrole, qui possède un point d'ébullition compris entre 40 et 60°C. Son caractère hydrophobe le rend sélectif aux lipides. Le solvant est chauffé à sa température d'ébullition. Il s'évapore et s'élève jusqu'à la colonne

de refroidissement. En passant par un tube extracteur, il se condense et tombe dans la cartouche contenant l'échantillon. A ce stade, les lipides sont extraits par le solvant. L'évaporation se poursuit et lorsque le tube extracteur est rempli (200 mℓ), le solvant est reflué dans le ballon de chauffage au moyen d'un siphon. Dans le ballon, le solvant est de nouveau porté à ébullition pour atteindre la colonne de refroidissement et entrer en contact avec l'échantillon. Selon la puissance de chauffe, il est possible d'ajuster la fréquence des cycles. Un cycle représente le temps entre deux reflux de solvant. La quantité de lipides extraits est mesurée en quantifiant la masse de lipides récupérés dans le solvant.

3.6.2 Méthode

Une cartouche en matière poreuse est utilisée pour contenir l'échantillon pendant l'extraction. La cartouche est tarée et on y introduit l'échantillon dont la masse a été déterminée précisément. Environ 3 g de Na_2SO_4 sont ajoutés dans la cartouche. La masse exacte est notée. Du coton cardé, dont la masse a été préalablement mesurée, est ajouté dans la cartouche pour empêcher les particules d'échantillon de flotter.

La cartouche préparée est placée dans le tube extracteur de l'appareil de Soxhlet (Figure 16). 200 mℓ d'éther de pétrole sont introduits dans le ballon monocol. Le montage est assemblé, la circulation d'eau mise en route et le chauffe ballon est ajusté à une température entre 50 et 60°C.

Lorsque le temps nécessaire à la réalisation de 8 cycles est écoulé, le chauffage est arrêté. Une fois à température ambiante, tout le solvant est récupéré dans un second ballon monocol. Ce ballon a été précédemment séché à l'étuve à 105°C et taré. Il est adapté à un évaporateur rotatif Rotavapor. Le solvant est évaporé sous pression réduite.

Après séchage à 105°C, le ballon ne contient plus que les lipides. Il est pesé et la différence de masse avec sa tare donne la masse de lipides extraits. Les résultats sont exprimés en g de lipides/g d'échantillon.

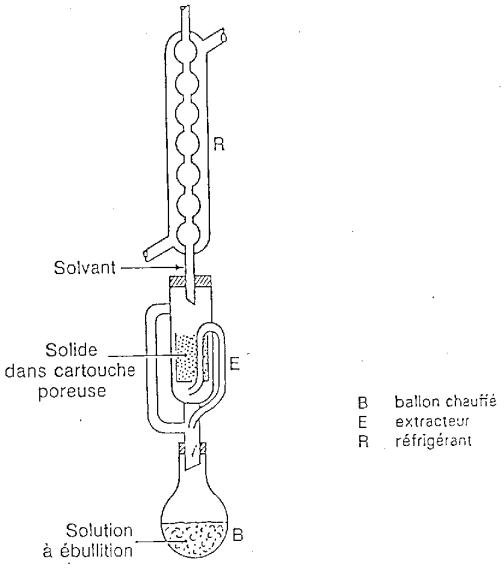


Figure 16. Schéma du montage de l'appareil de Soxhlet

3.7 Demande chimique en oxygène (DCO)

Les mesures de demande chimique en oxygène (DCO) sont réalisées selon la méthode normalisée NF T 90 101 (1988). La matière organique est oxydée en milieu acide (H_2SO_4) et en présence d'un catalyseur (Ag_2SO_4) par le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), introduit en excès. Après deux heures de chauffe à 150°C, la DCO est déterminée par dosage en retour : l'excès de bichromate de potassium est déterminé à l'aide d'une solution de fer ferreux et d'ammonium (sel de Mohr à 0,25 N) par dosage colorimétrique.

La société HACH offre la possibilité d'obtenir une mesure de la DCO plus précise, plus rapide et moins dangereuse grâce à la commercialisation de tubes disposant des réactifs en quantité souhaitée. Il existe différentes gammes de mesure pour ces tubes. Ici nous utilisons la gamme de 0 à 1500 mg d'O_2/ℓ. Les échantillons sont dilués 10 fois pour qu'ils puissent entrer dans la gamme de mesure. Ainsi, dans chaque tube est ajouté 200 µℓ d'échantillon avec 1,8 mℓ d'eau. Après 2 heures de chauffage à 150°C, le spectrophotomètre HACH DR/2010 dose la DCO de l'échantillon par différence d'absorption à 620 nm.

3.8 Acides gras volatils (AGV)

La nature et la concentration des acides gras volatils (AGV) sont déterminées à l'aide d'un chromatographe GC800 (Fisons Instruments) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un passeur automatique d'échantillons AS800.

La colonne utilisée est une colonne Econocap FFAP (Alltech) d'une longueur de 15 m et d'un diamètre de 0,53 cm, avec une épaisseur de film de 1,2 µm. La température de l'injecteur est de 250°C, celle du détecteur de 275°C. La montée en température du four est programmée de 80°C à 120°C en 3 minutes. Le gaz vecteur est un mélange d'azote (25 kPa), d'hydrogène (50 kPa) et d'air (100 kPa). Le volume d'échantillon injecté est de 1 µℓ. L'analyse est effectuée sur la phase soluble (surnageant de centrifugation).

La méthode employée est celle de l'étalon interne (1 g d'acide éthyl-2-butyrique dans 1 ℓ d'eau acidifiée à 5 % avec H_3PO_4). La gamme d'étalonnage est préparée à partir de six composés (acides acétique, propionique, iso-butyrique, butyrique, iso-valérique et valérique) à 1 g/ℓ chacun. Les échantillons sont préparés, tout comme la gamme étalon, en mélangeant un volume d'échantillon (éventuellement dilué pour être dans la gamme d'étalonnage) et un volume d'étalon interne. La gamme d'étalonnage est comprise entre 0,25 et 1 g/ℓ et le seuil de quantification est situé à 0,1 g/ℓ. L'erreur de mesure est de l'ordre de 4 à 5 %.

Une étude a été menée pour vérifier que les dosages effectués sur place au pilote de laboratoire et ceux réalisés au LBE mènent à des résultats comparables. Nous avons également vérifié que les échantillons envoyés au LBE ne subissaient pas de modification de leur concentration en AGV lors du transport et de la conservation (Annexe 2).

3.9 Azote ammoniacal

L'azote ammoniacal est dosé à partir de la méthode de Kjeldahl sans minéralisation. La concentration en ion NH_4^+ est déterminée par distillation pendant 6 minutes au Büchi 316 d'un échantillon mélangé à un volume de tampon (KH_2PO_4 et K_2HPO_4). Le distillat, piégé dans de l'acide orthoborique saturé, est ensuite titré par dosage colorimétrique à l'acide chlorhydrique à N/50. L'indicateur coloré est une solution éthylique de rouge de méthyle et de vert de bromocrésol. La mesure est exprimée en g N_{ammo}/ℓ. L'erreur sur la mesure est d'environ 8 %.

4 Mesures d'activités enzymatiques

4.1 Extraction des enzymes

4.1.1 Principe

La première étape de toute mesure d'activité enzymatique est l'extraction des enzymes. Cette étape présente une grande importance puisqu'elle doit permettre de récupérer un maximum d'enzymes fonctionnelles pour permettre une mesure d'activité représentative. Il est donc nécessaire de séparer les enzymes extracellulaires des membranes biologiques et du déchet. Cette première phase utilise les capacités d'une solution détergente à solubiliser les protéines membranaires et à permettre la désorption d'une partie des enzymes liées à une matrice solide (Maunoir *et al.*, 1991).

D'après notre étude bibliographique (Annexe 3), il est apparu qu'une majorité de protocoles expérimentaux se basent sur celui proposé par Jones et Grainger (1983) qui utilise le détergent anionique Triton x-100. Dans notre cas, le protocole doit pouvoir être effectué rapidement (en une à deux heures) afin de pouvoir réaliser les mesures d'activités enzymatiques dans la journée pour que les enzymes ne soient pas détériorées. Différents paramètres sont testés et notamment la vitesse de centrifugation qui doit s'adapter au type de déchet rencontré et à la localisation des enzymes à extraire (libres dans la phase liquide ou liées à une matrice solide). Des essais de congélation de l'extrait et du digestat ont également été menés afin d'envisager leur conservation pour une mesure simultanée des échantillons en fin d'essai et permettre un gain de temps. Pour déterminer la vitesse la mieux appropriée et l'impact de la congélation, il est nécessaire d'utiliser un indicateur permettant de visualiser la récupération des enzymes. Pour cela, nous utiliserons la mesure de l'activité cellulasique.

Les aspects financiers et techniques ont également été pris en compte pour le choix de la méthode (matériel disponible, coût des réactifs, personnel nécessaire) car un des buts est de déterminer des méthodes qui puissent être utilisées en routine en industrie.

4.1.2 Méthode

La Figure 17 illustre les étapes de l'extraction enzymatique. Après l'échantillonnage, 30 g de digestat frais sont ajoutés à 30 mℓ de solution aqueuse de Triton x-100 à 0,2 %. Le tout est placé sous agitation pendant 1h dans un bain de glace puis tamisé à 1 mm et pressé manuellement. Le liquide résultant est centrifugé 20 mn à 27 000×*g* (15 000 rpm, rotor Beckman JA-20). Le surnageant, appelé extrait enzymatique, est conservé à 4°C jusqu'au dosage des activités enzymatiques.

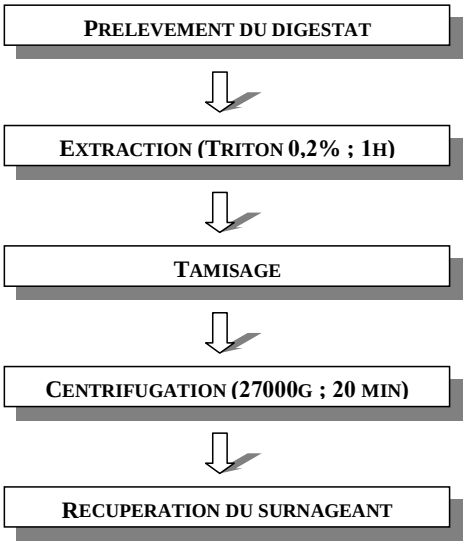


Figure 17. Protocole d'extraction des enzymes

4.2 Dispositif d'incubation

Le dispositif d'incubation schématisé sur la Figure 18 a été utilisé pour la mesure des activités amylasique, cellulasique et protéasique. Ces incubations sont réalisées dans des tubes à essai en verre, agités individuellement par un barreau aimanté, sur un agitateur magnétique multiposte permettant d'avoir une vitesse d'agitation égale dans tous les tubes. Ils sont placés dans un bain-marie assurant le maintient en température. La température de la réaction est celle du réacteur, plutôt que la température optimale de chaque enzyme, afin de mesurer une intensité d'activité enzymatique représentative de la réaction en cours.

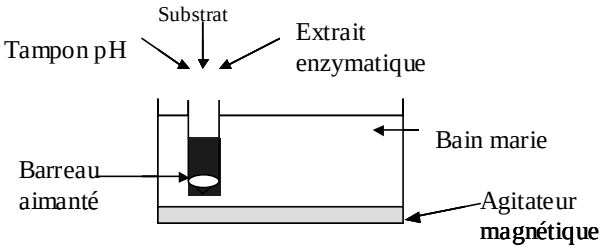


Figure 18. Dispositif d'incubation pour la mesure d'activité enzymatique

4.3 Activité amylasique

4.3.1 Principe

L'extrait enzymatique est incubé en présence d'amidon. L'hydrolyse de l'amidon par les amylases libère des sucres réducteurs (maltose, glucose et polysaccharides). Les sucres réducteurs sont dosés avant et après incubation. L'activité amylasique est considérée comme la quantité de sucres réducteurs libérés par unité de temps d'incubation. Les glucides réducteurs sont dosés par la méthode colorimétrique au DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique). A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction du DNS en un composé rouge : l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique. L'intensité de la coloration mesurée au spectrophotomètre (A_{540nm}) est proportionnelle à la concentration en sucres réducteurs. L'ajout de DNS sert également à arrêter la réaction.

4.3.2 Méthode

La comparaison de quelques protocoles expérimentaux trouvés dans la bibliographie est présenteé en Annexe 4. 1 mℓ d'extrait enzymatique est incubé en présence d'1 mℓ de solution d'amidon de pomme de terre à 1 % et 1 mℓ de tampon phosphate 2,0 M de pH 7,0. La durée d'incubation a été fixée à une heure d'après une étude cinétique réalisée au préalable. A la fin du temps d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout d'1 mℓ de réactif DNS. Les tubes sont portés 10 minutes à 100°C puis l'absorbance est lue à 540 nm. Des blancs sont réalisés dans lesquels le DNS est ajouté avant qu'il puisse y avoir incubation.

Une gamme étalon de glucose est effectuée en parallèle afin de corréler la ΔDO (DO_{essai} - $DO_{zéro}$) à la quantité de sucres libérés et par conséquent à l'intensité de l'activité enzymatique. L'activité amylasique est exprimée en mg de glucose formé/mn/g de digestat. Une version détaillée du protocole mis au point est donnée en Annexe 10.

4.4 Activité cellulasique

4.4.1 Principe

Les publications concernant la mesure d'activité cellulasique proposent deux principaux substrats : la cellulose-azure (Jones et Grainger, 1983) et la carboxyméthylcellulose (CMC ; Maunoir *et al.*, 1991). La cellulose-azure est insoluble et imprégnée d'un colorant dont la libération sous l'action de cellulases peut être mesurée par spectrophotométrie.

La CMC est un dérivé soluble de la cellulose obtenu par carboxyméthylation au niveau des fonctions alcools. Les sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse de la CMC peuvent être mis en évidence par la méthode au ferricyanure (Park et Johnson, 1949). Cependant, cette méthode n'est pas représentative de la cellulose naturelle, qui est majoritairement insoluble. La mesure revêt donc une spécificité indésirable (Lee *et al.*, 2002).

4.4.2 Méthode

La comparaison de quelques protocoles expérimentaux trouvés dans la bibliographie est présentée en Annexe 5. Nous avons retenu la méthode à la Cellulose-Azure. 1 mℓ d'extrait enzymatique est incubé avec 0,01 g de Cellulose-Azure et 1 mℓ de tampon phosphate 2,0 M de pH 7,0. La durée d'incubation a été fixée à 30 min d'après une étude cinétique réalisée au préalable. A la fin du temps d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de 1 mℓ d'acide trichloroacétique (TCA) et la Cellulose-Azure restante est éliminée par filtration sur membrane de Nylon de 0,45 µm de porosité. L'absorbance est mesurée à 520 nm. L'activité cellulasique est exprimée en variation d'absorbance par minute et par g de digestat. Une version détaillée du protocole mis au point est donnée en Annexe 11.

4.5 Activité protéinasique

4.5.1 Principe

La méthode la plus simple pour mesurer l'activité protéinasique consiste à utiliser une solution de protéine comme la serum-albumine bovine (BSA) ou la caséine. L'hydrolyse des protéines libère des peptides qui peuvent être dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu.

4.5.2 Méthode

La comparaison de quelques protocoles expérimentaux alternatifs trouvés dans la bibliographie est présentée en Annexe 6 et Annexe 7. 1 mℓ d'extrait enzymatique est incubé

en présence d'1 mℓ de solution de BSA à 1 % tamponnée. Le tampon utilisé est un tampon phosphate 2,0 M de pH 8,0. La durée d'incubation a été fixée à 10 minutes d'après une étude cinétique réalisée au préalable. A la fin du temps d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de 1 mℓ d'acide trichloroacétique (TCA) qui fait précipiter les enzymes ainsi que la BSA résiduelle. La BSA résiduelle est éliminée par centrifugation 10 minutes à 5 000 rpm (MiniSpin-Eppendorf) du surnageant d'une décantation de 30 minutes. 0,5 mℓ de réactif de Folin sont ajoutés et l'absorbance est lue à 660 nm après 2 h à l'obscurité. Une gamme étalon est préparée à partir de BSA digérée par une solution d'enzyme concentrée du commerce. L'activité protéinasique est exprimée en µg de BSA dégradée/mn/g de digestat. Une version détaillée du protocole mis au point est donnée en Annexe 12.

4.6 Activité lipasique

4.6.1 Principe

L'action des lipases hydrolyse un triglycéride composé de trois acides gras identiques. Connaissant le pKa de cet acide gras, il est possible de doser la quantité libérée par un dosage acido-basique (Sztajer et Maliszewska, 1988).

4.6.2 Méthode

La comparaison de quelques protocoles expérimentaux trouvés dans la bibliographie est présentée en Annexe 8. Dans une bouteille en verre de 50 mℓ, sont ajoutés : 5 mℓ d'émulsion trioléine (10 %) - alcool polyvinyle (PVA ; 2 %), 4 mℓ de tampon phosphate 2,0 M de pH 7,0 et 1 mℓ d'extrait enzymatique. Après incubation, la réaction est arrêtée par ajout de 20 mℓ de solution acétone-éthanol (1:1 v/v) et centrifugation 10 minutes à 3 000.*g*. Un blanc est réalisé avec un temps d'incubation nul. Quelques gouttes de thymolphtaléine (indicateur coloré) sont ajoutées à 20 mℓ de surnageant pour titration à la burette de soude 0,05 M. La thymolphtaléine prend une couleur bleue à la neutralisation. Une version détaillée du protocole mis au point est donnée en Annexe 13.

CHAPITRE III. CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE

Le microbe n'est rien. Le terrain est tout.

[Louis Pasteur]

III. CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE

1 Introduction

Dans les procédés de traitement biologique des déchets et effluents organiques, l'efficacité du traitement s'évalue généralement par le calcul du rendement d'élimination de la matière organique. Dans le cas de la méthanisation des déchets c'est le rendement de transformation de la matière organique en méthane qui est souvent pris en compte : ainsi les performances des installations sont-elles exprimées en volume de méthane par unité de masse de déchet traité (pris en matière fraîche, sèche ou en matière organique). Or, pour les déchets solides, et a fortiori pour les ordures ménagères, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode satisfaisante pour mesurer la quantité de matière organique. Notamment, pour ce type de déchet il est indispensable de pouvoir différencier la matière organique biodégradable. En effet, dans les ordures ménagères une part non négligeable de la matière organique n'est pas biodégradable, comme les matières plastiques, par exemple. Autrement dit, il est nécessaire de pouvoir mesurer la biodégradabilité des déchets par des méthodes plus rapides que la mesure directe qui passe par une opération de méthanisation à échelle réduite : la mesure du potentiel méthane.

De plus, pour les déchets solides, la structure du déchet joue un rôle important. Des matières a priori dégradables peuvent ne pas être dégradées du fait qu'elles se retrouvent emprises dans de la matière non biodégradable qui les préserve de l'action des micro-organismes.

Une meilleure connaissance de l'organisation de la matière organique dans les déchets solides est donc nécessaire. Pour cela, il faut mettre au point des méthodes pertinentes pour prédire la biodégradabilité des déchets solides qui soient adaptées à leur spécificité. Dans cette optique, l'étude bibliographique a montré l'intérêt d'étudier le fractionnement par la méthode de Van Sœst, ce que nous avons fait ici.

2 Etude du fractionnement selon Van Sœst

2.1 Introduction

La méthode de VAN SŒST est à l'origine, rappelons-le, une méthode permettant de décomposer la matière organique des fourrages en fractions de plus en plus difficiles à dégrader. Pour les végétaux, ces fractions organiques correspondent aux hémicelluloses, à la cellulose et à la lignine. Ainsi a-t-il été possible de relier ce fractionnement à la digestibilité des végétaux.

Dans le but d'étudier la pertinence des méthodes de caractérisation de la matière organique, ces méthodes ont été appliquées à la caractérisation de deux échantillons d'ordures ménagères provenant du même gisement à une semaine d'intervalle et d'un échantillon de digestat provenant d'un méthaniseur industriel. Les échantillons avaient une masse de 500 g.

La méthode de Van Sœst sépare les fractions suivantes par solubilité décroissante (Figure 19) :

- Soluble dans un détergent neutre (NDS) ;
- Soluble dans un détergent acide (ADS), mais pas dans un détergent neutre ;
- Soluble uniquement dans un acide fort (SAS) ;
- Volatile non solubilisable (IVS).

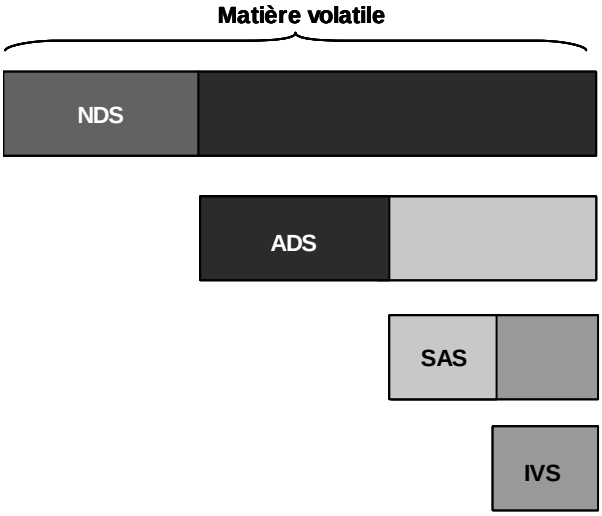


Figure 19. Rappel du fractionnement selon la méthode de Van Sœst.

2.2 Répartition des fractions de Van Sœst

Sur les trois échantillons considérés, les parts respectives de la matière volatile (MV) et de la matière non volatile (Inorganique) ont été mesurées. Au sein de la MV, les fractions de Van Sœst ont été identifiées.

Le fractionnement des échantillons par rapport à la matière sèche (volatile + non volatile) est présenté sur la Figure 20. La Figure 21 présente la répartition rapportée à la matière volatile uniquement.

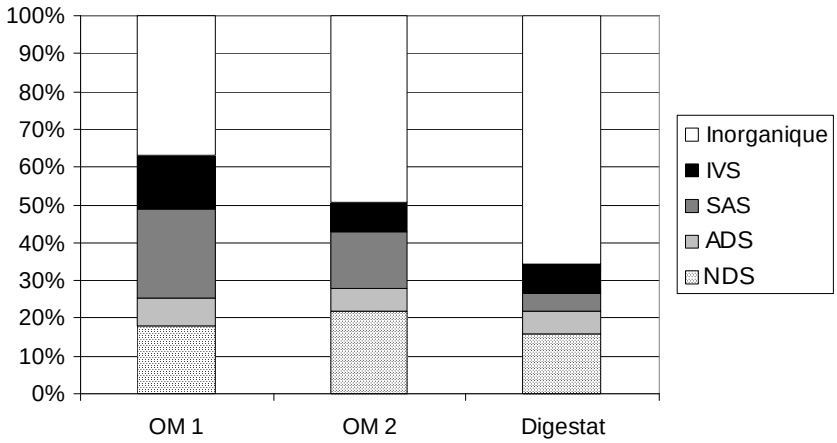


Figure 20. Fractionnement de la matière totale selon la méthode de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat.

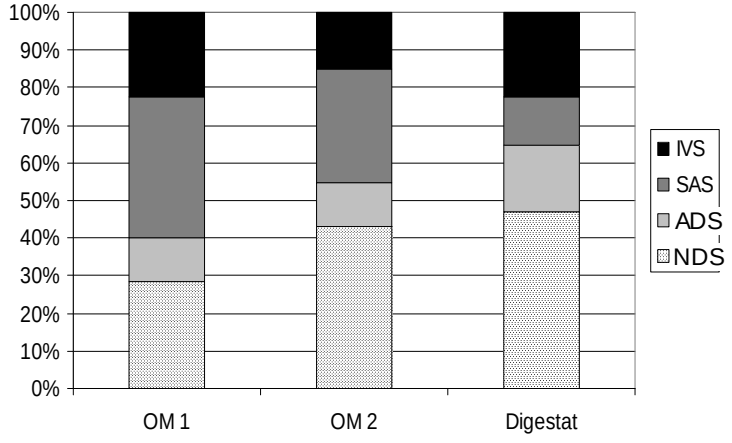


Figure 21. Fractionnement de la matière organique selon la méthode de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat.

Tout d'abord, il y a moins de matière volatile dans le digestat que dans les ordures ménagères non digérées. Cela est dû au fait qu'une partie de la matière organique est digérée au cours de la méthanisation et est éliminée sous forme de CH_4 et de CO_2. Néanmoins, il reste environ 35 % de matière volatile dans le digestat (cette valeur est souvent retrouvée pour les digestats en digestion sèche).

Nous remarquons également que la quantité de la fraction IVS (qui correspond à la matière organique la plus récalcitrante) reste du même ordre de grandeur entre les déchets et le digestat, tandis que la part de SAS diminue et celle des deux fractions les plus solubles (NDS et ADS) augmente (Figure 21). Cela semble indiquer qu'il y a une solubilisation de la fraction SAS vers la fraction ADS puis vers la fraction NDS au cours de la méthanisation. Néanmoins, **il y a une part non négligeable de matière organique qui est solubilisée mais qui ne peut pas être digérée sur l'échelle de temps de l'opération de méthanisation** et est donc retrouvée dans le digestat. Il en résulte que le digestat contient au final quasiment autant de NDS que les déchets (Figure 20).

Les deux échantillons de déchets, qui proviennent du même gisement mais à des moments différents, ne contiennent pas la même quantité de matière organique (*cf.* Figure 20). Ce résultat souligne la variabilité des approvisionnements en matière organique que peut subir un méthaniseur, et donc la nécessité de caractériser chaque alimentation afin de connaître la qualité du substrat apporté. Cette connaissance pourra permettre, d'une part, d'alimenter la quantité adéquate, et, d'autre part, d'estimer la quantité de biogaz qui sera produite afin d'évaluer, en retour, le fonctionnement de l'installation.

La Figure 21 montre que **la matière organique des deux déchets, provenant d'un même gisement à des dates différentes, est de composition différente.** Le premier déchet contient plus de matière volatile non solubilisable correspondant au compartiment "lignine". Le second déchet contient plus de matière volatile facilement soluble. Ces différences sont importantes car elles peuvent rendre un déchet plus ou moins biodégradable pour une même quantité de matière organique. En effet, la fraction IVS ou "lignine" est réputée non biodégradable alors que les substances facilement solubles (glucides simples, protéines, …) sont souvent plus facilement dégradables. Toutefois, il existe aussi de la matière soluble qui n'est pas dégradable sur le temps de la méthanisation, et le fractionnement selon la méthode de Van Sœst n'apporte pas d'information quant à sa quantité. **Ainsi le fractionnement selon Van Sœst peut apporter des informations importantes pour caractériser un déchet par**

rapport à un autre mais n'est pas suffisant à lui seul pour connaître avec précision la quantité de matière organique biodégradable dans un déchet.

Nous pouvons par ailleurs nous interroger sur l'opportunité d'utiliser ce fractionnement de VAN SŒST pour le suivi des milieux de digestion en tant que tel, afin de savoir si la digestion a été complète ou pas. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un programme de recherche du CREED conduit en parallèle de nos travaux. Les résultats (non présentés ici) ont indiqué qu'il n'existait pas une différence suffisante dans le fractionnement entre un mélange en début de fermentation et en fin de fermentation. La principale raison est que, compte tenu du temps de séjour élevé dans les méthaniseurs, le niveau de dilution des déchets frais entrant par le milieu en cours de digestion est très élevé.

2.3 Répartition des glucides et protéines

2.3.1 Répartition des glucides dans les fractions de Van Sœst

La concentration en glucides a été mesurée dans le déchet brut ainsi que dans le résidu solide après solubilisation au détergent neutre. Par soustraction on connaît donc la teneur en glucides de la fraction NDS et celle du reste de la matière, moins soluble.

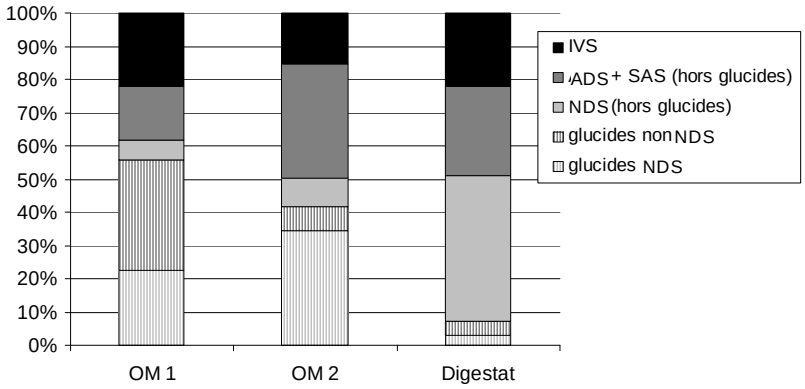


Figure 22. Répartition des glucides dans les fractions de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat.

La Figure 22 montre que deux déchets provenant du même gisement peuvent avoir des teneurs en glucides différentes. De plus, ces glucides se répartissent différemment entre les fractions de Van Sœst. Autrement dit, ils ont des solubilités différentes d'un déchet à l'autre. Ainsi, la matière volatile du second déchet contient moins de glucides en tout, mais contient plus de glucides solubles dans un détergent neutre et peu de glucides dans les autres fractions. **La mesure de la teneur en glucides peut donc apporter une information supplémentaire au fractionnement par la méthode de Van Sœst pour connaître la quantité de matière organique biodégradable dans un déchet.** En effet, les glucides solubles sont soupçonnés d'être fortement biodégradables. A l'inverse, la biodégradabilité des glucides non solubles, d'une part, et celle de la matière soluble non glucidique, d'autre part, sont moins assurées.

La Figure 22 montre que le digestat étudié ne contient presque plus de glucides. Ceux-ci ont été consommés par les micro-organismes pendant la méthanisation et transformés en biogaz. La matière soluble résiduelle n'est pas composée de glucides.

La teneur en glucides pourrait donc être un indicateur de suivi de la méthanisation. L'indication fournie serait néanmoins partielle au titre que seules les phases d'hydrolyse et d'acidogenèse sont concernées par ces glucides. L'hydrolyse solubilise les glucides complexes et fait donc passer les glucides de la fraction ADS à la fraction NDS. L'acidogenèse

consomme les glucides. Une accumulation de glucides simples indiquerait un blocage de l'acidogenèse mais cela est peu probable. C'est généralement un blocage de la méthanogenèse qui est cause ou conséquence de problèmes dans le procédé. Il n'en demeure pas moins qu'un suivi des glucides ainsi que de leur répartition dans les fractions Van Sœst pourrait s'avérer utile pour évaluer les vitesses d'hydrolyse et d'acidogenèse. Des vitesses lentes seraient le signe d'une difficulté à dégrader la matière organique, tandis que des vitesses trop élevées présenteraient le risque d'une accumulation d'AGV. Pour s'assurer de la pertinence d'un suivi des glucides, il faudrait réaliser une série d'expériences de suivi dans un digesteur industriel. Toutefois, il pourrait se produire le même phénomène que lors du suivi des fractions Van Sœst. C'est à dire que, compte tenu du temps de séjour élevé dans les méthaniseurs, le niveau de dilution des déchets frais entrant par le milieu en cours de digestion est très élevé et de ce fait aucune différence ne serait observable.

2.3.2 Répartition des protéines dans les fractions de Van Sœst

La concentration en protéines a été mesurée dans le déchet brut ainsi que dans le résidu solide après solubilisation au détergent neutre. Par soustraction on connaît donc la teneur en protéines de la fraction NDS et celle du reste de la matière, moins soluble.

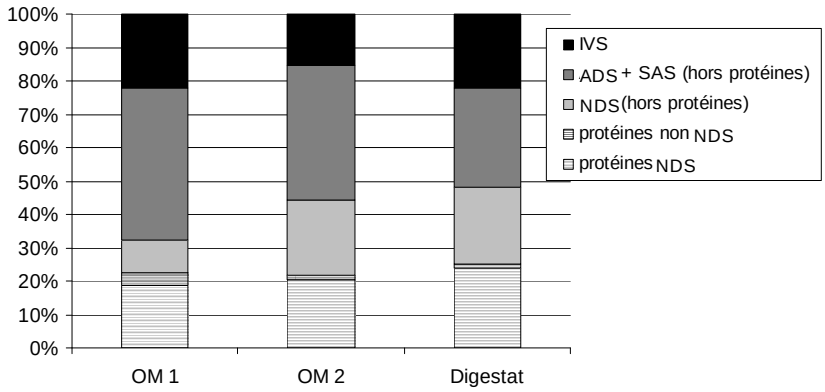


Figure 23. Répartition des protéines dans les fractions de Van Sœst dans deux échantillons d'ordures ménagères (OM) et un échantillon de digestat.

Si l'on compare la Figure 22 et la Figure 23, nous remarquons que les quantités de glucides NDS et de protéines NDS additionnées entre elles valent plus que la fraction NDS seule. Cela est dû au fait que le dosage des protéines, notamment sur un solide, n'aboutit pas à une valeur quantitativement exploitable. Cependant, les teneurs en protéines sont comparables entre elles.

La Figure 23 montre que les protéines sont majoritairement solubles dans un détergent neutre. Les deux déchets étudiés contiennent la même quantité de protéines.

Le digestat contient autant de protéines que les déchets. Cela est dû au fait que, pendant la méthanisation, les protéines du déchet sont métabolisées par les micro-organismes pour synthétiser de nouvelles protéines nécessaires à leur croissance.

Le dosage des protéines ne semble donc pas apporter d'information complémentaire au fractionnement Van Sœst qui puisse informer sur la biodégradabilité d'un déchet. Le seul intérêt de doser les protéines serait pour éviter une surcharge en ammoniac qui conduirait à une inhibition. Cependant, cela peut être réalisé par un simple dosage de l'azote. En outre, la teneur en azote organique informe également sur la teneur en protéines.

2.4 Lien entre "SAS+IVS" et Biodégradabilité

2.4.1 Biodégradabilité

Sachant que 1 mg de DCO dégradée produit 350 mℓ de méthane (CH_4), la quantité maximale de méthane est calculée à partir de la DCO mesurée. Le potentiel méthane (BMP) du second déchet a été mesuré à 67,9 ± 3 mℓCH_4/g. Sa DCO est de 0,602 gO_2/g. Sa biodégradabilité est donc de 67,9/(350×0,602) = 32,3 %.

2.4.2 Comparaison à la bibliographie

Buffière *et al.* (2006) ont établi une relation linéaire empirique entre la teneur en la fraction SAS+IVS et la biodégradabilité de déchets solides modèles et réels, à partir de leurs données et de données provenant de la bibliographie (Moller *et al.*, 2004). Des points correspondant à d'autres études ont également été ajoutés depuis (Hartmann et Ahring, 2005 ; Mshandete *et al.*, 2005) ainsi que des points plus récents obtenus par Buffière *et al.* (Non publiés). Le point correspondant au second déchet étudié ici a été ajouté sur leur graphique (Figure 24).

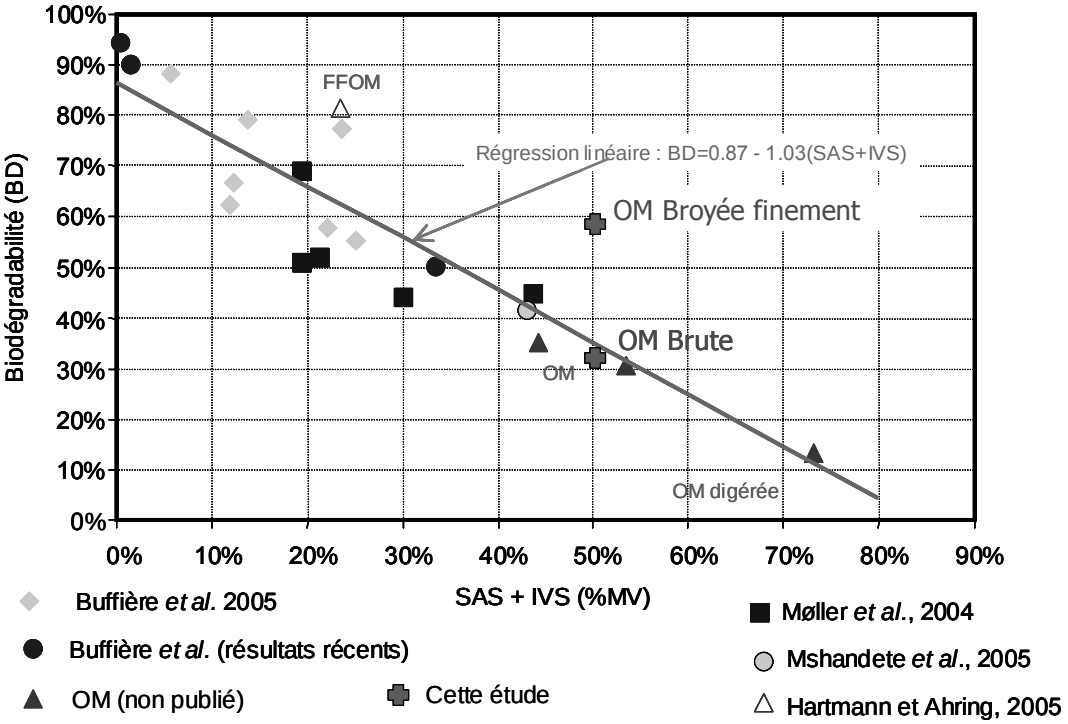


Figure 24. Relation entre la biodégradabilité et la somme des fractions SAS et IVS de différents déchets

La Figure 24 montre qu'il y a une **relation négative forte entre la biodégradabilité et la somme de fractions SAS et IVS des déchets solides, quels que soient leur type et leur provenance**. Les résultats obtenus ici sur le second déchet (OM brute) s'intègrent très bien aux résultats de la bibliographie. Il est logique que les fractions IVS et SAS, qui sont les moins solubles et les moins biodégradables, soient défavorables à la biodégradabilité. Toutefois, la relation linéaire est purement empirique et ne traduit pas un phénomène biologique. Le fractionnement selon la méthode de Van Sœst est donc une approche pertinente pour caractériser la matière organique des déchets en vue de prédire leur biodégradabilité mais des recherches sont nécessaires afin d'affiner cette relation à l'aide de mesures supplémentaires d'autres caractéristiques qu'il reste à déterminer.

2.4.3 Effet du broyage

Le second déchet a également été broyé sur un tamis de maille 1 mm afin de mesurer le BMP dans ces conditions. Le BMP du déchet broyé est de 124,4 ± 3 mℓCH_4/g. Sa DCO est de 0,602 gO_2/g. Sa biodégradabilité est donc de 124,4/(350×0,602) = 59,0 %.

La Figure 24 montre que, pour une même teneur en SAS et IVS, le déchet étudié devient beaucoup plus biodégradable quand il est broyé finement. Cela est dû au fait que le broyage rend disponible de la matière organique biodégradable qui était protégée par la structure du déchet. Les phénomènes qui entrent en jeu sont du type de la protection de la cellulose par la lignine. La cellulose fait partie du compartiment SAS et la lignine fait partie du compartiment IVS. Ces résultats montrent que des molécules du compartiment SAS ne sont pas dégradées uniquement parce qu'elles sont protégées par la structure du déchet. **La relation négative entre la biodégradabilité et la fraction SAS+IVS rend donc compte de la structure du déchet qui elle-même rend compte des conditions réelles de méthanisation**.

2.5 Synthèse

Comme nous l'avons vu, deux déchets provenant du même gisement à des dates différentes peuvent contenir des quantités différentes de matière organique. De plus, la matière organique est de composition différente.

Il existe une différence assez marquée entre les déchets et le digestat au niveau des compositions des fractions. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas de dégager des tendances claires. En effet, il serait envisageable qu'au cours du traitement, la fraction la moins extractible (IVS) devienne prépondérante au sein de la matière organique, en raison de sa faible biodégradabilité supposée. L'analyse des fractions de Van Sœst pour juger du niveau de dégradation d'un déchet donné devrait donc être considérée avec prudence.

En revanche, le fractionnement de la matière organique par la méthode de Van Sœst est une bonne manière d'appréhender la biodégradabilité des déchets solides. Il existe une relation négative entre la fraction SAS+IVS et la biodégradabilité qui rend compte de l'effet de la structure des déchets sur leur biodégradabilité.

Le dosage des glucides dans les différentes fractions de Van Sœst apporte également une information complémentaire pertinente pour tenter de prédire la biodégradabilité des déchets solides. En effet, les glucides solubilisés sont facilement et totalement dégradés et la production de méthane à partir de glucides peut être estimée. De plus la répartition des glucides dans les fractions Van Sœst donne une indication sur leur solubilité initiale, ainsi qu'une indication partielle sur la composition en matière organique facilement biodégradable ou non de ces fractions. Ce n'est pas le cas pour le dosage de protéines.

Ce type de fractionnement de la matière des déchets solides est une approche pertinente et prometteuse qui mérite d'être développée en vue de caractériser les ordures ménagères.

3 Fractionnement soluble et non soluble

3.1 Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons observé une relation négative entre la fraction SAS+IVS et la biodégradabilité des déchets solides. Komilis et Ham (2003) avaient montré une relation négative entre la fraction IVS et la dégradation aérobie de la matière organique.

Ils ont également montré une relation positive entre la fraction soluble à l'eau chaude et la dégradation.

Dans un article postérieur à notre étude, Frederic *et al.* (2007) ont séparé les fractions hydrosoluble et solide (non hydrosoluble) de déchets de pommes (drèches), à l'aide d'extractions à l'eau, à température ambiante. Ils ont observé les cinétiques d'hydrolyse de la matière organique de ces deux fractions. Une part importante de la DCO de la fraction hydrosoluble (60 à 85 %) était dégradée en 5 jours. Cela montre que la production de méthane la plus précoce dans la méthanisation est due à la consommation de la fraction hydrosoluble. Leur plus récents résultats montrent que la fraction hydrosoluble avait une biodégradabilité de 95,0 % contre 35,6 % seulement pour la fraction solide (Buffière *et al.*, 2008). Toutefois, leur étude s'attachait surtout à la fraction solide résiduelle après solubilisation, c'est-à-dire la fraction non hydrosoluble. La cinétique de dégradation de la fraction solide était limitée par l'hydrolyse.

La fraction hydrosoluble des déchets solides a peu été étudiée. Pourtant, il se peut qu'elle ait une part importante dans la méthanisation des déchets solides. En effet, elle est dégradée rapidement au début de la méthanisation et permet un démarrage plus rapide de celle-ci. La fraction hydrosoluble semble hautement biodégradable et sa quantité dans un déchet peut donc apporter des informations quant à la biodégradabilité de celui-ci.

L'amélioration de la maîtrise de la méthanisation des déchets solides nécessite une meilleure compréhension des phénomènes physico-chimiques et biochimiques mis en jeu. Ceux-ci sont difficiles à prédire compte tenu de la complexité des ordures ménagères. Elles contiennent différentes fractions de matière organique qui se comportent différemment au cours de la méthanisation. L'analyse des fractions hydrosolubles a pour objectif de compléter les informations issues des analyses de la matrice globale. C'est pour cette raison que nous l'avons étudiée en particulier.

L’étude proposée ici a pour objet de tester un fractionnement spécifique pour la digestion anaérobie. L'obtention des fractions hydrosolubles passe par un prétraitement de la matrice humide dans l’eau à une température égale à celle des réacteurs de méthanisation. Puis, la biodégradabilité de la fraction soluble extraite est mesurée et comparée à celle de la fraction restante et de la fraction totale. Des analyses biochimiques de la matière organique sont également appliquées aux différentes fractions obtenues.

3.2 Organisation de l'étude

3.2.1 Matrice

Cette étude est réalisée sur un échantillon d’ordures ménagères prélevées le 29/11/05 sur un site pilote de méthanisation de Veolia Environnement. Il s’agit d’ordures ménagères broyées et criblées à 40 mm. Cet échantillon a un aspect visuel plutôt homogène. Pour la plupart des mesures, les échantillons solides (de 100 g) sont lyophilisés et broyés finement sur un tamis de maille 1 mm.

3.2.2 Organisation générale

Le principe de la méthode proposée est repris sur la Figure 25. L’échantillon suit 3 voies en parallèle :

- Une série de mesures « directes » sur le solide ;
- Un test de biodégradabilité (potentiel méthanogène, BMP) ;

- Une voie avec séparation d'une fraction soluble à l'eau et d'une fraction insoluble.

Après la solubilisation à l'eau, les deux fractions sont alors analysées (c*f.* " 3.2.4. Mesures"). Deux variantes sont proposées pour l'essai : une variante en travaillant directement sur l'échantillon brut (la lyophilisation intervenant après la séparation liquide/solide) et une autre à partir de l'échantillon lyophilisé et broyé. Cette technique permettra de mieux croiser les informations.

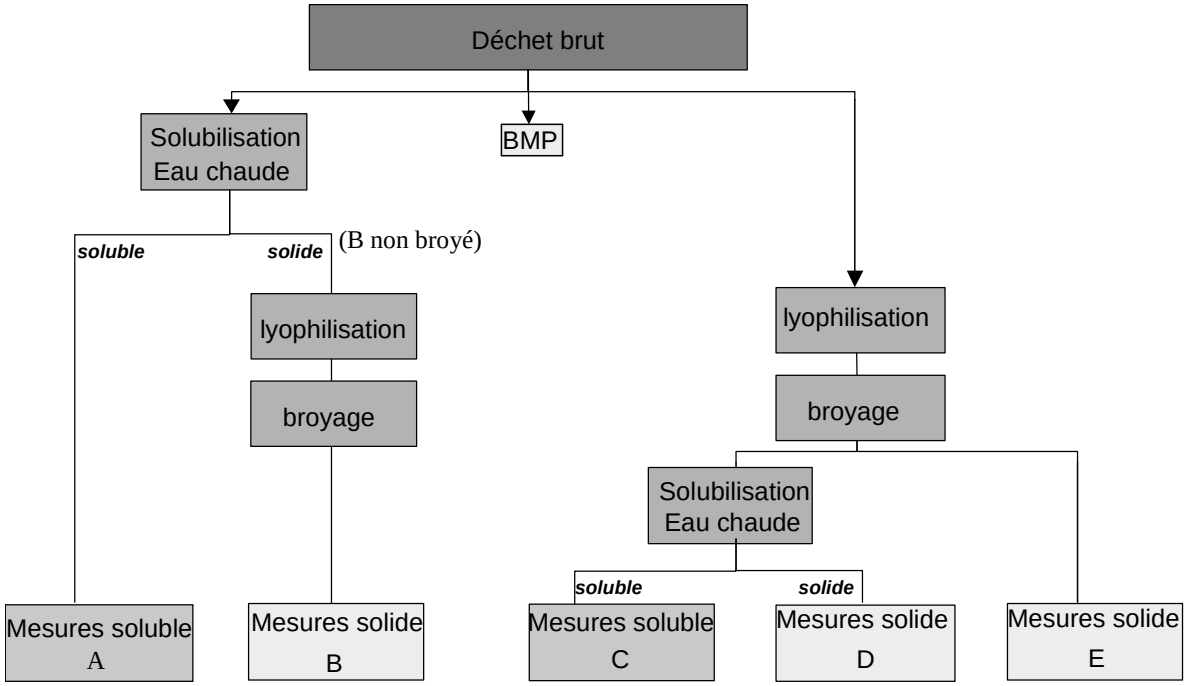


Figure 25 : Protocole expérimental.

Deux températures ont été testées : 37° et 55°C. C'est à dire que toute la série d'opérations de solubilisation et de dosages a été réalisée une fois à 37°C puis de nouveau à 55°C. Ont ainsi été obtenus, en plus du déchet brut, 10 échantillons à analyser (2 liquides et 3 solides pour chaque température). Dans la suite de ce chapitre, les échantillons obtenus seront appelés A, B, C, D, et Déchet brut comme indiqué sur la Figure 25. L'échantillon E sert à réaliser les dosages correspondant au déchet brut.

3.2.3 Protocole de solubilisation

- Sur les déchets bruts, une masse représentative de déchets (200 g) et de l'eau déminéralisée, dans un ratio 3/1, ont été placés dans une enceinte thermostatée (bain-marie) à la température souhaitée pendant 30 minutes sous agitation par un barreau magnétique. L'ensemble a été tamisé pour récupérer une fraction grossière et une fraction aqueuse. La fraction aqueuse a été centrifugée : le surnageant constitue la partie soluble. Le culot a été récupéré et ré-incorporé à la fraction grossière. Finalement, cette fraction solide est séchée à 105°C.
- Sur les déchets lyophilisés, une moindre quantité de déchets (100 g) peut être utilisée du fait de la meilleure homogénéité des lyophilisats. Le reste des paramètres est inchangé.

3.2.4 Mesures

Le Tableau 17 présente les dosages réalisés sur les différentes fractions obtenues lors des étapes de solubilisation ainsi que les méthodes utilisées. Les BMP ont été réalisés à la température de l'opération de solubilisation concernée.

Tableau 17. Méthodes des dosages effectués sur les différentes fractions obtenues

Dosage	Fractions concernées
Matière sèche / Matière volatile	Solides, liquides et déchet brut
DCO	Solides et liquides
AGV	Liquides
Protéines	Solides et liquides
Glucides	Solides et liquides
Graisses	Solides
Fibres Van Sœst	Solides
BMP	Solides, liquides et déchet brut

3.2.5 Expression des résultats

Afin de pouvoir les comparer, les résultats sont ramenés à 1 g de MV de l'échantillon brut de départ, sauf indication contraire.

En ce qui concerne les fractions liquides, il est nécessaire de distinguer :

- D'une part, la fraction soluble qui correspond à l'ensemble de la phase aqueuse présente lors de l'étape de solubilisation c'est à dire le volume d'eau ajoutée au déchet plus la petite quantité d'eau apportée par le déchet lui-même ;
- D'autre part, la fraction extraite qui correspond au volume de liquide qu'il a été possible de séparer de la phase solide. Ce volume est plus faible que le volume d'eau ajouté car une quantité non négligeable d'eau reste liée au déchet.

Partout où cela est possible, les résultats sont exprimés par rapport à la fraction soluble. Dans certains cas, qui seront indiqués, il n'est possible d'exprimer le résultat que par rapport à la fraction extraite. Cela constitue alors une approximation vis à vis des caractéristiques de la matière réellement solubilisée.

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Influence du prétraitement sur la caractérisation des fibres (Van Sœst)

Tous les échantillons solides ont été caractérisés selon la méthode de Van Sœst. Une variante a été appliquée à cette méthode afin d'évaluer l'importance d'un prétraitement à l'eau chaude des échantillons. En effet, certains auteurs (Parnaudeau *et al.*, 2004) appliquent un prétraitement de 30 minutes dans de l'eau distillée à 100°C aux échantillons à analyser. Ce prétraitement est censé améliorer la justesse de la mesure de la fraction soluble dans un détergent neutre. Elle permettrait de pré-solubiliser des protéines qui autrement auraient été rendues insolubles par le détergent.

Pour déterminer l'importance et l'effet de ce prétraitement lors du fractionnement des fibres selon Van Sœst, chaque dosage est réalisé 6 fois : 3 fois avec prétraitement ; 3 fois sans prétraitement.

La Figure 26 et la Figure 27 montrent les résultats obtenus pour le fractionnement selon la méthode de Van Sœst des fractions obtenues par les solubilisations à 37 et à 55°C respectivement. Les résultats avec et sans prétraitement sont présentés avec l'écart type de chacun des triplicatas. Chaque barre représente la répartition de la matière volatile dans les différents compartiments (Neutral Detergent Soluble, Acid Detergent Soluble, Sulfuric Acid Soluble et Insoluble Volatil Solids).

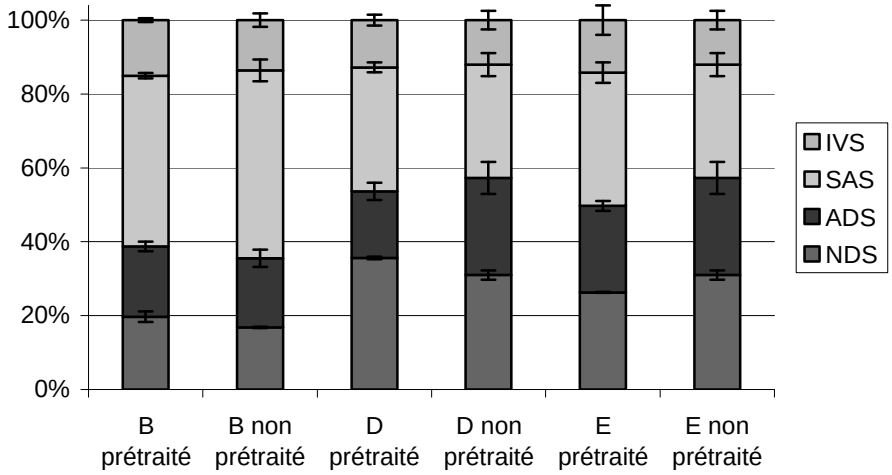


Figure 26. Répartition de la MV dans les compartiments de Van Sœst pour les fractions concernant la solubilisation à 37°C.

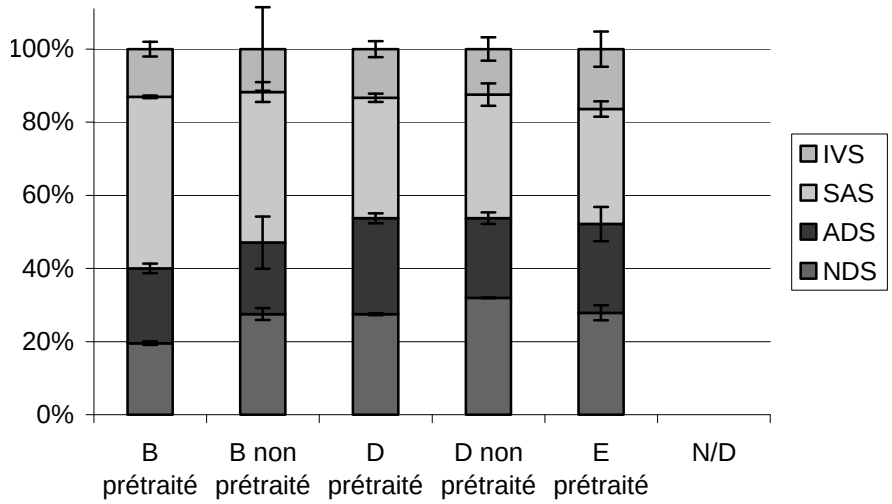


Figure 27. Répartition de la MV dans les compartiments de Van Sœst pour les fractions concernant la solubilisation à 55°C.

Ces résultats ne permettent pas de dégager une éventuelle influence du prétraitement à l'eau chaude sur la valeur mesurée de l'importance du compartiment soluble selon Van Sœst. Toutefois, le prétraitement semble entraîner un écart type plus faible. Les mêmes observations peuvent être faites sur les premiers résultats concernant les solubilisations à 55°C. C'est donc les résultats avec prétraitement qui seront utilisés dans la suite de ce compte-rendu.

3.3.2 Répartition de la matière après solubilisation

Nous présentons la répartition de la matière organique entre les phases solubles extraites A et C et les parties non solubles B et D, lors des différentes opérations de solubilisation (Figure 28 à Figure 31). La phase liquide a été caractérisée à l'aide de dosages des protéines,

des glucides et des Acides Gras Volatils. La phase solide a été caractérisée à l'aide du fractionnement selon Van Sœst.

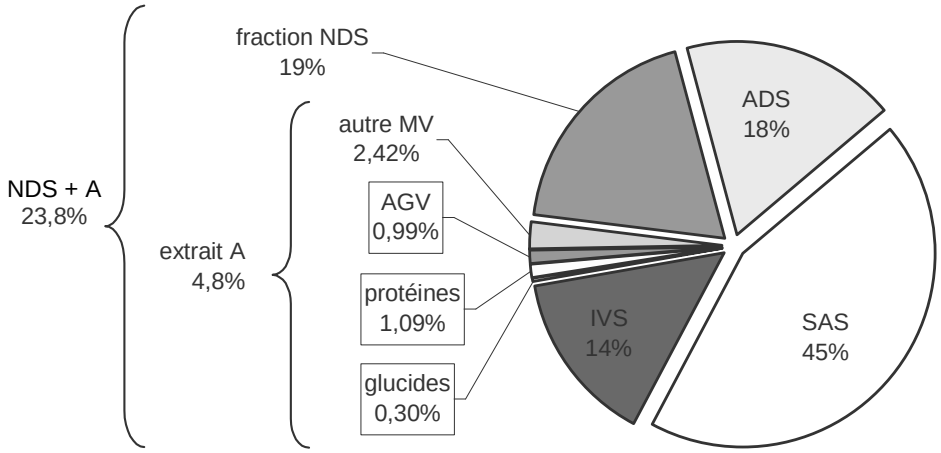


Figure 28. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 37°C du déchet brut entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon A) et phase solide restante (échantillon B). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide.

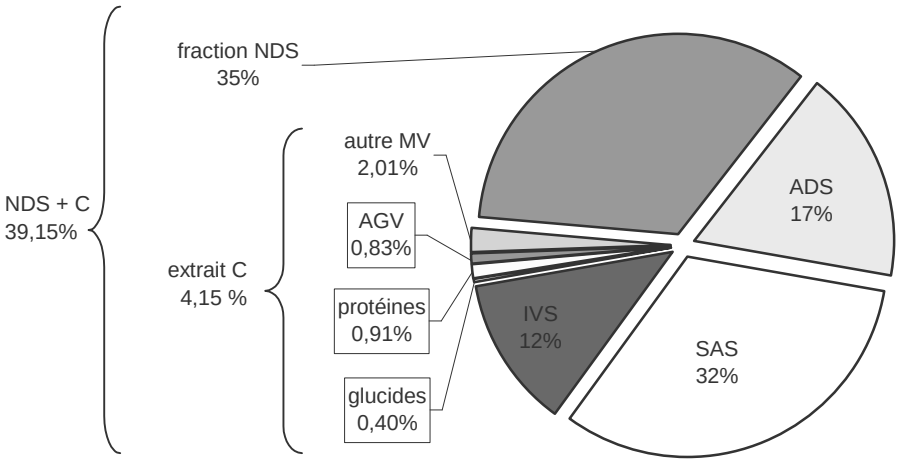


Figure 29. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 37°C du déchet lyophilisé et broyé entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon C) et phase solide restante (échantillon D). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide.

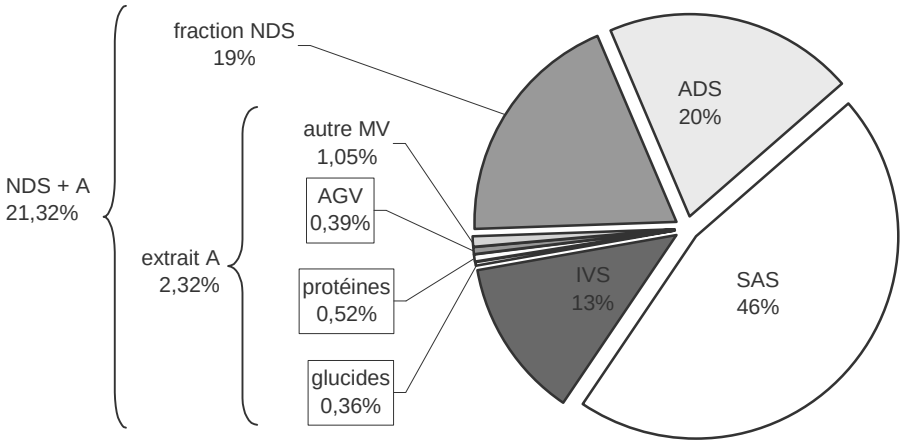


Figure 30. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 55°C du déchet brut entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon A) et phase solide restante (échantillon B). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide.

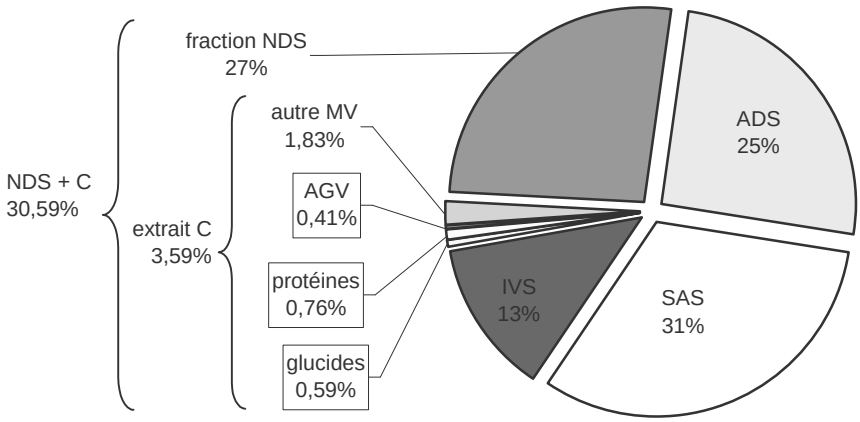


Figure 31. Répartition de la MV lors de la solubilisation à 55°C du déchet lyophilisé et broyé entre phase liquide extraite par tamisage/centrifugation (échantillon C) et phase solide restante (échantillon D). Composition biochimique de la phase extraite et fractionnement Van Sœst de la phase solide.

D'après les résultats présentés ci-dessus, la fraction extraite (A ou C) lors de la solubilisation du déchet représente une part faible de la matière organique totale (de l'ordre de 3,7% en moyenne). La température de solubilisation n'a pas d'influence visible sur ce résultat. Près de la moitié de cette fraction est constituée de matière non identifiée. Dans la moitié identifiée, les protéines représentent une part constante et importante. Les AGV et les glucides sont trouvés dans des proportions du même ordre de grandeur. Pour une température plus élevée, la part des glucides augmente au détriment de la part des AGV.

La lyophilisation et le broyage préalable des déchets semblent néanmoins avoir une influence sur le résultat du fractionnement selon Van Sœst de la fraction solide. En effet, cela entraîne une fraction NDS plus importante ; à la défaveur de la fraction SAS, quelle que soit la température de solubilisation. La fraction IVS, quant à elle, reste inchangée (entre 12 et 14 % de la matière volatile initiale).

La somme de la fraction extraite par solubilisation (A ou C) et du compartiment NDS de la fraction solide (B ou D) a été calculée pour chacune des quatre conditions de solubilisation (Figure 28 à Figure 31). Si nous comparons cette somme à la proportion de la fraction soluble selon Van Sœst dans le déchet brut (26% de la MV), nous trouvons des résultats proches en ce qui concerne la solubilisation du déchet brut non lyophilisé, cas qui correspond le plus à la réalité industrielle. Ce résultat indiquerait que la fraction extraite lors de la solubilisation fait partie de la fraction NDS selon Van Sœst du déchet brut.

3.3.3 Potentiels méthanogènes des différentes fractions

La Figure 32 présente les potentiels méthanogènes (BMP) mésophiles (37°C) des différentes fractions obtenues par les solubilisations à 37°C ainsi que des trois échantillons de déchet brut. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière volatile de chaque échantillon.

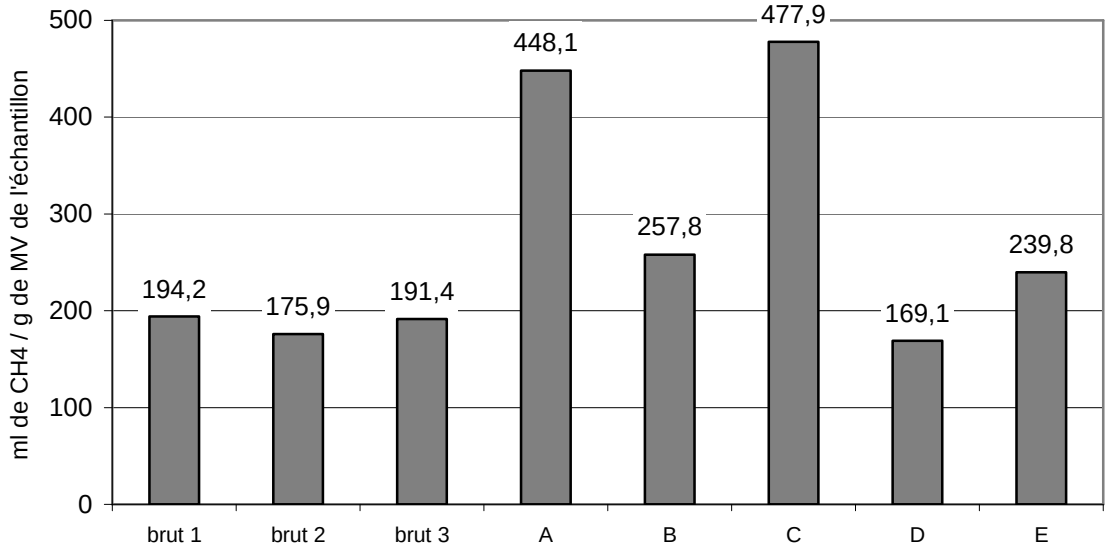


Figure 32. BMP mésophiles (A : fraction hydrosoluble du déchet brut ; B : fraction non soluble du déchet brut ; C : fraction hydrosoluble du déchet lyophilisé et broyé ; D : fraction non soluble du déchet lyophilisé et broyé ; E : déchet lyophilisé et broyé).

La Figure 33 présente les potentiels méthanogènes (BMP) thermophiles (55°C) des différentes fractions obtenues par les solubilisations à 55°C ainsi que des trois échantillons de déchet brut. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière volatile de chaque échantillon.

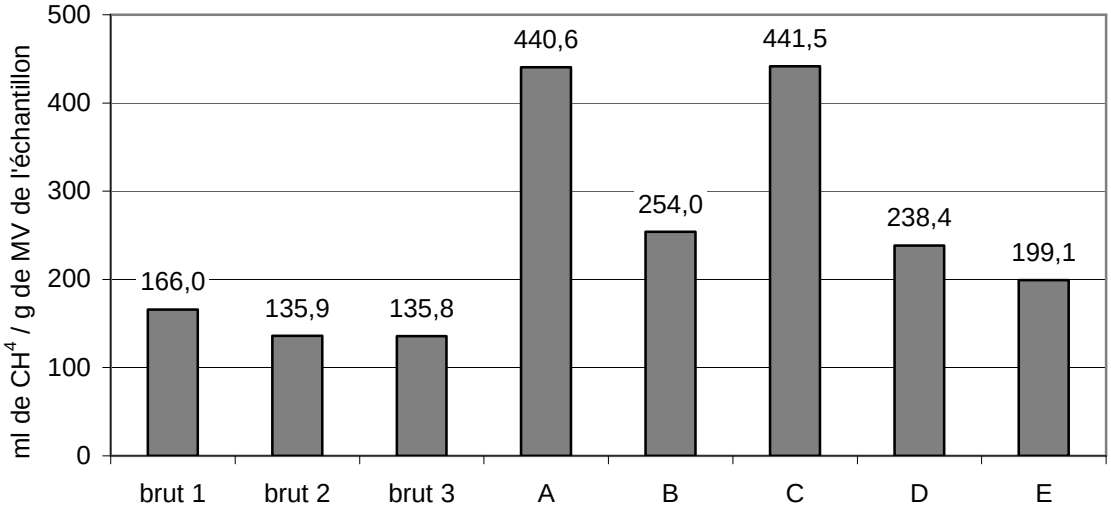


Figure 33. BMP thermophiles (A : fraction hydrosoluble du déchet brut ; B : fraction non soluble du déchet brut ; C : fraction hydrosoluble du déchet lyophilisé et broyé ; D : fraction non soluble du déchet lyophilisé et broyé ; E : déchet lyophilisé et broyé).

Les figures ci-dessus montrent que la matière organique contenue dans les fractions liquides (A et C) est près de deux fois plus fermentescible que celle des fractions solides.

La matière organique du déchet brut broyé (E) est légèrement plus productrice de méthane que celle du déchet brut non broyé (brut). Cela est sûrement lié à l'accessibilité de certains substrats organiques.

En ramenant les valeurs de BMP à 1 g de Matière Volatile du déchet solubilisé, on détermine la part du méthane produit par le déchet solide due à la fraction soluble (Tableau 18).

Tableau 18. Part du méthane produit due à la fraction soluble à l'eau, selon les différentes conditions opératoires

Température de solubilisation et de BMP	Part du soluble (A) dans la production de CH4 par le déchet brut	Part du soluble après broyage (C) dans la production de CH4 par le déchet broyé (E)
37°C	13 %	23 %
55°C	10 %	14 %

Le tableau ci-dessus montre que **la fraction soluble à l'eau est responsable, en moyenne, de 15% du méthane produit par la fermentation du déchet total**. Le rôle de la fraction soluble dans la production de méthane est donc non négligeable. Nous constatons également que le broyage avant la solubilisation augmente la part de méthane produit par la fraction hydrosoluble. C'est-à-dire que davantage de matière fermentescible est solubilisée.

Nous observons également une bonne homogénéité des résultats obtenus avec le déchet brut. En effet, l'écart type est de 5 % (de la valeur mesurée) pour les BMP mésophiles et de 12 % pour les BMP thermophiles.

3.3.4 Composition de la matière solubilisée

Le Tableau 19 donne la composition de la matière organique solubilisée avec les quatre conditions différentes de solubilisation.

Tableau 19. Identification de la matière organique dans les fractions solubilisées

Conditions de solubilisation	A : Déchet brut ; 37°C	C : Déchet broyé ; 37°C	A : Déchet brut ; 55°C	C : Déchet broyé ; 55°C
Glucides	6,35%	9,65%	15,60%	16,40%
Protéines	22,65%	21,96%	22,34%	21,17%
AGV	20,58%	19,98%	24,86%	9,84%
MV non identifiée	50,42%	48,41%	37,20%	52,59%

Les résultats obtenus montrent à nouveau que près de la moitié de la matière volatile soluble dans l'eau n'est pas identifiée. L'autre moitié se partage plutôt équitablement entre glucides, protéines et AGV.

Une température plus élevée (55°C au lieu de 37°C) permet une part environ deux fois plus importante de glucides. La température et le broyage ne semblent pas affecter la part des protéines et des AGV.

Le Tableau 20 indique la part des glucides du déchet brut ou broyé qui passe dans la phase liquide lors de la solubilisation à 37 ou à 55°C. Les valeurs sont exprimées en proportions de la quantité présente dans la matrice solide initiale. Nous observons que la solubilité des glucides et protéines est indépendante de la quantité initiale.

Tableau 20. Proportions de glucides et de protéines du déchet traité solubilisés

Conditions de solubilisation	Déchet brut ; 37°C	Déchet broyé ; 37°C	Déchet brut ; 55°C	Déchet broyé ; 55°C
Glucides	1,23%	2,35%	2,01%	2,87%
Protéines	17,74%	21,53%	18,53%	23,84%

D'après ces résultats, un broyage fin avant la solubilisation permet à plus de glucides et de protéines de passer dans la phase soluble. De même, lors de la solubilisation des déchets, des conditions thermophiles permettent de solubiliser légèrement plus de glucides et de protéines que des conditions mésophiles. Ce point mérite cependant une confirmation.

D'une façon globale, les protéines des ordures ménagères se solubilisent dix fois plus que les glucides.

3.3.5 Demande chimique en oxygène

Le Tableau 21 présente les valeurs de demande chimique en oxygène (DCO) obtenues sur les fractions solubles. Ces valeurs sont ramenées à 1 g de Matière Volatile du déchet brut ou broyé mis en jeu dans l'étape de solubilisation.

Tableau 21. DCO des fractions solubles ramenée à 1 g de MV du déchet solubilisé

Conditions de solubilisation	A : Déchet brut ; 37°C	C : Déchet broyé ; 37°C	A : Déchet brut ; 55°C	C : Déchet broyé ; 55°C
DCO (mg/l de phase liquide)	12 250	250 000	10 250	25 150
DCO (mg/g de MV du brut)	11,51	23,49	8,41	23,64

Ces données montrent que, lorsque le déchet est finement broyé avant l'étape de solubilisation, la quantité de DCO solubilisée est plus que doublée. En revanche, la température n'a pas d'influence visible.

3.3.6 Matière grasse

Le Tableau 22 présente les dosages des graisses dans les fractions solides issues des étapes de solubilisation ainsi que dans le déchet brut. Les résultats sont rapportés à 1 g de Matière Volatile du déchet traité à l'étape de solubilisation.

Tableau 22. Dosage des graisses dans les solides

Température de solubilisation	B (g/g de MV du déchet brut)	D (g/g de MV du déchet broyé)	Déchet brut (g/g de MV du déchet brut)
37°C	5,74%	3,27%	6,20%
55°C	3,02%	2,54%	

Les résultats ci-dessus montrent qu'une partie de la matière grasse contenue dans le déchet brut ne se retrouve pas dans la fraction solide après solubilisation. Une partie des graisses du déchet est donc passée dans la phase liquide lors de la solubilisation.

Il faut noter qu'il ne s'agit pas d'une solubilisation des graisses dans l'eau. Il doit plutôt s'agir de gouttelettes ou de petits globules graisseux qui ont pu être emportés dans la phase liquide. Cet effet augmente pour une granulométrie du déchet plus faible (broyage). La température favorise également le passage de la matière grasse dans la phase liquide car elle permet une solubilisation accrue des corps gras solides.

3.3.7 Importance de la fraction soluble

En utilisant des facteurs de conversion adéquats, nous pouvons calculer la DCO due aux glucides, protéines et AGV dans la fraction soluble. Sachant que 1 mg de DCO dégradée

produit 350 mℓ de méthane (CH_4), la quantité maximale de méthane est calculée à partir de la DCO calculée et de la DCO mesurée. En outre, les quantités de glucides, de protéines et d'AGV peuvent être exprimées en quantité de DCO.

Le Tableau 23 montre les quantités de DCO totale (mesurée) et de DCO d'origine identifiée (calculée) pour les fractions solubles obtenues à 37°C. Les productions de méthane maximales correspondantes sont aussi présentées, ainsi que les quantités expérimentales mesurées par BMP. Les résultats sont exprimés pour 1 ℓ de fraction soluble.

Tableau 23. Quantités de DCO et de CH_4 produit estimées et réelles pour les fractions solubles à 37°C

		Fraction soluble identifiée (glucides + protéines + AGV)		Fraction soluble totale (DCO mesurée)				
T	**Matrice de la solubilisation**	**DCO** (g/l)	**BMPmax** (mℓ/g MVbrut) **[X]**	**DCO** (g/l)	**BMPmax** (mℓ/g MVbrut) **[Y]**	**BMP mesuré** (mℓ/g MVbrut) **[Z]**	**X/Y (%)**	**X/Z (%)**
37°C	Déchet brut	4,58	15,1	12,25	40,3	31,0	37,5	48,7
	Déchet broyé	7,78	19,7	25,00	52,9	41,4	37,2	47,6
55°C	Déchet brut	4,31	14,2	10,25	33,7	25,3	42,1	56,1
	Déchet broyé	9,74	17,2	25,15	44,4	34,3	38,7	50,1

La comparaison des valeurs de méthane produit mesurées et calculées à partir de la DCO mesurée (Z/Y) montre que **77 % de la DCO de la matière organique soluble est fermentescible**, autrement dit transformable en méthane. La biodégradabilité de la fraction soluble est donc de 77 ±1,4 %. Cette valeur est à comparer aux 95,0 % obtenus sur des drèches de pommes par Buffière *et al.* (2008). Ces deux valeurs indiquent que la biodégradabilité de la fraction hydrosoluble est grande mais pas constante. La quantité de matière hydrosoluble ou sa DCO ne permettent donc pas de prédire son potentiel méthane.

Les glucides, protéines et AGV (DCO identifiée) sont responsables d'environ 40 % de la DCO réelle (X/Y) et sont à l'origine de la moitié du méthane produit (X/Z). **La partie non identifiée de la matière organique soluble représente donc 60 % de la DCO et la moitié du potentiel méthanogène de la matière organique soluble**.

3.3.8 Synthèse

La matière organique soluble représente une faible proportion (3,7 %) de la matière organique totale ainsi que du potentiel méthanogène global du déchet mais elle est très fermentescible. Elle produit 15% du méthane lors de la fermentation des ordures ménagères. De plus, elle est rapidement solubilisée et donc rapidement disponible pour les microorganismes. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle cette matière organique rapidement solubilisée revêt une importance certaine dans le démarrage de la méthanisation.

Elle est constituée en partie de glucides, de protéines et d'acides gras volatils dans des proportions voisines. Les protéines sont les plus solubles. La température et le broyage de la matrice ont une influence positive sur la plupart de ces constituants.

Une part importante de la matière organique soluble des ordures ménagères reste non identifiée par les méthodes employées ici. Elle représente la moitié de la matière volatile et de la DCO fermentescible ainsi que 60 % de la DCO totale de la matière organique soluble.

4 Conclusion

Le fractionnement de la matière organique selon Van Sœst montre une variabilité significative entre les déchets. De plus, il est, en première approche, un indicateur de la biodégradabilité (et donc du méthane à produire). Il s'agit donc d'une méthode très intéressante pour la caractérisation des déchets solides. En effet, une relation négative entre la biodégradabilité et la fraction SAS+IVS rend compte de la structure du déchet qui elle-même rend compte des conditions réelles de méthanisation.

Les expériences réalisées au cours de cette étude permettent d'avoir une meilleure connaissance de la fraction de matière organique solubilisée dans les premières minutes et dégradée dans les premiers jours de la méthanisation des ordures ménagères. Les résultats montrent que cette fraction soluble, bien que représentant une faible part de la matière organique totale, joue un rôle important dans la méthanisation. En effet, elle constitue une fraction très biodégradable rapidement disponible pour les micro-organismes et participe à 15 % de la production totale de méthane.

Compte tenu de son importance, la détermination de la fraction hydrosoluble d'un déchet apporte des informations supplémentaires quant à sa biodégradabilité ainsi que sa cinétique de dégradation. Cette caractérisation est un bon complément du fractionnement selon Van Sœst dans le but de décomposer en fractions élémentaires la complexité des ordures ménagères.

De plus, ce type d'étude permet d'approfondir les connaissances au sujet des phénomènes physico-chimiques et biochimiques qui entrent en jeu lors de la méthanisation par voie sèche de déchets solides.

Il serait utile de poursuivre cette étude sur d'autres échantillons de déchets afin d'obtenir des données plus généralisées. En outre, il serait intéressant de réaliser le même type d'étude sur des déchets simplifiés (végétaux, papier, etc…) afin d'identifier d'où provient la matière organique soluble.

Il serait intéressant d'arriver à caractériser davantage la matière organique soluble pour identifier la part non identifiée qui représente la moitié de cette fraction.

Des voies de recherche intéressantes ont été mises en évidence pour la caractérisation de la matière organique des déchets solides. Le fractionnement par la méthode de Van Sœst, couplé au dosage des glucides ainsi que la caractérisation de la fraction hydrosoluble, sont des manières pertinentes d'évaluer la quantité de matière organique biodégradable et donc la biodégradabilité. Ces méthodes méritent d'être développées par des recherches plus approfondies. Outre le dosage des glucides, d'autres mesures complémentaires au fractionnement Van Sœst peuvent être envisagées.

Des avancées dans ces voies permettront une meilleure connaissance de l'organisation de la matière organique dans les déchets solides. Il en découlera une meilleure approche de sa caractérisation qui permettra de prédire de façon plus fiable la biodégradabilité des déchets. Cette prédictibilité permettra de mieux maîtriser la méthanisation par voie sèche. Plus précisément, d'une part, les gisements de déchets pourront être évalués et les modalités de prétraitement, de digestion et de génie des procédés (temps de séjour, matière sèche, …) pourront être adaptées. D'autre part, il sera possible de déterminer, antérieurement à l'opération de méthanisation, la quantité de méthane attendue. Ainsi l'avancement de la réaction pourra être évalué et d'éventuels problèmes d'inhibition pourront être détectés par une production de méthane inférieure à celle attendue.

CHAPITRE IV. ETUDE DU REACTEUR PILOTE DE LABORATOIRE

Sur le Titanic en train de sombrer, est-il raisonnable de consacrer beaucoup d'efforts et d'intelligence à obtenir une meilleure cabine ?

[Albert Jacquard]

IV. ETUDE DU REACTEUR PILOTE DE LABORATOIRE

1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, la grande majorité des études menées sur la méthanisation des déchets solides ont été réalisées dans des fioles ou dans des réacteurs en voie liquide. Nous avons également vu que le test de potentiel méthanogène BMP était nécessaire mais pas suffisant pour étudier la méthanisation des déchets solides. Il existe très peu de données de laboratoire et d'études fondamentales sur la digestion par voie sèche. Cela est lié principalement à des questions techniques. Nous avons vu que le mélange avait une influence importante sur les performances observées d'un méthaniseur. Il peut être bénéfique ou néfaste suivant qu'il est assez, trop ou trop peu poussé. Des études appliquées et fondamentales sur la digestion par voie sèche nécessiteraient un nouveau type de réacteur de laboratoire :

- Permettant d'effectuer des expériences dans des conditions réelles de voie sèche sur des déchets solides réels ;
- Qui ait une taille adéquate : assez grand pour permettre d'effectuer des prélèvements réguliers pendant un essai et permettant de traiter des quantités significatives de déchet, compte tenu de leur hétérogénéité ; assez petit pour être pratique à utiliser, pour pouvoir effectuer des ajouts de substances (inhibiteurs par exemple) et être peu coûteux à entretenir ;
- Un système d'agitation permettant une homogénéisation suffisante pour des prélèvements représentatifs du contenu du réacteur tout en étant suffisamment grossière pour être représentative de la réalité industrielle.

Un nouveau réacteur de 40 ℓ a donc été développé et construit pour les besoins de cette thèse et d'études futures. Sa description est donnée au chapitre II. Afin de vérifier que ce nouveau réacteur possède les qualités voulues, le temps de mélange de particules sélectionnées a été déterminé. Ensuite, les caractéristiques de fonctionnement (biogaz, méthane, AGV, ammoniac) en batch et en semi-continu ont été analysées, avec des ordures ménagères résiduelles (OMR) comme substrat. Ces résultats ont été comparés à des données obtenues sur un réacteur industriel afin de s'assurer que le nouveau réacteur est représentatif de la réalité industrielle. Le réacteur industriel considéré est un méthaniseur en voie sèche de 21 m^3 fonctionnant selon le procédé DRANCO. Il appartient au CREED – Veolia Environnement et a été décrit précédemment (Lemaire *et al.*, 2005 ; chapitre II).

Le nouveau réacteur a été utilisé dans des études sur la méthanisation. La méthanisation d'OMR a été comparée en conditions thermophiles et mésophiles afin d'observer les différences et les points communs dans ces deux conditions de méthanisation, et, éventuellement, les avantages et les inconvénients.

La co-digestion OMR et de déchets carnés a été observée en conditions de charge organique normale et de surcharge en déchet carné. Les déchets carnés sont très biodégradables et contiennent beaucoup de protéines. Leur dégradation peut donc mener à des concentrations élevées en AGV et en ammoniac. Ces deux produits sont susceptibles d'être inhibiteurs. Le but de cette expérience était donc, d'une part, d'étudier la possibilité de la co-digestion d'OMR et de déchets carnés, d'autre part, d'analyser le comportement d'un méthaniseur pendant cette co-digestion et d'identifier des paramètres permettant de reconnaître une situation de surcharge en déchet carné.

2 Essai de détermination du temps de mélange

Une expérience a été réalisée pour tenter de déterminer le temps de mélange complet du nouveau réacteur de laboratoire. Le réacteur a été mis en agitation continue à 3,2 trs/mn. 900 billes calibrées de diamètre 1 cm et de densité 1 ont été ajoutées au temps 0 dans le réacteur contenant 20 kg de digestat OMR. Les caractéristiques de ces billes sont censées représenter les caractéristiques moyennes des particules constituant les déchets.

A intervalle régulier (1 puis 2 minutes, temps d'agitation), un prélèvement d'environ 200 g a été réalisé dans le réacteur et les billes y ont été localisées par recherche manuelle. La concentration en billes dans les échantillons est définie comme étant le nombre de billes dans l'échantillon divisé par la masse de l'échantillon. Nous avons donc calculé pour chaque instant la concentration en billes dans le réacteur comme le nombre de billes restant divisé par la masse de digestat restant dans le digesteur. Enfin, nous avons calculé le rapport à un instant *t* comme étant la concentration en billes de l'échantillon prélevé à cet instant divisé par la concentration en billes dans le réacteur à cet instant. Lorsque le mélange est parfait, ce rapport doit être proche de 1.

La Figure 34 présente les résultats obtenus pour l'essai de détermination du temps de mélange du nouveau réacteur de laboratoire. Nous nous apercevons que la courbe du ratio en fonction du temps suit une forme d'oscillation. D'après notre expérience, ce type de courbe serait typique d'un mélange "par paquets". L'observation visuelle du comportement du contenu du réacteur pendant le mélange confirme cette hypothèse. Le ratio atteint pour la première fois la valeur de 1 au bout de 30 minutes d'agitation environ. Les oscillations semblent se stabiliser autour de 1 au bout de 40 minutes ou plus. Malheureusement, nous n'avons pas pu poursuivre l'expérience assez longtemps pour nous en assurer. La méthode utilisée est particulièrement fastidieuse : en effet, la réalisation de prélèvements à répétition dans le réacteur s'est avérée difficile après 40 minutes d'agitation.

Des éléments de la taille des billes mettent donc environ 40 min à s'homogénéiser. Dans le cadre de nos études sur ce réacteur, les prélèvements journaliers seront effectués au bout d'un temps d'agitation cumulé supérieur. Ainsi, les prélèvements seront suffisamment représentatifs compte tenu de leur taille de 200 g. En revanche, des éléments plus petits mettront plus de temps à s'homogénéiser. C'est-à-dire qu'un mélange intime à l'échelle des cellules deamande plus de temps. Donc il n'y a pas de risque vis-à-vis d'un mélange trop fort qui empêcherait la formation de zones de méthanogenèse (*cf.* Chapitre I. 2.3.4) et/ou provoquerait une liquéfaction du milieu ou une séparation de phase liquide/solide.

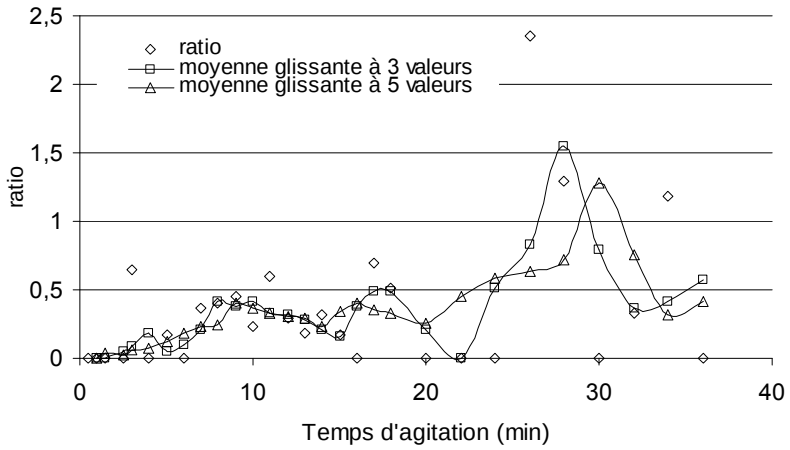


Figure 34. Expérience de détermination du temps de mélange dans le réacteur de laboratoire : le ratio calculé est le rapport entre la concentration en billes mesurée dans l'échantillon et la concentration totale en billes dans le réacteur. Les moyennes glissantes ont été calculées sur des ensembles de 3 mesures et de 5 mesures.

3 Fonctionnement en discontinu : comparaison à un réacteur industriel

3.1 Organisation de l'expérience

Le fonctionnement en batch du nouveau réacteur de laboratoire a été analysé et comparé à des données de fonctionnement en mode discontinu d'un réacteur d'échelle industrielle appartenant à Veolia.

Dans cette expérience, trois fermentations consécutives ont été menées dans chacun des deux réacteurs. Lors du premier essai, les réacteurs ont été inoculés avec un digestat mésophile provenant d'une installation de méthanisation industrielle. Ensuite, chaque essai suivant a été inoculé avec du digestat résiduel du batch précédent. Cela permet d'observer un éventuel effet de l'adaptation des micro-organismes au substrat.

Tableau 24. Conditions initiales des expériences en batch

	Réacteur de laboratoire			Réacteur industriel		
	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 1	Batch 2	Batch 3
% MS	32,1	32,2	33,8	36,9	39,7	33,2
% MV/MS	34,4	33,9	38,7	38,7	46,5	38,1
Rapport déchet/inoculum (kgMV/kgMV)	0,343	0,342	0,198	0,268	0,359	0,347
Durée (j)	35	40	40	35	35	40

Lors de ces expériences, les deux réacteurs ont fonctionné en régime mésophile. Ils ont été alimentés avec des ordures ménagères résiduelles broyées et criblées à 40 mm provenant du même gisement. En moyenne, le rapport déchet/inoculum était de 0,35 kg de MV du déchet par kg de MV de l'inoculum (Tableau 24). Le taux de MS a été ajusté à 35 ± 3 % par ajout d'eau du robinet. Pour plus d'informations sur le fonctionnement des réacteurs, voir Chapitre II.

Les productions de biogaz et de méthane ont été suivies en continu. A intervalles réguliers, des échantillons ont été prélevés, sur lesquels ont été dosées les concentrations d'AGV, d'ammoniac, de MS et de MV.

A titre de comparaison, le potentiel méthanogène (BMP) des ordures ménagères utilisées, sous forme brute ainsi qu'après lyophilisation et broyage à 1 mm, a été mesuré.

3.2 Biogaz et Méthane

3.2.1 Rendements en méthane

Les rendements finaux en méthane étaient similaires pour les six essais (Tableau 25) : le rendement moyen était de 200 ± 10 Nm^3/tMV. Le test de potentiel méthanogène présente un rendement proche pour le déchet brut : 220 Nm^3/tMV. Nous pouvons cependant remarquer que, lorsque le déchet est finement broyé, un rendement largement supérieur est obtenu : 300 Nm^3/tMV. Ceci montre l'importance de la taille des particules et donc la nécessité d'un réacteur de laboratoire qui puisse prendre en charge des déchets réalistes, c'est-à-dire dont le mode de préparation est le même que celui expérimenté en conditions industrielles. Il est à noter que, pour des raisons de comparaison, les résultats présentés pour les tests BMP ne

tiennent pas compte de l'activité endogène car celle-ci n'est pas accessible pour les tests en réacteur.

Tableau 25. Rendements finaux en méthane

	Réacteur de laboratoire			Réacteur industriel			BMP	
	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Déchet brut	Déchet broyé
Nm^3CH_4/tMV	193	211	187	193	205	212	220 ± 10	300 ± 10
Durée (j)	35	40	40	35	35	40	40	40

3.2.2 Evolution des productions cumulées

Les évolutions des productions de biogaz et de méthane sont remarquablement similaires dans les deux réacteurs (Figure 35 B).

Dans le cas du premier essai, nous observons une phase de démarrage moins rapide dans chacun des deux réacteurs. Ensuite, au cours des essais suivants, cette phase de latence devient de moins en moins prononcée comme la réaction devient plus rapide. Ce phénomène peut être attribué à l'adaptation des micro-organismes au déchet et aux conditions de l'expérience. Cette **adaptation se fait de manière identique dans les deux réacteurs**.

Lors du premier essai en réacteur industriel, une production anormalement élevée est observée aux alentours du 15ème jour et explique la production finale de biogaz plus importante. Les circonstances de cette production restent incertaines. L'une des explications avancées pourrait être un temps sans alimentation de déchets avant le lancement de l'essai trop court. Il en a résulté que la concentration initiale en AGV était déjà élevée et il y aurait donc eu un effet de surcharge. Une autre explication peut être le fait que les micro-organismes n'étaient pas encore adaptés au fonctionnement discontinu qui sous-entend une alimentation massive en une fois plutôt qu'une série d'alimentations moins importantes comme lors du fonctionnement en semi-continu qui était en place dans le méthaniseur d'où provient l'inoculum.

Les profils de production de méthane et de biogaz dans les tests BMP ressemblent davantage aux premiers profils (démarrage) qu'à ceux de la troisième répétition (Figure 35A). En effet, les courbes de production de méthane des BMP présentent une phase de latence de plusieurs jours et une forme sigmoïde caractéristique, comme pour les essais de démarrage des expériences en réacteur. A l'inverse, lors de la troisième répétition des essais en réacteur, aucune phase de latence n'est visible et les courbes de production de biogaz et de méthane ont un profil particulier en trois portions rectilignes.

Les tests BMP présentent un fonctionnement de batch dans lequel les micro-organismes ne sont pas totalement adaptés. Ils n'auraient donc pas pu être utilisés pour prédire la cinétique d'un réacteur dans lequel les micro-organismes seraient adaptés. C'est pour cette raison qu'il faudrait réaliser deux, voire trois, tests BMP à la suite pour obtenir un résultat idéal, comme cela a déjà été observé (Angeladiki et Ahring, 1993). Cela ferait que le test BMP serait une technique encore plus longue à mettre en place et perdrait totalement son intérêt prédictif pour caractériser des déchets très variables au cours du temps. De plus, dans le cas des ordures ménagères, il n'est pas très pratique d'effectuer des ajouts successifs dans un test en fiole.

L'aspect des courbes concernant la troisième répétition des essais en discontinu indique une phase initiale de fermentation rapide de composés facilement biodégradables, suivie d'une phase de fermentation plus lente de composés moins biodégradables, avant une phase de production quasiment nulle correspondant à l'épuisement du milieu en matière organique assimilable. La faible production résiduelle en fin de batch

pourrait être due à l'activité endogène liée à l'autolyse des cellules des micro-organismes et/ou à une troisième fraction de la matière organique très lentement biodégradable.

L'observation des courbes de BMP révèle que, pendant les 12 premiers jours, les déchets bruts et broyés suivent une cinétique de dégradation identique et superposable. Ce n'est qu'après cette première phase que les deux courbes s'écartent pour donner des productions finales différentes. De plus, c'est à partir du même moment, qu'une cassure dans la pente des courbes est observée, avec un ralentissement de la production, pour le déchet non broyé. Il semblerait donc que le broyage ait un effet sur la fraction difficilement biodégradable et non sur la fraction facilement biodégradable. Ceci indiquerait que l'existence de ces deux fractions a un lien avec la structure physique du déchet. La fraction facilement biodégradable aurait une structure fine, voire soluble, alors que la fraction difficilement biodégradable aurait une structure physique moins soluble et plus difficile à attaquer pour les micro-organismes. Le broyage permet de détruire cette structure physique et donc de rendre le second compartiment plus biodégradable. Cette hypothèse est conforme à ce qui peut être lu dans la bibliographie (*cf.* Chapitre I. 2.3.2 et 2.3.3).

3.2.3 Vitesses spécifiques

La vitesse spécifique de production de méthane est la vitesse de production de méthane instantanée ramenée à la quantité de MV de l'inoculum. A l'instar des productions de biogaz et de méthane, les évolutions de la vitesse spécifique de production de méthane sont remarquablement similaires entre les deux réacteurs au cours des trois essais en discontinu successifs (Figure 35C). Les profils varient d'un essai à l'autre mais de la même manière pour les deux réacteurs.

L'évolution de la vitesse spécifique ne suit pas la cinétique du premier ordre à laquelle on pourrait s'attendre si la vitesse de dégradation était contrôlée uniquement par la vitesse d'hydrolyse (*cf.* I.2.3.2). Apparemment, il y a au moins deux phases dans la production de méthane. Ce comportement a été observé auparavant pour des déchets de repas en méthanisation par voie humide (Buffière *et al.*, 2006). Pour le réacteur industriel, l'activité méthanogène présente un premier pic après 2 à 3 jours, puis un pic plus important aux alentours du 10ème jour. A l'échelle du pilote de laboratoire, l'apparition du premier pic est moins flagrante.

3.3 Acides Gras Volatils

3.3.1 AGV totaux

Les AGV totaux sont exprimés en équivalents DCO (Demande Chimique en Oxygène) par kg de milieu réactionnel. Les équivalents DCO sont calculés par la somme de la DCO de chaque AGV. Dans la plupart des cas, une accumulation transitoire d'AGV est observable, suivie de près par leur dégradation (Figure 35D). Une corrélation peut être établie, dans une certaine mesure, entre cette évolution et les profils de vitesse spécifique de production de méthane. Ainsi, la plupart des pics d'AGV concordent avec des pics d'activité spécifique. Toutefois, il y a une certaine disparité entre les niveaux maximaux des pics d'AGV qui varient autant entre les batchs d'un même réacteur qu'entre les réacteurs. De plus, certains échantillons des deux premiers essais réalisés sur le réacteur industriel ont souffert de mauvaises conditions de transport et de dosage, et sont sans doute peu fiables. Cela explique l'aspect singulier des deux courbes correspondantes.

L'accumulation transitoire d'AGV pendant les tests en batch indique que la méthanisation des ordures ménagères n'est pas limitée uniquement par l'hydrolyse,

contrairement à ce qui est souvent mentionné dans la bibliographie (*cf.* I. 2.3). La consommation des AGV peut aussi jouer un rôle crucial dans la cinétique de dégradation dans son ensemble. En revanche, il n'est pas possible de dire si l'adaptation des micro-organismes favorise plutôt l'hydrolyse ou la méthanogenèse.

Dans le premier batch du réacteur industriel, nous observons une baisse puis une brusque augmentation du niveau d'AGV vers le 15ème jour. Cela pourrait être lié à la production anormale de CO_2 observée plus haut. Une inhibition ou un problème de type surcharge pourrait en être à l'origine. Toutefois, les circonstances de ce problème éventuel ne sont pas connues.

3.3.2 Détail des AGV

La concentration en acétate et en propionate dans le réacteur de laboratoire est présentée sur la Figure 36. Les concentrations des autres AGV dosés (butyrate, isobutyrate, valérate, isovalérate) étaient négligeables. Le détail des différents AGV n'est pas disponible pour le réacteur industriel, et ne présenterait que peu d'intérêt compte tenu des remarques précédentes sur les problèmes d'altération des échantillons pendant leur transport.

Le pic d'AGV observé est dû à une production rapide d'acétate et de propionate, qui sont les deux AGV les plus simples. L'acétate est produit plus majoritairement mais le propionate est dégradé plus lentement. C'est seulement une fois que l'acétate est totalement dégradé que le propionate commence à être dégradé : c'est donc la dégradation du propionate qui est la plus lente et qui semble indiquer la fin de la réaction globale.

3.4 Ammoniac

Des concentrations en ammoniac différentes peuvent être une cause possible des différences de concentration en AGV entre des batchs successifs dans un même réacteur avec un déchet identique. En effet, en fonction de l'histoire récente des réacteurs, les concentrations d'ammoniac peuvent différer d'un essai à l'autre.

Comme le montre la Figure 37, les concentrations en azote ammoniacal total varient de 1 200 à 2 000 mg N-NH_4/kg. Les concentrations durant chaque essai sont stables (les légères fluctuations observées sont attribuées à la déviation expérimentale). Dans notre cas, les valeurs obtenues ne sont pas supposées créer de problème d'inhibition, compte tenu du pH qui était supérieur ou égal à 8,0.

3.5 Synthèse

Le fonctionnement en mode discontinu du nouveau réacteur de laboratoire a été analysé et comparé à des données de fonctionnement d'un réacteur industriel. Les résultats montrent que **le nouveau réacteur reproduit fidèlement les conditions et le comportement du réacteur industriel**. Pour un déchet donné, les **cinétiques de production de biogaz et de méthane** sont identiques et les évolutions des **vitesses spécifiques de production de méthane sont très comparables** entre les deux réacteurs. L'analyse de l'accumulation des AGV ne permet d'identifier aucune différence dans le fonctionnement des deux réacteurs. Les niveaux d'ammoniac ont été stables, à des valeurs proches, dans toutes les expériences. D'après les paramètres suivis, il n'y a donc pas eu de différence de niveau d'inhibition observable entre les deux réacteurs.

Les conditions des tests BMP mènent à des productions de biogaz et de méthane plus élevées que lors d'une opération de méthanisation en conditions réelles. De plus, les **cinétiques des BMP ne permettraient pas de prédire** celles des réacteurs. Enfin, il n'a

techniquement pas été possible d'effectuer des prélèvements de suivi dans les fioles de BMP afin de suivre les niveaux d'AGV et d'ammoniac.

Un effet de l'adaptation de l'inoculum microbien aux conditions et au déchet a été observé au cours de trois essais successifs. Cette adaptation s'est déroulée de manière identique dans les deux réacteurs. Au cours de ces essais successifs, la phase initiale de latence a disparu et la vitesse s'est accrue. L'allure sigmoïde des courbes de production de gaz a cédé la place à une courbe rectiligne. Le rendement final de biogaz est toutefois resté le même pour toutes les expériences dans les deux réacteurs. L'allure des tests BMP évoquait celle d'un batch avec un inoculum pas encore adapté.

Une accumulation transitoire d'AGV dans les réacteurs montre que, **dans la digestion sèche des ordures ménagères, l'hydrolyse n'est pas la seule phase limitante,** contrairement à ce qui est généralement présumé. L'acétate et le propionate sont les deux seuls AGV à s'accumuler.

Deux phases sont observables dans la production de biogaz et de méthane, surtout une fois que les micro-organismes sont adaptés. La première phase correspond à une production rapide de gaz, probablement à partir de matière organique facilement biodégradable, tandis que la seconde phase est marquée par une production plus lente, probablement à partir de matière organique plus difficilement biodégradable. C'est sans doute cette seconde phase pour laquelle la cinétique est contrôlée par l'hydrolyse, comme en témoignent les essais en fioles réalisés avec du déchet finement broyé.

En effet, le broyage du déchet à 1 mm lors du test BMP augmente considérablement le rendement en méthane. Celui-ci passe alors d'une valeur de 220 Nm^3/tMV, proche de la réalité industrielle (200 Nm^3/tMV) à une valeur de 300 Nm^3/tMV. Le broyage fin du déchet augmente le rendement en méthane dans la deuxième moitié de la production. **La fraction lentement biodégradable semble donc être moins biodégradable en partie à cause de sa structure physique, que le broyage peut réduire partiellement.**

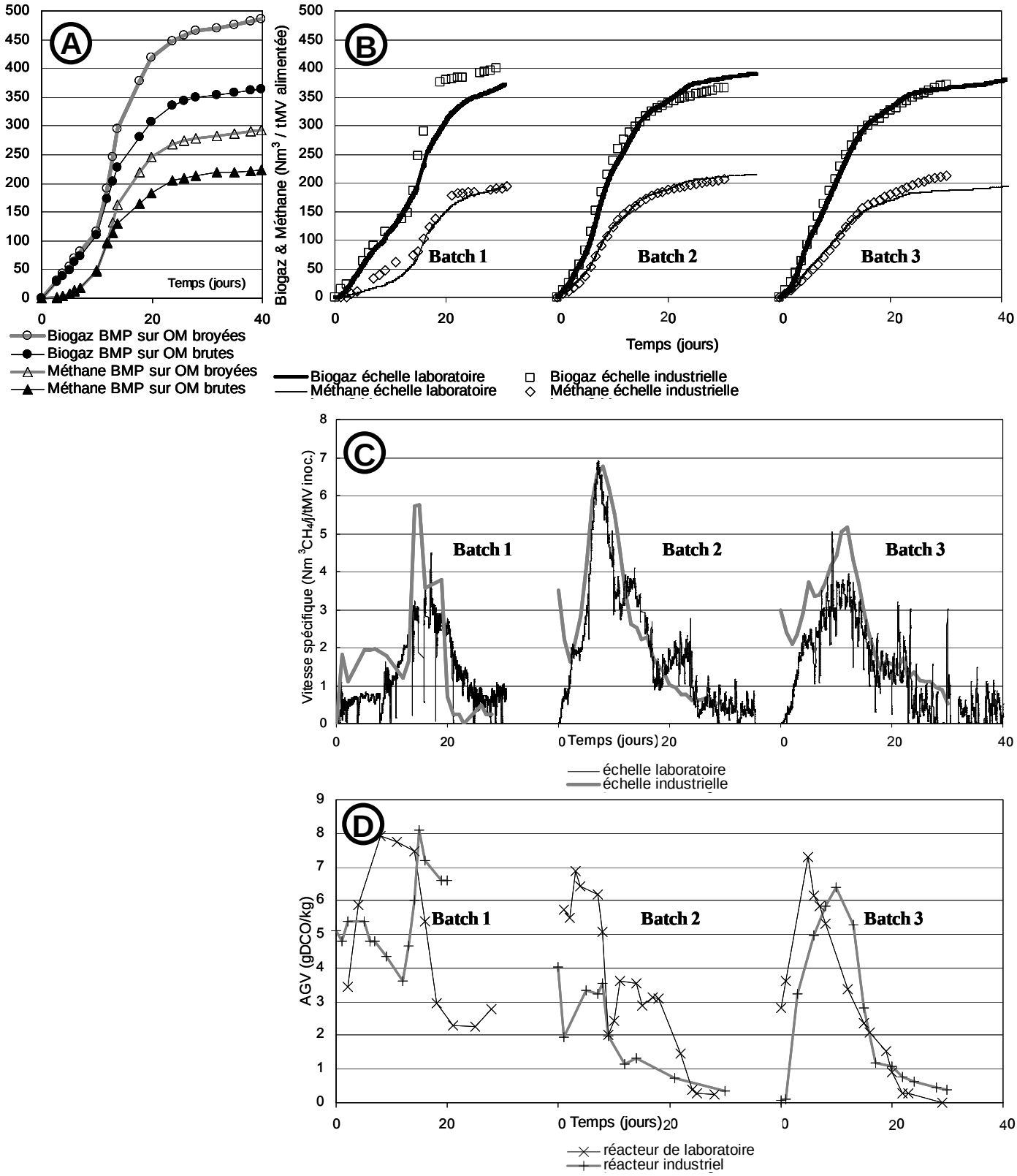


Figure 35. Suivi des paramètres du fonctionnement en batch de trois installations de méthanisation d'échelles différentes. **A** : Biogaz et méthane de tests BMP en fiole ; **B** : Biogaz et méthane aux échelles de laboratoire et industrielle ; **C** : Vitesse spécifique de production de méthane aux échelles de laboratoire et industrielle ; **D** : AGV aux échelles de laboratoire et industrielle.

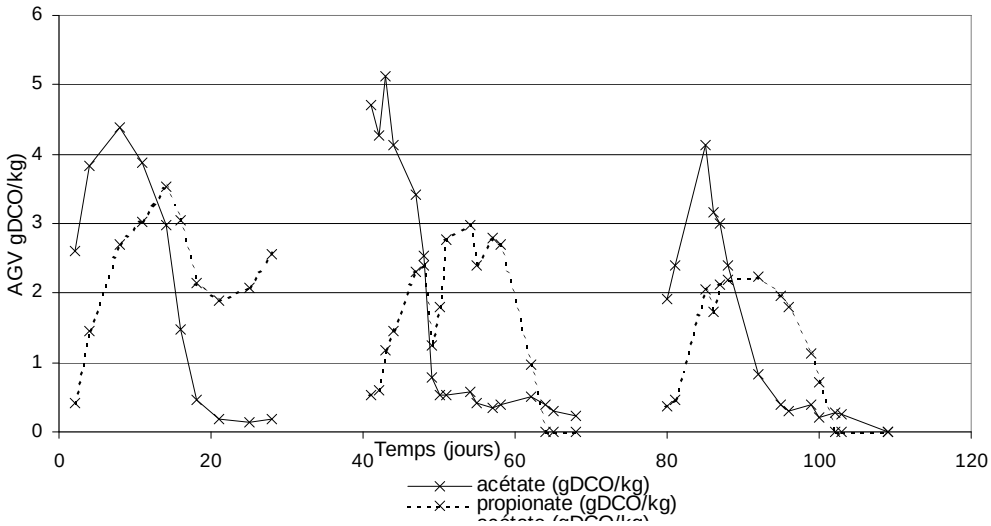


Figure 36. Concentration en différents AGV au cours du suivi du fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire

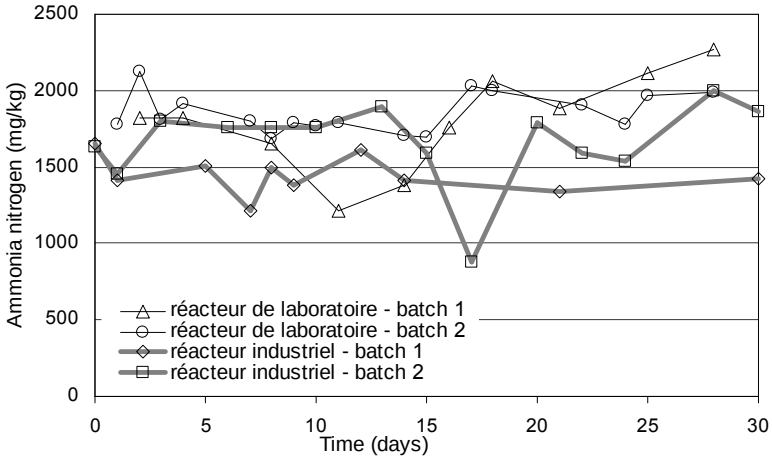


Figure 37. Concentration en azote ammoniacal total dans le réacteur de laboratoire et le réacteur industriel

4 Fonctionnement en semi-continu : comparaison à un réacteur industriel

4.1 Organisation de l'expérience

Le fonctionnement en mode semi-continu du réacteur de laboratoire a été analysé et comparé aux données de fonctionnement d'un réacteur d'échelle industrielle appartenant à Veolia. Chacun des deux réacteurs a fonctionné en conditions thermophiles à 35 % de MS. Le réacteur de laboratoire était alimenté deux fois par semaine et le réacteur industriel était alimenté trois fois par semaine avec les mêmes ordures ménagères.

La Figure 38 présente les flux d'alimentation du réacteur de laboratoire. Ces valeurs, que nous appellerons par la suite les "débits" sont calculées en divisant la quantité de MV alimentée par le nombre d'heures avant l'alimentation suivante et par la masse de digestat présente dans le réacteur. La montée en charge a été faite rapidement, en moins de 14 jours. Ensuite, dans le réacteur de laboratoire le débit d'alimentation a été maintenu autour de 3,5 g MV/j/kg de milieu pour le reste de l'expérience à l'exception de deux accidents le 25ème et le 35ème jour. Dans le réacteur industriel, le débit d'alimentation a été maintenu autour de 3,2 g MV/j/kg de milieu.

Ce mode de fonctionnement stabilisé correspond à un temps de séjour moyen des déchets de 39 jours dans le réacteur de laboratoire et de 40 jours dans le réacteur industriel.

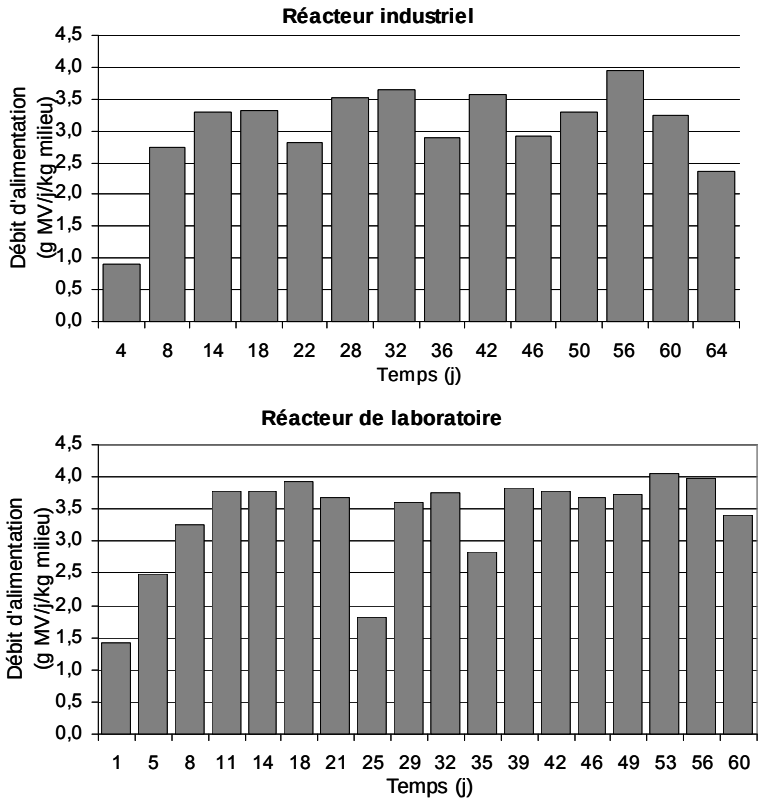


Figure 38. "Débits" de montée en charge et d'alimentation du réacteur industriel et du réacteur de laboratoire fonctionnant en semi-continu.

4.2 Biogaz et Méthane

4.2.1 Rendements en méthane

La Figure 39 montre les rendements en méthane pour les deux réacteurs en fonctionnement semi-continu. Chaque valeur correspond à une alimentation du réacteur. Elle est calculée en divisant la quantité de méthane produite entre deux alimentations par la quantité de MV apportée lors de la première des deux. Ces valeurs restent dans la même gamme et sont proches entre les deux réacteurs : 0,182 ± 0,017 Nm^3/kg MV pour le réacteur industriel et 0,187 ± 0,033 Nm^3/kg MV pour le réacteur de laboratoire. Les valeurs sont légèrement plus dispersées pour le réacteur de laboratoire. Cela peut être dû au fait que les quantités alimentées sont plus faibles sur le réacteur le plus petit et donc celles-ci sont davantage sujettes à variation.

Les valeurs obtenues sont légèrement inférieures au rendement final déterminé lors du fonctionnement en batch (200 ± 0,017 Nm^3/kg MV). Nous pouvons calculer que, lors du fonctionnement en mode semi-continu, l'avancement de la réaction était de 91,0 % pour le réacteur industriel et 93,5 % pour le réacteur de laboratoire. Ces valeurs élevées sont à mettre en relation avec le temps de séjour dans les réacteurs qui est de 40 jours et correspond donc à la fin des essais discontinus. A la fin (40 jours) des essais discontinus, le rendement final en méthane est de 91 % de celui des BMP (200/220).

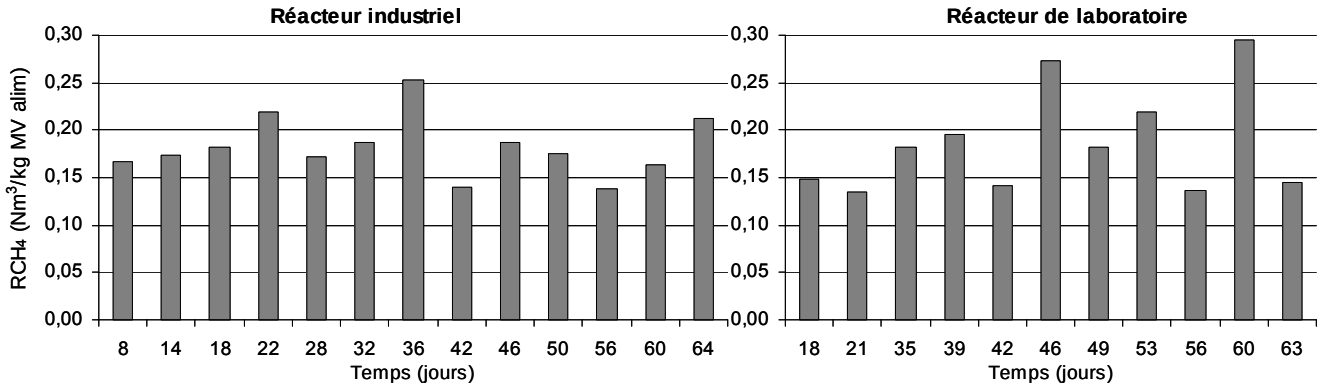


Figure 39. Rendements en méthane en fonctionnement semi-continu du réacteur industriel et du réacteur pilote de laboratoire.

4.2.2 Vitesses de production de biogaz

La Figure 40 montre les débits de méthane pour les deux réacteurs fonctionnant en semi-continu en Nℓ/h/kg de milieu réactionnel. Ils se trouvent dans la même gamme pour les deux réacteurs : entre 0,02 et 0,10 Nℓ/h/kg. La valeur moyenne après la phase de démarrage est de 0,0487 Nℓ/h/kg pour le réacteur industriel et de 0,0492 Nℓ/h/kg pour le réacteur de laboratoire. Ces valeurs sont proches. Cependant, les évolutions sont légèrement différentes. Comme c'était le cas pour le fonctionnement en batch, la production de biogaz en deux étapes est plus évidente dans le réacteur industriel tandis que les pics sont plus prononcés pour le réacteur de laboratoire.

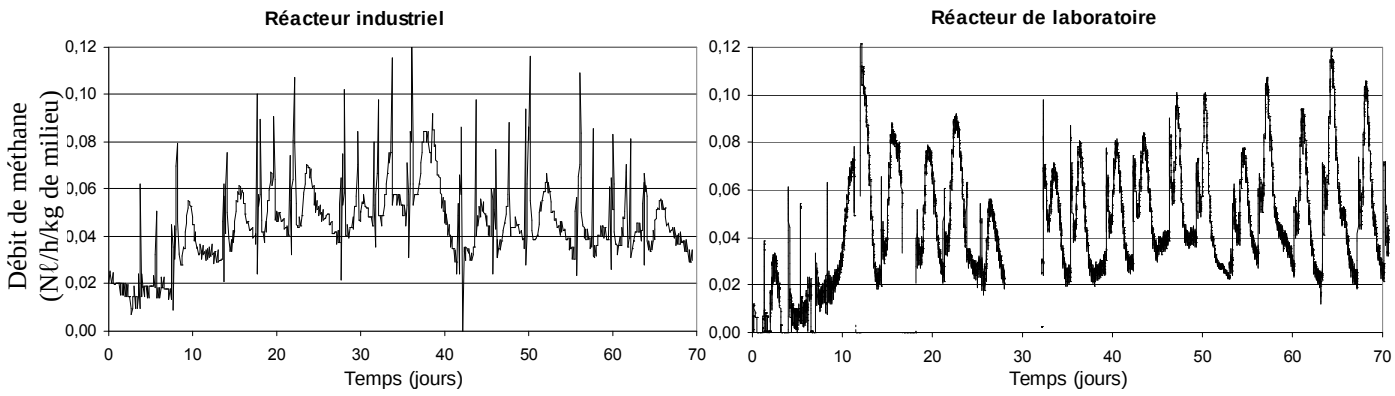


Figure 40. Débits de méthane normés en fonctionnement semi-continu du réacteur industriel et du réacteur de laboratoire

4.3 Acides Gras Volatils

4.3.1 AGV totaux

Les AGV totaux sont exprimés en équivalents DCO par kg de milieu réactionnel. Les équivalents DCO sont calculés par la somme de la DCO de chaque AGV. La Figure 41 présente le suivi de la concentration en AGV totaux dans le réacteur de laboratoire. Il y a une augmentation de la concentration en AGV lors de la montée en charge, jusqu'à 20 g DCO/kg. Cela est rapidement résorbé et le système trouve progressivement un équilibre à une faible concentration en AGV (<5 g DCO/kg).

Le même comportement a été observé par Schmidell *et al.* (1986) avec des ordures ménagères. Ils ont comparé deux modalités de démarrage de leur réacteur : avec un inoculum non adapté et avec un inoculum préalablement adapté aux conditions et au déchet. Lorsque l'inoculum était préalablement adapté, le pic d'AGV au départ était moins haut et été résorbé plus rapidement. Le pic observé puis sa résorption progressive est donc très probablement dû à l'adaptation des micro-organismes méthanogènes. Notons que la concentration en AGV monte ici à 4 fois la concentration la plus forte rencontrée en batch mésophile sans toutefois poser de problème d'inhibition. Dans le réacteur industriel, déjà adapté, la concentration demeure stable dès le départ à une concentration entre 5 et 10 g de DCO par kg de milieu réactionnel. Ces concentrations sont différentes des concentrations nulles observées à la fin des essais discontinus alors que le temps de séjour des essais semi-continus est de 40 jours.

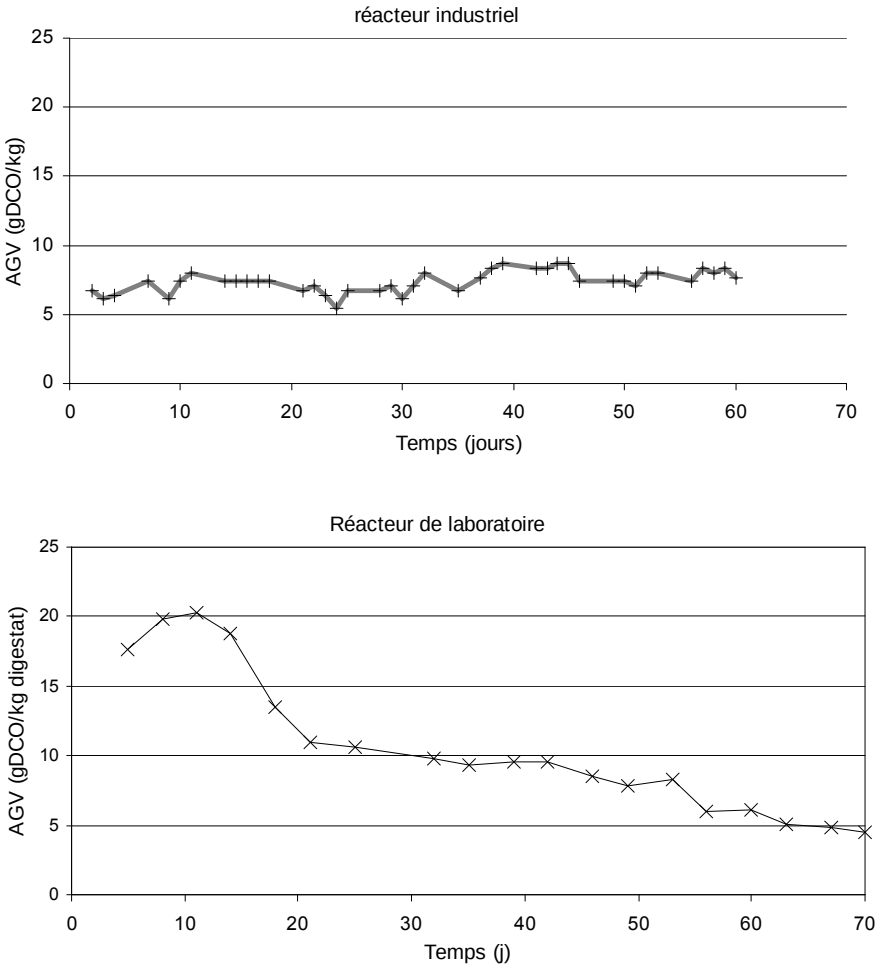


Figure 41. Concentration en AGV totaux (en équivalents DCO) pendant le démarrage et le fonctionnement en semi-continu du réacteur industriel et du réacteur de laboratoire.

4.3.2 Détail des AGV

La Figure 42 présente le détail des concentrations en AGV dans le réacteur de laboratoire. Le pic d'AGV au démarrage du réacteur est essentiellement dû à de l'acétate, l'AGV le plus simple. Des niveaux initiaux moyens de butyrate et de valérate (4 et 2,5 g DCO/kg de milieu) sont résorbés au cours de l'expérience. Les formes ramifiées de ces deux AGV sont quasiment absentes, mis à part un petit pic d'*iso*-butyrate qui suit le pic d'acétate. Un niveau élevé de propionate (autour de 5 g DCO/kg de milieu) subsiste tout au long de l'expérience et semble diminuer lentement.

Récemment, Angelidaki *et al.* (2006) ont observé le même type de pic d'AGV lors du démarrage progressif de réacteurs de méthanisation de FFOM parfaitement mélangés. Au démarrage, la concentration en acétate augmentait rapidement puis diminuait tout aussi vite. Dans leurs essais, du propionate était produit au départ également mais disparaissait au bout de 15 jours de fonctionnement.

La persistance du propionate lors du fonctionnement en semi-continu est conforme aux observations effectuées lors des essais en mode discontinu, à savoir que le propionate est le dernier acide à être dégradé. Il est donc le seul à persister dans le milieu en fin de digestion. En revanche, le propionate est le seul AGV responsable de la différence entre le fonctionnement stabilisé des essais semi-continus à 40 jours de temps de séjour et la fin des

essais discontinus (40 jours). Dans notre cas, il y a donc un phénomène dans les fermentations semi-continues qui limite la dégradation du propionate.

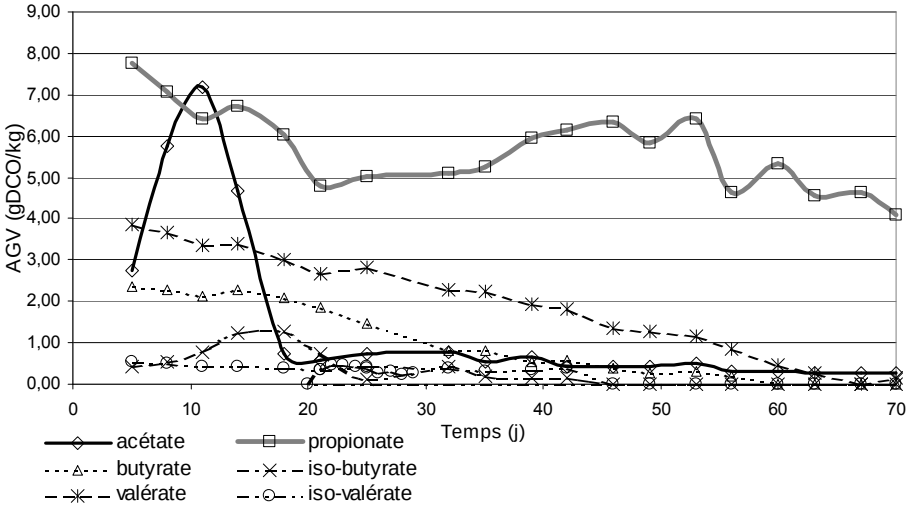


Figure 42. Concentration des différents AGV (en équivalents DCO) pendant le démarrage et le fonctionnement en semi-continu du réacteur de laboratoire

4.4 Ammoniac

Pendant l'expérience en semi-continu, l'azote ammoniacal est resté aussi constant et à un niveau similaire que pendant les expériences en régime discontinu (Figure 43). Ici encore, ce niveau ne correspond pas à une concentration reconnue comme potentiellement inhibitrice de la digestion.

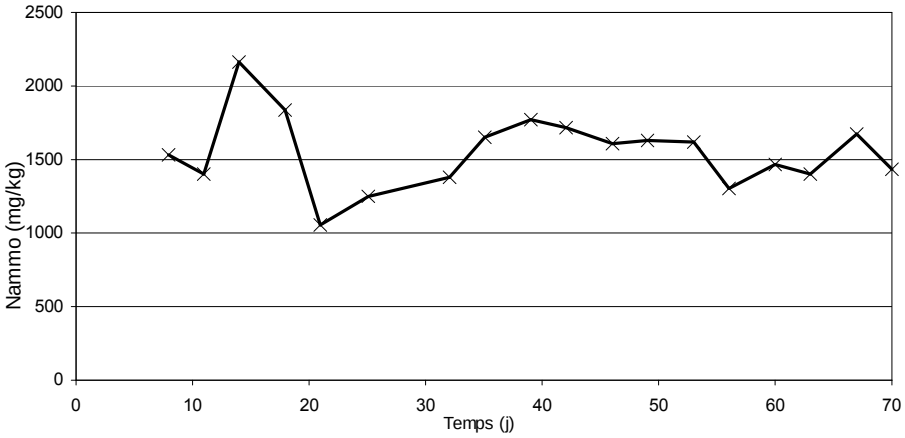


Figure 43. Concentration en azote ammoniacal total pendant le démarrage et le fonctionnement en semi-continu du réacteur de laboratoire

4.5 Synthèse

Le fonctionnement en semi-continu du nouveau réacteur de laboratoire a été analysé et comparé à des données de fonctionnement en semi-continu d'un réacteur industriel. Les résultats montrent que **le nouveau réacteur reproduit fidèlement les conditions et le comportement en semi-continu du réacteur industriel**. Pour un déchet donné, les **cinétiques de production de biogaz et de méthane** sont semblables et **les rendements de production de méthane sont identiques** entre les deux réacteurs. L'analyse de l'accumulation

des AGV ne permet d'identifier aucune différence dans le fonctionnement des deux réacteurs. Les niveaux d'ammoniac ont été stables, à des valeurs proches, dans toutes les expériences. Il n'y a donc pas eu de différence de niveau d'inhibition observable entre les deux réacteurs.

Un démarrage rapide du réacteur en une dizaine de jours est possible. Il en résulte une accumulation passagère d'acétate qui se résorbe une fois le démarrage terminé, dès que les micro-organismes ont pu s'adapter aux conditions et au déchet.

Le propionate, que nous avions identifié lors des essais en discontinu comme le dernier AGV à être dégradé, est également la seule forme résiduelle d'AGV en mode semi-continu stabilisé. Le niveau final en réacteur de laboratoire reste relativement élevé, ce qui indique qu'une partie de la matière organique n'est pas convertie en méthane. Nous notons également que pour un même temps de réaction (40 jours), le niveau résiduel d'acides gras volatils est plus élevé en semi-continu (près de 5 g DCO/kg, principalement du propionate) qu'en discontinu (valeur quasi nulle). D'un point de vue purement formel, cela pourrait signifier que le mode de fonctionnement continu mélangé est moins efficace que le mode piston (en prenant l'hypothèse que le fonctionnement discontinu est la transposition temporelle du mode piston).

5 Comparaison mésophile / thermophile

5.1 Biogaz et méthane

La Figure 44 présente le suivi du biogaz, du méthane et de la vitesse spécifique de production de méthane dans des essais en mode discontinu sur le réacteur de laboratoire en conditions mésophiles (37°C) et thermophiles (55°C). Les cinétiques sont très différentes entre les deux températures. Comme nous pouvions nous y attendre, la digestion thermophile est plus rapide que la digestion mésophile. La digestion est terminée en moins de 15 jours en conditions thermophiles contre presque 30 jours en conditions mésophiles. La vitesse spécifique maximale atteinte est plus de deux fois supérieure dans les conditions thermophiles : environ 8 Nm^3/j/tMV inoculum contre environ 3,5 en mésophile. Cependant, le rendement final en méthane reste le même : environ 200 Nm^3/tMV. **La température a donc un effet sur la cinétique de dégradation mais pas sur la biodégradabilité.**

La production de méthane en deux phases, observée auparavant, est beaucoup plus marquée lors de la digestion thermophile que lors de la digestion mésophile. Notamment, le premier pic de production de méthane, à partir de matière organique facilement dégradable, est beaucoup plus visible. Il semblerait donc qu'**une température plus élevée, d'une part, favorise la solubilisation de la fraction facilement dégradable, d'autre part, augmente sa vitesse de dégradation**.

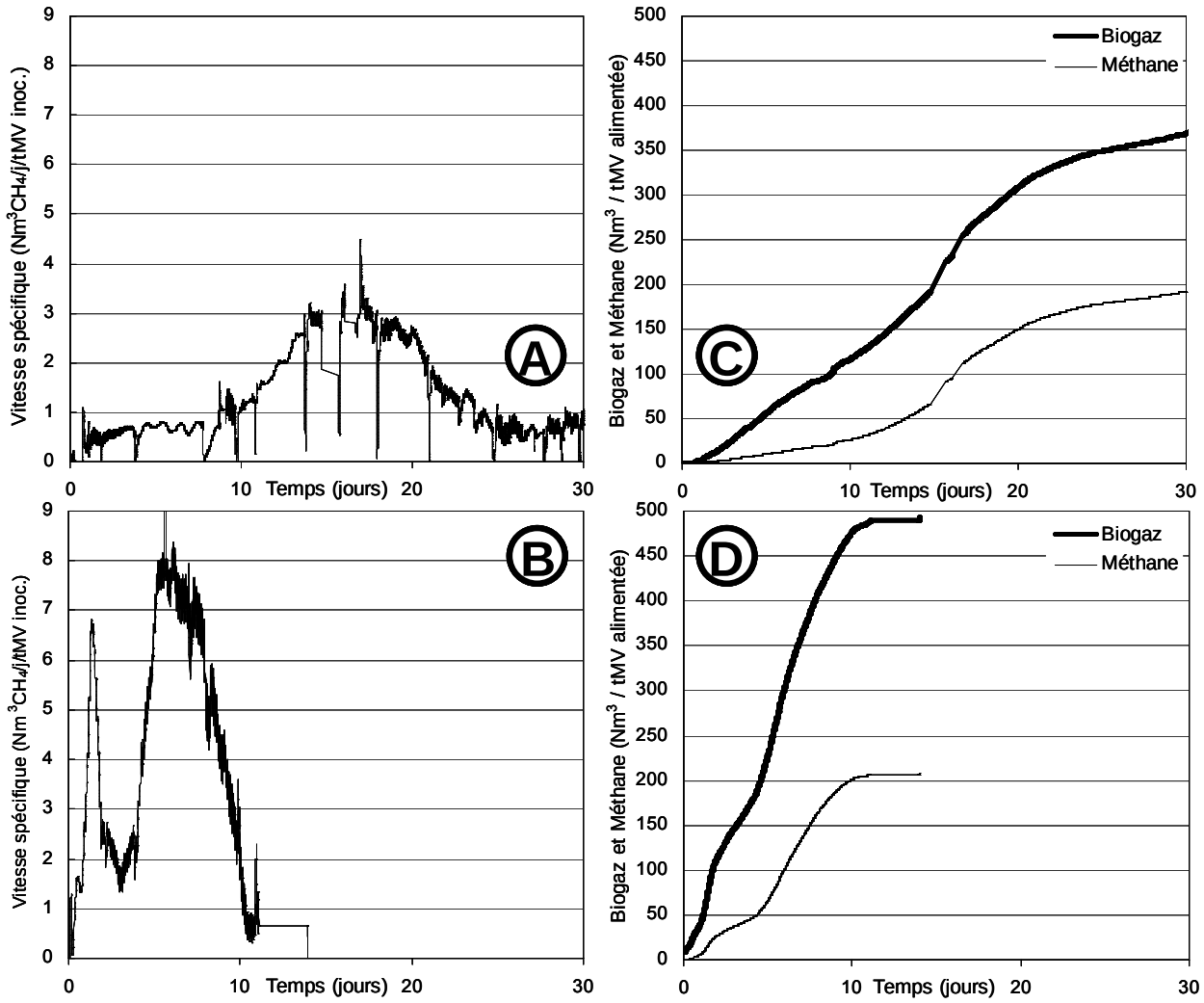


Figure 44. Suivi du gaz dans le réacteur de laboratoire en conditions mésophiles et thermophiles dans des batchs de démarrage. A : vitesse spécifique de production de méthane en conditions mésophiles ; B : vitesse spécifique de production de méthane en conditions thermophiles ; C : productions cumulées de biogaz et de méthane en conditions mésophiles ; D : productions cumulées de biogaz et de méthane en conditions thermophiles.

5.2 AGV

L'observation des concentrations en AGV dans les essais thermophile et mésophile (Figure 45) confirme l'hypothèse précédente. En régime thermophile, nous observons une production d'AGV plus rapide que dans le batch mésophile ; le pic est atteint en moins de 5 jours. Cela correspond à une hydrolyse rapide de la fraction biodégradable. Les AGV s'accumulent jusqu'à un niveau plus élevé dans le batch thermophile (16 gDCO/kg). Cela indique que la température plus élevée accélère de façon plus importante l'hydrolyse/acidogenèse que la méthanogenèse. Toutefois, les niveaux d'AGV ne semblent pas causer de problème d'inhibition car le pic est très rapidement résorbé.

Comme pour les essais mésophiles (Figure 36), le pic d'AGV en thermophile est essentiellement dû à l'acétate (Figure 46). Un pic secondaire de propionate, plus étalé, est également observé. Les autres AGV sont dans des concentrations négligeables. La température ne semble donc pas avoir d'effet sur la nature des AGV qui s'accumulent. Ici encore, c'est le propionate qui est le dernier composé à être dégradé.

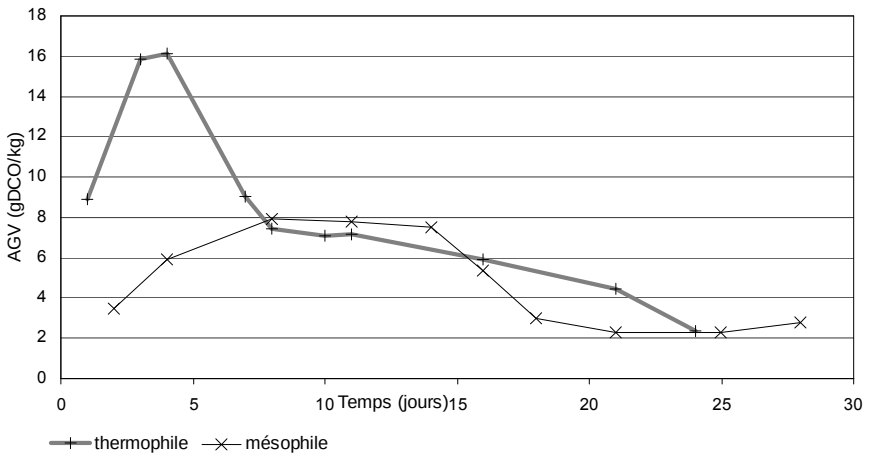


Figure 45. Concentration en AGV totaux (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions mésophiles et thermophiles.

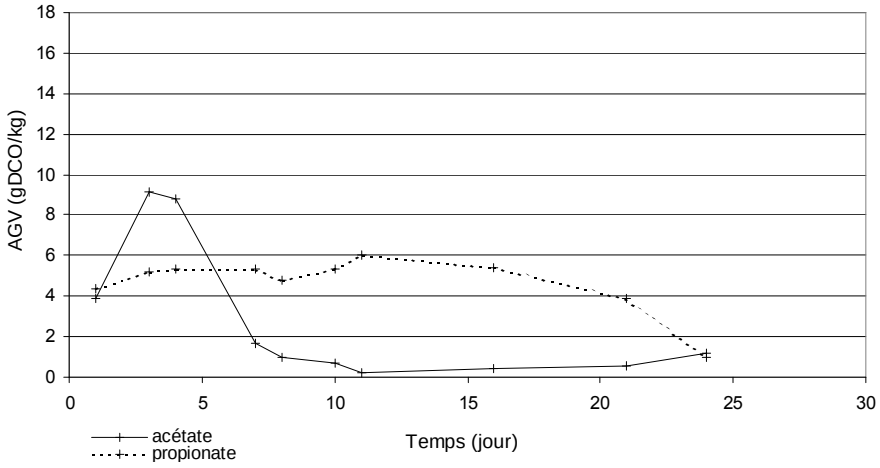


Figure 46. Concentration des différents AGV (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions thermophiles.

6 Essais de co-digestion

6.1 Caractéristiques des déchets utilisés

Des essais de co-digestion ont été menés dans le réacteur de laboratoire en conditions mésophiles (37°C). Les deux déchets co-digérés étaient :

- Des ordures ménagères résiduelles provenant du même gisement que pour les expériences décrites ci-dessus ;
- Du steak haché surgelé décongelé, censé imiter un déchet carné d'abattoir.

Tableau 26. Composition biochimique des co-déchets utilisés

Déchet		Steak haché	OM résiduelles
MS (g/g)		34 %	58,8 %
MV/MS (g/gMS)		97,1 %	61,7 %
Protéines (g/gMV)		0,539	0,088
Lipides (g/gMV)		0,441	0,062
Glucides (g/gMV)		0,0	0,345
Van Soest	NDF (g/gMV)	41,1 %	26,3 %
	ADF (g/gMV)	51,7 %	23,4 %
	SAS (g/gMV)	0,8 %	36,1 %
	IVS (g/gMV)	6,4 %	14,2 %
DCO (gO_2/gMV)		1,543	1,669
BMP (mℓCH_4/gMV)		533	187
Biodégradabilité		100 %	32 %

Les caractéristiques biochimiques des deux co-déchets sont données dans le Tableau 26. Le déchet carné est essentiellement composé de lipides (44 % de la MV) et de protéines (54 % de la MV) et aucun glucide, ce qui est normal pour de la viande. Il est composé essentiellement des fractions les plus solubles de la matière organique (NDF et ADF). Cette composition élevée en matière très biodégradable (lipides, protéines, fractions solubles) résulte en une biodégradabilité mesurée de 100 %.

Une première expérience de co-digestion a été réalisée dans le réacteur avec une charge organique de 0,3 kg de MV apportée par les déchets / kg de MV de l'inoculum. 15 % de la MV des déchets alimentés étaient apportés par le déchet carné.

Une deuxième expérience de co-digestion a été réalisée dans le réacteur avec une charge organique de 1,0 kg de MV apportée par les déchets / kg de MV de l'inoculum dans le but de simuler une surcharge. Toute la matière organique supplémentaire par rapport à l'expérience précédente était apportée sous forme de déchet carné. Il s'agissait donc d'une surcharge en déchet carné. 75 % de la MV des déchets alimentés étaient apportés par le déchet carné.

6.2 Biogaz et méthane

La Figure 47 présente le suivi du biogaz, du méthane et de la vitesse spécifique de production de méthane lors des expériences en mode discontinu mésophile de co-digestion d'OMR et de déchets carnés, avec ou sans surcharge en déchet carné. En comparant ces résultats à ceux obtenus sur des OMR seules (Figure 47 A & C), il apparaît que la cinétique

est différente. En présence de déchets carnés, nous pouvons observer une augmentation importante de la vitesse spécifique de production de méthane dès le premier jour de la digestion. Ensuite, la vitesse continue d'augmenter et atteint des valeurs importantes aux alentours du 10ème jour, c'est à dire avant le pic observé au 15ème jour sur des OMR seules. Enfin, la production de méthane autour du 15ème jour a également lieu lors de la co-digestion comme avec les OMR seules.

De plus, alors qu'en conditions de co-digestion modérées (15% de la MV constituée de viande) la production de biogaz s'arrête rapidement après 20 jours, en conditions de surcharge en déchet carné, la vitesse spécifique de production de méthane continue d'augmenter jusqu'au 25ème jour, puis semble diminuer mais augmente à nouveau jusqu'à atteindre son maximum au 34ème jour. Cela montre que, bien que la matière organique ajoutée sous forme de viande soit facilement biodégradable, le procédé semble limité en surcharge organique par le nombre de micro-organismes et a donc besoin de plus de temps pour absorber toute la matière organique. Il finit toutefois par y parvenir et aucun signe d'inhibition n'est à signaler.

Les rendements finaux en méthane sont plus élevés lorsque le déchet alimenté contient plus de viande car il s'agit d'un déchet hautement biodégradable et il augmente donc la biodégradabilité totale des déchets alimentés.

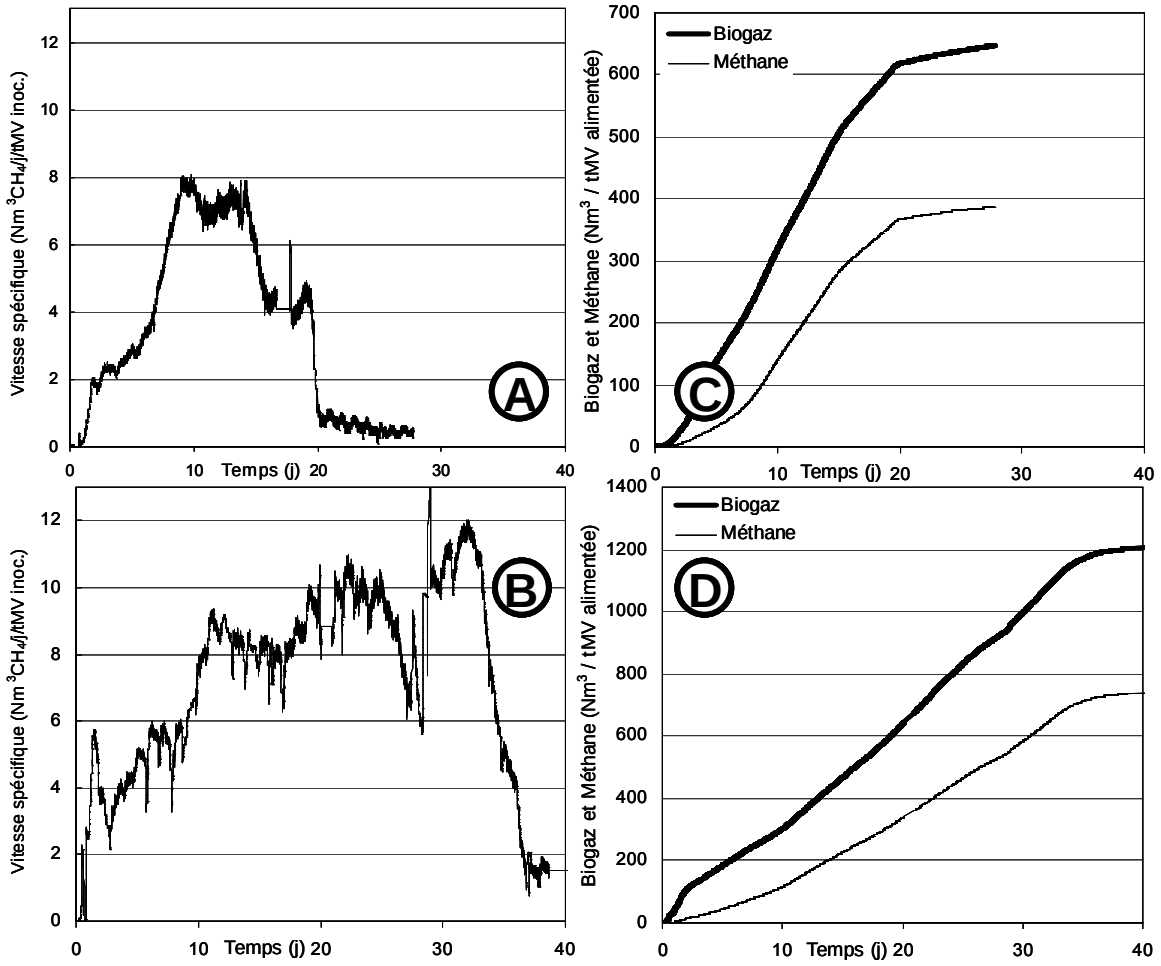


Figure 47. Suivi du gaz dans le réacteur de laboratoire en batchs en conditions de co-digestion d'OMR et de déchets carnés. A : vitesse spécifique de production de méthane en co-digestion normale ; B : vitesse spécifique de production de méthane en co-digestion avec surcharge en déchet carné ; C : productions cumulées de biogaz et de méthane en co-digestion normale ; D : productions cumulées de biogaz et de méthane en co-digestion avec surcharge en déchet carné.

6.3 AGV

Lors de la surcharge en déchet carné, nous observons une production très importante d'AGV dès le début de la réaction : jusqu'à 30 g DCO/kg de milieu réactionnel (Figure 48). Ces AGV ne semblent pas générer d'inhibition, ni de ralentissement de la réaction (nous avons vu que les vitesses spécifiques de production de méthane sont du même ordre, voire supérieures qu'avec des OMR seules). Ils sont dégradés totalement mais cela prend 50 jours contre les 25 jours nécessaires pour la co-digestion sans surcharge. Cela est dû à la quantité importante de matière organique facilement hydrolysable. Nous remarquons aussi qu'il semble y avoir une deuxième phase de production d'AGV peu avant le 30ème jour. Pour la co-digestion sans surcharge, le pic d'AGV n'est pas plus élevé que celui observé lors de la digestion mésophile OMR seules (Figure 45) : environ 7 g d'équivalent DCO/kg de milieu réactionnel.

En ce qui concerne le détail des AGV (Figure 49), dans le cas d'une co-digestion avec un produit carné sans surcharge les profils de production sont similaires à ceux de la digestion d'OMR seules : un pic principal composé essentiellement d'acétate est suivi de près par un pic de propionate moins élevé et plus étalé dans le temps. La seule différence notable est la présence d'un peu d'*iso*-butyrate en début de digestion.

En revanche, lors de la co-digestion en surcharge de déchet carné, il y a une production importante, dès le départ, de tous les AGV sauf l'*iso*-valérate. Les deux AGV principaux sont l'acétate comme d'habitude et l'*iso*-butyrate. La présence de fortes concentrations d'*iso*-butyrate peut paraître surprenante car cette forme est habituellement minoritaire par rapport à la forme non ramifiée. Cependant, il a été montré que la forme ramifiée (*iso*-) prévaut sur la forme non ramifiée en conditions de stress (Nozhevnikova *et al.*, 2000). De plus, l'*iso*-butyrate est formé à partir de la valine (Allison, 1978) qui est un acide aminé, et qui est donc retrouvé dans les protéines qui ont été apportées abondamment ici par la viande.

L'*iso*-butyrate est l'AGV qui est consommé en premier, probablement transformé en *n*-butyrate (Matthies et Schink, 1992), puis le *n*-butyrate disparaît peu de temps après. Ensuite le valérate et l'acétate sont dégradés en même temps. Enfin, ce n'est que lorsque l'acétate a complètement disparu, que la dégradation du propionate débute. Cela dit, elle se fait très rapidement.

Notons enfin, que dans tous les cas que nous avons observés, la dégradation du propionate ne se faisait que lorsque l'acétate avait été presque totalement consommé. Cela est très marqué dans le cas de la surcharge en déchet carné et est en accord avec les observations de la bibliographie (*cf.* I. 3.4).

En résumé, ces essais de co-digestion en présence de déchets carnés (simulant des déchets d'abattoirs) indiquent que c'est surtout l'accumulation transitoire d'acides organiques qui peut constituer un obstacle à la dégradation : ce type de déchets est en effet très rapidement hydrolysé et les concentrations en AGV obtenues en mode discontinu atteignent des valeurs élevées (près de 30 g DCO/kg de milieu). En revanche, dans les conditions utilisées, nous n'avons pas mis en évidence de phénomènes d'inhibition, ni par les acides gras volatils, ni par l'ammoniac apporté par les déchets carnés. Il est clair cependant qu'en fonctionnement continu, les niveaux d'ammoniac obtenus seront bien plus élevés que ceux que nous avons dans un seul essai en discontinu.

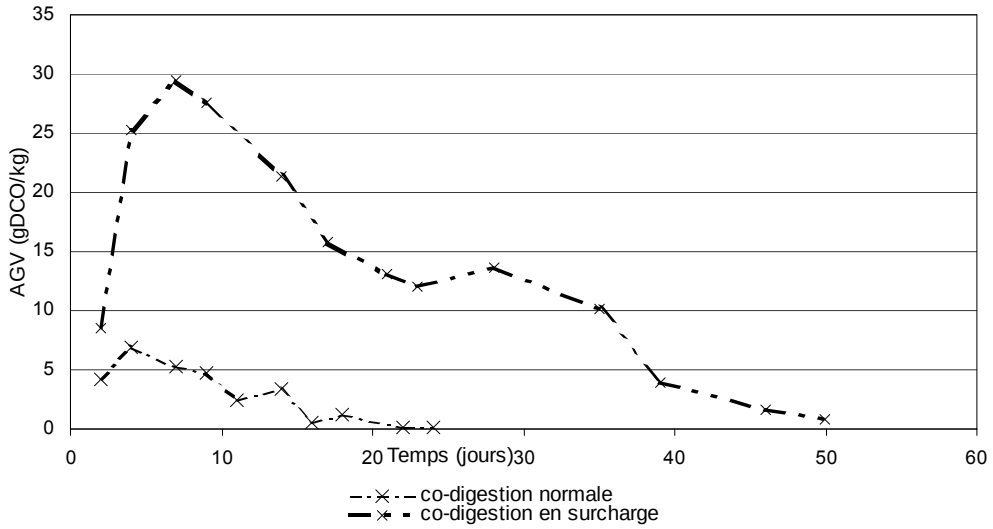


Figure 48. Concentration en AGV totaux (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions de co-digestion avec un déchet carné et de co-digestion avec une surcharge en déchet carné.

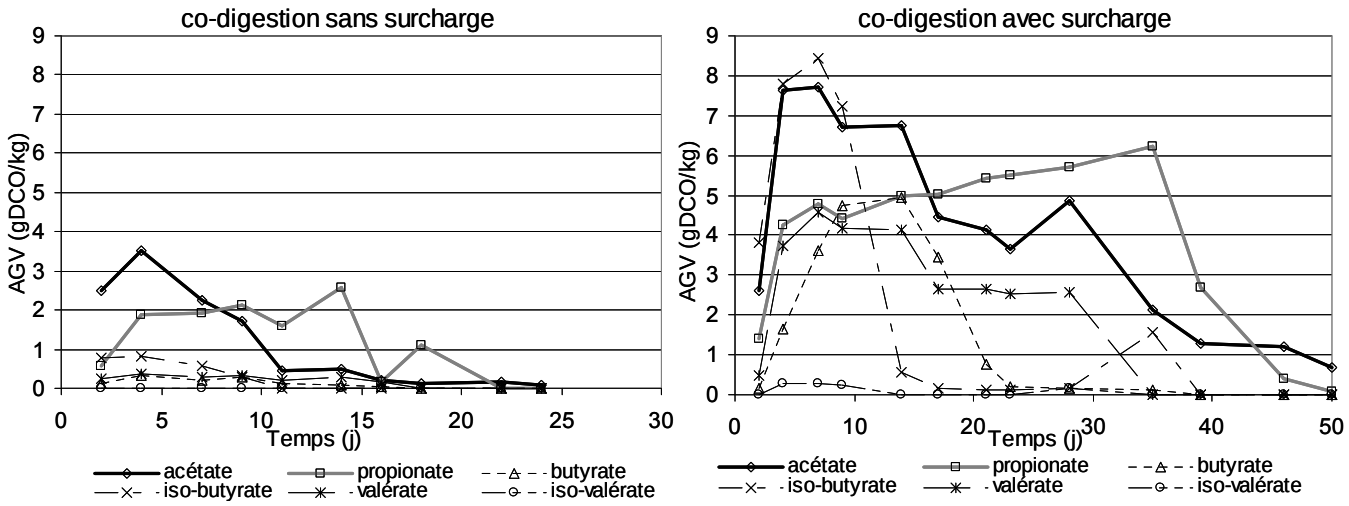


Figure 49. Concentration des différents AGV (en équivalents DCO) pendant le fonctionnement en batch du réacteur de laboratoire en conditions de co-digestion avec un déchet carné et de co-digestion avec une surcharge en déchet carné.

7 Synthèse

Un nouveau réacteur de laboratoire a été développé, doté d'un système d'agitation qui permet d'effectuer des prélèvements représentatifs du contenu du réacteur. Dans le même temps, l'agitation est suffisamment délicate pour ne pas perturber les équilibres physico-chimiques par rapport au fonctionnement habituel des réacteurs industriels.

Certains défauts sur ce réacteur sont toutefois à signaler. Notamment, nous n'avons pas été en mesure de mettre au point un système de prélèvement et de soutirage qui permette de soutirer des quantités importantes, représentatives et homogènes d'échantillon tout en garantissant une parfaite étanchéité au gaz. Un choix s'imposait donc entre la qualité du prélèvement/soutirage et le risque d'une entrée d'air importante dans le réacteur. La mise au point d'un système de soutirage adéquat constitue la principale voie d'amélioration de ce prototype. La difficulté réside dans le fait que le digestat à sous-tirer est difficilement

pompable, il est hétérogène et n'est ni totalement liquide, ni totalement solide. De plus, compte tenu des faibles dimensions du réacteur, toute création de volume mort est à proscrire.

Les données expérimentales de production de biogaz et de méthane ainsi que de concentrations en AGV et en ammoniac sont très comparables entre ce réacteur de laboratoire et un réacteur de taille industrielle, pour un déchet donné en fonctionnement en batch ou en semi-continu. **Le nouveau réacteur de laboratoire mime donc très bien les conditions et le comportement d'un réacteur industriel.** Il permet donc de reproduire les conditions réelles à échelle réduite et est donc plus facile à utiliser.

Au cours de cette comparaison, nous avons également observé que **l'hydrolyse n'était pas la seule étape limitante de la méthanisation de déchets solides**. Cela donne lieu, dans notre cas, à une **accumulation transitoire d'AGV**, essentiellement de l'acétate puis du propionate. **Le propionate ne se dégrade qu'une fois l'acétate presque complètement consommé**. Dans des expériences de type BMP, le suivi des AGV n'aurait pas pu être réalisé car ces réacteurs sont trop petits pour pouvoir réaliser des prélèvements réguliers. D'autres, de plus grande taille, ne peuvent fonctionner qu'en conditions de digestion humide. Ces expériences n'auraient pas pu être réalisées sur un autre réacteur que celui que nous avons utilisé. Les tests BMP, dont le but est de créer des conditions idéales, ont des rendements supérieurs à ceux obtenus dans le réacteur industriel et dans le nouveau réacteur de laboratoire. **Un broyage plus fin du déchet aboutit à un rendement en méthane plus élevé**. Il n'est donc pas judicieux de réaliser des études en laboratoire sur des déchets broyés beaucoup plus finement qu'en pratique en conditions industrielles. Or, nombre de réacteurs employés au laboratoire nécessitent un broyage fin des déchets pour pouvoir fonctionner, compte tenu de leur système d'agitation. **Le nouveau réacteur de laboratoire permet de pallier ce problème**.

Nous avons également observé que **la production de méthane se fait en deux phases au moins**, **correspondant très probablement à deux compartiments dans la matière organique : l'un facilement dégradable et l'autre difficilement dégradable. Le compartiment difficilement dégradable semble devoir sa résistance en partie à sa structure physique** car le broyage le rend plus dégradable. Les deux phases de production de biogaz sont plus marquées dans le réacteur industriel et lorsque les micro-organismes sont adaptés aux conditions et au déchet.

Une adaptation des micro-organismes aux conditions et au déchet permet un démarrage plus prompt de la méthanisation ainsi qu'une cinétique plus rapide. Le rendement final en méthane demeure cependant inchangé. Dans les tests BMP, lorsqu'on utilise un inoculum non adapté spécifiquement au déchet à traiter, nous observons une cinétique qui reflète ce manque d'adaptation. Si nous souhaitons tirer des informations sur les cinétiques des tests BMP, alors il faudra réaliser trois ajouts de déchet en série. Cela n'est pas très pratique avec un déchet réel dans un réacteur de BMP. **Il s'agit donc d'un intérêt supplémentaire du nouveau réacteur de laboratoire**.

Ce réacteur nous a permis de comparer les conditions mésophiles et thermophiles pour la digestion sèche d'OMR. Le réacteur s'est révélé très pratique d'emploi pour cette étude. Nous avons observé que **la température thermophile accélère la cinétique de la méthanisation mais aboutit au même rendement final en méthane**. En conditions thermophiles la production de méthane en deux phases est beaucoup plus marquée. Il semblerait donc qu'**une température plus élevée, d'une part, favorise la solubilisation de la fraction facilement biodégradable et, d'autre part, augmente sa vitesse de dégradation**. **Dans la méthanisation thermophile, plus d'AGV sont produits plus rapidement lors de leur accumulation transitoire en début de fermentation**. Cependant,

leur dégradation est également plus rapide et ils ne semblent pas poser de problèmes d'inhibition. La répartition entre acétate et propionate des AGV s'accumulant reste toutefois la même entre les conditions mésophile et thermophile. Dans les deux cas, c'est le propionate qui est le dernier composé dégradé.

Nous avons également étudié le comportement de ce réacteur en co-digestion de déchets carnés avec des OMR. Il a été observé que **les produits carnés, composés de lipides et de protéines, sont très facilement biodégradables et augmentent donc le rendement en méthane du mélange de déchets**. Ils sont également rapidement hydrolysables. Dans des conditions de charge organique totale normales, où 15 % de la charge sont apportés par le déchet carné, l'accumulation d'AGV est semblable à celle de la digestion OMR seules. En revanche, **en conditions de surcharge organique, où la charge supplémentaire est apportée sous forme de déchet carné, il y a une très forte accumulation de tous les AGV de l'acétate au valérate**. Cette accumulation est durable, ce qui signifie que leur dégradation est compensée par une production constante, sans doute liée aux processus plus lents de dégradation des graisses en AGV.

Toutefois, ces AGV ne causent pas de blocage de la méthanisation mais le temps nécessaire pour les consommer est double par rapport à une charge normale. En fonctionnement en semi-continu, cela aurait put provoquer de graves problèmes d'accumulation jusqu'à une inhibition de la méthanisation. Cela montre l'**intérêt de caractériser les déchets entrants d'une part, et de suivre la concentration en différents AGV pendant la méthanisation d'autre part. Ainsi, des problèmes de surcharge en certains déchets spécifiques pourraient être évités ou détectés.**

8 Conclusion

Nous avons développé un nouveau réacteur de laboratoire afin d'étudier la digestion sèche en conditions proches des conditions industrielles réelles, ce qui n'est pas réalisable dans les réacteurs de laboratoire classiques ou par des tests BMP. Ce réacteur reproduit fidèlement les conditions et le comportement des réacteurs industriels. Il est donc un outil adapté pour l'étude de la méthanisation par voie sèche au laboratoire.

Le réacteur a montré son utilité et son efficacité au cours d'études sur l'influence des conditions thermophiles et mésophiles et sur l'influence de la co-digestion avec des déchets carnés. Ces études ont permis de vérifier ou de découvrir que :

- La digestion par voie sèche semble se dérouler en deux phases correspondant à deux compartiments dans la matière organique : facilement et difficilement biodégradable. L'existence de ces deux compartiments est étudiée dans le chapitre II et leur rôle dans l'hydrolyse sera étudiée au chapitre VI. L'influence du broyage et de la température sur ces phénomènes ont été mis en évidence lors des essais sur le réacteur.
- L'hydrolyse n'est pas la seule étape limitante dans la digestion sèche. Des mécanismes de production et de consommation d'AGV mènent à une accumulation transitoire. En fonctionnement normal, seuls l'acétate et le propionate s'accumulent et le propionate est difficilement dégradé en présence d'acétate. Ces observations montrent l'intérêt de suivre la concentration en différents AGV lors de la méthanisation et cela sera appliqué lors de l'étude des phénomènes d'inhibition par l'ammoniac.

- L'intérêt de caractériser la composition des déchets utilisés peut permettre d'éviter des problèmes comme, par exemple, une surcharge en matière organique facilement biodégradable.

Dans la suite de notre travail, ce réacteur de laboratoire servira de source pour l'échantillonnage de digestat réel tout au long d'une opération de méthanisation. Ces échantillons permettront, d'une part, d'évaluer la faisabilité de dosages de l'activité enzymatique hydrolytique dans des conditions réelles, d'autre part, de suivre ces activités pendant une fermentation en mode discontinu afin de mieux connaître la dynamique de production d'activité hydrolytique au cours de la méthanisation.

Le réacteur servira enfin à étudier l'influence d'ajouts d'ammoniac dans une opération de méthanisation semi-continue en conditions réelles de voie sèche. Cela n'aurait pas été possible dans un réacteur de laboratoire classique qui ne reproduit pas les conditions réelles, et n'aurait pas été réalisable dans un réacteur industriel car cela aurait demandé des quantités d'ammoniac à ajouter trop importantes. De plus, aller jusqu'à l'inhibition totale d'un réacteur industriel n'est pas souhaitable car cela générerait des quantités conséquentes de digestat à éliminer.

CHAPITRE V. INHIBITION PAR L'AZOTE AMMONIACAL

Rien ne peut être aussi bénéfique à la santé humaine et augmenter les chances de survie de la vie sur terre que d'opter pour une diète végétarienne.

[Albert Einstein]

V. INHIBITION PAR L'AZOTE AMMONIACAL

1 Introduction

1.1 Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu (*cf.* I. 3.6.3), un des principaux problèmes rencontrés dans la méthanisation des déchets solides est l'inhibition par l'ammoniac. Paradoxalement, peu de données sont disponibles sur ce phénomène, surtout dans le cas de la digestion sèche et dans les conditions réelles. L'étude bibliographique montre d'importantes dissensions sur les mécanismes mis en jeu, ainsi qu'une forte variabilité des concentrations d'ammoniac identifiées comme causant une inhibition partielle ou totale. De plus, les observations faites en laboratoire sont éloignées de celles faites par les opérateurs d'unités industrielles de méthanisation.

Nous avons donc entrepris, dans cette étude, un début de recherche sur les particularités éventuelles de la voie sèche vis-à-vis de l'inhibition par l'ammoniac. Pour cela, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations en ammoniac sur l'activité méthanogène à différentes concentrations de matière sèche (MS) allant de la voie humide à la voie sèche. La teneur en eau (et plus précisément la teneur en MS) est donc un des paramètres de notre étude.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inhibition par l'ammoniac est étroitement liée au pH. En effet, d'une part, une inhibition plus forte de la méthanogenèse par rapport à l'acidogenèse/acétogenèse peut provoquer une accumulation d'AGV qui entraînera une chute du pH, d'autre part, un pH plus élevé favorise la prépondérance de la forme libre de l'ammoniac (NH_3) qui est plus inhibitrice que l'ion ammonium (NH_4^+). La variation du pH peut expliquer en partie la grande diversité de concentrations en ammoniac inhibitrices (exprimées en azote ammoniacal total, N_{ammo}). Pour ces raisons, nous avons étudié l'effet du pH conjointement à ceux des concentrations en ammoniac et en MS.

Une hausse de température déplace également l'équilibre chimique en faveur de la forme libre de l'ammoniac. De plus, des opérateurs d'unités industrielles ont observé empiriquement que l'inhibition par l'ammoniac pouvait être jugulée par l'abaissement de la température de 55°C à 45°C. Pour ces raisons, nous avons étudié l'effet de variations modérées de température conjointement à ceux des concentrations en ammoniac et en MS, ainsi que du pH.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une batterie de tests classiques de laboratoire afin de déterminer des surfaces de réponse de l'activité méthanogène vis à vis de ces quatre facteurs. Dans un second temps, nous avons réalisé une expérience dans le nouveau réacteur de laboratoire afin de confronter les résultats obtenus en fiole à des résultats dans des conditions réelles de méthanisation.

1.2 Organisation de l'étude

1.2.1 Tests réalisés

Des expériences de deux types ont été réalisées. Les premières sont des mesures d'activité méthanogène (*cf.* II. 2.2) en fonction des concentrations en ammoniac et en MS, du pH et de la température. D'après la bibliographie, l'ammoniac a un effet prépondérant sur l'acétogenèse et/ou la méthanogenèse mais pas sur l'hydrolyse. Nous avons donc utilisé le glucose comme substrat. Un plan d'expérience a permis à la fois de diminuer le nombre de

mesures à réaliser et de pouvoir calculer des surfaces de réponse[7]. La matière sèche a été apportée en même temps que l'inoculum par du digestat réel d'OMR afin de se trouver dans des conditions plus réalistes. Ce digestat provenait d'une fin prolongée de fermentation discontinue et ne contenait donc plus de matière organique biodégradable sur l'échelle de temps de l'expérience.

La seconde expérience a été menée sur le réacteur de laboratoire en fonctionnement semi-continu en conditions thermophiles. Après 3 temps de séjour d'alimentation normale (*cf.* IV.4.1), la concentration en ammoniac a été augmentée progressivement dans le réacteur, tandis que les alimentations en OMR étaient maintenues au niveau normal. L'augmentation de la concentration en ammoniac était suffisamment rapide pour qu'il n'y ait pas d'effet d'adaptation des micro-organismes. Cette expérience permet de déterminer l'effet de l'ammoniac dans des conditions réelles de méthanisation industrielle. Les principales différences avec l'expérience en fioles sont que le milieu réactionnel n'est pas tamponné et que le substrat est constitué d'OMR réelles et non de glucose. Cette expérience permettra en plus d'effectuer un suivi du contenu du réacteur pour y doser les AGV, l'ammoniac et le pH.

La détermination des surfaces de réponse à partir de l'expérience en fiole permet de calculer une activité méthanogène attendue pour des conditions de température, pH, MS et N_{ammo} données, à condition qu'elles se trouvent entre les bornes du domaine étudié. Nous pourrons donc comparer les valeurs prédites à celles réellement observées dans le réacteur.

1.2.2 Plan d'expérience et modèle mathématique

Nous désirons étudier l'influence de 4 facteurs indépendants sur l'activité méthanogène. Il nous faut réaliser des expériences avec plus de 2 niveaux pour ces facteurs car la réponse à ces facteurs n'est pas forcément linéaire. Si nous voulions tester 3 niveaux pour chaque facteur, cela ferait $3^4 = 81$ essais à réaliser. Compte tenu des contraintes techniques, nous ne pouvons réaliser que 8 essais à la fois. Chaque série d'essais prend au moins 15 jours ce qui fait un total de plus de 150 jours pour réaliser la totalité des essais. D'un côté, ce temps est long mais d'un autre côté, se limiter à 3 niveaux est insatisfaisant pour certains des paramètres (concentration en ammoniac et pH). C'est pourquoi nous avons fait appel à un plan d'expérience.

L'objectif des plans d'expériences est de choisir au mieux les expériences à réaliser pour découvrir les règles d'évolution d'une grandeur d'intérêt en fonction de variables opératoires. Ces règles se traduisent le plus souvent par une formule mathématique ou par des consignes d'utilisation. Les formules trouvées sont essentiellement pratiques, c'est-à-dire qu'elles donnent une représentation mathématique approchée du phénomène dans une région limitée de l'espace expérimental (Goupy, 1990).

Cette fonction algébrique peut être représentée dans un espace géométrique. Nous choisirons un repère cartésien ; nous attribuerons le premier axe à une variable x_1, le second axe à x_2 et le $n^{ème}$ axe à x_n. L'espace ainsi défini est appelé l'espace expérimental. Pour réaliser une expérience, il faut fixer chacune des variables à une valeur précise. L'expérience est alors représentée par un point dans l'espace expérimental. Il existe différents plans d'expérience caractérisés par différentes formes de répartition des points expérimentaux dans l'espace expérimental.

[7] La méthode de surface de réponse consiste à construire une expression approchée de la fonction de réponse à partir d'un nombre limité d'évaluations de la "vraie" fonction en fonction de facteurs multiples.

Doehlert a proposé une répartition uniforme des points expérimentaux dans l'espace expérimental (Doehlert, 1970). Nous en donnons une illustration pour 1, 2 et 3 facteurs (Figure 50). Pour 4 facteurs, la représentation visuelle n'est pas possible. Tous les points sont à la même distance du centre du domaine expérimental. Pour deux variables, le plan de Doehlert consiste en un point central et six points formant un hexagone régulier disposé sur le cercle trigonométrique (Araujo et Brereton, 1996). Nous observons que le nombre de niveaux n'est pas le même pour toutes les variables. Dans un plan de Doehlert à deux variables, par exemple, une variable est étudiée à 5 niveaux tandis que l'autre est étudiée à 3 niveaux (Figure 50). Cette propriété permet de choisir quels facteurs assigner à un grand ou un petit nombre de niveaux (Ferreira *et al.*, 2004). La matrice d'expériences est construite en prenant les coordonnées de chaque point. Le Tableau 27 donne les coordonnées centrées réduites de la matrice de Doehlert pour 4 facteurs. Elle correspond à 21 points régulièrement répartis sur l'hypersphère à quatre dimensions de rayon unité.

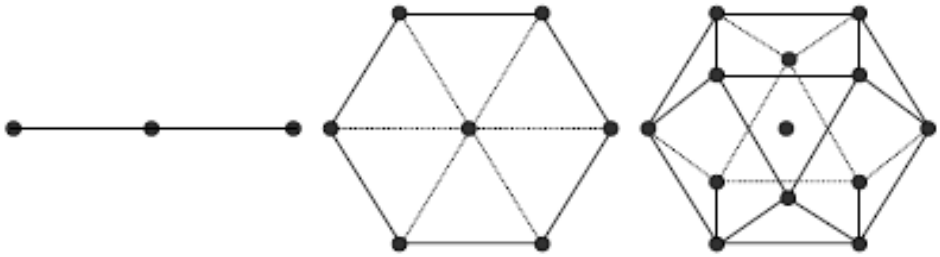


Figure 50. Répartition des points expérimentaux dans l'espace de Doehlert pour 1, 2 et 3 facteurs

Tableau 27. Coordonnées centrées réduites de la matrice de Doehlert pour 4 facteurs

N° de l'essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4
1	0	0	0	0
2	-1	0	0	0
3	1	0	0	0
4	-1/2	-√3/2	0	0
5	+1/2	-√3/2	0	0
6	-1/2	+√3/2	0	0
7	+1/2	+√3/2	0	0
8	-1/2	-1/2√3	-√2/3	0
9	0	+1/√3	-√2/3	0
10	+1/2	-1/2√3	-√2/3	0
11	-1/2	+1/2√3	+√2/3	0
12	0	-1/√3	+√2/3	0
13	+1/2	1/2√3	+√2/3	0
14	-1/2	-1/2√3	-1/√24	-√5/8
15	0	+1/√3	-1√24	-√5/8
16	0	0	√3/8	-√5/8
17	1/2	-1/2√3	-1√24	-√5/8
18	-1/2	1/2√3	1/√24	√5/8
19	0	-1/√3	1√24	√5/8
20	0	0	-√3/8	√5/8
21	1/2	1/2√3	1/√24	√5/8

Les avantages de la matrice de Doehlert sont qu'elle nécessite moins d'expériences, lesquelles sont plus efficaces et peuvent être déplacées dans l'espace expérimental (Ferreira *et al.*, 2003). Des points obtenus dans des études précédentes peuvent être incorporés au modèle. Elle permet de déduire des surfaces de réponse qui donnent plus d'information et de meilleure qualité que les modèles du premier ordre.

Le modèle mathématique utilisé pour interpréter les résultats et construire la surface de réponse est un polynôme du second degré. Le polynôme pour 4 facteurs est présenté ci-dessous. Il prend en compte les effets indépendants des facteurs (x_1, x_2, x_3, x_4), les effets des facteurs au carré (x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2) et les interactions entre les facteurs (x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_3, x_2x_4, x_3x_4). Il peut donc rendre compte de phénomènes non linéaires. Le modèle mathématique est obtenu à partir d'une régression linéaire multiple sur les résultats obtenus.

$$y = k + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_{1.1}x_1^2 + a_{2.2}x_2^2 + a_{3.3}x_3^2 + a_{4.4}x_4^2 + a_{1.2}x_1x_2 + a_{1.3}x_1x_3 + a_{1.4}x_1x_4 + a_{2.3}x_2x_3 + a_{2.4}x_2x_4 + a_{3.4}x_3x_4$$

Le Tableau 28 liste les essais réalisés dans notre expérience. Nous avons testé plus de niveaux pour l'ammoniac car c'est le facteur qui nous intéresse le plus et qui est suspecté d'avoir le plus d'influence. Il en est de même pour le pH. Il est techniquement difficile de tester de nombreux niveaux de température (une seule enceinte thermorégulée à disposition). Nous n'avons donc testé que 3 niveaux de température. Des réplicats ont été réalisés sur certains points, surtout les points centraux, afin de déterminer les qualités statistiques du modèle mathématique. Idéalement, les essais doivent être réalisés dans un ordre aléatoire. Cependant, nous avons dû grouper les essais par température en raison de considérations techniques.

Tableau 28. Matrice des essais réalisés

N° de l'essai	N_{ammo} (mg d'N/kg de milieu)	pH	MS (%)	T (°C)	Nombre de répétitions
1 (point central)	3081	8,20	20,0	55	11
2	3832	8,20	35,0	55	1
3	2270	8,20	5,0	55	1
4	4547	8,20	27,5	55	1
5	2193	8,20	12,5	55	1
6	2425	8,20	27,5	55	1
7	3158	8,20	12,5	55	1
8	3840	9,10	27,5	55	1
9	2514	7,30	12,5	55	1
10	3132	7,30	27,5	55	1
11	3595	7,30	20,0	55	1
12	2836	9,10	12,5	55	1
13	2566	9,10	20,0	55	1
14	3840	8,42	27,5	65	1
15	2514	7,98	12,5	45	3
16	3132	8,42	27,5	45	1
17	3595	7,98	20,0	45	1
18	3081	8,87	20,0	45	1
19	2836	8,42	12,5	65	3
20	2566	8,42	20,0	65	1
21	3081	7,53	20,0	65	1

2 Effet de l'ammoniac sur l'activité méthanogène (tests en fiole)

2.1 Introduction

Les activités méthanogènes ont été déterminées selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, à l'aide d'un lissage dans le logiciel R, dans les conditions décrites par le plan d'expérience ci-dessus. Un exemple de la détermination de la vitesse maximale est donné à la Figure 51. Le substrat organique utilisé est du glucose.

A l'aide du logiciel MODDE, qui a d'abord servi à déterminer la matrice du plan d'expérience, les résultats obtenus ont été analysés. Le modèle mathématique a été calculé et les surfaces de réponse ont été générées. La qualité statistique du modèle a été analysée au préalable. Puis, les effets indépendants ainsi que les interactions des quatre paramètres (température, MS, pH, N_{ammo}) ont été examinés. Les résultats – et les manières de les présenter – apportant le plus d'information sont présentés ici.

Les quatre paramètres de notre étude sont appelés "facteurs". La valeur mesurée, l'activité méthanogène, est appelée "réponse". Elle est exprimée en g de DCO dégradée par jour et par g de MV dans l'inoculum (g DCO/j/g MVinoc).

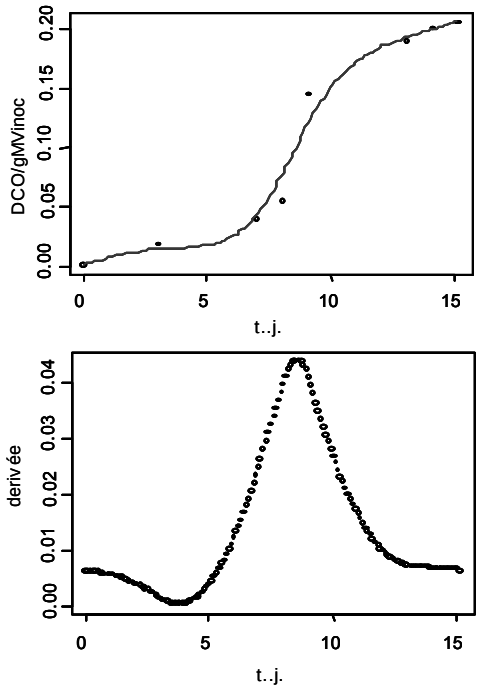


Figure 51. Exemple de courbe de DCO dégradée en fonction du temps (jours) lissée et de détermination de l'activité maximale par calcul de la dérivée en fonction du temps de la DCO dégradée en fonction du temps.

2.2 Qualité statistique du modèle mathématique

Les écarts-types des points réalisés en plusieurs réplicats sont donnés par le Tableau 29.

Tableau 29. Moyennes et écarts-types des points réalisés en plusieurs réplicats

N° de l'essai	Activité méthanogène moyenne (gDCO/j/gMVinoc)	Ecart-type (gDCO/j/gMVinoc)
1 (point central)	0,0066	0,00105
15	0,0103	0,00309
19	0,0048	0,00124

La qualité du modèle statistique peut être décrite par trois valeurs principales : le R^2, le Q^2 et la reproductibilité. Le R^2 exprime la représentativité. C'est le pourcentage de variation de la réponse que le modèle peut expliquer. Le R^2 surestime la justesse du modèle. Le Q^2 exprime la prédictibilité. C'est le pourcentage de la variation de la réponse que le modèle est capable de prédire. Le Q^2 sous-estime la justesse du modèle. La reproductibilité représente la variation de la réponse dans des conditions identiques comparée à la variation totale de la réponse. Elle est calculée sur la répétition des points centraux de la matrice.

Nous pouvons observer que les trois critères de qualité du modèle mathématique sont proches de 1 (Figure 52). Les expériences réalisées sont donc bien reproductibles et le modèle calculé représente bien la réalité, dans les conditions de l'expérience.

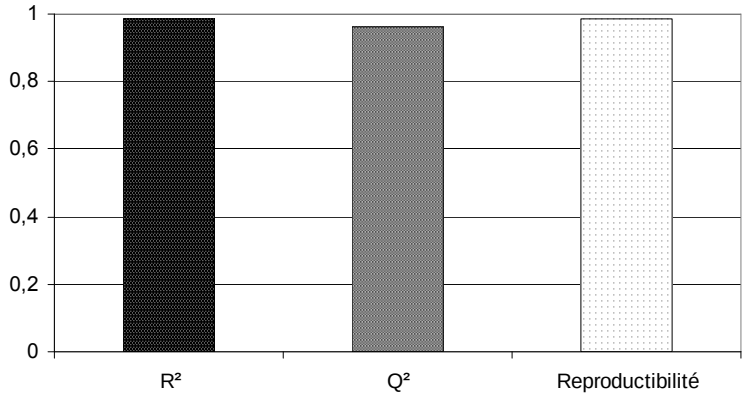


Figure 52. Données statistiques sur la qualité du modèle mathématique

2.3 Effets bruts des paramètres

Le Tableau 30 présente les effets des facteurs et interactions de facteurs. Il s'agit des valeurs que prennent les coefficients a_i dans l'équation du modèle mathématique. Le facteur d'interaction MS×MS a été exclu du modèle car il avait un effet non significatif (intervalle de confiance supérieur à sa valeur).

La Figure 53 présente ces effets graphiquement par ordre d'importance. Nous observons que les trois effets les plus importants sont ceux du pH, de l'interaction de la température et de l'ammoniac, et de l'ammoniac. Ces trois facteurs ont un effet négatif sur l'activité méthanogène, c'est-à-dire un effet inhibiteur. Les deux facteurs qui ont un effet positif important sont l'interaction de l'ammoniac et de la matière sèche et l'interaction du pH et de la matière sèche. Il est difficile d'interpréter les effets de cette manière. Il faut surtout les

considérer comme les facteurs de l'équation et interpréter plus globalement à partir des surfaces de réponse et des courbes que nous pouvons tracer à partir de cette équation.

Tableau 30. Liste des effets des facteurs sur la réponse activité méthanogène

Facteurs	Effet	Intervalle de confiance à 95%
pH	-0,0222	± 0,0025
Nammo*T	-0,0196	± 0,0074
Nammo	-0,0191	± 0,0033
Nammo*MS	0,0150	± 0,0062
pH*MS	0,0140	± 0,0052
MS*T	-0,0139	± 0,0076
T*T	-0,0114	± 0,0028
MS	-0,0101	± 0,0041
T	-0,0063	± 0,0025
pH*T	-0,0062	± 0,0062
Nammo*pH	0,0057	± 0,0039
Nammo*Nammo	0,0045	± 0,0033
pH*pH	0,0041	± 0,0031

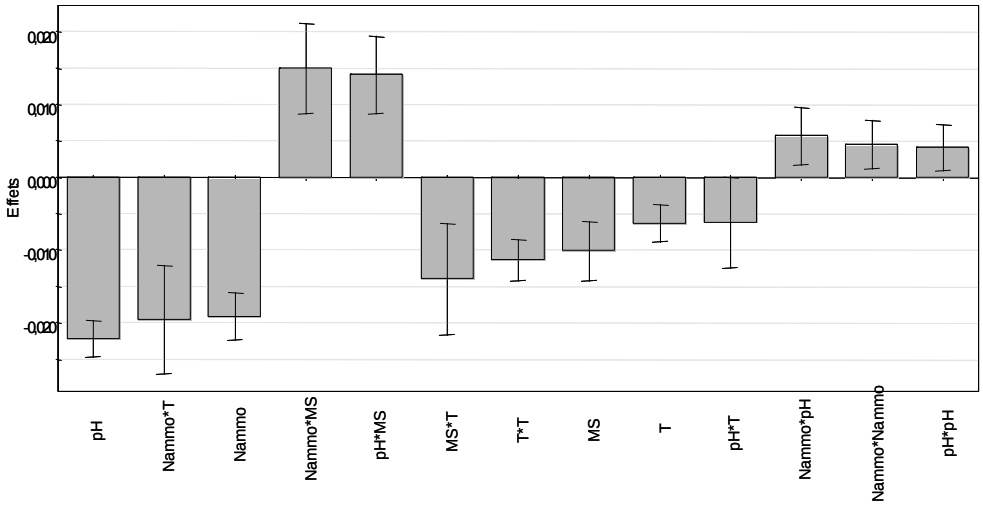


Figure 53. Effets des facteurs sur la réponse activité méthanogène, classés par importance

2.4 Effets conjoints de l'ammoniac et du pH pour trois MS différents

Le premier but de cette expérience est de savoir si les phénomènes observés en conditions de digestion humide peuvent être extrapolés à la digestion sèche. En outre, nous savons, d'après la bibliographie, que c'est l'ammoniac libre qui est le plus inhibiteur. La concentration en ammoniac libre augmente soit lorsque la concentration en ammoniac total augmente, soit lorsque le pH augmente, principalement. Nous avons donc représenté, sur la Figure 54, l'activité méthanogène en fonction de l'ammoniac et du pH pour trois valeurs de MS : 5 % (voie humide), 30 % (voie sèche) et 17,5 % (valeur médiane).

Nous pouvons observer que l'activité méthanogène diminue en fonction de la concentration en ammoniac et du pH. Cela indique que c'est la forme libre de l'ammoniac qui

est la forme la plus inhibitrice. En effet, lorsque le pH augmente, c'est cette forme qui prédomine.

Ce phénomène est le même en voie humide et en voie sèche. Les mécanismes découverts lors d'études fondamentales en voie humide semblent donc valables pour la voie sèche. Cependant, en voie sèche, pour les conditions les moins inhibitrices de l'étude (2 200 mgN/kg ; pH 7,3), l'activité méthanogène est plus faible qu'en voie humide : 0,021 contre 0,055 gDCO/j/gMVinoc respectivement. L'activité méthanogène maximale est donc moins élevée en voie sèche. La surface de réponse par rapport au pH et à l'ammoniac est plus écrasée. La diminution de l'activité méthanogène en fonction du pH et de l'ammoniac est moins marquée en voie sèche. Les valeurs numériques de concentrations inhibitrices et de leur effet sur l'activité méthanogène ne sont donc pas extrapolables depuis des études en voie humide vers des applications en voie sèche.

Notons que, pour la valeur extrême inférieure de MS (5 %), aux valeurs extrêmes supérieures de pH et d'ammoniac (9,0 et 3800 mg/kg), l'activité méthanogène calculée par le modèle mathématique prend des valeurs négatives. Cela est dû au fait qu'avec la matrice de Doehlert, l'incertitude est élevée aux extrêmes de l'étude. Pour pallier ces incertitudes, des points expérimentaux ont été ajoutés aux extrêmes inférieurs et supérieurs d'ammoniac et de MS pour l'extrême inférieur de pH. Mais le temps a manqué pour réaliser des points à l'extrême supérieur de pH, qui concerne ce problème de valeurs négatives.

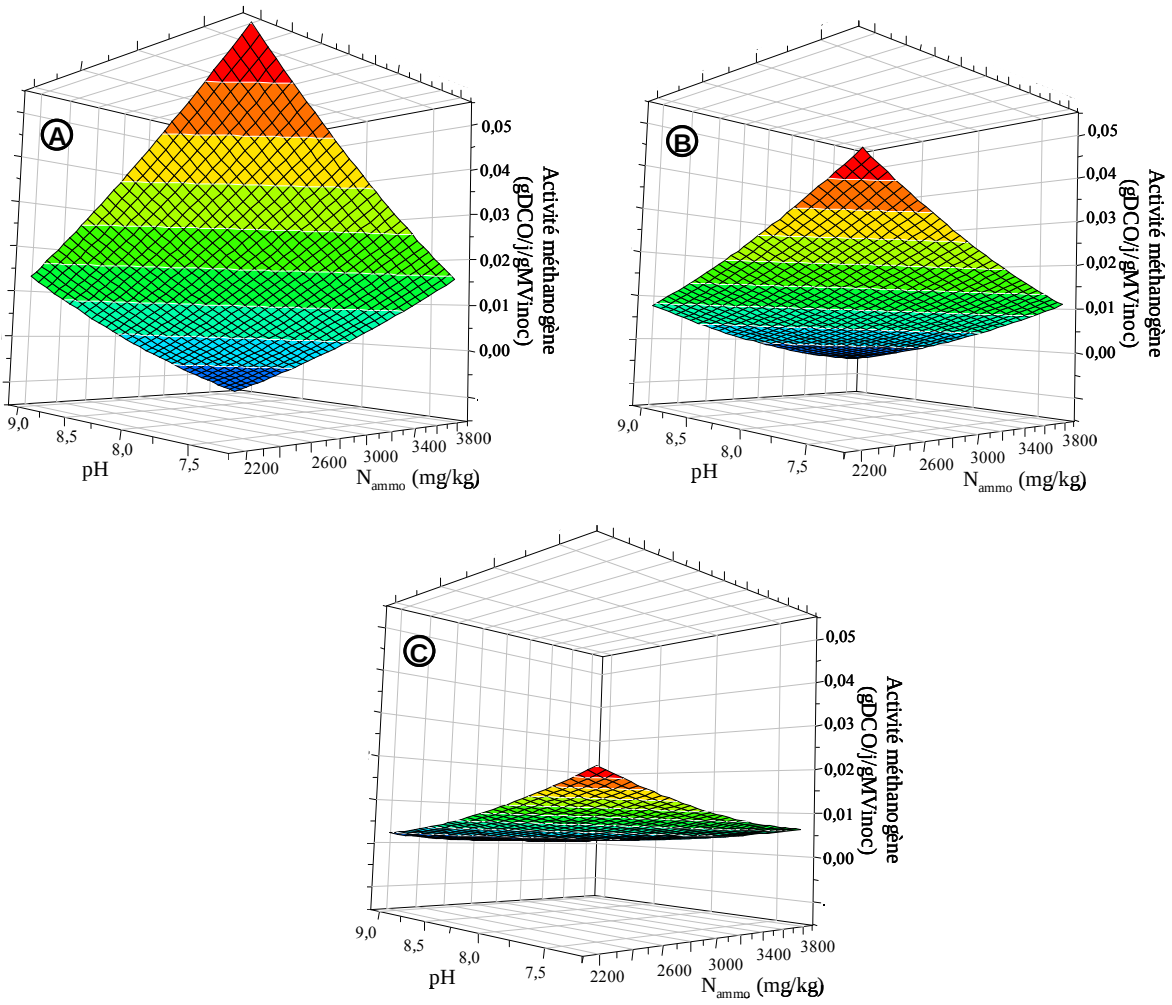


Figure 54. Surface de réponse : Activité méthanogène en fonction du pH et de l'azote ammoniacal. A : à 5 % de MS ; B : à 17,5 % de MS ; C : à 30 % de MS.

2.5 Effet de la température

La Figure 55 présente l'activité méthanogène en fonction de la température, pour trois concentrations en ammoniac différentes : la plus faible de l'étude, la plus élevée et la valeur moyenne. Les autres facteurs sont à leur valeur moyenne. Pour les deux concentrations en ammoniac les plus faibles (2 190 et 3 020 mgN/kg), il y a un optimum de température autour de 55°C. En ravanche, lorsque la concentration en ammoniac atteint des valeurs élevées (3 840 mgN/kg), il est clair qu'une température inférieure à 55°C permet une activité méthanogène plus élevée. Ces observations confirment bien celles effectuées à l'échelle industrielle : en cas d'inhibition par une forte concentration en ammoniac, une diminution de la température de 55 à 45°C permet de lever l'inhibition.

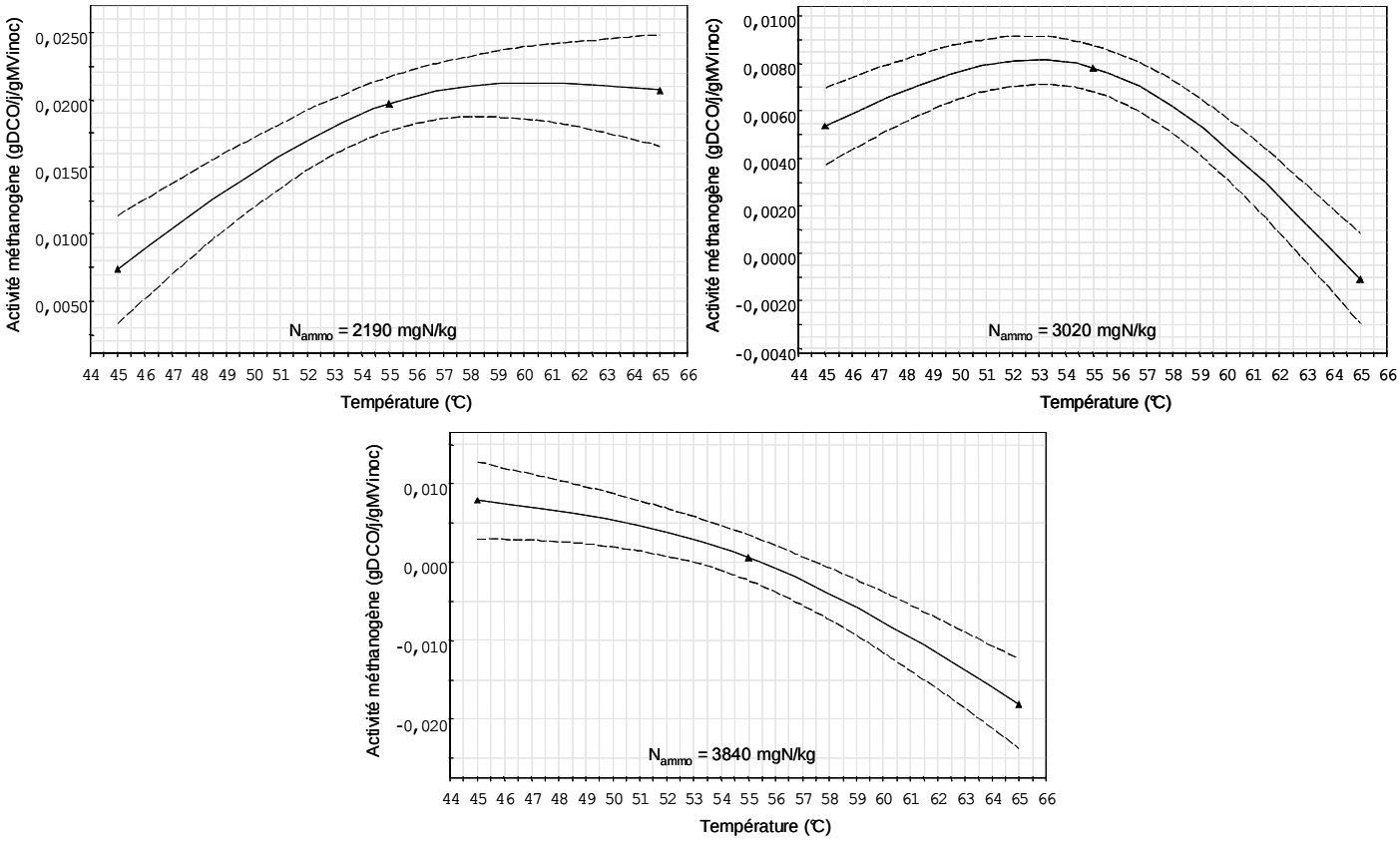


Figure 55. Activité méthanogène en fonction de la température pour trois concentrations en azote ammoniacal total. MS = 17,8 % ; pH = 8,2. Intervalle : intervalle de confiance à 95 %.

2.6 Analyse des interactions entre les facteurs

2.6.1 Azote ammoniacal et pH

La Figure 56 montre qu'un pH plus élevé renforce l'inhibition par l'ammoniac. Cela est dû au déplacement de l'équilibre vers la forme libre de l'ammoniac, et conforte donc l'hypothèse selon laquelle c'est cette forme qui est la plus inhibitrice.

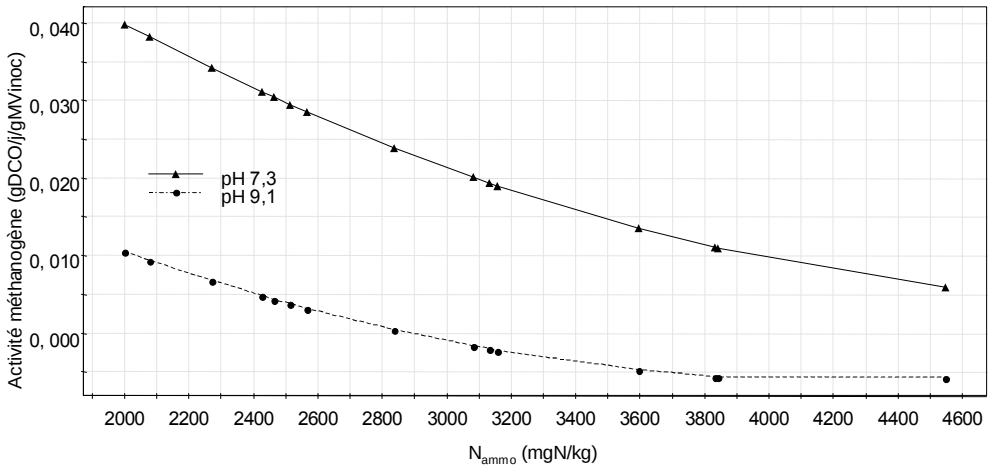


Figure 56. Interaction entre le pH et la concentration en azote ammoniacal. Activité méthanogène en fonction de la concentration en ammoniac pour les deux pH extrêmes. MS = 17,8 % ; T = 55°C

2.6.2 Azote ammoniacal et température

La Figure 57 montre l'interaction entre la température et la concentration en ammoniac total. Pour les concentrations faibles en ammoniac, la température provoque l'effet observé habituellement : un optimum aux alentours de 55°C. En revanche, pour les concentrations élevées en ammoniac, l'élévation de la température au-delà de 55°C fait chuter considérablement l'activité méthanogène tandis qu'une diminution de la température permet d'augmenter l'activité méthanogène. Ici encore, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la baisse de température déplace l'équilibre de l'ammoniac vers la formation d'ion ammonium, ce qui peut contribuer à atténuer l'inhibition par la forme libre.

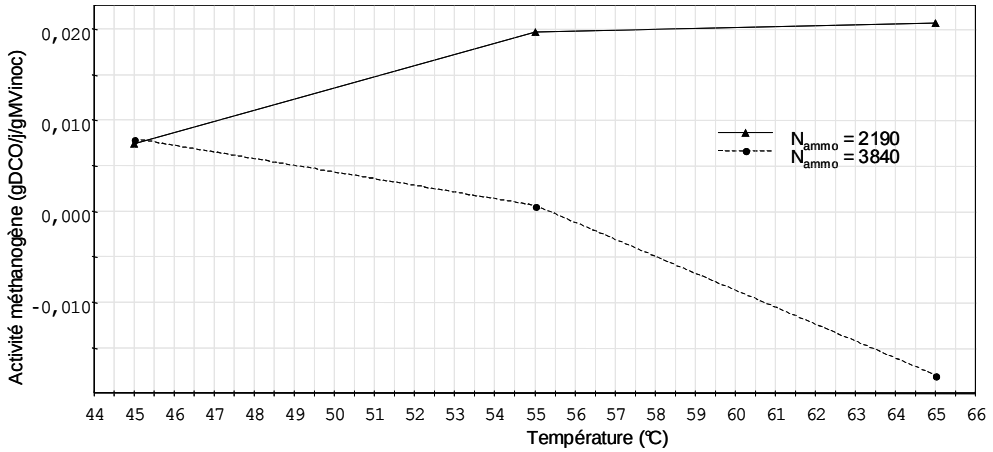


Figure 57. Interaction entre la température et la concentration en azote ammoniacal. Activité méthanogène en fonction de la température pour les deux concentrations en ammoniac extrêmes. MS = 17,8 % ; pH = 8,2

2.6.3 Matière Sèche et azote ammoniacal

Comme le montre la Figure 58, en digestion par voie sèche (30 % MS), l'activité méthanogène semble plus faible qu'en digestion par voie humide (5 % MS). Cela peut être dû au fait que l'activité méthanogène est exprimée par rapport à la quantité de MV dans l'inoculum, et que dans notre expérience l'inoculum est apporté en même temps que la matière servant à ajuster la matière sèche, sous forme de digestat (à forte teneur en MS, nous serions donc en excès de biomasse par rapport au substrat). Il serait donc intéressant de réaliser une

expérience où de la matière sèche serait apportée sous une forme indépendante de l'inoculum, par du sable, par exemple, ou du digestat stérilisé.

Cependant, la digestion par voie sèche semble mieux résister à l'ajout d'ammoniac que la digestion par voie humide. Mais cela peut n'être qu'un effet de bord dû au fait que l'activité méthanogène est déjà faible à 30 % de MS et qu'elle peut donc difficilement diminuer davantage.

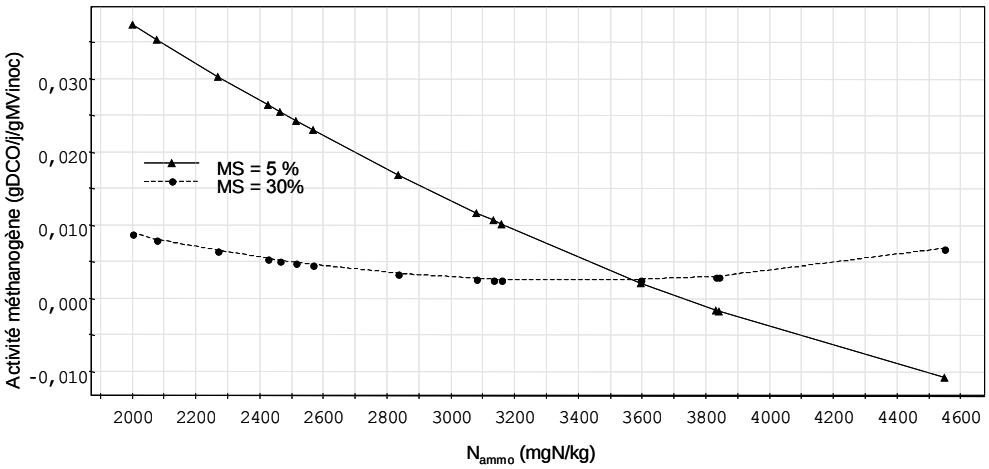


Figure 58. Interaction entre la matière sèche et la concentration en azote ammoniacal. Activité méthanogène en fonction de la matière sèche pour les deux concentrations en MS extrêmes. T = 55°C ; pH = 8,2

2.6.4 Matière Sèche et pH

Les mêmes observations que pour l'interaction de la MS et de la concentration en ammoniac peuvent être faites pour l'interaction de la MS et du pH. Comme le montre la Figure 59, en digestion par voie sèche (30 % MS), l'activité méthanogène semble plus faible qu'en digestion par voie humide (5 % MS). Mais cela peut être dû au fait que l'activité méthanogène est exprimée par rapport à la quantité de MV dans l'inoculum.

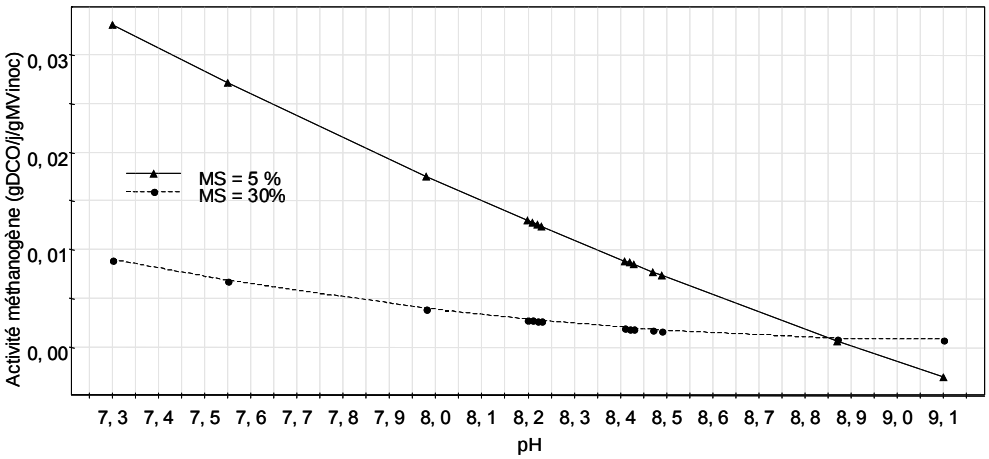


Figure 59. Interaction entre la matière sèche et le pH. Activité méthanogène en fonction de la matière sèche pour les deux concentrations en MS extrêmes. T = 55°C ; N_{ammo} = 3020 mgN/kg.

2.6.5 Matière Sèche et Température

La Figure 60 montre que la digestion par voie sèche semble plus affectée par les variations de température lors d'une inhibition "modérée" par l'ammoniac. A 5% de MS, pour une inhibition par 3 020 mgN/kg, 55°C reste la température optimale. En revanche, à 30% de

MS, une baisse de la température à 45°C permet de diminuer un peu l'inhibition, tandis qu'une augmentation à 65°C augmente de façon cruciale l'inhibition.

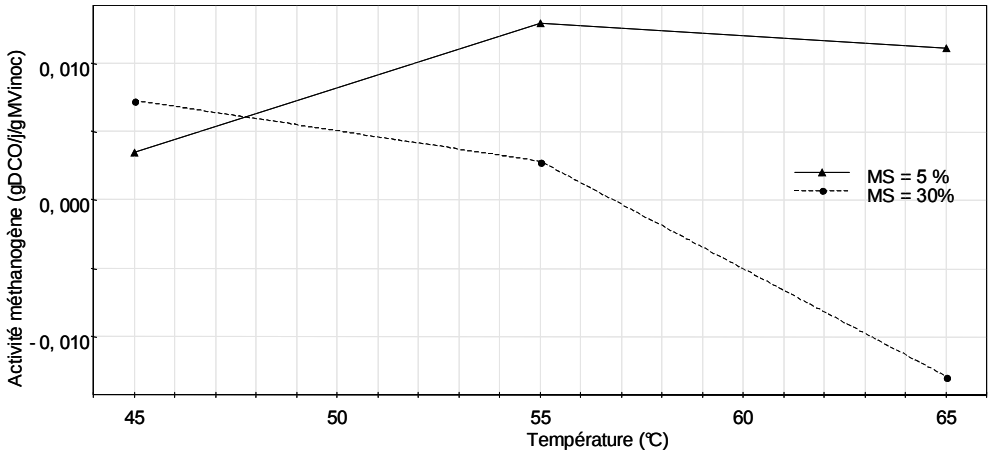


Figure 60. Interaction entre la matière sèche et la température. Activité méthanogène en fonction de la température pour les deux concentrations en MS extrêmes. pH = 8,2 ; N_{ammo} = 3020 mgN/kg

2.7 Synthèse

L'étude de l'influence de quatre paramètres (teneur en matière sèche, température, pH et teneur en azote ammoniacal) permet, sur la base d'une étude menée au moyen d'un plan d'expérience, de dégager les observations suivantes :

- Une inhibition par l'ammoniac est observable pour des concentrations de 2200 à 3800 mgN/kg, quelles que soient les valeurs des autres facteurs étudiés, et ce dès que la concentration en ammoniac total augmente légèrement. Il est donc possible de supposer qu'à 2200 mgN/kg, la méthanisation était déjà inhibée (c'est par exemple la concentration mesurée dans nos essais en digesteurs).
- L'augmentation du pH, entre 7,3 et 9,1, provoque une diminution de l'activité méthanogène. Il est raisonnable de penser que le déplacement de l'équilibre acido-basique vers la forme libre de l'ammoniac renforce l'inhibition car cette forme est plus inhibitrice que la forme dissociée.
- L'augmentation de la température au-delà de la température optimale (environ 55°C) diminue l'activité méthanogène. La diminution de la température à 45°C entraîne une activité méthanogène non optimale, sauf dans le cas où il y a une inhibition par l'ammoniac prononcée. Dans ce cas, la diminution de la température à 45°C permet de diminuer l'effet inhibiteur de l'ammoniac. Ces phénomènes sont particulièrement marqués en digestion sèche. Précisons par ailleurs que ces baisses de température, dans les conditions expérimentales où elles ont été réalisées, ne permettent pas l'établissement d'un consortium microbien adapté. Il s'agit donc bien d'un effet de la température sur l'activité d'un consortium thermophile adapté à 55°C.
- En digestion par voie sèche (30 % MS), l'activité méthanogène semble plus faible qu'en digestion par voie humide (5 % MS). Cela peut être dû au fait que l'activité méthanogène est exprimée par rapport à la quantité de MV dans l'inoculum, et que dans notre expérience l'inoculum est apporté en même temps que la matière servant à ajuster la matière sèche, sous forme de digestat. Il serait donc intéressant de réaliser une expérience où de la matière sèche serait apportée sous une forme indépendante de l'inoculum, par du sable, par exemple, ou du digestat stérilisé. Il n'est pas possible de savoir, en effet, si cette diminution est liée à un réel effet physique (manque d'eau, faible motilité de micro-

organismes) ou à un effet biologique associé à un excès de micro-organismes en digestion sèche (limitation par le substrat).

3 Essai en réacteur pilote

3.1 Introduction

Nous avons réalisé une expérience d'ajout d'ammoniac dans le nouveau réacteur de laboratoire dans le but d'étudier l'effet de l'ammoniac dans des conditions réelles de digestion sèche. Après trois temps de séjour d'alimentation normale d'OMR, deux fois par semaine, le réacteur était dans un état de fonctionnement quasiment stabilisé (*cf.* 0. 4). C'est alors que nous avons ajouté de l'ammoniac, sous forme de NH_4Cl, lors des alimentations. La concentration en ammoniac augmentait lors de la première alimentation de la semaine et était maintenue stable lors de la deuxième, à l'aide d'un ajout plus faible visant à compenser seulement la quantité d'ammoniac perdue avec le soutirage. La concentration visée a été augmentée de 1 677 mgN/kg (concentration mesurée au début de l'expérience) à 3 758 mgN/kg en quatre paliers de 520 mgN/kg.

Le réacteur a été suivi pendant les 60 jours de l'expérience. L'azote ammoniacal, les AGV, la DCO soluble et le pH ont été dosés. Les productions de biogaz et de méthane ont été suivies.

3.2 Concentration en ammoniac mesurée

La concentration en ammoniac totale mesurée suit bien la concentration visée et augmente comme elle (Figure 61 A). Cependant, après l'arrêt des ajouts d'ammoniaque et des alimentations, la concentration mesurée continue d'augmenter. Cela peut être dû à la dégradation de protéines ou d'acides aminés qui s'étaient accumulés jusque là du fait de l'inhibition par l'ammoniac, mais nous ne pouvons pas en être sûrs. Vu le rythme d'augmentation de la concentration en ammoniac, ainsi que les résultats ci-dessous, il est peu probable que les micro-organismes aient eu le temps de s'adapter.

3.3 Effet sur le biogaz

L'augmentation régulière de la concentration en ammoniac crée une inhibition flagrante de la production de biogaz et de méthane (Figure 61 B). Le débit de méthane décroît de façon régulière. Il peut sembler sur le graphique que le débit diminue à chaque alimentation même lors de celles où l'on n'augmente pas la concentration en ammoniac. Cela est dû au fait que la deuxième alimentation de la semaine (celle ou la concentration en ammoniac n'augmente pas) correspond à 3 jours de fonctionnement contre 4 pour la première. L'alimentation est donc plus petite et le débit plus faible. En revanche, si l'on ramène le débit à la quantité de MV alimentée, le débit maximum ne décroît que lors de l'augmentation de la concentration en ammoniac et reste constant entre les deux (résultats non présentés). Juste avant le dixième jour des données sont manquantes à cause d'une panne informatique.

Lorsque la concentration en ammoniac a atteint 3 760 mgN/kg, la production de biogaz est devenue nulle. Nous avons alors arrêté les alimentations et les ajouts d'ammoniac. A la fin de l'expérience une tentative de tamponner le milieu a été réalisée en ajoutant du carbonate de calcium ($CaCO_3$). Cela a provoqué une brève production de biogaz, observable entre les jours 40 et 50 sur le graphique. Cependant, ce biogaz contenait surtout du CO_2 qui s'est dégagé suite à l'augmentation du pH et au changement de l'équilibre acido-basique entre les carbonates et le CO_2 dissouts.

3.4 Effet sur la phase soluble

3.4.1 DCO soluble et AGV totaux

L'inhibition croissante par l'ammoniac cause une augmentation de la concentration en DCO soluble dans le réacteur de 8 à 30 g/kg (Figure 61 C). Cette augmentation de DCO soluble est essentiellement due à une augmentation de la concentration en AGV de 5 à 20 g DCO/kg. L'ammoniac inhibe donc la méthanogenèse, ce qui crée une accumulation des AGV qui continuent d'être produits par l'hydrolyse et l'acidogenèse. Dans le cas de l'inhibition par l'ammoniac, il est vraiment clair que ce n'est pas l'hydrolyse qui est la phase limitante. Comme nous l'avons vu plus haut, la concentration en ammoniac continue d'augmenter après l'arrêt des alimentations. Il en est de même pour la DCO soluble (de 30 à 35 g/kg), ainsi que, pendant un certain temps, les AGV (de 20 à 23 g DCO/kg). Cela pourrait être dû à une hydrolyse, des protéines notamment, qui, elle, n'est pas tout à fait inhibée et continue à se dérouler en arrière plan. Il en résulte une accumulation d'ammoniac, d'AGV et d'autres produits intermédiaires solubles.

L'accumulation des AGV engendre une chute du pH de 7,7 à 6,7. L'ajout de carbonate de calcium en fin d'expérience a fait remonter le pH à 8, son niveau en l'absence d'inhibition par l'ammoniac.

3.4.2 Détail des AGV

Le détail des AGV présente un profil très intéressant (Figure 61 D). En effet, des effets similaires à ceux observés pendant la surcharge en déchet carné peuvent être observés pendant l'inhibition par l'ammoniac (*cf.* 0. 6.3). Il y a une forte augmentation de la concentration en acétate et en iso-butyrate. La différence est qu'ici, l'iso-butyrate n'augmente pas au même niveau que l'acétate. Cela est dû au fait que le l'iso-butyrate ne peut être produit qu'à partir de protéines qui étaient apportées massivement par le déchet carné. Toutefois, il est bien un des deux AGV produits majoritairement en situation de stress (Nozhevnikova *et al.*, 2000). De plus, c'est toujours l'iso-butyrate qui est dégradé en premier une fois que les ajouts d'ammoniac sont arrêtés. Il ne semble pas être transformé en butyrate contrairement à ce que proposaient Matthies et Schink (1992). L'expérience n'a pas été poursuivie assez longtemps pour pouvoir observer la dégradation des autres AGV. Ici le valérate et le butyrate ne s'accumulent pas autant que lors de la surcharge en déchet carné.

Le propionate a un comportement à part. Il était le seul AGV présent avant l'inhibition. Il ne semble pas affecté par l'inhibition il garde son niveau très constant tout au long de l'expérience.

Vu le niveau élevé d'acétate en fin d'expérience, par rapport aux autres AGV, nous pouvons supposer que l'inhibition par l'ammoniac porte surtout sur les bactéries acétotrophes.

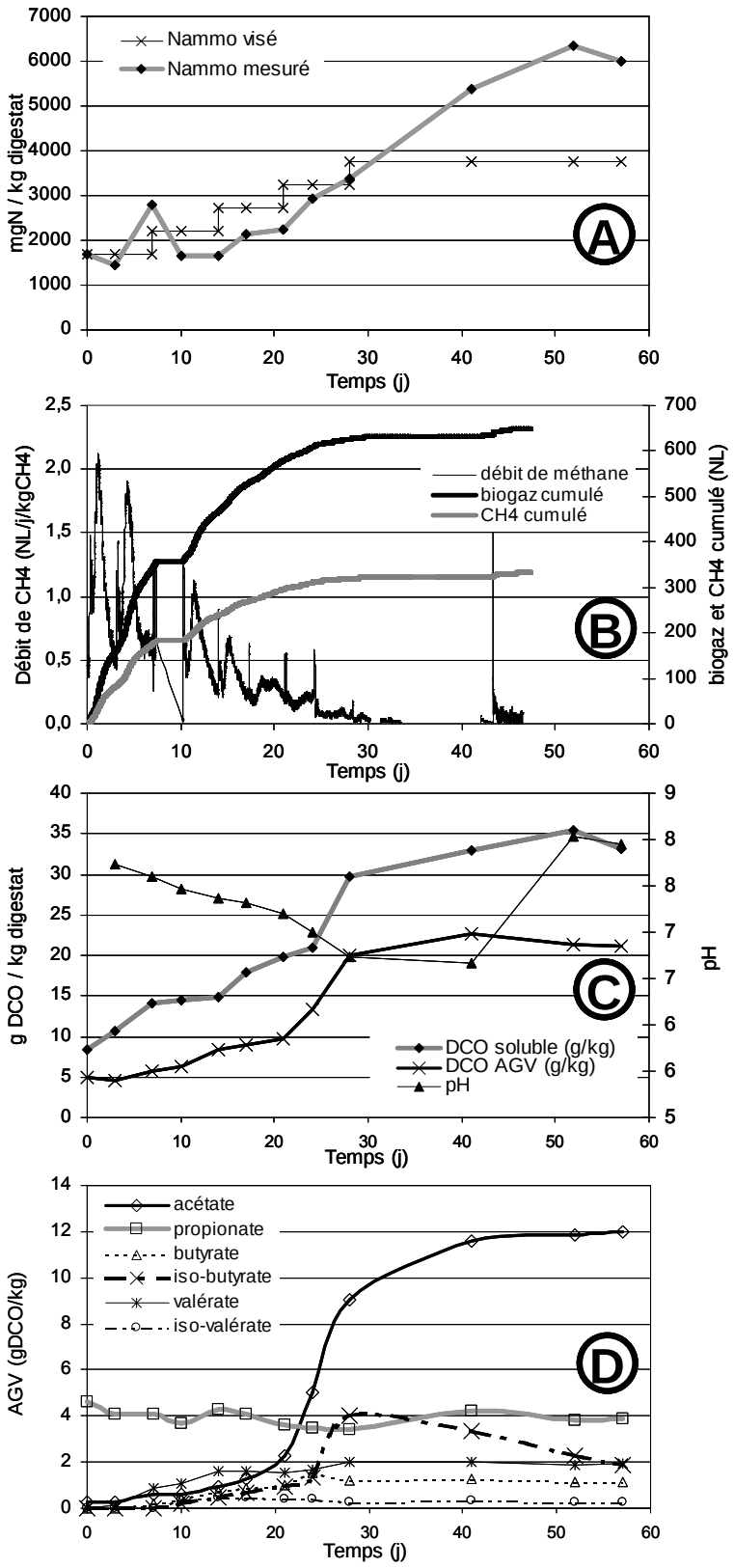


Figure 61. Evolution des paramètres dans le réacteur de laboratoire fonctionnant en semi-continu lors d'augmentations de la concentration en ammoniac. A : azote ammoniacal total visé et mesuré ; B : débit de méthane et biogaz et méthane cumulés ; C : pH, DCO soluble et AGV totaux (en équivalents DCO) ; D : détail des AGV (en équivalents DCO)

4 Comparaison fioles / réacteur pilote

La dernière étape de cette étude a été de comparer les résultats obtenus sur le réacteur de laboratoire aux valeurs qui peuvent être prédites pour des conditions équivalentes à partir du modèle mathématique calculé dans la première partie de l'étude. Pour pouvoir les comparer, les vitesses de production de méthane dans le réacteur ont été converties en vitesses de dégradation de DCO et ramenées à la quantité de MV présente dans le digestat. Ainsi, nous avons les mêmes unités que l'activité méthanogène. L'activité résiduelle mesurée juste avant l'alimentation a été retranchée de l'activité totale mesurée à partir de la vitesse maximale après alimentation. Ainsi les mesures sont comparables entre les deux expériences.

A partir des valeurs de pH, de concentration en azote ammoniacal, de taux de MS et de température, les valeurs d'activité méthanogène attendues ont été calculées pour chaque point de l'expérience en réacteur (Tableau 31). La Figure 62 compare ces points aux valeurs mesurées sur le réacteur.

Les valeurs prédites sont dans le même ordre de grandeur que les valeurs mesurées. En revanche, elles ne prédisent pas le comportement observé. Cela montre que les phénomènes observés lors d'expériences en conditions simplifiées ne sont pas les mêmes ou ne sont pas les seuls impliqués lors d'expériences en conditions réelles. Il y a donc un intérêt à disposer d'un réacteur permettant d'effectuer des expériences en conditions réelles de digestion sèche.

Il est difficile de conclure quant à la cause des différences observées. La différence de substrat est très probablement une des causes principales. Lorsque le substrat est un déchet complexe (OMR), l'hydrolyse tient un rôle plus important que pour le glucose. Elle est moins, ou pas, inhibée par l'ammoniac et du biogaz supplémentaire peut être produit.

Le pH est un autre point de différence. Dans le réacteur aucun tampon n'a été ajouté pendant l'expérience. Le pH a diminué par effet naturel de l'accumulation des AGV. En revanche, dans l'expérience en fioles, le pH a été artificiellement fixé à l'aide de solutions tampon et d'acide et base forts. Cela peut avoir eut une influence.

Tableau 31. Prédiction de l'activité méthanogène à partir des paramètres du réacteur en utilisant le modèle mathématique

Point n°	T (°C)	MS (%)	N_{ammo} (mg/kg)	pH	activité prédite (gDCO/j/gMVinoc)
1	55	25	2 000	7,80	0,0201
2	55	25	2 000	7,80	0,0201
3	55	25	2 520	7,74	0,0141
4	55	25	2 520	7,60	0,0158
5	55	25	3 040	7,46	0,0120
6	55	25	3 040	7,36	0,0132
7	55	25	3 560	7,31	0,0097
8	55	25	3 560	7,20	0,0108
9	55	25	4 080	7,00	0,0102
10	55	25	4 080	6,74	0,0129

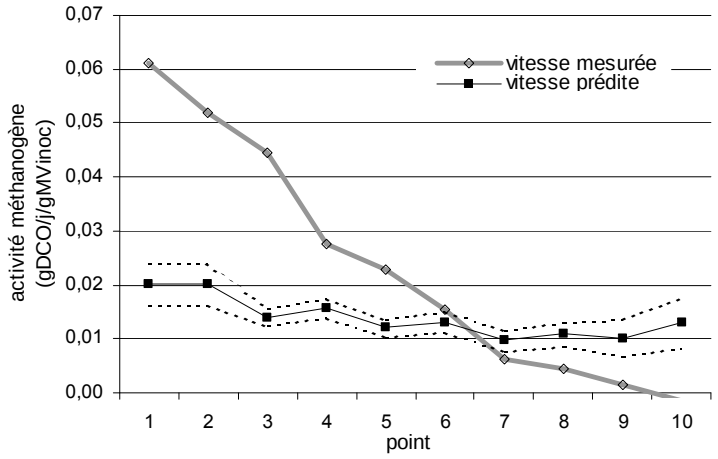


Figure 62. Comparaison de la l'activité méthanogène observée dans le réacteur de laboratoire lors de l'augmentation de la concentration en ammoniac et de l'activité méthanogène prédite à partir du modèle mathématique pour les mêmes conditions. Intervalle : intervalle de confiance à 95 %.

5 Conclusion

Nous avons réalisé deux expériences pour étudier l'effet de l'ammoniac et d'autres conditions physico-chimiques (température, MS, pH) sur la méthanisation. La première était une série de mesures dans des conditions simplifiées de laboratoire. La seconde était un essai en réacteur en conditions réelles de digestion sèche.

De la première expérience nous avons pu tirer des informations quant aux mécanismes mis en jeu lors de l'inhibition par l'ammoniac. Nous avons vérifié que le pH avait un effet d'augmentation de l'inhibition en favorisant la forme libre de l'ammoniac qui est plus inhibitrice. Nous avons vérifié que la température optimale était d'environ 55°C mais que, dans des cas de forte inhibition par l'ammoniac, une baisse de la température à 45°C permet d'obtenir une activité méthanogène plus grande en levant partiellement l'inhibition. Ce phénomène est particulièrement marqué en voie sèche.

En digestion par voie sèche (30 % MS), l'activité méthanogène semble plus faible qu'en digestion par voie humide (5 % MS). Cela peut être dû au fait que l'activité méthanogène est exprimée par rapport à la quantité de MV dans l'inoculum, et que dans notre expérience l'inoculum est apporté en même temps que la matière servant à ajuster la matière sèche, sous forme de digestat. Il serait donc intéressant de réaliser une expérience où de la matière sèche serait apportée sous une forme indépendante de l'inoculum, par du sable, par exemple, ou du digestat stérilisé.

Nous avons observé les mêmes phénomènes en voie sèche et en voie humide. Des expériences en voie humide peuvent donc être utiles pour étudier les mécanismes en recherche fondamentale. En revanche, les niveaux d'inhibition et les variations d'activité méthanogène ne sont pas les mêmes. Les résultats numériques obtenus en voie humide ne sont donc pas extrapolables à la voie sèche, notamment dans la détermination de seuils d'inhibitions pour le pilotage d'unités industrielles.

En comparant l'expérience en fioles avec du glucose comme substrat à celle en réacteur avec des OMR comme substrat, il apparaît que les phénomènes sont différents selon que l'on se trouve en conditions simulées ou en conditions réelles. Il est donc important de valider les résultats obtenus en conditions simplifiées par des essais en conditions réelles. Il semblerait que ce soit le substrat qui soit en cause ici. Lorsque le substrat est un déchet complexe (OMR), l'hydrolyse tient un rôle plus important que pour le glucose. Elle est moins, ou pas,

inhibée par l'ammoniac et du biogaz supplémentaire peut être produit. Le fait que, dans les essais en fioles, le pH soit fixé par une solution tampon peut aussi être en cause.

Dans les conditions réelles, la méthanogenèse est plus inhibée par l'ammoniac que l'acidogenèse/acétogenèse. Il s'ensuit une accumulation d'acétate et d'autres AGV, ainsi que, peut-être, des sous-produits de l'hydrolyse. Le détail des AGV est très intéressant lorsqu'on le compare à celui observé lors de la méthanisation discontinue d'une surcharge en déchet carné. Dans les deux cas, le stress causé se traduit par une accumulation importante d'acétate et d'iso-butyrate. Il peut donc se révéler très intéressant de suivre ces deux AGV en vue de détecter un éventuel problème d'inhibition par l'ammoniac dans les méthaniseurs industriels. L'abondance de l'acétate lors de l'ajout d'ammoniac semble confirmer que ce sont les bactéries acétotrophes qui sont fortement affectées.

Malheureusement, les essais sur le réacteur de laboratoire en conditions réelles n'ont pas pu être poursuivis car la thèse arrivait à échéance. Il y a de nombreux autres paramètres qui pourraient être testés afin de répondre aux questions qui restent en suspens : L'inhibition est-elle réversible, et aurait-on récupéré une activité si l'on avait attendu plus longtemps ? Y-a-t-il une forte mortalité cellulaire? La méthanisation seraient-elle repartie si l'on avait éliminé l'ammoniac dans le réacteur (par stripage par exemple) ? Quel aurait été l'effet du pH, si l'on avait tamponné le milieu ? Quel est l'effet des AGV, ont-ils un effet inhibiteur en synergie avec l'ammoniac ? Aurait-on observé une adaptation des micro-organismes si l'on avait augmenté la concentration en ammoniac plus lentement ?

Cette étude sur l'ammoniac a donc apporté des résultats très intéressants. Ils permettent de préparer les travaux futurs dans ce domaine. Les voies de recherche et les modalités opératoires les plus pertinentes ont été identifiées. Le mécanisme général de l'inhibition par l'ammoniac dans le cas de la voie sèche a été déterminé. Il reste maintenant à déterminer les cas particuliers (adaptation, etc.).

CHAPITRE VI. ACTIVITES HYDROLYTIQUES

La Terre n'appartient pas à l'homme, c'est l'homme qui appartient à la Terre.

[Sitting Bull]

VI. ACTIVITES HYDROLYTIQUES

1 Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrolyse est un point clef de la méthanisation. Si elle est trop rapide, des intermédiaires inhibiteurs, tels que les AGV, peuvent s'accumuler. Si elle est trop lente, elle limite la vitesse de tout le reste du procédé. L'hydrolyse est réalisée par quatre grandes classes d'enzymes : les protéinases, les amylases, les cellulases et les lipases. La mesure de l'activité de ces quatre groupes d'enzymes devrait donc apporter des informations sur l'activité hydrolytique dans le réacteur.

De plus, ces enzymes sont extracellulaires. Il est donc relativement aisé de les extraire à l'aide d'une solution de détergent qui permet de détacher les enzymes de la paroi des cellules et des particules de matière organique afin de les mettre en solution.

Cette étude a pour objectif, tout d'abord, d'étudier la pertinence et la faisabilité de mesures d'activités enzymatiques hydrolytiques dans des conditions réelles de digestion sèche. Ces conditions sont obtenues en mesurant l'activité enzymatique dans des échantillons provenant d'essais de digestion réalisés en mode discontinu mésophiles et thermophiles dans le réacteur de laboratoire décrits au chapitre IV. Des ordures ménagères résiduelles ont été utilisées comme substrat afin de reproduire les conditions d'hétérogénéité rencontrées dans la pratique. Des essais de co-digestion avec des déchets carnés, riches en protéines et en lipides, ont également été utilisés dans l'espoir de stimuler les activités protéinasique et lipasique (voir chapitre IV.6).

Le suivi des activités enzymatiques hydrolytiques à l'occasion de ces essais permettra également de mieux comprendre les processus mis en jeu lors de la phase d'hydrolyse de la méthanisation de déchets solides.

2 Optimisation des paramètres d'extraction

2.1 Introduction

L'étape d'extraction doit permettre de solubiliser un maximum d'enzymes puis de précipiter les matières en suspension tout en gardant les enzymes solubilisées (*cf.* II. 4.1). Ainsi, des essais ont été menés concernant la centrifugation effectuée après agitation du digestat en présence de détergent. De plus, l'impact de la congélation sur l'activité enzymatique a été étudié à des fins pratiques.

2.2 Elimination de la turbidité

Lors de la phase d'extraction des enzymes, c'est la centrifugation qui permet la précipitation de la matière indésirable, mais qui présente aussi le risque de précipiter une partie des enzymes. La centrifugeuse utilisée permet une accélération maximale de 27 000 *g*. Afin de déterminer si cette accélération n'est pas trop élevée, nous avons testé deux niveaux : 27 000 *g* et 12 000 *g*. C'est la valeur mesurée d'activité cellulasique, pour chacune de ces deux conditions d'extraction qui nous a servi de point de comparaison. Les résultats obtenus apparaissent dans le Tableau 32.

Tableau 32. Optimisation de la vitesse de centrifugation lors de l'étape d'extraction enzymatique

Accélération (*g*)	Activité cellulasique (ΔDO/mn)
12 000	$3{,}1.10^{-5} \pm 0{,}56.10^{-5}$
27 000	$16{,}4.10^{-5} \pm 2{,}9.10^{-5}$

Après une extraction sous agitation d'une heure en présence de Triton x-100, la vitesse de centrifugation de 27 000 *g* (20 mn) permet de mesurer une activité cellulasique supérieure à celle obtenue après centrifugation 20 minutes à 12 000 *g*. La vitesse de 27 000 *g* permet donc d'éliminer une plus grande quantité de matière en suspension sans précipiter les enzymes dans le culot.

Afin de confirmer qu'une plus grande quantité de matière en suspension était éliminée, la DO_{520nm} de l'extrait a été mesurée dans deux cas :

- Après 30 minutes d'agitation et centrifugation à 3 000 *g* (20 mn) : DO_{520nm} = 2,7877
- Après 30 minutes d'agitation et centrifugation à 27 000 *g* (20 mn) : DO_{520nm} = 2,4542

Cette mesure permet de vérifier que la vitesse plus élevée permet de réduire la turbidité du milieu. Cela permet d'avoir moins de bruit de fond lors des mesures colorimétriques des activités enzymatiques.

Malgré ce traitement, la densité optique de l'extrait enzymatique reste élevée. Cette couleur foncée pose de nombreux problèmes pour les mesures colorimétriques d'activité enzymatique car elle masque la coloration libérée par l'hydrolyse enzymatique. Cela augmente donc le seuil de détection.

Des essais de dilution n'ont pas donné de résultat probant. En effet, bien que la dilution fasse baisser la densité optique de l'extrait et donc le seuil de détection, elle dilue également les enzymes et diminue donc l'activité mesurée.

2.3 Influence de la congélation

La congélation des échantillons prélevés permettrait de conserver les échantillons afin de grouper les mesures d'activité enzymatique en fin d'expérience dans le but de réaliser les essais en parallèle pour une meilleure comparaison et de gagner du temps. Il existe deux possibilités : soit congeler l'extrait enzymatique après la phase d'extraction ; soit congeler l'échantillon de digestat frais puis réaliser l'extraction, après décongélation, le jour de la mesure.

La mesure de l'activité cellulasique a été utilisée pour évaluer l'effet sur l'activité enzymatique de la congélation à -20°C du digestat frais d'une part et de l'extrait enzymatique d'autre part. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 33.

Tableau 33. impact de la congélation sur l'activité enzymatique

	Activité cellulasique (ΔDO/mn)
Extrait frais	$65,6.10^{-5}$
Extrait congelé	$20,7.10^{-5}$
Digestat congelé	Non détectée

Nous observons une baisse importante (environ deux tiers) de l'activité enzymatique entre l'extrait frais et l'extrait congelé. Par ailleurs, lorsque l'on congèle le digestat brut et que l'on effectue l'extraction enzymatique après décongélation, l'activité n'est plus détectable. Nous préconisons donc de réaliser les extractions et les mesures d'activité au fur et à mesure des essais, ce qui n'est pas sans poser des problèmes logistiques lorsqu'un suivi de réacteur est souhaité, vu la complexité des analyses. Dans notre cas, le suivi de l'activité enzymatique lors d'essais en mode discontinu (batch) a donc été effectué sans congélation.

3 Suivi enzymatique de méthanisation en discontinu

3.1 Introduction

Afin d'évaluer la pertinence du suivi de l'activité enzymatique, nous avons suivi les activités amylasique, cellulasique, protéasique et protéinasique au cours de deux expériences en discontinu. Ces expériences ont été réalisées sur le réacteur pilote de laboratoire décrit précédemment afin de se trouver dans des conditions similaires à celles rencontrées à l'échelle industrielle. Ainsi, nous avons pu évaluer également la faisabilité technique de ces mesures dans les conditions réelles de la digestion sèche d'ordures ménagères. En effet, le fait de travailler sur une telle matrice n'est pas anodin :

- Le milieu est hétérogène ;
- Il est très concentré en matière solide ainsi qu'en matière dissoute ;
- Il a une couleur foncée (DO > 2).

Les expériences ont été décrites au chapitre IV. La première est la digestion mésophile d'ordures ménagères résiduelles (OMR) seules. La deuxième est la co-digestion mésophile d'OMR et d'un modèle de déchet carné (steak haché), permettant d'avoir un déchet plus riche en protéines et en lipides. La troisième est la co-digestion d'OMR et de déchet carné avec une surcharge en déchet carné. La quatrième est la digestion thermophile d'OMR seules.

3.2 Amylase

L'activité amylasique a été suivie pendant les quatre expériences. Les résultats sont présentés dans la Figure 63. Ils traduisent l'évolution de l'activité amylasique exprimée en mg de glucose formé/mn.g de digestat dans les deux expériences. Notons que pour la première expérience, les mesures n'ont put être effectuées qu'à partir du 7ème jour, en raison du temps nécessaire à l'adaptation des protocoles expérimentaux.

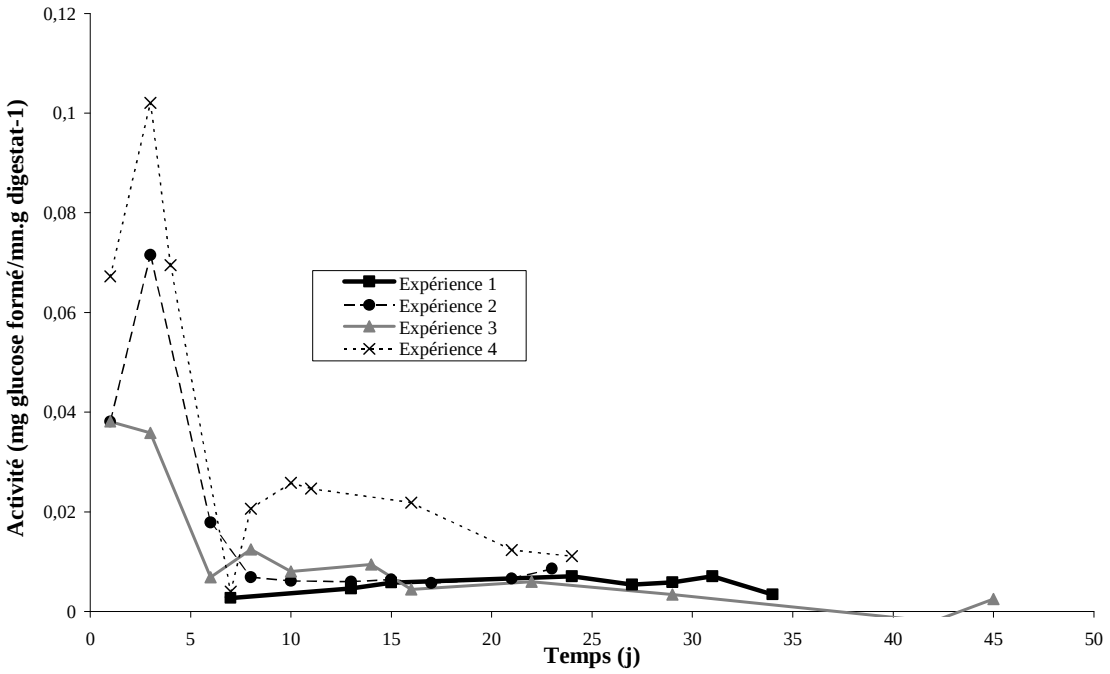


Figure 63. Evolution temporelle de l'activité amylasique lors des expériences 1 à 4.

L'activité amylasique augmente dès le démarrage de chaque expérience. Cette augmentation est suivie très rapidement d'une baisse à partir du cinquième jour d'essai. Dans toutes les expériences, elle se stabilise à un niveau faible à partir du 10ème jour. L'amidon étant un substrat très facilement dégradable, nous pouvons supposer qu'il est consommé prioritairement en début de digestion. Les micro-organismes hydrolytiques produisent donc massivement des amylases. Ensuite, l'amidon ayant été rapidement dégradé, sa disparition ainsi que l'augmentation de la concentration en monomères de glucose inhibent la production et l'action des amylases.

Les niveaux maximaux détectés lors de ces essais (à l'exception du premier) sont respectivement de 0,069, 0,038 et 0,104 g_{glc} par g de digestat et par minute pour les essais 2, 3 et 4.

Nous pouvons également observer que la surcharge en déchet carné (donc en protéines) semble diminuer l'activité amylasique maximale. Ce résultat a déjà été observé par ailleurs (*cf.* I. 5.3.4; Glenn, 1976). En effet, l'activité est plus faible lorsqu'il y a surcharge en déchet carné que lorsqu'il y a simple co-digestion sans surcharge.

Nous observons également que la température thermophile favorise l'activité hydrolytique (*cf.* I. 3.2). En effet, l'expérience thermophile est celle pour laquelle l'activité est la plus élevée. Ce résultat est également en accord avec les données par El-Fadel *et al.* (1996) dans le cas de décharges de déchets municipaux.

Des résultats similaires sont obtenus par Zhang *et al.* (2007) dans un méthaniseur de déchets de légumes à 9,5 % de MS. Ils observent une forte activité amylasique dès le début de l'expérience qui chute, ensuite, et se stabilise près de 0 à partir du 6ème jour jusqu'à la fin de l'expérience. Ce comportement est d'autant plus marqué que la charge organique est élevée.

Jones et Grainger (1983) ont mesuré l'activité amylasique dans des simulateurs de centres de stockage (lysimètres). Dans ce type de réacteur il n'y a pas d'agitation, ce qui peut expliquer que les échelles de temps observées sont plus étirées (jusqu'à 120 jours). Pour un déchet sec (70 % MS) ils observent une activité élevée puis une baisse progressive de l'activité jusqu'à 50 % de sa valeur initiale à la fin de l'expérience. A l'inverse, pour un déchet saturé en eau, l'activité amylasique initiale est près de 1000 fois supérieure à celle obtenue pour le déchet sec, quand elle est ramenée à la masse de matière sèche. Ensuite, l'activité double en 50 jours avant de diminuer lentement. Nous pouvons imaginer que, pour un taux de matière sèche équivalent à la digestion sèche, le comportement serait intermédiaire entre ces deux ; c'est-à-dire comme celui observé ici, ou par Zhang *et al.*, mais sur des temps plus longs. Cependant, dans les centres de stockage le terme de "saturation en eau" signifie qu'il n'y a plus d'eau qui coule du massif de déchet. De plus, la cinétique est ralentie car le déchet est compacté. La comparaison est donc délicate ici.

Lors de la première expérience, l'agitation a été accidentellement stoppée durant 48 h, (du 25ème au 27ème jour), simulant involontairement une perturbation d'ordre physique. La mesure d'activité amylasique effectuée le 27ème jour indiquait une légère baisse d'activité mais cette variation n'est pas significative car l'activité amylasique avait déjà atteint un niveau faible.

3.3 Cellulase

L'activité cellulasique a été suivie pendant trois expériences en batch. Les résultats sont présentés dans la Figure 64. Ils traduisent l'évolution de l'activité cellulasique exprimée en ΔDO/mn.g de digestat dans les deux expériences. Dans le cas de la première expérience, les mesures n'ont put être effectuées qu'à partir du 10ème jour, en raison du temps nécessaire à l'adaptation des protocoles expérimentaux.

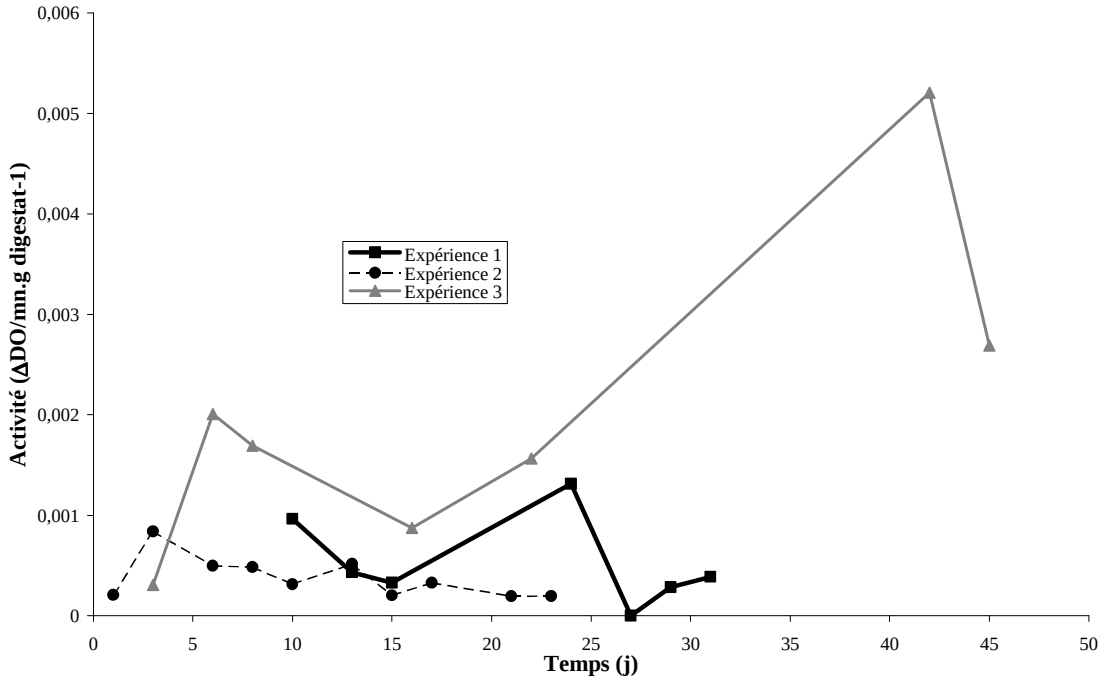


Figure 64. Evolution temporelle de l'activité cellulasique lors des trois premières expériences

Sur la Figure 64, les points sont espacés car un certain nombre de mesures ont échoué en raison de la difficulté rencontrée pour mettre au point une méthode de dosage fiable. L'interprétation est donc difficile.

Rappelons tout d'abord que, lors de la première expérience, l'agitation a été accidentellement stoppée durant 48 h (du 25ème au 27ème jour) simulant involontairement une perturbation d'ordre physique. L'activité cellulasique chute brutalement à ce moment, avant de remonter progressivement. Nous pouvons supposer que l'arrêt d'agitation est à l'origine de cette chute.

Néanmoins, il semble que deux pics d'activité cellulasique se succèdent : le premier entre le départ et le 15ème jour, et le deuxième après le 15ème jour.

Les mesures présentées ici reflètent l'hydrolyse d'une cellulose représentative de la cellulose naturelle, dans son ensemble. Zhang *et al.* (2007), quant à eux, mesurent deux types de cellulases distinctes : la FPase qui mesure la quantité de glucose produite à partir de papier filtre et la CMCase qui mesure la quantité de glucose produite à partir de carboxyméthylcellulose (de la cellulose soluble). Dans leur expérience sur un méthaniseur de déchets de légumes à 9,5 % de MS, ils observent deux pics de FPase au départ et à 6 jours et un pic de CMCase à 10 jours. Leur expérience n'est malheureusement pas poursuivie au-delà de 10 jours.

Comme nous l'avons vu précédemment (*cf.* I. 5.3.5), le mode d'action des cellulases est complexe et se déroule en plusieurs étapes. Il n'est donc pas étonnant que nos résultats soient

difficiles à interpréter. Néanmoins, ce qui ressort de nos observations et de celles de Zhang *et al.*, c'est qu'il y a plusieurs pics d'activité cellulolytique au cours de la méthanisation de déchets solides. Des productions d'activité cellulolytique en deux pics ont également été observées par Maunoir *et al.* (1991) dans la méthanisation d'eaux usées et par Lai *et al.* (2001) durant la méthanisation de déchets municipaux en lysimètre.

Nous pouvons avancer plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène. Il se peut que différentes cellulases soient produites à différents moments, éventuellement par différents groupes de micro-organismes. Il se peut aussi que, du fait de l'inhibition de la cellulolyse par les produits de la réaction, il se déroule un phénomène cyclique. Dans ce phénomène, les sous-produits de la cellulolyse seraient libérés, causeraient l'inhibition de celle-ci avant d'être consommés par les micro-organismes et ainsi, un nouveau cycle de cellulolyse pourrait démarrer.

Dans le cas de la première hypothèse, il serait intéressant de suivre les activités des trois classes de cellulases (les exoglucanases, les endoglucanases et les β-glucosidases) pour voir si elles apparaissent à des moments différents de la digestion. Rivard *et al.* (1993) ont mesuré ponctuellement ces trois activités dans la digestion sèche de déchets municipaux mais sans effectuer de suivi.

Remarquons également que ce double pic pourrait être en lien avec les doubles-pics de production de biogaz fréquemment observés en digestion sèche (*cf.* 0. 3.2). On aurait alors, dans le déchet, une fraction rapidement dégradée, constituée principalement d'amidon et de cellulose facilement biodégradable – ainsi que de sucres simples et d'AGV – et une fraction dégradée plus tardivement, composée de cellulose plus difficilement dégradable.

La mesure globale de l'activité cellulolytique semble donc contenir un grand nombre d'informations, relatives à la fois à la dégradation de composés plus rapides à dégrader et d'autres plus lents, et mettant en jeu des enzymes de natures différentes. A ce titre, ce paramètre global est particulièrement complexe, et sujet à une trop forte variabilité pour constituer un indicateur fiable de l'activité. Dans l'optique d'un suivi de la méthanisation, la problématique de la cellulolyse est un point sans doute important mais qu'il est encore difficile d'étudier de manière simple. Une connaissance préalable approfondie des mécanismes est nécessaire afin de mieux décrire les différents modes d'action des cellulases, et d'être en mesure de proposer des solutions analytiques. Cependant, il s'agit d'un champ de recherche à part entière qui dépasse largement le cadre de notre travail.

3.4 Protéinase

L'activité protéinasique n'a pu être correctement suivie que dans l'expérience 2. Les résultats sont présentés dans la Figure 65. Ils traduisent l'évolution de l'activité protéinasique exprimée en µg d'équivalent sérumalbumine bovine (BSA) dégradée/mn.g de digestat.

La Figure 65 montre une forte activité protéinasique dès le début de l'expérience. Ensuite la baisse est progressive jusqu'à atteindre un niveau très faible après 15 jours.

Des résultats similaires sont obtenus par Zhang *et al.* (2007) dans un méthaniseur de déchets de légumes à 9,5 % de MS. Ils observent une forte activité protéinasique, dès le début de l'expérience, qui chute ensuite, et se stabilise près de 0 à partir du 6ème jour jusqu'à la fin de l'expérience. Ce comportement est d'autant plus marqué que la charge organique est faible ; c'est-à-dire que la dilution est élevée.

Des résultats similaires sont obtenus par Jones et Grainger (1983) dans des simulateurs de décharge. L'activité protéinasique augmente très rapidement dès le début de l'expérience pendant 20 jours puis retombe tout aussi vite et reste quasi nulle jusqu'à la fin de l'expérience.

Comme pour Zhang *et al.*, ce phénomène est d'autant plus marqué que le déchet est dilué avec de l'eau.

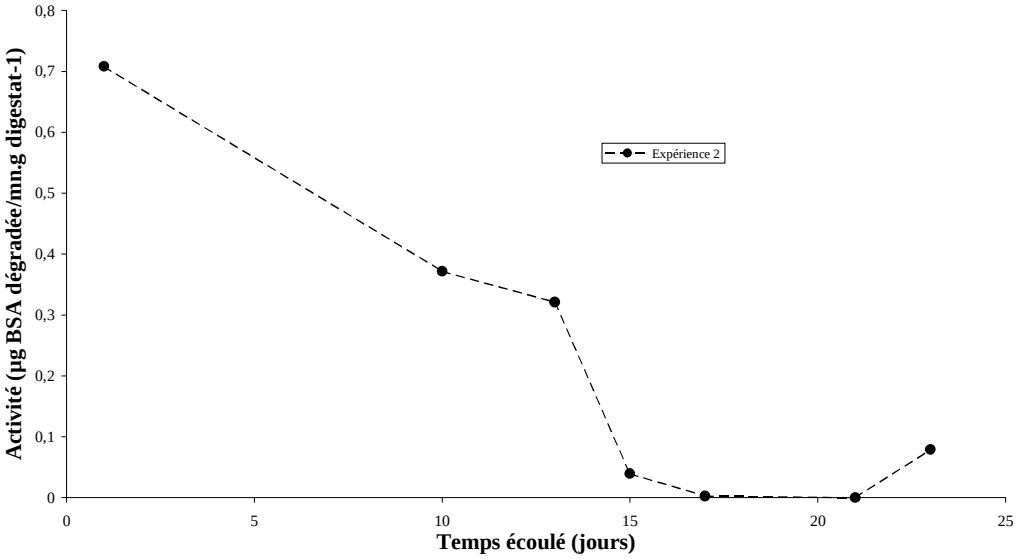


Figure 65. Evolution temporelle de l'activité protéasique lors de la deuxième expérience

Les protéines étant très facilement dégradables, nous pouvons supposer qu'elles sont consommées rapidement en début de digestion. Les micro-organismes hydrolytiques produisent donc massivement des protéinases. Ensuite, les protéines sont rapidement dégradées. Leur disparition ainsi que l'augmentation de la concentration en acides aminés et en glucose stoppent la protéinolyse, conformément à ce que nous avons vu précédemment (*cf.* I. 5.3.6). Les résultats obtenus sont donc conformes à ceux attendus.

Dans notre cas, nous ne pouvons que supposer que la production de protéinases a été stimulée par l'ajout de steak haché car les autres expériences sont manquantes. Il aurait été utile de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus lors des expériences 1 et 3, contenant respectivement moins et plus de protéines. Cela aurait permis de savoir si une surcharge en protéines peut être détectée par une variation de l'activité protéinasique. Il est à noter que l'activité mesurée ici demeure très faible et à la limite du seuil de détection.

3.5 Lipase

L'activité lipasique a été suivie pendant les quatre expériences en batch. Aucune activité lipasique n'a été détectée, même dans les expériences de co-digestion avec des déchets carnés, qui sont riches en matière grasse animale. Les méthodes ne sont pas à remettre en cause ici.

Jones et Grainger (1983), dans leur expérience en simulateur de décharge, n'ont pas non plus détecté d'activité lipasique. Dans la bibliographie, l'activité lipasique est la moins souvent mesurée des quatre activités hydrolytiques étudiées ici.

4 Synthèse et Conclusion

La première conclusion que nous pouvons tirer est que le temps a manqué pour mener à bien cette étude sur les activités enzymatiques. Par exemple Sabil (1991) a consacré sa thèse à l'étude des activités enzymatiques dans les boues de fosses septiques. Soulignons que cette matrice est plus homogène et plus simple que les ordures ménagères. Une mise au point plus poussée des méthodes ainsi qu'un plus grand nombre d'expériences permettrait de réellement

déterminer la pertinence d'un suivi des activités enzymatiques hydrolytiques dans les installations de méthanisation par voie sèche.

Dans notre étude nous avons rencontré de nombreux problèmes liés à une turbidité résiduelle des extraits enzymatiques qui constituait un bruit de fond important sur nos mesures. Cette turbidité est liée à la forte concentration de matières solubles de la digestion par voie sèche. De plus, les valeurs d'activités enzymatiques mesurées diminuent avec l'augmentation du taux de matière sèche (Jones et Grainger, 1983), ce qui rend les mesures en digestion sèche d'autant plus difficiles.

Nous avons tout de même montré ici que ce suivi est une piste envisageable si l'on y consacre les moyens nécessaires pour adapter les méthodes aux conditions réelles. En effet, il semble que **certains schémas sont constants dans la digestion anaérobie de déchets de ce type : activités amylasique et protéinasique précoces ; activité cellulolytique plus tardive.** Il est envisageable de déterminer un schéma plus précis dans le but de surveiller l'avancement de la digestion. Il est également envisageable d'**utiliser les activités enzymatiques comme indicateur afin de détecter un éventuel problème de surcharge ou d'inhibition**. Par exemple, en cas de surcharge en protéines, l'activité amylasique est inhibée. Nous n'avons malheureusement pas pu déterminer si une surcharge en protéines entraînait une augmentation de l'activité protéinasique.

En revanche, compte tenu de la variabilité de la mesure, la détermination de niveaux d'activité attendus nécessite la standardisation des méthodes ainsi que la définition précise des conditions de mesure. Il est très probable qu'une légère variation des paramètres (température, MS, etc.) de la méthanisation rende les valeurs difficiles à comparer et oblige à définir des valeurs standards pour chaque installation.

Nous avons également pu éliminer le suivi de l'activité lipasique parmi les quatre activités envisagées. Nous avons identifié que l'activité cellulasique est à étudier au moyen de techniques plus fines et moins globales pour déterminer si son suivi est exploitable pour la surveillance des méthaniseurs.

La mesure des activités hydrolytiques, en particulier amylasique et cellulasique, pourrait également être un outil puissant pour comprendre les **mécanismes de dégradation** de la matière organique propres à la méthanisation de déchets solides, notamment par voie sèche. En effet, comme nous l'avons vu, **l'apparition à différents moments de la digestion de pics d'activité hydrolytique pourrait être reliée à la présence de plusieurs fractions de matière organique avec des biodégradabilités différentes** (au moins deux). Il serait très intéressant d'identifier ces fractions (qui sont certainement liées à la dégradation de la cellulose) pour trouver des méthodes pertinentes de caractérisation de la matière organique. Il serait également intéressant de comprendre pourquoi certaines fractions sont plus difficilement dégradables. Cela permettrait d'améliorer le procédé de méthanisation, voire de prétraitement. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer qu'une partie de la cellulose est moins dégradable, nous pouvons citer le degré de lignification de la cellulose, son degré de ramification, sa structure chimique (amorphe ou cristalline) ou sa solubilité. Mieux comprendre ces phénomènes serait une grande avancée pour la maîtrise de la méthanisation par voie sèche.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les bonnes questions ne se satisfont pas de réponses faciles.

[Paul Samuelson]

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1 Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail était de contribuer à la recherche fondamentale et appliquée visant à mieux connaître et à être capable de suivre la méthanisation par voie sèche. L'étude bibliographique nous a montré l'étendue des domaines pouvant être étudiés dans ce but. Les spécificités de la digestion sèche et la rareté des données dans ces conditions empêchent d'identifier précisément les voies de recherche à favoriser sur la seule base de l'étude bibliographique. Cette thèse s'est donc attachée à réaliser le travail préliminaire d'orientation des recherches futures. Dans le même temps, des amorces de réponses ont été suggérées alors que de nouvelles questions émergeaient.

Les quatre grands axes dégagés par l'étude bibliographique ont été passés en revue par des expériences visant à identifier les orientations de recherche les plus pertinentes. Ces quatre axes sont (i) la caractérisation de la matière organique, (ii) les conditions physiques de la méthanisation, (iii) les conditions biochimiques de la méthanisation et (iv) l'activité biologique au sein du méthaniseur. Cependant, des lignes directrices transversales à ces quatre axes ont été dégagées au cours des études et sont présentées ici.

1.1 Compartiments de la matière organique

Le paramètre élémentaire influençant l'efficacité de la méthanisation est la qualité du déchet entrant et de sa matière organique. Nous avons fait à ce sujet un progrès appréciable. Nous avons montré que la matière organique des déchets solides pouvait être divisée en plusieurs (au moins deux) compartiments de solubilité différente. La répartition de ces compartiments varie d'un déchet à l'autre et peut donc servir à la caractériser.

Le compartiment hydrosoluble, le plus soluble, est le plus biodégradable. Nous l'appellerons compartiment "A". Malgré une importance relative faible dans la composition de la matière organique (moins de 5 % de la MV dans le cas des OMR), il prend une part substantielle dans la production du méthane (environ 15 %). Ce compartiment est composé de glucides solubles, de la majorité des protéines, d'AGV ainsi que d'autres substances qui n'ont pas pu être identifiées.

Le compartiment le moins soluble (correspondant à la fraction non soluble dans un détergent acide), à l'inverse, est le moins biodégradable. Nous l'appellerons compartiment "C". Une relation linéaire négative forte peut même être établie entre la teneur d'un déchet en cette fraction peu soluble et sa biodégradabilité. La composition exacte de ce compartiment n'a pas été identifiée mais il s'agit sûrement en partie de plastique et de lignocellulose, structure dans laquelle la cellulose est protégée de la dégradation par la lignine.

Cette dichotomie, entre un compartiment très soluble et biodégradable et un compartiment peu soluble et difficilement biodégradable, a été retrouvée tout au long des autres thèmes abordés dans la thèse.

Lors d'essais discontinus à trois échelles différentes (fioles, réacteur de laboratoire, réacteur industriel), il a été observé que, lors de la méthanisation de déchets particulaires réels, la production de méthane se faisait en deux fois (deux pics). Il y a une première production, caractérisée par une cinétique rapide, qui correspondrait au compartiment A. Il y a ensuite une phase de production de méthane marquée par une cinétique plus lente. Cette seconde phase doit probablement correspondre à la dégradation d'un compartiment "B" qui se dégrade plus lentement et n'est pas digéré préférentiellement (sans doute des glucides

complexes ou des graisses, métabolisés plus lentement). Enfin, lorsque la production de méthane prend fin, il ne reste plus que la matière organique pas ou très peu biodégradable, le compartiment C.

Nous avons montré que, dans ces conditions, les enzymes hydrolysant les polymères les plus solubles (amidon et protéines) ont une forte activité au début des essais discontinus. Les enzymes hydrolysant la cellulose prennent ensuite le relais plus tardivement dans l'expérience. Ces résultats confirment le mécanisme de fonctionnement proposé : une hydrolyse précoce et préférentielle d'un compartiment facilement biodégradable (A) suivie d'une seconde phase correspondant à un compartiment plus difficilement biodégradable (B), consommé moins préférentiellement par les micro-organismes.

Nous avons mis en évidence que le broyage a un effet sur les compartiments les moins solubles. Lorsque le broyage du déchet est plus fin, sa biodégradabilité augmente. Cette augmentation est due à une augmentation de la production de méthane lors de la phase B et non lors de la phase A[8]. Le broyage augmente donc la quantité de matière organique biodégradable dans le compartiment B. L'explication la plus plausible est que le broyage rend disponible, ou plus soluble, de la matière organique du compartiment C. Cela peut être, par exemple, la libération de cellulose qui était emprisonnée dans de la lignine avant le broyage. Nous pouvons également en conclure que les plus faibles biodégradabilités des compartiments B et C sont liées en partie à leur structure physique. La composition biochimique des déchets, qui ne rend pas compte de la structure physique, n'est donc pas adaptée pour décrire fidèlement leur aptitude à être méthanisés.

L'étude bibliographique indiquait que la méthanisation des déchets solides est exclusivement limitée par l'hydrolyse. Cependant, nos observations ne corroborent pas cette hypothèse, comme nous l'avons vu dans le chapitre IV. L'analyse des résultats dans leur globalité tendrait plutôt à montrer que c'est seulement la deuxième phase, de dégradation du compartiment B, qui est limitée par l'hydrolyse. Cela est cohérent dans la mesure où le compartiment A est facilement hydrolysable alors que ce n'est pas le cas du compartiment B.

Enfin, lors de l'étude de l'effet de paramètres environnementaux sur la méthanisation, nous avons observé des comportements différents lorsque nous avons utilisé un substrat solide réel (OMR) et lorsque nous avons utilisé un substrat soluble (glucose). Ces divergences peuvent être dues à la différence physique des deux substrats : un substrat complexe dans un cas, constitué de différents compartiments ; un substrat unique dans l'autre cas, facilement dégradable et qui ne fait pas intervenir d'étape d'hydrolyse.

En conclusion, nous pouvons souligner l'importance de la configuration physique de la matière organique, et donc l'importance de prendre en compte cette configuration lors de la caractérisation des déchets solides. La proportion de la fraction qui n'est pas soluble dans un détergent acide (SAS+IVS) donne une indication assez précise sur la part du compartiment C et donc sur la biodégradabilité d'un déchet. La détermination de la quantité de matière hydrosoluble donne une indication approchée sur la part du compartiment A et donc sur la cinétique de la production de méthane. En effet, l'importance du compartiment A permettra d'évaluer l'importance de la première phase de production de méthane.

Nous retiendrons également que, lors d'études fondamentales comme lors de la caractérisation de déchets pour les applications industrielles, il ne faut pas négliger l'importance de la granulométrie du déchet. Le broyage trop fin du déchet peut mener à

[8] Les phase A, B et C sont les périodes de temps correspondant à la dégradation des compartiments A, B et C respectivement

d'importantes erreurs lors de la détermination de potentiels méthanogènes et de paramètres cinétiques.

1.2 Equilibre entre hydrolyse/acidogenèse et méthanogenèse

Comme nous venons de le voir, la biodégradabilité de la matière organique dépend de sa capacité à être hydrolysée plus ou moins facilement. Toujours est-il qu'un équilibre est nécessaire entre l'étape d'hydrolyse/acidogenèse et l'étape de méthanogenèse, c'est-à-dire entre la production d'intermédiaires à courte chaîne et leur consommation. Si l'étape de méthanogenèse est plus lente que l'étape d'hydrolyse/acidogenèse, les composés intermédiaires s'accumulent dans le milieu réactionnel. Les principaux intermédiaires causant ce type de problème sont les AGV.

Au cours de ces travaux, nous avons pu observer plusieurs cas d'accumulation d'AGV liés à différentes contraintes. Ils étaient en lien avec le fonctionnement normal de méthaniseurs en mode semi-continu et discontinu ou lors d'évènements exceptionnels. L'étude des différences dans les accumulations d'AGV en fonction des conditions nous permet de mieux comprendre certains mécanismes et aussi d'identifier certains problèmes de fonctionnement des méthaniseurs par l'observation d'accumulation d'AGV.

Lors du fonctionnement normal en mode discontinu, dans le réacteur de laboratoire comme dans le réacteur industriel, nous avons observé une accumulation transitoire d'AGV. Cela est dû à une acidogenèse trop rapide en début de l'essai qui produit rapidement des AGV. La méthanogenèse étant plus lente, les AGV ne sont pas consommés aussi rapidement qu'ils sont produits. L'hydrolyse n'est donc pas l'étape limitante au début de l'essai. Dans le réacteur de laboratoire, ce sont l'acétate et le propionate qui s'accumulent. Le propionate est dégradé en dernier, une fois que l'acétate a été complètement consommé. Il y a donc une consommation préférentielle de l'acétate sur le propionate.

Lors du fonctionnement stabilisé en semi-continu, c'est aussi le propionate qui est dégradé le moins préférentiellement. En effet, il est le seul à être accumulé dans le milieu. Cependant, le niveau de propionate correspond à un avancement inférieur à 30 jours dans les essais discontinus alors que la production de méthane en semi-continu correspond à un avancement de 40 jours, durée qui est également le temps de séjour appliqué aux déchets.

Lors du démarrage du réacteur de laboratoire en mode semi-continu, une accumulation passagère d'acétate a été observée. Elle est sûrement due à la nécessité d'un temps d'adaptation des micro-organismes aux conditions, au déchet et à la charge organique.

Dans le cas d'une co-digestion de déchets riches en matière facilement biodégradable (viande) avec les OMR, si la charge organique totale reste la même, aucune différence significative n'est observable. En revanche, dans le cas d'une surcharge en matière organique facilement biodégradable, il y a une très forte accumulation de tous les AGV de l'acétate au valérate. Cependant, il n'y a pas blocage de la réaction et les AGV finissent par être consommés. L'iso-butyrate est dégradé préférentiellement et, encore une fois, le propionate est dégradé en dernier.

Nous avons également observé qu'une inhibition par l'ammoniac provoquait une accumulation d'AGV, surtout d'acétate et d'iso-butyrate. Cela montre que la méthanogenèse est plus touchée par l'inhibition par l'ammoniac. De nouveau, l'iso-butyrate est dégradé préférentiellement. L'accumulation de propionate n'est pas affectée par l'inhibition et celui-ci reste à la même concentration lors de l'augmentation de la concentration en ammoniaque que lors du fonctionnement stabilisé.

L'effet de la surcharge en composés facilement biodégradables a également été observé sur l'activité hydrolytique. En cas de surcharge en protéines, l'activité amylasique est diminuée. Nous n'avons malheureusement pas pu déterminer si elle provoquait une augmentation de l'activité protéinolytique. La mesure des activités hydrolytiques semble néanmoins prometteuse pour étudier l'équilibre entre l'hydrolyse et les autres étapes de la méthanisation.

Nous retiendrons que le suivi des AGV permet de détecter d'éventuels dysfonctionnements de la méthanisation. Une accumulation d'AGV est le témoin que l'hydrolyse se déroule plus rapidement que la méthanogenèse. Contrairement à ce qui peut être lu dans la bibliographie, cela est normal lors de la dégradation du compartiment A en début de méthanisation. En revanche, une accumulation plus élevée qu'à l'accoutumée sera le signe d'un problème. Ce problème peut avoir deux causes : soit la méthanogenèse est trop lente à cause d'une inhibition ; soit la production d'AGV est trop forte à cause d'un substrat facilement hydrolysable.

L'analyse de la composition en différentes espèces d'AGV apporte de l'information supplémentaire. Le propionate peut être un témoin de l'avancement de la réaction. C'est surtout l'acétate et l'iso-butyrate qui s'accumulent en cas de problème. L'ordre de dégradation des AGV après leur accumulation semble être toujours le même. Le suivi de ces dégradations peut permettre de s'assurer que le fonctionnement de la méthanisation entre en bon ordre après l'accumulation. Le suivi de certaines activités enzymatiques semble également prometteur pour détecter d'éventuelles surcharges.

Enfin, nous avons vu ici l'importance de caractériser la matière organique des déchets alimentés afin d'éviter une éventuelle surcharge en matière organique facilement hydrolysable. Cela peut en effet causer un déséquilibre de la quantité d'AGV produits par l'hydrolyse par rapport à la vitesse de leur consommation, surtout si cette surcharge est brusque et que les micro-organismes n'ont pas le temps de s'y adapter.

Notons que la surcharge créée ici en mode discontinu n'a pas engendré de problèmes car nous lui avons laissé le temps de se résorber (50 jours). Mais en mode discontinu, si la surcharge n'est pas détectée et que le temps de séjour n'est pas allongé, les AGV vont continuer de s'accumuler jusqu'à des niveaux dangereux pour le fonctionnement du méthaniseur.

1.3 Effet des conditions opératoires

Nous avons pu observer, tout au long de ce travail de thèse, qu'il y a de nombreuses conditions opératoires qui ont un effet sur les performances de la méthanisation par voie sèche. Il est nécessaire de mieux connaître les mécanismes mis en jeu afin de pouvoir prendre en compte le maximum de paramètres, ainsi que leurs interactions, lors du pilotage des méthaniseurs.

Dans ce travail, nous avons cherché à éclaircir les phénomènes d'inhibition par l'ammoniac en relation avec le pH, la température et la teneur en MS. Nous avons observé que les phénomènes mis en jeux sont les mêmes en voie sèche et en voie humide. L'activité méthanogène diminue en fonction de la concentration en ammoniac et du pH. En revanche, les niveaux d'inhibition et les variations d'activité méthanogène ne sont pas les mêmes pour la voie sèche que pour la voie humide. Des expériences en voie humide peuvent donc être utiles pour étudier les mécanismes en recherche fondamentale, mais les résultats numériques obtenus en voie humide ne sont pas extrapolables à la voie sèche. En voie sèche, les activités méthanogènes semblent plus faibles.

Des différences sont également observables entre les résultats obtenus sur des tests en fiole, avec du glucose comme substrat et un tamponnage du pH, et un essai en réacteur dans des conditions réalistes. L'inhibition par l'ammoniac touche surtout la méthanogenèse et provoque une accumulation d'AGV lorsque le substrat est complexe. Les AGV font chuter le pH lorsque le milieu n'est pas tamponné.

Nous avons vérifié que la température optimale en régime thermophile est d'environ 55°C mais que, dans des cas de forte inhibition par l'ammoniac, une baisse de la température à 45°C permet d'obtenir une activité méthanogène plus élevée en levant partiellement l'inhibition. Ce phénomène est particulièrement marqué en voie sèche. En outre, nous avons observé, en comparant un essai mésophile à un essai thermophile, qu'en mode thermophile, la vitesse de production de méthane est plus élevée mais le rendement final reste le même qu'en mésophile.

Suite à nos observations, nous pouvons préconiser, lors de la méthanisation par voie sèche, de suivre régulièrement la concentration en ammoniac et le pH. Notamment en fonctionnement en mode semi-continu, l'ammoniac est susceptible de s'accumuler si l'on recycle les jus de presse car l'ammoniac n'est pas dégradé ; il ne peut être éliminé que dans le digestat soutiré. Les seuils de concentration en ammoniac potentiellement inhibitrice sont susceptibles de varier d'un méthaniseur à un autre en fonction des conditions opératoires exactes. La détermination des concentrations maximales devra donc se faire avec une marge de sécurité ou bien au cas par cas.

En cas de problème d'inhibition par l'ammoniac sur un méthaniseur, nous pouvons préconiser de diminuer de 10°C la température pour un réacteur thermophile. La diminution de vitesse de la méthanisation peut nécessiter qu'on augmente le temps de séjour. Il est également envisageable de diluer le milieu réactionnel avec de l'eau et/ou de remplacer le recyclage des jus de presse par un apport d'eau fraîche.

1.4 Mises au point méthodologiques

Mon travail de thèse s'est heurté à de nombreux problèmes méthodologiques liés au manque de méthodes préexistantes et aux spécificités de la voie sèche et des OMR (hétérogénéité, concentrations élevées, phases solides et liquides, etc.). Ainsi, au-delà de la problématique scientifique et technique, il m'a fallu mettre au point des solutions techniques et pratiques pour appréhender les milieux de digestion.

Pour la majorité des dosages il faut extraire les molécules à doser, avant le dosage à proprement parler, à cause de l'appartenance ou de l'adsorption sur la phase solide de tout ou partie des molécules à doser. Il en va de même pour les dosages de caractérisation de la matière organique (glucides, protéines, DCO, AGV). Il existe une autre méthode où l'échantillon est réduit en poudre et mis en suspension mais elle est très insatisfaisante au niveau de sa représentativité et de sa répétabilité. J’ai montré l'intérêt de méthodes différentes pour caractériser la matière organique, telles que le fractionnement en compartiments de solubilité différente. Ainsi, les méthodes classiques de caractérisation des déchets pourront-elles être remplacées par des méthodes plus adaptées aux déchets solides.

L'extraction des molécules à doser est également nécessaire pour la mesure des activités enzymatiques. Ici, la couleur noire à marron foncée du milieu a été un problème supplémentaire dans le cas des méthodes colorimétriques. La mise au point de méthodes de dosage d'activité enzymatique est délicate et nécessiterait de pouvoir s'y consacrer entièrement. Cela dit, les essais que nous avons pu mener ont permis de montrer la pertinence et l'intérêt de mettre au point des méthodes permettant de suivre les activités amylasique, cellulasique et protéinasique (mais pas lipasique).

Enfin, la mise au point d'un réacteur, permettant de simuler, à l'échelle du laboratoire, les conditions et le comportement des réacteurs industriels, a été réussie. Cet outil peut être mis à profit pour poursuivre l'étude des mécanismes de digestion par voie sèche.

2 Perspectives

L'objectif de ce travail était en partie d'identifier des voies de recherches pertinentes pour améliorer la connaissance et le suivi de la méthanisation par voie sèche. Cet objectif a été atteint dans le sens où de nouvelles questions s'offrent à nous quant aux mécanismes de la méthanisation par voie sèche. Les réponses à ces questions apporteront une meilleure connaissance de ces mécanismes et/ou des moyens techniques de contrôler les méthaniseurs.

Nous avons observé que la caractérisation des déchets solides nécessitait des outils spécifiques différents de ceux utilisés pour les déchets liquides. Le fractionnement en compartiments a été identifié comme pertinent à ce point de vue. Il faudra, à l'avenir, tester un plus grand nombre d'échantillons de déchets pour pouvoir déterminer la variabilité des mesures de fractionnement. Les échantillons étudiés devront être prélevés sur différents gisements et à différentes périodes de l'année. Il faudra mettre en relation la variabilité de compositions en différents compartiments de ces déchets et leur biodégradabilité. Il est également envisageable d'analyser des échantillons de digestats de différentes maturités, bien que les premiers résultats semblent indiquer que ce type d'expérience n'est pas exploitable.

Pour ce travail, notre choix s'est porté sur des déchets réels qui ont leur variabilité intrinsèque. Cependant, il sera pertinent par la suite de revenir vers des déchets "artificiels" ou "reconstitués" afin d'évaluer la variabilité et la reproductibilité des mesures. Cela permettra également d'avoir des échantillons plus homogènes pour des recherches fondamentales, et ces recherches permettront de répondre à plusieurs questions qui restent en suspens.

De quoi est composée la fraction soluble non identifiée ? Des mesures sous-traitées à un laboratoire privé (LARA, Toulouse) n'ont pas permis de l'identifier comme des composés humiques, des polyphénols ou des acides gras à longue chaîne.

Quel est le lien entre le compartiment A et la fraction hydrosoluble ? Pour répondre à cette question, il faudra réaliser des mesures de potentiel méthanogène avec un suivi de la cinétique de production de méthane sur les fractions solubles extraites. Les résultats seront comparés à ceux obtenus pour le déchet total. Ici encore, l'utilisation de déchets modèles artificiels pourra permettre d'obtenir des résultats plus exploitables. De nouvelles techniques de mesure en continu de la production de biogaz , sont en cours de mise en place au LBE et au CREED, ils permettront d'obtenir des profils de production de méthane plus précis et plus lissés.

Comment mesurer la quantité de matière du compartiment B ? Il sera envisageable, dans un premier temps, de procéder par différence entre le déchet total et les compartiments A et C. Cependant il sera très utile de mettre au point des méthodes de fractionnement, inspirées de celle de Van Sœst, pour séparer la matière organique en compartiments A, B et C. Il sera alors possible de répondre aux questions : De quoi est composé le compartiment B ? Quelle est l'importance relative du compartiment B dans la matière organique totale et dans la production de biogaz ?

Pour avancer dans l'identification des compartiments, une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation de la cellulose et des lipides serait un avantage. En effet, nous avons vu, dans le chapitre VI, que la cellulose existait sous plusieurs formes, dégradées par des enzymes différentes à des moments différents. Il se peut donc que la cellulose totale se répartisse dans différents compartiments. Il en va de façon similaire pour les lipides. Ils sont

hydrolysés en glycérol et en acides gras à longue chaîne. Le glycérol est consommé rapidement tandis que les acides gras à longue chaîne sont dégradés plus lentement sur une longue période.

La méthode d'échantillonnage des échantillons solides en vue des dosages de glucides, de protéines et de DCO totale doit être améliorée. Une manière de contourner ce problème, serait de remplacer l'étape de suspension dans l'eau distillée par une extraction des molécules à doser par une base ou un acide adapté pour chaque molécule. Cela nécessitera des travaux de mise au point méthodologique.

Une fois que les compartiments seront clairement identifiables, il sera très utile de pouvoir suivre leur devenir au cours de la méthanisation. Les mécanismes liés à leurs dégradations successives pourront être étudiés à l'aide d'observations des activités enzymatiques. Pour cela, l'adaptation des méthodes d'enzymologie à la matrice des digestats devra être poursuivie. Notamment, le protocole d'extraction devra être optimisé. Il est possible qu'il existe un protocole optimal pour chaque groupe d'enzyme à extraire. Un travail sur une matrice simplifiée pourra également permettre des mesures plus précises afin de dégager des connaissances fondamentales sur les mécanismes de dégradation. Des dosages d'activités enzymatiques plus précis permettront également de trouver des niveaux d'alertes témoins de problèmes comme une surcharge en un groupe de molécules organiques précis (protéines, glucides, etc.).

D'autres enzymes, impliquées dans la suite de la chaîne de dégradation de la matière organique, pourraient être également mesurées. Cependant, ces enzymes sont intracellulaires et il faudrait donc adapter un protocole d'extraction impliquant des étapes de lyse cellulaire et de purification.

Concernant la suite du travail réalisé ici, il sera très intéressant de suivre l'activité protéinasique dans des cas de charges organiques différentes de déchet carné. L'effet d'autres co-déchets, en charge normale et en surcharge, permettra de compléter le tableau des réponses enzymatiques face à la qualité et la quantité de matière organique. Parmi les co-déchets envisageables sont les déchets riches en glucides complexes (légumes) ou en glucides simples (fruits).

La mesure de la biodégradabilité et le suivi des cinétiques et des AGV pendant ces essais sera indispensable, de même qu'il sera intéressant de suivre la réponse enzymatique à l'inhibition par l'ammoniac. Ainsi, c'est en mettant en relation les différentes approches d'étude des mécanismes de méthanisation des déchets solides que le plus d'information sera obtenue. Une autre approche pour étudier en détail les voies métaboliques impliquées dans la digestion sèche serait l'utilisation d'un déchet modèle contenant des molécules marquées.

Les expériences sur l'inhibition par l'ammoniac devront être poursuivies. En premier lieu, il faut revenir sur les tests en fioles. Il faudra vérifier si l'utilisation d'un substrat complexe permet de mieux prédire les résultats obtenus en conditions réelles. La plage de valeurs des paramètres testés pourra être facilement élargie grâce à l'utilisation de la matrice de Doehlert qui permet de réutiliser les points déjà testés. En outre, le même travail devra être réalisé pour les températures mésophiles, avec 37°C comme la température de base. Enfin, il sera utile à l'interprétation des résultats de découpler l'apport d'inoculum et de matière sèche grâce à l'apport de matière sèche sous forme de matière inerte représentative au niveau physique de la matière sèche des déchets (plastique, bois sans cellulose, etc.).

Dans un second temps, il faudra compléter l'expérience en réacteur car un certain nombre de questions restent en suspens :

L'inhibition est-elle réversible ou y-a-t-il une forte mortalité cellulaire ? Il faudrait attendre plus longtemps en fin d'expérience tout en continuant à doser les AGV, le pH et l'ammoniac afin d'observer ou non une lente dégradation puis un redémarrage spontané de la réaction jusqu'à consommation totale des AGV. Il est aussi envisageable d'éliminer l'ammoniac, par stripage en faisant buller de l'azote, par exemple. Cela permettrait d'observer si c'est seulement la présence d'ammoniac qui empêche la réaction de redémarrer ou si, même une fois l'ammoniac retiré, les micro-organismes ne parviennent pas à se réactiver. Nous pourrions également vérifier si la diminution de la température permet de juguler une inhibition d'intensité moyenne.

Quelle est la capacité d'adaptation des micro-organismes en voie sèche ? Il faudrait réaliser de nouveau la même expérience avec des vitesses d'augmentation de la concentration en ammoniac plus lentes. Il est à noter que ces séries d'expériences seraient assez longues à réaliser, à moins de disposer de plusieurs réacteurs.

Quel est le rôle des AGV dans l'inhibition par l'ammoniac ? Sont-ils uniquement une conséquence de l'inhibition ou ont-ils un rôle inhibiteur en synergie avec l'ammoniac ? Ont-ils, au contraire, un rôle antagoniste vis-à-vis de l'ammoniac du fait de la diminution du pH qu'ils causent ? Pour répondre à ces questions, il faudrait réaliser des expériences où le pH pourrait être fixé à l'aide d'un tampon. Il faudrait aussi tester l'effet d'ajout d'AGV en présence et en absence de tampon.

Au chapitre des paramètres qui n'ont pas été testés, citons l'effet de l'agitation. De nombreuses expériences peuvent être réalisées en conditions d'agitation dégradée ou trop élevée. L'analyse des cinétiques et des accumulations d'AGV dans ces conditions nous éclairerait sur l'importance de l'agitation et sur la théorie de la formation de zones de méthanogenèse dans la digestion sèche. Ces phénomènes de transfert sont spécifiques à la voie sèche, car très dépendant de la quantité d'eau disponible (donc de la MS), et méritent donc d'être étudiés en détail.

Plusieurs travaux de modélisation peuvent être envisagés. On pourrait décomposer la méthanisation des déchets solides en trois parties correspondant aux trois compartiments A, B, C ayant chacun des caractéristiques cinétiques de dégradation spécifiques. Il est aussi envisageable de modéliser l'inhibition par l'ammoniac par un modèle structuré à partir des résultats obtenus en fioles.

Dans nombre des expériences futures préconisées ci-dessus, le réacteur de laboratoire qui a été mis au point sera très utile. Le principal perfectionnement dont il pourra faire l'objet concerne le système de soutirage qui est à l'étude en ce moment.

Pour conclure, ce travail est une contribution à l'amélioration de la méthanisation des déchets solides, en général et par voie sèche. Il s'inscrira dans un effort global d'amélioration du traitement des déchets et de production d'énergies renouvelables. Car, comme l'ont montré Gutowski *et al.* du MIT (2008), les changements de comportement individuels ne seront efficaces que s'ils sont accompagnés d'un changement généralisé des infrastructures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

La terre est un panier trop petit et fragile pour que la race humaine y mette tous ses oeufs.

[Robert Anson Heinlein]

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ADA.** 2007. Position of the American Dietetic Association: Food and nutrition professionals can implement practices to conserve natural resources and support ecological sustainability. Journal of the American Dietetic Association, **107** (6)**:**1033-1043.
2. **ADEME (ed.).** 1993. MODECOM^{TM}. Méthode de Caractérisation des Ordures Ménagères. Ademe, Angers.
3. **ADEME (ed.).** 1999. La composition des ordures ménagères en France (données et références). Ademe, Paris.
4. **ADEME.** 2004. Enquête sur les installations de traitement des ordures ménagères, ITOM 2004.
5. **ADEME.** 2006. Les déchets en chiffres. Direction Déchets et Sols, Septembre.
6. **Aguilar, A., Casas, C. et Lema, J.M.** 1995. Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: kinetics and inhibition. Water Research, **29** (2)**:**505-509.
7. **Ahring, B.K. et Westermann, P.** 1988. Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. Applied and Environmental Microbiology, **54** (10)**:**2393-2397.
8. **Ahring, B.K., Sandberg, M. et Angeladiki, I.** 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. Applied Microbiology and Biotechnology, **43:**559-565.
9. **Ahring, B.K.** 2003. Biomethanation, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin.
10. **Allison, M J.** 1978. Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **35** (5)**:**872-877.
11. **Ananthanarayan, R. et Jayaram Paniker, C.K.** 1978. Textbook of microbiology, 2nd ed. Orient Longman.
12. **Andi-Aconsult.** 2003-2004. Le marché de la méthanisation industrielle en France. Enquêtes qualitatives et quantitatives auprès des acteurs (collectivités et industriels), prospective à 15 ans. Gaz de France, Ademe.
13. **Angeladiki, I. et Ahring, B.K.** 1992. Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. Applied Microbiology and Biotechnology, **37:**808-812.
14. **Angeladiki, I. et Ahring, B.K.** 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. Applied Microbiology and Biotechnology, **38** (4)**:**560-564.
15. **Angeladiki, I., Ellegaard, L. et Ahring, B.K.** 1993. A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. Biotechnology and Bioengineering, **42:**159-166.
16. **Angeladiki, I. et Ahring, B.K.** 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. Water Research, **28** (3)**:**727-731.
17. **Angeladiki, I. et Sanders, W.** 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, **3:**117-129.

18. **Angeladiki, I., Boe, K. et Ellegaard, L.** 2005. Effect of operating conditions and reactor configuration on efficiency of full-scale biogas plants. Water Science and Technology, **52** (1-2)**:**189-194.

19. **Angeladiki, I., Chen, X., Cui, J., Kaparaju, P. et Ellegaard, L.** 2006. Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: Start-up procedure for continuously stirred tank reactor. Water Research, **40:**2621-2628.

20. **Araujo, P.W. et Brereton, R.G.** 1996. Experimental design II. Optimization. Trends in analytical chemistry, **15** (2)**:**63-70.

21. **Barlaz, M.A., Schaefer, D.M. et Ham, R.K.** 1989. Bacterial population development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated sanitary landfill. Applied and Environmental Microbiology, **55** (1)**:**55-65.

22. **Barredo, M.S. et Evison, L.M.** 1991. Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. Applied and Environmental Microbiology, **57** (6)**:**1764-1769.

23. **Batstone, D.J., Keller, J., Newell, R.B. et Newland, M.** 2000. Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. I: model development. Bioresource Technology, **75:**67-74.

24. **Bäumler, R. et Kögel-Knabner, I.** 2008. Spectroscopic and wet chemical characterization of solid waste organic matter of different age in landfill sites, southern Germany. Journal of Environmental Quality, **37** (1)**:**146-153.

25. **Bhattacharya, S.K. et Parkin, G.F.** 1989. The effect of ammonia on methane fermentation processes. Journal of the WPCF, **61** (1)**:**55-59.

26. **Bilgili, M.S., Demir, A. et Özkaya, B.** 2007. Influence of leachate recirculation on aerobic and anaerobic decomposition of solid wastes. Journal of Hazardous Materials, **143:**177-183.

27. **Bolzonella, D., Battistoni, P., Mata-Alvarez, J. et Cecchi, F.** 2003. Anaerobic digestion of organic solid wastes: process behaviour in transient conditions. Water Science and Technology, **48** (4)**:**1-8.

28. **Boopathy, R.** 1996. Isolation and characterization of a methanogenic bacterium from swine manure. Bioresource Technology, **55** (3)**:**231-235.

29. **Borja, R., Sanchez, E. et Weiland, P.** 1996. Influence of ammonia concentration on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Process Biochemistry, **31** (5)**:**477-483.

30. **Borzacconi, L., Lopez, I. et Anido, C.** 1997. Hydrolysis constant and VFA inhibition in acidogenic phase of MSW anaerobic degradation. Water Science and Technology, **36** (6-7)**:**479-484.

31. **Braber, K..** 1995. Anaerobic digestion of municipal solid waste: A modern waste disposal option on the verge of breakthrough. Biomass and Bioenergy, **9** (1-5)**:**365-376.

32. **Braun, R., Huber, P. et Meyrath, J.** 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. Biotechnology Letters, **3** (4)**:**159-164.

33. **Buffière, P., Loisel, D., Bernet, N. et Delgenes, J-P.** 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. Water Science and Technology, **53** (8)**:**233-241.

34. **Buffière, P. et Frederic, S.** 2008. Les technologies de la méthanisation des résidus solides. L'Eau, l'Industrie, les Nuisances, **Hors Série Spécial Traitements Anaérobies**.

35. **Buffière, P., Frederic, S., Marty, B. et Delgenes, J-P.** 2008. A comprehensive method for organic matter characterization in solid wastes in view of assessing their anaerobic biodegradability. *Vth International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops*, IWA Hammamet, Tunisia p. 7 *In press*.

36. **Bujoczek, G., Oleszkiewicz, J., Sparling, R. et Cenkowski, S.** 2000. High solid anaerobic digestion of chicken manure. Journal of Agricultural Engineering Research, **76:**51-60.

37. **Buswell, A.M. et Mueller, H.F.** 1952. Mechanism of methane fermentation. Industrial & Engineering Chemistry, **44** (3)**:**550.

38. **Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B. et Yenigun, O.** 2005. Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. Process Biochemistry, **40:**1285-1292.

39. **Cecchi, F., Traverso, P.G., Mata-Alvarez, J., Clancy, J. et Zaror, C.** 1988. State of the art of R&D in the anaerobic digestion process of municipal solid waste in Europe. Biomass, **16:**257-284.

40. **Cecchi, F., Mata-Alvarez, J., Pavan, P., Sans, C. et Merli, C.** 1992a. Semi-dry anaerobic digestion of MSW: influence of process parameters on the substrate utilization model. Water Science and Technology, **25** (7)**:**83-92.

41. **Cecchi, F., Pavan, P., Musacco, A., Mata-Alvarez, J. et Sans, C.** 1992b. Comparison between thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge coming from urban wastewater treatment plants. Water Science and Technology, **26** (9-11)**:**2409-2412.

42. **Chandler, J.A., Jewell, W.J., Gossett, J.M., Van Soest, P.J. et Robertson, J.B.** 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. Biotechnology and Bioengineering Symposium Series, **10:**93-107.

43. **Chavira, R. Jr., Burnett, T. J. et Hageman, J. H.** 1984. Assaying Proteinases with Azocoll. Analytical Biochemistry, **136:**446-450.

44. **Chen, Y., Cheng, J.J. et Creamer, K.S.** 2007. Inhibition on anaerobic digestion process: a review. Bioresource Technology, **in press** (doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057).

45. **Chen, Ye, Knappe, D.R.U. et Barlaz, M.A.** 2004. Effect of cellulose/hemicellulose and lignin on the bioavailability of toluene sorbed to waste paper. Environmental Science & Technology, **38** (13)**:**3731-3736.

46. **Chipasa, K.B. et Medrzycka, K.** 2006. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, **33:**635-645.

47. **Cho, J.K., Park, S.C. et Chang, H.N.** 1995. Biochemical methane potential and solid state anaerobic digestion of korean food wastes. Bioresource Technology, **52:**245-253.

48. **Chomsky, N.** 1999. Le profit avant l'homme. Fayard, Paris.

49. **Christ, O., Wilderer, P.A., Angerhöfer, R. et Faulstich, M.** 2000. Mathematical modelling of the hydrolysis of anaerobic processes. Water Science and Technology, **41** (3)**:**61-65.

50. **Chynoweth, D., Svoronos, S.A., Lyberatos, G., Harman, J.L., Pullammanappallil, P.C., Owens, J.M. et Peck, M.J.** 1994. Real-time expert system control of anaerobic digestion. Water Science and Technology, **30** (12)**:**21-29.

51. **Chynoweth, D.P., Turick, C.E., Owens, J.M., Jerger, D.E. et Peck, M.W.** 1993. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. Biomass and Bioenergy, **5** (1)**:**95-111.

52. **Chynoweth, D.P.** 1996. Environmental impact of biomethanogenesis. Environmental Monitoring and Assessment, **42:**3-18.

53. **Chynoweth, D.P., Owens, J.M. et Legrand, R.** 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. Renewable Energy, **22:**1-8.

54. **Couturier, C.** 2000. La méthanisation des déchets ménagers et assimilés. Solagro.

55. **Couturier, C., Berger, S. et Meiffren, I.** 2001. La digestion anaérobie des boues urbaines : état des lieux, état de l'art. Agence de l'eau Adour-Garonne & Solagro.

56. **Davidsson, A., Gruvberger, C., Christensen, T.H., Hansen, T.L. et La Cour Jansen, J.** 2007. Methane yield in source-sorted organic fraction of municipal solid waste. Waste Management, **27:**406-414.

57. **De Baere, L., Devocht, M., Van Assche, P. et Verstraete, W.** 1984. Influence of high NaCl and NH4Cl salt levels on methanogenic associations. Water Research, **18** (5)**:**543-548.

58. **De Baere, L.** 2000. Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art. Water Science and Technology, **41** (3)**:**283-290.

59. **De Baere, L.** 2006. Will anaerobic digestion of solid waste survive in the future? Water Science and Technology, **53** (8)**:**187-194.

60. **de Boer, J., Helms, M. et Aiking, H.** 2006. Protein consumption and sustainability: Diet diversity in EU-15. Ecological Economics, **59:**267-274.

61. **Degrémont (ed.).** 1989. Mémento technique de l'eau. Degrémont, Rueil-Malmaison.

62. **Dignac, MF., Houot, S., Francou, C. et Derenne, S.** 2005. Pyrolytic study of compost and waste organic matter. Organic Geochemistry, **36:**1054-1071.

63. **Dinamarca, S., Aroca, G., Chamy, R. et Guerrero, L.** 2003. The influence of pH in the hydrolytic stage of anaerobic digestion of the organic fraction of urban solid waste. Water Science and Technology, **48** (6)**:**249-254.

64. **Doehlert, D.H.** 1970. Uniform Shell design. Applied Statistics, **19:**231.

65. **Dreywood, R.** 1946. Qualitative test for carbohydrate material. Industrial & Engineering Chemistry Research, **18:**199.

66. **Eastman, J.A. et Ferguson, J.F.** 1981. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. Journal of the WPCF, **52** (3)**:**352-366.

67. **EIA.** 1997. Annual energy review. Energy Information Administration.

68. **Eleazer, W.E., Odle, W.S., Wang, YS. et Barlaz, M.A.** 1997. Biodegradability of municipal solid waste components in laboratory-scale landfills. Environmental Science & Technology, **31** (3)**:**911-917.

69. **Elefsiniotis, P., Wareham, D.G. et Oldham, W.K.** 1996. Particulate organic carbon solubilization in an acid-phase upflow anaerobic sludge blanket system. Environmental Science & technology, **30** (5)**:**1508-1514.

70. **El-Fadel, M., Findikakis, A.N. et Leckie, J.O.** 1996. Temperature effects in modelling solid waste biodegradation. Environmental Technology, **17:**915-935.

71. **Fahey, J.W. et Caplan, J.A.** 1981. New methodology for the rapid detection of protein degradation in activated sludge. Journal of environmental science and health, **B16** (1)**:**67-73.

72. **Fernandez, A., Sanchez, A. et Font, X.** 2005. Anaerobic co-digestion of a simulated organic fraction of municipal solid wastes and fats of animal and vegetable origin. Biochemical Engineering Journal, **26:**22-28.

73. **Ferreira, S.L.C., dos Santos, W.N.L., Bezerra, M.A., Lemos, V.A. et Bosque-Sendra, J.M.** 2003. Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimisation of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry.

74. **Ferreira, S.L.C., dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., Neto, B.B. et Bosque-Sendra, J.M.** 2004. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review. Talanta, **63:**1061-1067.

75. **Forsberg, Cecil W., Beveridge, Terrance J. et Hellstrom, Anita.** 1981. Cellulase and Xylanase Release from Bacteroides succinogenes and Its Importance in the Rumen Environment. Applied and Environmental Microbiology, **42** (5)**:**886-896.

76. **Forster-Carneiro, T., Pérez, M. et Romero, L.I.** 2008. Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. Bioresource Technology, **In press** (doi:10.1016/j.biortech.2008.01.052).

77. **Franke, M., Jandl, G. et Leinwaber, P.** 2007. Analytical pyrolysis of re-circulated leachates: Towards an improved municipal waste treatment. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, **79:**16-23.

78. **Frederic, S., Buffière, P., Marty, B. et Delgenes, J-P.** 2007. Importance of waste composition on the kinetics of hydrolysis and methane production inaerobic digestion: soluble and non-soluble fractions. *11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion*, IWA Brisbane (AU) p. Session 1A.

79. **Fricke, K., Santen, H., Wallmann, R., Hüttner, A. et Dichtl, N.** 2007. Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. Waste Management, **27:**30-43.

80. **Frolund, B., Griebe, T. et Nielsen, P.H.** 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. Applied Microbiology and Biotechnology, (43)**:**755-761.

81. **Fujishima, S., Miyahara, T. et Noike, T.** 2000. Effect of moisture content on anaerobic digestion of dewatered sludge: ammonia inhibition to carbohydrate removal and methane production. Water Science and Technology, **41** (3)**:**119-127.

82. **Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M. et Nagai, S.** 1990. Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. Applied and Environmental Microbiology, **56** (3)**:**719-723.

83. **Gallert, C. et Winter, J.** 1997. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. Applied Microbiology and Biotechnology, **48:**405-410.

84. **Gallert, C., Bauer, S. et Winter, J.** 1998. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. Applied Microbiology and Biotechnology, **50:**495-501.

85. **Georgescu-Roegen, N.** 1979. La décroissance: Entropie - Ecologie - Economie, 2 ed. Sang de la Terre, Paris.

86. **Gessesse, A., Dueholm, T., Petersen, S.T. et Nielsen, P.H.** 2003. Lipase and protease extraction from activated sludge. Water Research, **37:**3652-3657.

87. **Giddings, B., Hopwood, B. et O'Brien, G.** 2002. Environment, economy and society: fitting them together into sustainable development. Sustainable Development, **10** (4)**:**187-196.

88. **Glenn, A R.** 1976. Production of Extracellular Proteins by Bacteria. Annual Review of Microbiology, **30** (1)**:**41-62.

89. **Global Footprint Network** 2007, Humanity's footprint 1961-2003. last update: 10/05/2007.

    http://www.footprintnetwork.org/gfn_sub.php?content=global_footprint

90. **Goel, R., Mino, T., Satoh, H. et Matsuo, T.** 1997. Effect of electron acceptor conditions on hydrolytic enzyme synthesis in bacterial cultures. Water Research, **31** (10)**:**2597-2603.

91. **Goel, R., Mino, T., Satoh, H. et Matsuo, T.** 1998. Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under different electron acceptor conditions. Water Science and Technology, **37** (4/5)**:**335-343.

92. **Gomez, X., Cuetos, M.J., Cara, J., Moran, A. et Garcia, A.I.** 2006. 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, **31:**2017-2024.

93. **Goodwin, N., Ackerman, F. et Kiron, D. (ed.).** 1997. The consumer society. Island Press, Washington, DC.

94. **Gorris, L.G.M., van Deursen, J.M.A., van der Drift, C. et Vogels, G.D.** 1989. Inhibition of propionate degradation by acetate in methanogenic fluidized bed reactors. Biotechnology Letters, **11** (1)**:**61-66.

95. **Goupy, J.L.** 1990. Etude comparative de divers plans d'expériences. Revue de statistique appliquée, **38** (4)**:**5-44.

96. **Graaf, A. A. van de, Mulder, A., Bruijn, P. de, Jetten, M. S. M., Robertson, L. A. et Kuenen, J. G.** 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. Applied and Environmental Microbiology, **61** (4).

97. **Gutowski, T., Taplett, A., Allen, A., Banzaert, A., Cirinciore, R., Cleaver, C., Figueredo, S., Fredholm, S., Gallant, B., Jones, A., Krones, J., Kudrowitz, B., Lin, C., Morales, A., Quinn, D., Roberts, M., Scaringe, R., Studley, T., Sukkasi, S., Tomczak, M., Vechakul, J. et Wolf, M.** 2008. Environmental Life Style Analysis (ELSA). *International Symposium on Electronics and the Environment*, IEEE San Francisco USA. vol. 2 p. 1-5.

98. **Habig, C.** 1985. Influences of substrate composition on biogas yields of methanogenic digesters. Biomass, **8** (4)**:**245-253.

99. **Hansen, K.H., Angeladiki, I. et Ahring, B.K.** 1998. Anaerobic digestion of swine manure : inhibition by ammonia. Water Research, **32** (1)**:**5-12.

100. **Hansen, K.H.** 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. Water Research, **33** (8)**:**1805-1810.

101. **Hansen, T.L., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., Marca, E., La Cour Jansen, J., Mosbaek, H. et Christensen, T.H.** 2004. Method for determination of methane potential of solid organic waste. Waste Management, **24:**393-400.

102. **Hansen, T.L., la Cour Jansen, J., Davidsson, A. et Christensen, T.H.** 2007. Effects of pre-treatment technologies on quantity and quality of source -sorted municipal organic waste for biogas recovery. Waste Management, **27:**398-405.

103. **Hartmann, H. et Ahring, B.K.** 2005. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. Water Research, **39:**1543-1552.

104. **Hartmann, H. et Ahring, B.K.** 2006. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: An overview. Water Science and Technology, **53** (8)**:**7-22.

105. **Hashimoto, A.G.** 1986. Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle waste. Agricultural Wastes, **17:**241-261.

106. **Hawken, P., Lovins, A. et Lovins, L.H.** 1999. Natural Capitalism. Little Brown and Company.

107. **He, P-J., Lü, F., Shao, L-M., Pan, X-J. et Lee, D-C.** 2006. Enzymatic hydrolysis of polysaccharide-rich particulate organic matter. Biotechnology and Bioengineering, **93** (6)**:**1145-1151.

108. **Heinrichs, D.M., Poggi-Varaldo, H.M. et Oleszkiewicz, J.A.** 1990. Effects of ammonia on anaerobic digestion of simple organic substrates. Journal of Environmental Engineering, **116** (4)**:**698-710.

109. **Hendriksen, H.V. et Ahring, B.K.** 1991. Effects of ammonia on growth and morpholoy of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria. FEMS Microbial Ecology, **85:**241-246.

110. **Hickey, R.F. et Switzenbaum, M.S.** 1991. Thermodynamics of volatile fatty acid accumulation in anaerobic digesters subject to increases in hydraulic and organic loading. Research Journal of the WPCF, **63** (2)**:**141-144.

111. **Hills, D.J. et Nakano, K.** 1984. Effects of particle size on anaerobic digestion of tomato solid wastes. Agricultural Wastes, **10:**285-295.

112. **Hindrichsen, I.K., Wettstein, H.R., Machmuller, A., Jorg, B. et Kreuzer, M.** 2005. Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. Environmental Monitoring and Assessment, **107** (1-3)**:**329-350.

113. **Hobson, P.N. et Shaw, B.G.** 1976. Inhibition of methane production by *Methanobacterium formicicum*. Water Research, **10:**849-852.

114. **Hu, WS.** 2003. Stoichiometry and kinetics of cell growth and product formation. *Cell and Tissue Reactor Engineering*, University of Minnesota.

115. **Hwu, CS., van Beek, B., van Lier, J.B. et Lettinga, G.** 1997. Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: effect of washed out biomass recirculation. Biotechnology Letters, **19:**453-456.

116. **IEA.** 2004. Synthèse, Task 37, Groupe de travail sur les bio-énergies. International Energy Agency.

117. **International, AND.** 2003. Le marché de la méthanisation en France : Hypothèses d'évolution à 5 et 10 ans. GDF - ADEME.

118. **IPCC.** 2007. Climate change 2007: The physical science basis. International Panel on Climate Change.

119. **Jarrell, K. F., Saulnier, M. et Ley, A.** 1987. Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. Canadian Journal of Microbiology, **33** (6)**:**551-554.

120. **Jewell, W.J., Kim, TW., Alvarez, C.J. et Montserrat, P.G.** 1999. Anaerobic composting of animal waste: diary system. *Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes*, Barcelona. vol. 1 p. 107-112.

121. **Jin, P., Bhattacharya, S.K., Williama, C.J. et Zhang, H.** 1998. Effects of sulfide addition on copper inhibition in methanogenic systems. Water Research, **32** (4)**:**977-988.

122. **Jokela, J. et Rintala, J.** 2003. Anaerobic solubilisation of nitrogen from municipal solid waste (MSW). Reviews in Environmental Science and Biotechnology, **2:**67-77.

123. **Jones, K.L. et Grainger, J.M.** 1983. The application of enzyme activity measurements to a study of factors affecting protein, starch and cellulose fermentation in domestic refuse. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, **18:**181-185.

124. **Jorgensen, S.E. et Halling-Sorensen, B.** 1993. Nitrogen compounds as pollutants. p. 3-40. *In* The removal of nitrogen compounds from wastewater, S. E. Jorgensen (ed.). Elsevier, Amsterdam.

125. **Karim, K., Klasson, K.T., Hoffmann, R., Drescher, S.R., DePaoli, D.W. et Al-Dahhan, M.H.** 2005. Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mixing. Bioresource Technology, **96:**1607-1612.

126. **Kayhanian, M. et Tchobanoglous, G.** 1993. Innovative two-stage process for the recovery of energy and compost from the organic fraction of municipal solid waste (MSW). Water Science and Technology, **27** (2)**:**133-143.

127. **Kayhanian, M. et Rich, D.** 1995. Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrient requirements. Biomass and Bioenergy, **8** (6)**:**433-444.

128. **Kayhanian, M.** 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. Environmental Technology, **20:**355-365.

129. **Kiely, G., Tayfur, G., Dolan, C. et Tanji, K.** 1997. Physical and mathematical modelling of anaerobic digestion of organic wastes. Water Research, **31** (3)**:**534-540.

130. **Kim, I.S., Hwang, M.H., Jang, N.J., Hyun, S.H. et Lee, S.T.** 2004. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. International Journal of Hydrogen Energy, **29** (11)**:**1133 – 1140.

131. **Kim, J.K., Cho, J.H., Lee, J.S., Hahm, K.S., Park, D.H. et Kim, S.W.** 2002. Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment. Applied Biochemistry and Biotechnology, **98-100:**753-764.

132. **Komilis, D.P. et Ham, R.K.** 2003. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes. Waste Management, **23:**419-423.

133. **Koster, I. W. et Lettinga, G.** 1984. The influence of Ammonium-Nitrogen on the Specific Activity of Pelletized Methanogenic Sludge. Agricultural Wastes, **9:**205-216.

134. **Koster, I. W.** 1986. Characteristics of the pH-influenced adaptation of methanogenic sludge to ammonium toxicity. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **36:**445-455.

135. **Koster, I. W. et Koomen, E.** 1988. Ammonia inhibition of the maximum growth rate (µm) of hydrogenotrophic methanogens at various pH-levels and temperatures. Applied Microbiology and Biotechnology, **28:**500-505.

136. **Koster, I. W. et Lettinga, G.** 1988. Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. Biological Wastes, **25:**51-59.

137. **Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B. et Lapp, H.M.** 1979. Anaerobic treatment process stability. Journal of the WPCF, **51** (4)**:**718-727.

138. **Krylova, N.I., Khabiboulline, R.E., Naumova, R.P. et Nagel, M.A.** 1997. The influence of ammonium, and methods for removal during the anaerobic treatment of poultry manure. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **70:**99-105.

139. **Kugelman, I.J. et McCarthy, P.L.** 1965. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. Journal of the WPCF, **37:**97-115.

140. **Kugelman, I.J. et Chin, K.K.** 1970. Toxicity, synergism, and antagonism in anaerobic waste treatment processes. *Anaerobic Biological Treatment Processes*, American Chemical Society (Washington DC) Houston (Texas), February 26 p. 64-71.

141. **Kylefors, K., Andreas, L. et Lagerkvist, A.** 2003. A comparison of small-scale, pilot-scale and large-scale tests for predicting leaching behaviour of landfilled wastes. Waste Management, **23** (1)**:**45–59.

142. **Lai, T.E., Nopharatana, A., Pullammanappallil, P.C. et Clarke, W.P.** 2001. Cellulolytic activity in leachate during leach-bed anaerobic digestion of municipal solid waste. Bioresource Technology, **80:**205-210.

143. **Lalman, J.A. et Bagley, D.M.** 2000. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. Water Research, **34** (17)**:**4220-4228.

144. **Lay, J.J., Li, Y.Y. et Noike, T.** 1997a. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. Water Research, **31** (6)**:**1518-1524.

145. **Lay, J.J., Li, Y.Y., Noike, T., Endo, J. et Ishimoto, S.** 1997b. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste. Water Science and Technology, **36** (6/7)**:**493-500.

146. **Lay, J.J., Li, Y.Y. et Noike, T.** 1998. The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion processes. Water Environment Research, **70** (5)**:**1075-1082.

147. **Le Bihan, Y. et Lessard, P.** 2000. Use of enzyme tests to monitor the biomass activity of a trickling biofilter treating domestic wastewaters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **75:**1031-1039.

148. **Lehman, Glen.** 1996. Environmental accounting: Pollution permits or selling the environment. Critical Perspectives on Accounting, **7** (6)**:**667-676.

149. **Lemaire, O., Buffière, P., Milhau, C., Arribas, R. et Carrère, M.** 2005. Biomethanisation expertise improvement by pilot and full scale unit follow-up: Project development and first results. *Anaerobic Digestion of Solid Waste*, Copenhagen, August 31 - September 2. vol. 2 p. 195-200.

150. **Liu, D., Liu, D., Zeng, R.J. et Angeladiki, I.** 2006a. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. Water Research, **40:**2230-2236.

151. **Liu, G. T., Peng, X. Y. et Long, T. R.** 2006b. Advance in high-solid anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. Journal of Central South University of Technology, **13:**151-157.

152. **Liu, T. et Sung, S.** 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlasic methanogens. Water Science and Technology, **45:**113-120.

153. **Lopez, I., Passeggi, M. et Borzacconi, L.** 2006. Co-digestion of ruminal content and blood from slaughterhouse industries: influence of solid concentration and ammonium generation. Water Science and Technology, **54** (2)**:**231-236.

154. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fau, A.L. et Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin reagent. Journal of Biological Chemistry, **193:**265-275.

155. **Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. et Pretorius, I.S.** 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **66** (3)**:**507-577.

156. **Mace, S., Bolzonella, D., Cecchi, F. et Mata-Alvarez, J.** 2003. Comparison of the biodegradability of the grey fraction of municipal solid waste of Barcelona in mesophilic and thermophilic conditions. Water Science and Technology, **48** (4)**:**21-28.

157. **Malherbe, S. et Cloete, T.E.** 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, **1:**105-114.

158. **Mallard, P., Rogeau, D., Gabrielle, B., Vignoles, M., Sablayrolles, C., Le Corff, V., Carrère, M., Renou, S., Vial, E., Muller, O., Pierre, N. et Coppin, Y.** 2005. Impacts environnementaux de la gestion biologique des déchets. ADEME.

159. **Malthus, T.R.** 1798. An essay on the principle of population, 6 ed. J. Johnson, London.

160. **Marx, K.** 1844. The economic and philosophical manuscripts of 1844.

161. **Mata-Alvarez, J., Cecchi, F., Pavan, P. et Bassetti, A.** 1993. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of fresh and pre-composted organic fraction of municipal solid waste (MSW): digester performance. Water Science and Technology, **27** (2)**:**87-96.

162. **Mata-Alvarez, J., Mace, S. et Llabres, P.** 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. Bioresource Technology, **74** (1)**:**3-16.

163. **Mata-Alvarez, J.** 2003. Fundamentals of the anaerobic digestion process. p. 1-20. *In* Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes, J. Mata-Alvarez (ed.). IWA Publishing, London.

164. **Matthies, Carola et Schink, Bernhard.** 1992. Reciprocal Isomerization of Butyrate and Isobutyrate by the Strictly Anaerobic Bacterium Strain WoG13 and Methanogenic Isobutyrate Degradation by a Defined Triculture. Appl. Environ. Microbiol., **58** (5)**:**1435-1439.

165. **Maunoir, S., Sabil, N., Rambaud, A., Philip, H. et Coletti-Previero, M.A.** 1991. Role of insoluble enzymes in anaerobic wastewater treatment and enzyme-bioactivator interactions. Environmental Technology, **12:**313-323.

166. **Mawson, A.J., Earle, R.L. et Larsen, V.F.** 1991. Degradation of acetic and propionic acids in the methane fermentation. Water Research, **25** (12)**:**1549.

167. **McClure, W.F.** 2003. Review: 204 years of near infrared technology: 1800-2003. Journal of Near Infrared Spetroscopy, **11:**487-518.

168. **McMahon, K.D., Stroot, P.G., Mackie, R.I. et Raskin, R.** 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions II: Microbial population dynamics. Water Research, **35** (7)**:**1817-1827.

169. **Meadows, D.H., Meadows, D.L., Randers, J. et Behrens III, W.W.** 1972. Limits to growth, 1 ed. Universe Books.

170. **Moller, H.B., Sommer, S.G. et Ahring, B.K.** 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. Biomass and Bioenergy, **26:**485-495.

171. **Moriarty, P. et Honnery, D.** 2008. Mitigating greenhouse: Limited time, limited options. Energy Policy, **36:**1251-1256.

172. **Mösche, M. et Jördening, HJ.** 1999. Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. Water Research, **33** (11)**:**2545-2554.

173. **Moutet, S., Bugel, JP., Cecchi, JM. et Giouse, F.** 2004. Réalisation d'un référentiel technique et économique d'unités de traitement de déchets organiques par méthanisation avec et sans valorisation du biogaz. Rapport d'étude. ADEME.

174. **Mshandete, A., Bjornsson, L., Kivaisi, A.K., Rubindamayugi, S.T. et Mattiasson, B.** 2005. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. Water Research, **39:**1569-1575.

175. **Mshandete, A., Bjornsson, L., Kivaisi, A.K., Rubindamayugi, M.S.T. et Mattiasson, B.** 2006. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. Renewable Energy, **31:**2385-2392.

176. **Nallathambi Gunaseelan, V.** 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. Biomass and Bioenergy, **26** (4)**:**389-399.

177. **Nallathambi Gunaseelan, V.** 2007. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. Bioresource Technology, **98:**1270-1277.

178. **Nielsen, H.B., Uellendahl, H. et Ahring, B.K.** 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. Biomass and Bioenergy, **31:**820-830.

179. **Nopharatana, A., Clarke, W.P., Pullammanappallil, P.C., Silvey, P. et Chynoweth, D.P.** 1998. Evaluation of methanogenic activities during anaerobic digestion of municipal solid waste. Bioresource Technology, **64:**169-174.

180. **Nozhevnikova, A.N., Rebak, S., Kotsyurbenko, O.R., Parshina, S.N., Holliger, C. et Lettinga, G.** 2000. Anaerobic production and degradation of volatile fatty acids in low temperature environments. Water Science and Technology, **41** (12)**:**39-46.

181. **Omil, F., Mendez, R. et Lema, J.M.** 1995. Anaerobic treatment of saline wastewater under high sulphide and ammonia content. Bioresource Technology, **54** (3)**:**269-278.

182. **Owens, J.M. et Chynoweth, D.** 1993. Biochemical methane potential of MSW components. Water Science and Technology, **27** (2)**:**1-14.

183. **Özeler, D., Yetis, Ü et Demirer, G.N.** 2006. Life cycle assessment of municipal solid waste management methods: Ankara case study. Environment International, **32:**405-411.

184. **Ozturk, Mustafa.** 1991. Conversion of acetate, propionate and butyrate to methane under thermophilic conditions in batch reactors. Water Research, **25** (12)**:**1509-1513.

185. **Palmisano, A.C., Schwab, B.S. et Maruscik, D.A.** 1993. Hydrolytic enzyme activity in landfill refuse. Applied Microbiology and Biotechnology, **38:**828-832.

186. **Palmowski, L.M. et Müller, J.A.** 2000. influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. Water Science and Technology, **41** (3)**:**155-162.

187. **Parawira, W., Murto, M., Read, J.S. et Mattiasson, B.** 2005. Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. Process Biochemistry, **40:**2945-2952.

188. **Parkin, G.F., Speece, R.E., Yang, C.H.G. et Kocher, W.M.** 1983. Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. Journal of the WPCF, **55** (1)**:**44-53.

189. **Parnaudeau, V., Nicolardot, B. et Pagès, J.** 2004. Relevance of organic matter fractions as predictors of wastewater sludge mineralization in soil. Journal of Environmental Quality, **33:**1885-1894.

190. **Pavan, P., Battistoni, P., Mata-Alvarez, J. et Cecchi, F.** 1999. Performance of thermophilic semi-dry anaerobic digestion process changing the feed biodegradability. *Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes*, Barcelona, 15-18 June. vol. 1 p. 57-64.

191. **Pavlostathis, S.G., Miller, T.L. et Wolin, M.J.** 1988. Kinetics of insoluble cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. Applied and Environmental Microbiology, **54** (11)**:**2660-2663.

192. **Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E. et Mielenz, J.R.** 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, **24:**452-481.

193. **Peres, C.S., Sanchez, C.R., Matumoto, C. et Schmidell, W.** 1992. Anaerobic biodegradability of the organic components of municipal solid wastes (OFMSW). Water Science and Technology, **25** (7)**:**285-293.

194. **Petre, Jean, Longin, Robert et Millet, Jacqueline.** 1981. Purification and properties of an endo-[beta]-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. Biochimie, **63** (7)**:**629-639.

195. **Pfeffer, J.T.** 1974. Temperature effects on anaerobic fermentation of domestic refuse. Biotechnology and Bioengineering, **16:**771-787.

196. **Philip, H., Maunoir, S., Rambaud, A. et Philippi, L.S.** 1993. Septic tank sludges: accumulation rate and biochemical characteristics. Water Science and Technology, **28** (10)**:**57-64.

197. **Pichler, M. et Kögel-Knaber, I.** 2000. Waste management : Chemolytic analysis of organic matter during aerobic and anaerobic treatment of municipal solid waste. Journal of Environmental Quality, **29:**1337-1344.

198. **Pimentel, D. & M.** 2003. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. American Journal Of Clinical Nutrition, **78(suppl):**660S-663S.

199. **Pind, P.F., Angeladiki, I. et Ahring, B.K.** 2003. Dynamics of the anaerobic process: Effects of volatile fatty acids. Biotechnology and Bioengineering, **82** (7)**:**791-801.

200. **Poggi-Varaldo, H.M. et Oleszkiewicz, J.A.** 1992. Anaerobic co-composting of municipal solid waste and waste sludge at high total solids levels. Environmental Technology, **13:**409-421.

201. **Poggi-Varaldo, H.M., Esparza-Garcia, F., Fernandez-Villagomez, G., Caffarel-Mendez, S. et Arce-Medina, E.** 1997a. Empirical and kinetic modeling of solid substrate anaerobic digestion (DASS) for joint municipal-industrial waste satbilization. *52nd Purdue Industrial Waste Conference*, Ann Arbor Press Purdue (USA) p. 319-335.

202. **Poggi-Varaldo, H.M., Rodriguez-Vazquez, R., Fernandez-Villagomez, G. et Esparza-Garcia, F.** 1997b. Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. Applied Microbiology and Biotechnology, **47:**284-291.

203. **Pullammanappallil, P.C., Chynoweth, D., Lyberatos, G. et Svoronos, S.A.** 2001. Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid. Bioresource Technology, **78** (2)**:**165-169.

204. **R Development Core Team.** 2007. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

205. **Raunkjaer, K., Hvitved-Jacorbsen, T. et Halkjaer Nielsen, P.** 1994. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. Water Research, **28** (2)**:**251-262.

206. **Reijinders, L. et Soret, S.** 2003. Quantification of the environmental impact of different dietary protein choices. American Journal Of Clinical Nutrition, **78 (suppl):**664S-668S.

207. **Richards, S.R., Hastwell, C. et Davies, M.** 1984. The comparative Examination of 14 Activated-Sludge Plants Using Enzymatic Techniques. Water Pollution Control**:**300-313.

208. **Rivard, C.J., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., Adney, W.S., Wyman, C.E. et Grohmann, K.** 1990. Anaerobic digestion of processed municipal solid waste using a novel high solids reactor: maximum solids levels and mixing requirements. Biotechnology Letters, **12** (3)**:**235-240.

209. **Rivard, C.J., Nagle, N.J., Adney, W.S. et Himmel, M.E.** 1993. Anaerobic bioconversion of municipal solid wastes: effect of total solids levels on microbial numbers and hydrolytic activites. Applied Biochemistry and Biotechnology, **39/40:**107-117.

210. **Rivers, D.B. et Emert, G.H.** 1988. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components. Biotechnology and Bioengineering, **31:**278-281.

211. **Robbins, J.E., Gerhardt, S.A. et Kappel, T.J.** 1989. Effects of total ammonia on anaerobic digestion and an example of digestor performance from cattle manure - protein mixtures. Biological Wastes, **27:**1-14.

212. **Rosnick, D. et Weisbrot, M.** 2006. Are shorter work hours good for the environment? Center for Economic and Policy Research, Washington.

213. **Russell, J.B. et Jeraci, J.L.** 1984. Effect of carbon monoxide on fermentation of fiber, starch, and amino acids by mixed rumen microorganisms in vitro. Applied and Environmental Microbiology, **48** (1).

214. **Ryan, J.C. et Durning, A.T.** 1997. Stuff: The secret lives of everyday things. Northwest Environment Watch.

215. **Sabil, N.** 1991. Activités enzymatiques dans des boues résiduaires anaérobies. Thèse de doctorat, Université de Montpellier I, Unités de formation et de recherche pharmaceutiques, Montpellier, France.

216. **Sanders, W., Geerink, M., Zeeman, G. et Lettinga, G.** 2000. Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates. Water Science and Technology, **41** (3)**:**17-24.

217. **Sanders, W.** 2001. Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen.

218. **Savant, D.V., Shouche, Y.S., Prakash, S. et Ranade, D.R.** 2002. *Methanobrevibacter acididurans sp nov.*, a novel methanogen from a sour anaerobic digester. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **55** (4)**:**1081-1087.

219. **Schmidell, W., Craveiro, A.M., Peres, C.S., Hirata, Y.S. et Varella, R.F.** 1986. Anaerobic digestion of municipal solid wastes. Water Science and Technology, **18** (12)**:**163-175.

220. **Sharma, S.K., Mishra, I.M., Sharma, M.P. et Saini, J.S.** 1988. Effect of particle size on biogas generation from biomass residues.

221. **Siegert, I. et Banks, C.** 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. Process Biochemistry, **40:**3412-3418.

222. **Siegriest, H., Renggli, D. et Gujer, W.** 1993. Mathematical modelling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment. Water Science and Technology, **27** (2)**:**25-36.

223. **Six, W. et De Baere, L.** 1992. Dry anaerobic conversion of municipal solid waste by means of the DRANCO process. Water Science and Technology, **25** (7)**:**295-300.

224. **Smidt, E., Lechner, P., Schwanninger, M., Haberhauer, G. et Gerzabek, M.H.** 2002. Characterization of waste organic matter by FT-IR spectroscopy: Application in waste science. Applied Spectroscopy, **56** (9)**:**1170-1175.

225. **Smidt, E. et Meissl, K.** 2007. The applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management. Waste Management, **27:**268–276.

226. **Smidt, E., Meissl, K., Schwanninger, M. et Lechner, P.** 2007. Classification of waste materials using Fourier transform infrared spectroscopy and soft independent modeling of class analogy. Waste Management, **in press**.

227. **Sossa, K., Alarcon, M., Aspé, E. et Urrutia, H.** 2004. Effect of ammonia on the methanogenic activity of methylaminotrophic methane producing Archaea enriched biofilm. Anaerobe, **10** (1)**:**13-18.

228. **Soto, M., Mendez, R. et Lema, J.M.** 1993. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental setup. Water Research, **27** (8)**:**1361-1376.

229. **Speece, R.E.** 1996. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press, Nashville, TN.

230. **Sprott, G.D., Shaw, K.M. et Jarrell, K. F.** 1984. Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria. Journal of Biological Chemistry, **259** (20)**:**12602.

231. **Sprott, G.D. et Patel, G.B.** 1986. Ammonium toxicity in pure culture methanogenic bacteria. Systematic and Applied Microbiology, **7:**358.

232. **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** (7)**:**1804-1816.

233. **Sung, S. et Liu, T.** 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. Chemosphere, **53:**43-52.

234. **Sztajer, H. et Maliszewska, I.** 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme and Microbial Technology, **10:**492-497.

235. **Takashima, M. et Speece, R.E.** 1989. Mineral nutrient requirements for high-rate methane fermentation of acetate at low SRT. Research Journal of the WPCF, **61** (11/12)**:**1645-1650.

236. **Tommaso, G., Ribeiro, R., Varesche, M.B.A., Zalat, M. et Foresti, E.** 2003. influence of multiple substrates on anaerobic protein degradation in a packed-bed bioreactor. Water Science and Technology, **48** (6)**:**23-31.

237. **Tong, X., Smith, L.H. et McCarthy, P.L.** 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. Biomass, **21:**239-255.

238. **TSM.** 2006. Vade-Mecum du porteur de projet de méthanisation des déchets des collectivitées. Techniques, Sciences, Méthodes, **4:**24-66.

239. **Ubukata, Y.** 1992. Kinetics of polymeric substrate removal by activated sludge: hydrolysis of polymers is the rate-determining step. Water Science and Technology, **26:**2457-2460.

240. **Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M. et Igarashi, Y.** 2006. Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. Journal of Applied Microbiology, **101** (2)**:**331-343.

241. **van Lier, J.B., Grolle, K.C.F. et Frijters, C.T.M.J.** 1993. Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. Applied and Environmental Microbiology, **59** (4)**:**1003-1011.

242. **Van Soest, P.J.** 1963. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fibre and lignin. Journal of the Association of Analytical Chemistry, **46** (5)**:**829-835.

243. **Van Soest, P.J. et Wine, R.H.** 1967. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds IV. Determination of plant cell wall constituents. Journal of the Association of Analytical Chemistry, **50** (1)**:**50-55.

244. **Van Velsen, A.F.M.** 1979. Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. Water Research, **13:**995-999.

245. **Vavilin, V.A.** 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. Bioresource Technology, **56:**229-237.

246. **Vavilin, V.A. et Angeladiki, I.** 2004. Anaerobic degradation of solid material: importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. Biotechnology and Bioengineering, **89** (1)**:**114-122.

247. **Vedrenne, F.** 2007. Etude des processus de dégradation anaérobie et de production de méthane au cours du stockage des lisiers. Thèse de doctorat, Ecole National Supérieure d'Agronomie, Rennes.

248. **Vedrenne, F., Béline, F., Dabert, P. et Bernet, N.** 2007. The effect of incubation conditions on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock wastes. Bioresource Technology, **In press**.

249. **Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H. et Hamelers, B.** 2000. Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. Journal of Environmental Engineering**:**1076-1081.

250. **Vermeulen, J., Huysmans, A., Crespo, M., Van Lierde, A., De Rycke, A. et Verstraete, W.** 1993. Processing of biowaste by anaerobic composting to plant growth substrates. Water Science and Technology, **27** (2)**:**109-119.

251. **Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R. et Lema, J.M.** 2000. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. Bioresource Technology, **74:**231-239.

252. **Vigneron, V.** 2005. Voies de réduction de oxydes d'azote lors de leur injection dans un massif de déchets ménagers et assimilés. Thèse de doctorat, Université Paris-XII, Val-de-Marne.

253. **Wang, Y.S., Odle, W.S., Eleazer, W.E. et Barlaz, M.A.** 1997. Methane potential of food waste and anaerobic toxicity of leachate produced during food waste decomposition. Waste Management and Research, **15:**149-167.

254. **Wheatley, A.** 1990. Anaerobic digestion: A waste treatment technology. Elsevier Applied Science.

255. **Wiegant, W. M. et Zeeman, G.** 1986. The mechanism of ammonia inhibition in the thermophilic digestion of livestock wastes. Agricultural Wastes, **16** (4)**:**243-253.

256. **Wujcik, W.J. et Jewell, W.J.** 1980. Dry anaerobic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. vol. 10 p. 43-65.

257. **Yu, HQ. et Fang, H.H.P.** 2002. Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. Water Science and Technology, **45** (10)**:**201-206.

258. **Zeeman, G. et Sanders, W.** 2001. Potential of anaerobic digestion of complex waste(water). Water Science and Technology, **44** (8)**:**115-122.

259. **Zhang, B., He, P-J., Lü, F., Shao, L-M. et Wang, P.** 2007. Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. Water Research, **41:**4468-4478.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PROGRAMMATION DU LOGICIEL "R" POUR LE LISSAGE DES COURBES DE PRODUCTION DE GAZ ET LA DETERMINATION DE LA DERIVEE MAXIMALE 213

ANNEXE 2 : COMPARAISON DES DOSAGES D'AGV REALISES SUR PLACE SUR LE SITE INDUSTRIEL ET APRES ENVOI AU LABORATOIRE. 215

ANNEXE 3 : QUELQUES PROTOCOLES D'EXTRACTION ENZYMATIQUE 229

ANNEXE 4 : MESURES D'ACTIVITE AMYLASIQUE 231

ANNEXE 5 : MESURES D'ACTIVITE CELLULASIQUE 233

ANNEXE 6: MESURES D'ACTIVITE PROTEASIQUE (AZOCOLL) 235

ANNEXE 7 : MESURES D'ACTIVITE PROTEASIQUE (CASEINE ET AZOCASEIN) 237

ANNEXE 8 : MESURES D'ACTIVITE LIPASIQUE 239

ANNEXE 9 : PROTOCOLE D'EXTRACTION ENZYMATIQUE 241

ANNEXE 10 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE AMYLASIQUE 243

ANNEXE 11 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE CELLULASIQUE 245

ANNEXE 12 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE PROTEINASIQUE 247

ANNEXE 13 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE LIPASIQUE 249

ANNEXE 1 : PROGRAMMATION DU LOGICIEL "R" POUR LE LISSAGE DES COURBES DE PRODUCTION DE GAZ ET LA DETERMINATION DE LA DERIVEE MAXIMALE

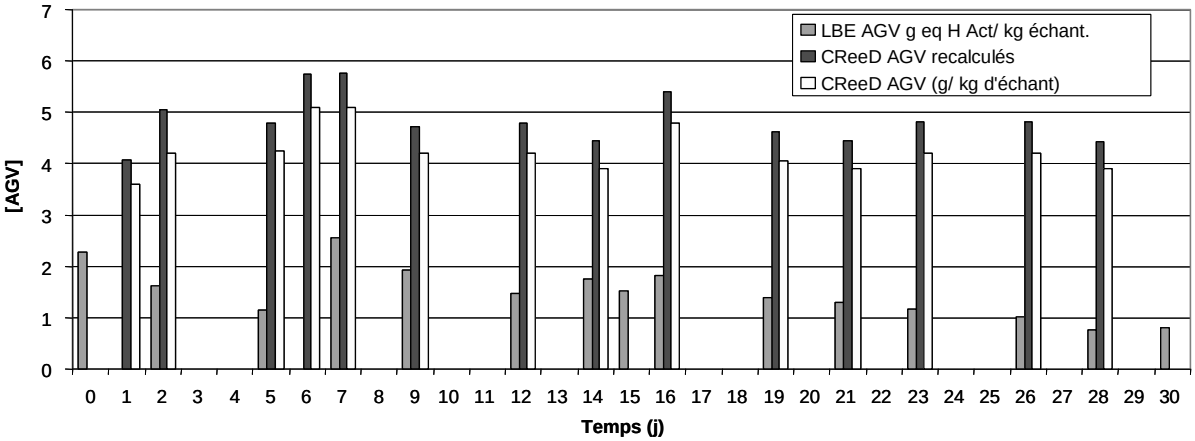
(R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2007)

```
don<-
read.table("C:/Documents and Settings/Administrateur/Mes documents/these/Résultats/Seuils
Inhibiteurs/donnees.txt",header=T,dec=",",sep="\t")
xx<-seq(0,max(don[,1]),by=0.1)
don1<-smooth.spline(don,spar=0.2)
don2<-smooth.spline(don,spar=0.3)
don3<-smooth.spline(don,spar=0.4)
y1<-predict(don1,xx)
y2<-predict(don2,xx)
y3<-predict(don3,xx)
deriv1<-predict(don1,xx,deriv=1)
deriv2<-predict(don2,xx,deriv=1)
deriv3<-predict(don3,xx,deriv=1)
layout(matrix(c(1:6),2,3))
layout.show(6)
plot(don,main=c("graph1, spar:",don1$spar))
lines (predict(don1, xx), col = 2)
plot (deriv1,main=c("derivée max :",max (deriv1$y)))
plot(don,main=c("graph2, spar:",don2$spar))
lines (predict(don2, xx), col = 2)
plot (deriv2,main=c("derivée max :",max (deriv2$y)))
plot(don,main=c("graph3, spar:",don3$spar))
lines (predict(don3, xx), col = 2)
plot (deriv3,main=c("derivée max :",max (deriv3$y)))
max (deriv1$y)
max (deriv2$y)
max (deriv3$y)
```

ANNEXE 2 : COMPARAISON DES DOSAGES D'AGV REALISES SUR PLACE SUR LE SITE INDUSTRIEL ET APRES ENVOI AU LABORATOIRE.

Organisation de l'expérience

Sur le site industriel, différentes mesures ont été réalisées pour suivre la concentration en acides gras volatils (AGV) des digestats. Cependant des divergences importantes sont observables entre les mesures qui sont réalisées à sur le site industriel par le CREED et celles réalisées, ici, au LBE (**Graphe 1)**
Ces différences varient entre 66 et 135 % de la valeur moyenne et sont de 100 % en moyenne.



Graphe 1 : Différences entre les résultats obtenus au sur site et ceux du LBE

Nous supposons que ces divergences peuvent-être dues :

- Aux différentes méthodes: en effet, sur site, la méthode par titrimétrie a été utilisée pour connaître la concentration en AGV Totale alors qu'au LBE c'est la méthode par chromatographie qui permet de connaître la nature et la concentration des AGV dans l'échantillon.
- A la méthode de calcul : Au LBE, la matière sèche est prise en compte dans le résultat alors que sur site seule la dilution de l'échantillon est prise en compte.
- Aux différents temps d'agitation : En effet au LBE, l'échantillon est mis sous agitation pendant 30 minutes alors que sur site le temps d'agitation est de 5 minutes. Nous pouvons supposer que pendant ces 30 minutes certains AGV ont le temps de s'évaporer.
- Au transport : Le transport peut être une cause de différences car durant le transport l'échantillon est congelé puis décongelé. Nous pouvons donc supposer qu'il y a une dénaturation de l'échantillon.

Test sur l'agitation

Trois échantillons sont prélevés sur un même digestat. Pour chacun des échantillons, 10 g de digestat sont prélevés aux quels 30 mℓ d'eau sont ajoutés.

- *Le temps d'agitation*

- Premier échantillon : il est placé pendant 5 minutes en agitation à l'aide d'un agitateur magnétique et à l'air libre.
- Deuxième échantillon : il est placé pendant 30 minutes en agitation et à l'air libre.

- Troisième échantillon : il est placé dans une fiole hermétique pendant 30 minutes en agitation.

Pour chaque échantillon la concentration en AGV sera mesurée en triple afin d'observer la régularité des mesures à l'aide de la méthode par chromatographie. Cependant, dans cette expérience pour les trois échantillons la vitesse d'agitation n'était pas contrôlée.

➢ *Avec la même vitesse d'agitation 200 trs/mn mais pas le même temps*

Cette expérience est réalisée sur deux échantillons provenant du même digestat, avec les mêmes proportions (c'est à dire 10 g de digestat dans 30 mℓ d'eau), avec le même système d'agitation (appareil d'agitation + agitateur magnétique) et avec la même vitesse d'agitation 200 trs/min. Ainsi, si on obtient la même différence que précédemment, nous pourrons supposer que cette différence provient uniquement de l'hétérogénéité des échantillons prélevés.

- Premier échantillon : temps d'agitation 5 min
- Deuxième échantillon : temps d'agitation 30 min

<u>Test sur le transport</u>

Deux échantillons sont prélevés à sur le site industriel. Ils sont dosés le jour de leur prélèvement le premier le 29/03/07 et l'autre le 02/04/07.
L'échantillon du 29/03 est congelé alors que l'échantillon du 02/04 reste à température ambiante ainsi une simulation de transport est réalisée. Une partie de chaque échantillon sera envoyée au LBE le jour du prélèvement du deuxième ainsi nous avons un échantillon congelé et un autre frais mais ayant tout les deux subis un transport.
Le jour de la réception du digestat, la méthode titrimétrique sont effectuées en parallèle au LBE et sur site. Les deux échantillons sont réalisés dans les mêmes conditions c'est à dire 50g de digestat dans 200 mℓ d'eau et avec un temps d'agitation de 5 min. Chaque dosage titrimétrique est réalisé 3 fois. Au LBE la méthode par chromatographie est aussi réalisée et après avoir effectué le dosage, le surnageant sera congelé et titré plus tard. Le reste de digestat des deux échantillons sera congelé à -20°C.
Au LBE, sur chaque reste de digestat ainsi que sur les surnageants congelés, les deux méthodes sont refaites pour savoir l'influence qu'il y a à congeler du digestat ou du surnageant.

<u>Comparaison des différentes techniques d'analyses des AGV</u>

Les essais de dosage sont effectués sur un digestat du site industriel qui n'a pas été congelé et qui est maintenu à 4°C. Sur ce digestat, les dosages sont effectués en triple par la méthode titrimétrique et par la méthode chromatographique. Ces deux méthodes sont décrites dans le paragraphe suivant (II-2). La préparation des échantillons est également décrite dans ces paragraphes.

Tous les résultats sont exprimés dans la même unité pour pouvoir comparer les deux méthodes. L'unité utilisée est exprimée en g CH_3COOH/kg digestat.

➢ *Expression des résultats obtenus par chromatographie*

Nous obtenons pour chaque essai la composition détaillée ainsi que la concentration C en g/ℓ de chaque AGV (C_2, C_3,…).

Premièrement, il y a transformation des g/ℓ en mol/ℓ pour chaque AGV

- Pour C_2 (CH_3COOH)

Masse molaire de CH_3COOH = 60g/mol

C (mol/ℓ) = C (g/ℓ) / 60

- Pour C_3 (CH_3-CH_2-COOH)

Masse molaire de CH_3-CH_2-COOH = 74g/mol

C (mol/ℓ) = C (g/ℓ) / 74

Et de même jusqu'à C5.

Deuxièmement, la somme, de toutes les concentrations en mol/ℓ de tous les AGV que contient chaque essai, est calculée. Ainsi nous obtenons le total des AGV en mol/ℓ.

Ce total est divisé par la masse molaire de CH_3COOH. Ainsi les résultats obtenus sont exprimés en g CH_3COOH/ℓ.

Pour passer des g CH_3COOH/ℓ aux g CH_3COOH/kg de digestat, il faut revenir à l'échantillon de départ c'est à dire les 10 g de digestat dans 30 mℓ d'eau. Dans les 10 g de digestat, il y a à la fois la matière sèche mais aussi de l'eau c'est pourquoi il faut en tenir compte.

Calculs :

(30mℓ+ (1-%MS)*10g) * C (g/ℓ) = C (g/kg de digestat) * 10g

C (g/kg de digestat) = (30mL+ (1-%MS)*10g) * C (g/ℓ)/10g

= (3+1-%MS)* C (g/ℓ)

Ainsi la concentration en AGV de l'échantillon est exprimée en g de CH_3COOH/kg de digestat.

➢ *Modification des résultats obtenus par titrimétrie*

Nous obtenons des résultats en g de CH_3COOH/ℓ et l'unité finale est exprimés en g de CH_3COOH/kg de digestat donc comme précédemment il faut revenir à l'échantillon de départ c'est à dire 20g de digestat dans 100mℓ d'eau.

Calcul :

(100mL+ (1-%MS)*20g)* C (g/ℓ) = C (g/kg de digestat) * 20g

C (g/kg de digestat) = (100mL+ (1-%MS)*20g) * C (g/ℓ)/20g

= (5+1-%MS)* C (g/ℓ)

Ainsi nous aurons tous les résultats dans la même unité. Nous pourrons donc les comparer et voir si les divergences entre les résultats obtenus au LBE et ceux obtenus au sur site viennent des différentes méthodes.

Les différentes techniques d'analyses

Par chromatographie

La méthode de dosage des AGV par chrommatographie a été décrite dans le paragraphe II.3.8.

Par titrimétrie

- *Préparation des échantillons* :

A température ambiante, 20 g de digestat sont prélevés, auxquels sont ajoutés 100mℓ d'eau. Ce mélange est placé pendant 30 min sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique puis il est passé sur le tamis et centrifugé. Dans trois bécher, 10 mℓ de surnageant sont prélevés auxquels sont ajoutés 15 mℓ d'eau.

- *Détermination du TAC (Taux Alcalimétrique Complet)*

Mode opératoire :
La solution préparée de 25 mℓ est agitée continuellement et le pH initial est mesuré.
Un volume V1 de la solution d'acide sulfurique à 0,1 N est versé jusqu'à obtenir un pH = 4.

Réactions chimiques : $CO_3^{2-} + H_3O^+ \rightarrow H_2O + HCO_3^-$

$$HCO_3^- + H_3O^+ \rightarrow H_2O + H_2CO_3$$

Calculs TAC: TAC = V1 * 0.5 (g/ℓ de $CaCO_3$)

- *Détermination de la concentration en AGV*

Mode opératoire :

L'acide sulfurique est versé jusqu'à avoir un pH = 3,5.

Puis la solution est portée à ébullition pendant 3min, puis laissée refroidir.

Un volume V2 de NaOH à 0,1 N est versé jusqu'à un pH = 4.

Un volume V3 est versé jusqu'à un pH = 7

Réaction chimique: $CH_3COOH + OH^- \rightarrow CH_3COO^- + H_2O$

Calcul de la concentration en AGV : AGV = (V3-V2) * 0,6 (g/ℓ de CH_3COOH)

Comparaison des différentes méthodes : résultats

Sur l'agitation

Les résultats suivants ont été obtenus pour des dosages d'AGV par la méthode chromatographique et avec un ratio de 10g de digestat pour 30 mℓ d'eau lors de l'extraction. Pour chaque échantillon, le digestat utilisé est le même.

- *Test avec différents temps d'agitation et une vitesse d'agitation non contrôlée*

Des tests ont été réalisés avec différents temps d'agitation. Les échantillons n'ont pas été traités avec le même système d'agitation : la vitesse n'était pas contrôlée.
Les résultats des dosages d'AGV sont présentés dans le **tableau 1.**

Tableau 1 : Test d'agitation avec des temps d'agitation différents

	Essai1	Essai2	Essai3	Moyenne	Ecart type	Intervalle de confiance 95%
Echantillon 1 Eq HAc/kg de digestat	7,607	7,347	7,811	7,589	0,232	0,263
Echantillon 2 Eq HAc/kg de digestat	7,844	8,046	8,285	8,058	0,221	0,250
Echantillon 3 Eq HAc/kg de digestat	7,844	7,495	7,328	7,556	0,263	0,298

D'après le **tableau 1**, pour les trois essais réalisés avec l'échantillon 1 qui ont un temps d'agitation de 5 minutes, la moyenne des concentrations en AGV est de 7,589 g/kg avec un intervalle de confiance de ± 0,263 g/kg. Les résultats de l'échantillon 2 ont été obtenus avec un temps d'agitation de 30 minute, la moyenne des trois essais avec un temps d'agitation de 30 minutes est de 8,058 ± 0,250 g/kg.
Pour les trois essais réalisés avec l'échantillon 3 avec un temps d'agitation de 30 minutes dans une fiole fermée, la moyenne des résultats est de 7,556 ± 0,298g/kg.

➢ *Test avec des temps d'agitation différents mais avec le même système d'agitation*

Des dosages d'AGV ont été réalisés avec des temps d'agitation différents après que le digestat utilisé précédemment ait été congelé puis décongelé une seconde fois. Pour ces deux échantillons la vitesse d'agitation était contrôlée et maintenue à 200 tr/min. Pour chaque échantillon, deux essais ont été réalisés. Les résultat des dosages d'AGV sont présentés dans **le tableau 2.**

- **Tableau 2**: Test avec une vitesse d'agitation de 200tr/min et avec des temps d'agitation différents

	Essai1	Essai2	Moyenne
Echantillon 1 (Eq HAc/kg de digestat)	7,271	7,301	7,286
Echantillon 2 (Eq HAc/kg de digestat)	6,593	6,630	6,611

D'après le **tableau 2**, dans l'échantillon 1, la moyenne des deux essais réalisés avec un temps d'agitation de 5 minutes et avec une vitesse de 200tr/min est de 7,286 g/kg .
Pour l'échantillon 2 qui a été traité avec une vitesse de 200tr/min et un temps d'agitation de 30 minutes la moyenne des deux essais est de 6,611g/kg.

Sur le transport et les méthodes d'analyse

➢ *Sur le transport*

- Résultats obtenus sur site

L'échantillon prélevé le jeudi 29/03 a été congelé puis décongelé pour être titré le mardi 03/04 comme s'il avait subi un transport, alors que l'échantillon du 02/04 n'a pas été congelé et est resté à température ambiante durant toute une journée avant d'être titré. Le **Tableau 3** présente les résultats des dosages d'AGV sur ces échantillons.

Tableau 3 : Test sur le transport - Résultats obtenus au sur site par titrimétrie

Date de prélèvement	Date d'analyse	CReeD AGV recalculés (g/kg d'échant)
Jeudi29/03	Jeudi29/03	7,132
Lundi 02/04	lundi 02/04	8,61
Jeudi 29/03	Mardi 03/04	7,811
Lundi 02/04	Mardi 03/04	8,266

- Résultats obtenus au LBE réalisé le mardi 3 avril après réception des digestats.

Les **Tableaux 4 et 5** présentent respectivement les résultats obtenus pour le test du transport au LBE par la méthode titrimétrique et par chromatographie.

❖ par la méthode de titrimétrie

Tableau 4: Test sur le transport – Résultats du LBE par titrimétrie

	Etat	Digestat initial	Surnageant congelé	Digestat congelé
29-mars	Essai1	7,012	6,467	6,949
	Essai2	6,705	6,705	6,881
	Essai3		6,467	6,744
	moyenne	6,859	6,547	6,858
	IC(95%)	0,300	0,138	0,118
	Ecart type	0,217	0,156	0,104
	Etat	Digestat initial	Surnageant congelé	Digestat congelé
02-avril	Essai1	7,327	6,774	5,791
	Essai2	7,603	6,359	6,812
	Essai3	7,189	5,150	7,153
	moyenne	7,373	6,094	6,585
	IC(95%)	0,211	0,844	0,802
	Ecart type	0,239	0,955	0,709

❖ par la méthode de chromatographie

Tableau 5 : Test sur le transport – Résultats du LBE par chromatographie

	Etat	Digestat initial	Surnageant congelé	Digestat congelé
29 mars	Essai1	7,755	7,974	8,774
	Essai2	7,941	8,167	8,567
	Essai3	7,666	8,762	8,185
	Moyenne	7,787	8,301	8,509
	IC(95%)	0,159	0,465	0,338
	Ecart type	0,141	0,411	0,299
02 avril	Etat	Digestat initial	Surnageant congelé	Digestat congelé
	Essai1	8,257	9,052	8,710
	Essai2	8,344	8,962	8,914
	Essai3	7,762	8,982	9,103
	Moyenne	8,121	8,999	8,909
	IC(95%)	0,355	0,053	0,355
	Ecart type	0,314	0,047	0,314

➢ *Sur les méthodes d'analyse*

- Comparaison des techniques d'analyse à partir des résultats obtenus sur le test de transport

Les **Tableaux 6 et 7** présentent respectivement la comparaison des différentes méthodes d'analyse obtenus sur le test de transport dans l'échantillon du 29/03 et dans l'échantillon du 02/04.

Tableaux 6: Comparaison des différentes méthodes obtenus sur le test de transport : Echantillon du 29/03

	Digestat congelé		Surnageant congelé		Digestat décongelé	
Méthode	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie
moyenne	7,787	6,859	8,301	6,547	8,509	6,858
IC(95%)	0,159	0,300	0,465	0,138	0,338	0,118
Ecart type	0,141	0,217	0,411	0,156	0,299	0,104
Différence entre les méthodes	12.67%		23.63%		21.49%	

Tableaux 7: Comparaison des différentes méthodes obtenus sur le test de transport : Echantillon du 02/04

	Digestat congelé		Surnageant congelé		Digestat redécongelé	
Méthode	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie
moyenne	8,121	7,373	8,999	6,094	8,909	6,585
IC(95%)	0,355	0,211	0,053	0,844	0,355	0,802
Ecart type	0,314	0,239	0,047	0,955	0,314	0,709
Différence entre les méthodes	9%		38.49%		30%	

Les **tableaux 6 et 7** montrent une différence en moyenne de 21% entre les deux techniques d'analyse.

- Résultats des différentes techniques d'analyse réalisées sur un même digestat au LBE.

Les **Tableaux 8 et 9** présentent respectivement les résultats obtenus au LBE par la méthode titrimétrique et par chromatographie.

❖ Résultats obtenus par chromatographie

Tableau 8 : Concentration des AGV par chromatographie réalisé au LBE

	Essai1	Essai2	Essai3	Moyenne	Ecart type	Intervalle de confiance (95%)
Eq HAc/kg de digestat	6,3	6,46	6,64	6,47	0,113	0,157

D'après le **tableau 8**, la moyenne pour la concentration total en AGV est de 6.47 g de CH_3COOH/kg de digestat à ± 0.157 (avec un intervalle de confiance à 95%). Les résultats obtenus sont pratiquement similaires.

❖ Résultats obtenus par titrimétrie

Tableau 9 : Concentration des AGV par titrimétrie réalisé au LBE

Echantillon	pH initial	V1 (mℓ)	TAC (g/ℓ de CaCO3)	V2 (mℓ)	V3 (mℓ)	AGV (g/ℓ)	AGV (g/kg)
Essai1	7,88	3,5	1,75	0,55	2,2	0,99	5,62
Essai2	7,93	3,35	1,68	0,4	1,8	0,84	4,77
Essai3	7,94	3,5	1,75	0,45	1,75	0,78	4,43

D'après le **tableau 9,** la moyenne des trois essais est de 4.94 g de CH_3COOH/kg de digestat à ± 0,695 (avec un intervalle de confiance à 95%).

Discussion

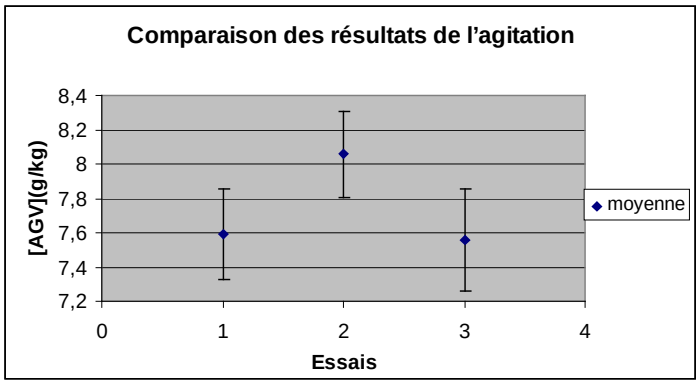
Test sur l'agitation

➢ *Comparaison des résultats obtenus avec les trois premier échantillons*

Le **tableau 10 et le graphe 2** représentent les résultats des trois échantillons réalisés avec pour le premier un temps d'agitation de 5 minutes, pour le deuxième et le troisième avec un temps d'agitation de 30 minutes mais le troisième a été réalisé dans une fiole hermétique.

Tableau 10 et Graphe 2 : Tableau récapitulatif et comparaison des résultats du test d'agitation

Echantillons	1	2	3
Temps d'agitation	5min	30min	30min
Etat	ouvert	ouvert	fermé
Essai1	7,607	7,844	7,844
Essai2	7,347	8,046	7,495
Essai3	7,811	8,285	7,328
Moyenne	7,589	8,058	7,556
Ecart type	0,232	0,221	0,263
IC(95%)	0,263	0,250	0,298



➢ Comparaison des résultats avec des temps d'agitation différents

Dans le **tableau 10** et sur **la figure 16**, nous remarquons que les échantillons 1 et 3 sont très proches alors que l'essai 2 a des valeurs plus importantes. Toutefois, sur la figure 15, il y a entre les trois échantillons des valeurs communes. En comparant les échantillons 1 et 2, le test de Student donne une probabilité de 6,4 % seulement pour que les deux valeurs proviennent de deux populations sous-jacentes ayant la même moyenne. Il y a donc une différence significative entre ces deux valeurs mais elle n'est que de 6,1 % de la valeur mesurée. En comparant les échantillons 2 et 3, le test de Student donne une probabilité de 6,6 % seulement pour que les deux valeurs proviennent de deux populations sous-jacentes ayant la même moyenne. Il y a donc une différence significative entre ces deux valeurs mais elle n'est que de 6,5 % de la valeur mesurée. Et en comparant les échantillons 1 et 3, le test de Student donne une probabilité de 87,9 % pour que les deux valeurs proviennent de deux populations sous-jacentes ayant la même moyenne. La différence entre les deux est de 0.4 %. Ces deux échantillons n'ont ni les mêmes temps d'agitations ni les mêmes conditions opératoires : l'un est ouvert et l'autre est fermé, cependant les résultats obtenus restent très proches. Cela peut être dû aux variations expérimentales. Toutefois, il est important de noter

que ces deux échantillons ont été traités avec le même appareil d'agitation. C'est pourquoi nous avons réalisé une nouvelle expérience avec un système d'agitation identique dans tous les cas.

- *Comparaison des résultats avec le même système d'agitation*

Le **Tableau 11** permet la comparaison des résultats obtenus sur deux échantillons ayant le même système d'agitation avec une vitesse de 200tr/min mais avec des temps d'agitation différents.

Tableau 11 : Tableau de comparaison des résultats avec une agitation contrôlée de 200tr/min

Temps d'agitation	5min	30min
Essai1	7,271	6,593
Essai2	7,301	6,630
Moyenne	7,286	6,611

D'après le **tableau 11,** les intervalles de confiances ne se chevauchent pas, pour le premier il est de [7.257 ; 7.315] et pour le deuxième de [6.585 ; 6.637].
Le test de Student donne une probabilité de 0 %. Il n'y a statistiquement aucune chance pour que les deux valeurs proviennent de deux populations sous-jacentes ayant la même moyenne. La différence entre les deux est de 10 %.
En comparant avec les résultats de comparaison des échantillons 1 et 2 obtenus précédemment, les résultats sont inversés : celui avec un temps d'agitation de 5min est plus important que celui avec un temps d'agitation de 30 min. De plus, la différence est plus importante quand les deux échantillons ont le même système d'agitation.
Nous pouvons en conclure que le temps d'agitation a une influence sur la concentration en AGV mesurée.
Cependant, ces valeurs montrent que même si elles ne sont pas identiques, les différences ne sont pas non plus très importantes.

Test sur le transport

- Comparaison des résultats entre le sur site et le LBE

Le **Tableau 12** permet la comparaison des résultats obtenus sur le test de transport entre le sur site et le LBE.

Tableau 12 : Test sur le transport - Comparaison des résultats entre le site industriel et le LBE

	lieu	méthode	frais ou décongelé	transport ou non	stockage LBE	Moyenne	Ecart type
Echantillon du 29/03	Sur site	Titrimétrie	Frais	non		7,132	
			Décongelé	simulation transport		7,811	
	LBE	Titrimétrie	Décongelé	oui	digestat et surnageant	6,859	0,22
		Chromatographie		oui		7,787	0,14
Echantillon du 02/04	Sur site	Titrimétrie	Frais	non		8,610	
			Frais	simulation transport sans congélation		8,266	
	LBE	Titrimétrie	Frais	oui	digestat et surnageant	7,373	0,21
		Chromatographie	Frais	oui		8,121	0,31

D'après le **tableau 12**, en comparant les résultats obtenus sur site, pour l'échantillon du 29/03, nous observons une augmentation de la concentration en AGV après congélation et décongélation. Ceci est dû au fait que la décongélation endommage la paroi des cellules et libère ainsi des AGV. Alors que pour l'échantillon de 02/04 qui n'a pas été congelé, il y a une diminution de la concentration.

Au LBE, après réception des échantillons (une journée de transport), on remarque que pour les deux échantillons, que ce soit avec la méthode chromatographique ou titrimétrique, il y a diminution de la concentration en AGV qui peut être due à une évaporation de ces molécules volatiles au cours du transport ou encore à une dégradation par les microorganismes.

Pour l'échantillon du 29/03, entre les résultats obtenus sur site et ceux obtenus au LBE il y a une différence de 13 % et pour l'échantillon du 02/04 il y a une différence de 11,4 %. Ces différences sont trop faibles pour pouvoir expliquer celles observées avant cette étude.

- Résultats obtenus au LBE sur l'influence de la congélation de surnageant ou de digestat

Le **Tableau 13** permet d'observer l'influence de la congélation de surnageant ou de digestat.

Tableau 13 : Test transport – Comparaison des variations l'influence de la congélation de surnageant ou de digestat

	Digestat initial	Surnageant congelé	Digestat recongelé
Echantillon du 29/03	6,859	6,547	6,858
Echantillon du 02/04	7,373	6,094	6,585

Après comparaison des résultats (**Tableau 13)**, pour les deux échantillons il y a une diminution de la concentration en AGV par rapport au digestat initial. Cela s'explique par le fait que pendant la congélation il y a rupture de certaines parois cellulaires entraînant la libération des AGV. Cependant il est plus facile de briser les parois cellulaires dans le surnageant que dans le digestat qui forme une sorte de matrice protectrice. C'est pourquoi les variations sont moins importantes entre le digestat initial et le digestat recongelé qu'avec le surnageant congelé. Il est donc préférable du congeler du digestat brut que du surnageant extrait.

Comparaison des techniques d'analyse

Le **Tableau 14** compare les différences observées entre la méthode par chromatographie et par la méthode titrimétrique au moment du test du transport.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des différences entre les deux méthodes obtenues au moment du test du transport

		Digestat congelé		Surnageant congelé		Digestat redécongelé	
Echantilllon du 29/03	Méthode	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie
	moyenne	7,787	6,859	8,301	6,547	8,509	6,858
	IC(95%)	0,159	0,300	0,465	0,138	0,338	0,118
	Différence ente les méthodes	13%		24%		21%	
Echantillon du 02/05	Méthode	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie	chromatographie	titrimétrie
	moyenne	8,121	7,373	8,999	6,094	8,909	6,585
	IC(95%)	0,355	0,211	0,053	0,844	0,355	0,802
	Différence ente les méthodes	10%		38%		30%	

D'après le **tableau 14**, il y a toujours une différence entre ces deux méthodes qui est en moyenne de 21%. Même en tenant compte des intervalles de confiance (95 %)nous remarquons qu'il n'y a aucune valeur commune aux deux intervalles. Ils ne se chevauchent pas.
Un test de conformité selon la loi statistique de Student qui permet de connaître statistiquement si la valeur pourrait être la même entre les deux méthodes, donne une probabilité en moyenne de 1 % pour que les deux méthodes donnent des valeurs identiques.

Le **Tableau 15** permet la comparaison des deux techniques d'analyse réalisées au LBE.

Tableau 15 : Tableau de comparaison des deux techniques d'analyse

Méthode	chromatographie	titrimetrie
Essai1	6,304	5,62
Essai2	6,457	4,77
Essai3	6,645	4,428
moyenne	**6,470**	**4,939**
±	**0,193**	**0,695**
Ecart type	0,170	0,613

Dans le **tableau 15**, si l'on tient compte des intervalles de confiance, nous obtenons pour la méthode par chromatographie un intervalle de [6.277 ; 6.663] et pour la méthode par titrimétrie un intervalle de [4.244; 5.634]. Comme précédemment, il n'y a aucune valeur commune aux deux intervalles.

La loi statistique de Student, donne une probabilité de 4 % pour que les deux valeurs soient identiques. Nous pouvons donc considérer que les deux méthodes ne donnent pas des résultats identiques. Ici la différence entre les deux méthodes est de 26,8 % cette valeur reste assez proche de celle trouvée précédemment en calculant la moyenne des différences.

Conclusion

Pour chaque expérience, les résultats obtenus sont différents. Toutefois, ils restent assez proches. Pour le test sur le temps d'agitation, il y a peut être évaporation de certains AGV quand le temps d'agitation est plus important mais pas assez pour expliquer les différences observées au départ. Pour le test sur le transport, d'après les résultats obtenus, il y a bien une légère perte de la concentration en AGV à force que le digestat soit congelé et décongelé mais, comme pour le test d'agitation, les différences observées ne sont pas très importantes. Les différentes techniques d'analyse utilisées n'expliquent pas non plus ces différences. De plus, dans les différences de départ entre le site industriel et le LBE, les mesures réalisées avec la technique par chromatographie donnent des valeurs plus faibles qu'avec la méthode par titrimétrie, alors que pour chaque expérience de comparaison des deux méthodes réalisées au LBE nous obtenons des résultats plus importants avec la méthode par chromatographie qu'avec la méthode par titrimétrie.

Nous pouvons donc conclure que les différentes méthodes utilisées par le LBE et le site industriel, les paramètres d'extraction, le transport du digestat et sa congélation ont une influence sur les mesures de la concentration en AGV d'un digestat. Toutefois, toutes les différences observées ne sont pas assez importantes pour expliquer les larges différences observées sur les résultats de départ. Nous ne sommes pas parvenus à reproduire les erreurs observées par le passé.

ANNEXE 3 : QUELQUES PROTOCOLES D'EXTRACTION ENZYMATIQUE

Référence	Source d'enzymes	Méthode proposée
Jones et Grainger, 1983	Ordures ménagères brutes	Agitation de l'échantillon en présence de Triton x-100 (0,2 %) et de $MgSO_4$ Centrifugation (2 500 ou 4 000×*g*) Mesures effectuées sur le surnageant
Gessesse *et al.*, 2003	Boues activées	Agitation dans la glace en présence de Triton x-100 Centrifugation 10 min (5 000×*g* ; 4°C) Mesures sur le surnageant Sonication possible du culot (30 min) en présence de Triton x-100, centrifugation 15 min (10 000×*g*) et récupération du surnageant
Palmisano *et al.*, 1993	Ordures ménagères brutes	*Idem* Gessesse et al. (2003) mais centrifugation à 10 000×*g*
Maunoir *et al.*, 1991, Sabil, 1991	Boues de fosse septique	Centrifugation 15min (2 500×*g*) Resuspension du culot dans l'eau distillée Centrifugation 15min (3 800×*g*) Extraction sur le culot 15 min dans Triton x-100 (0,3 %) Centrifugation 15 min (7 000×*g*) Mesures sur le surnageant Enzymes localisées dans la phase solide
Philip *et al.*, 1993	Boues de fosse septique	Centrifugation 15 min (2 460×*g*) Ultracentrifugation du surnageant 1h (142 000×*g*) Mesures sur le surnageant obtenu
Parawira *et al.*, 2005	Résidus de pomme de terre	Centrifugation 10 min (3 000×*g*) Mesures directes sur le surnageant (enzymes libres) Lavage du culot dans tampon Phosphate pH 7,0 Centrifugation 10 min (3 000×*g*) Resuspension du culot dans tampon Acétate pH 6,0 pour mesures d'activités des enzymes fixées aux cellules
He *et al.*, 2006	Boues activées de station d'épuration	Décantation des boues Centrifugation du décantat 30 min (2 500 rpm) Lavage du culot dans NaCl 0,9 % Centrifugation 30 min (2 500 rpm) Reprise du culot dans tampon Phosphate pH 7,2 Centrifugation 30 min (3 000 rpm) Mesures sur le surnageant
Fahey et Caplan, 1981	Boues activées	Pas d'extraction : mesure d'activité sur l'échantillon brute

ANNEXE 4 : MESURES D'ACTIVITE AMYLASIQUE

Référence	Méthode proposée
Jones et Grainger, 1983	1 mℓ d'extrait + 1 mℓ d'amidon soluble 1% dans tampon phosphate pH 7,0 Incubation à 37°C Dosage des sucres réduits par la méthode au DNS Ajout de 4 mℓ d'eau Mesure de l'absorbance à 500 nm
Parawira *et al.*, 2005	Incubation de l'extrait à 37°C en présence d'amidon soluble dans tampon Acétate, pH 6,0 Dosage du glucose
Palmisano *et al.*, 1993	Utilisation du *p*-nitrophenyl α D-maltoheptaoside (PNPG7) comme substrat. Incubation à 37°C Mesure de l'absorbance à 405 nm

ANNEXE 5 : MESURES D'ACTIVITE CELLULASIQUE

- **Substrat Cellulose-azure**

Référence	Méthode proposée
Jones et Grainger, 1983	1 mℓ d'extrait + 10 mg de cellulose-azure dans du tampon Phosphate pH 7.0 ou tampon Acétate pH 5,0 Incubation à 37°C Arrêt de la réaction par ajout de 2,5 mℓ de TCA Mesure de l'absorbance à 594 nm
Lai *et al.*, 2001	Suspension de cellulose-azure dans tampon acétate pH 5,0 Ajout de l'extrait et agitation Incubation à 38°C Filtration à 0,45 µm Mesure de l'absorbance à 595 nm
Palmisano *et al.*, 1993	2 mℓ d'extrait enzymatique + 100 mg de cellulose-azure dans 3 mℓ de tampon citrate, pH 4,8 Incubation à 37°C Mélange portée à ébullition pour stopper la réaction Filtration sur papier filtre Whatman n°1 (0,45µm) Mesure de l'absorbance à 595 nm

- **Substrat CarboxyMéthylCellulose (CMC)**

Référence	Méthode proposée
Parawira *et al.*, 2005	Incubation de l'extrait à 37°C en présence de carboxyméthylcellulose (CMC) dans tampon acétate, pH 6,0
Maunoir *et al.*, 1991	Incubation de l'extrait 24h à 37°C en présence carboxyméthylcellulose (CMC) dans tampon acétate, pH 4,5 Dosage du glucose libéré par la méthode de Park et Jonhson (1949)
Philip *et al.*, 1993	Incubation de l'extrait à 37°C en présence de carboxyméthylcellulose (CMC), à pH 4,5 Mesure à 700 nm

ANNEXE 6: MESURES D'ACTIVITE PROTEASIQUE (AZOCOLL)

Référence	Méthode proposée
Jones et Grainger, 1983, Palmisano *et al.*, 1993	1 mℓ d'extrait enzymatique + 10 mg Azocoll + 1 mℓ tampon sodium phosphate pH 9,0 Incubation à 37°C Arrêt de la réaction par ajout de 2,5 mℓ de TCA Mesure de l'absorbance à 520 nm Précision : la masse de protéine dégradée par rapport à l'absorbance obtenue est donnée en ajoutant de l'enzyme commerciale à une masse croissante d'Azocoll (0-10 mg) dans le tampon et en mesurant l'absorbance obtenue. L'activité est exprimée en mg d'Azocoll dégradé/h/g de MS.
Chavira *et al.*, 1984	0,250 g d'Azocoll dans 50 mℓ ,de tampon Tris-HCl (pH 7,8) → suspension 5mg/mℓ Agitation dans bécher 100 mℓ Utilisation de tubes eppendorf 2 mℓ (Beckman microfuge) Ajout de la suspension Azocoll + extrait Vortex Arrêt de la réaction par immersion dans un bain de glace Vortex Centrifugation Mesure de l'absorbance du surnageant à 520 nm
Fahey et Caplan, 1981	Dans tubes à centrifuger de 13 mℓ 0,5 mℓ d'extrait + 5 mℓ de tampon phosphate (pH 7) + 0,0125 g d'Azocoll Vortex Incubation 37°C Vortex Centrifugation 30 min (2 600×*g*) Mesure d'absorbance du surnageant (520 nm) Zéro d'activité obtenu avec extrait autoclavé
Documentation Fournisseur (Calbiochem)	Faire suspension Azocoll (5mg/mℓ) dans tampon (pH 7,0 - PBS) contenant l'extrait Incuber 15 min à 37°C Refroidir les tubes dans un bain de glace et filtrer sur Whatman No.1 Mesure de l'absorbance du filtrat à 520 nm

ANNEXE 7 : MESURES D'ACTIVITE PROTEASIQUE (CASEINE ET AZOCASEIN)

Référence	Méthode proposée
Gessesse *et al.*, 2003	Dans eppendorf 2 mℓ : Azocasein 0,5 % (800 µℓ) dans tampon Tris-HCl pH 8 + 200µℓ d'enzyme Incubation 1h à 30°C Ajout de 500µℓ de TCA 30 min d'incubation à T° ambiante Centrifugation à 14 000 rpm Récupération du surnageant et ajout de 200 µℓ de NaOH Mesure de l'absorbance à 440 nm
Richards *et al.*, 1984, Goel *et al.*, 1997	Azocasein (1 mℓ) + 2 mℓ eau distillée + 1 mℓ extrait Incubation à 37°C Arrêt par ajout de TCA (2mℓ) Centrifugation (2 600 rpm, 5 min) 2 mℓ surnageant + 2 mℓ NaOH Mesure absorbance 440 nm
Parawira *et al.*, 2005	Azocasein dans tampon Tris-HCl (pH 7,4) + extrait Incubation 1h à 50°C Ajout de 2 mℓ de TCA Centrifugation 10 min à 3 000×*g* Mesure absorbance de surnageant à 380 nm
Gessesse *et al.*, 2003	Caséine 1 mℓ de caséine 2 % préparée dans tampon glycine-NaOH pH 10 1 mℓ d'extrait Incubation à 37°C Ajout de 2 mℓ de TCA Centrifugation 10 min (5 000×*g*) Prélever 0,5 mℓ de surnageant dans tube à hémolyse et y ajouter 2,5 mℓ de carbonate de sodium + réactif de Folin Incubation 30 min à T° ambiante Lecture à 660 nm
Philip *et al.*, 1993	Caséine caséine + extrait enzymatique + tampon pH 8 Incubation à 37°C Lecture à 280 nm

ANNEXE 8 : MESURES D'ACTIVITE LIPASIQUE

Référence	Méthode proposée
Jones et Grainger, 1983	Utilisation d'un kit de détermination Sigma : méthode titrimétrique
Sztajer et Maliszewska, 1988	5 mℓ d'émulsion d'alcool tributyrine-polyvynil (PVA) + 4 mℓ de tampon pH 7,0 + 1 mℓ d'échantillon Incubation sous agitation 30 min à 30°C Arrêt de la réaction par ajout de 20 mℓ d'un mélange acétone-éthanol Les acides libérés sont titrés par ajout de NaOH en présence de thymolphtaléine
Maunoir *et al.*, 1991, Philip *et al.*, 1993	Hydrolyse de tributyrine à 25°C et pH 7,5 L'acide butyrique libéré est neutralisé par ajout automatique de soude pour maintenir un pH constant : méthode titrimétrique

ANNEXE 9 : PROTOCOLE D'EXTRACTION ENZYMATIQUE

Réactif :

Solution de Triton x-100 à 0,2 %

Prélever 2 mℓ de solution commerciale à l'aide d'une pipette jetable (solution visqueuse).

Dans un bécher (1 ℓ) agité contenant 600 mℓ d'eau distillée, ajouter le Triton et attendre la dilution du produit. Ajuster à 1 ℓ avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée.

Conserver dans une bouteille en verre.

Procédure :

Après l'échantillonnage, peser 30 g de digestat frais dans un bécher et y ajouter 30 mℓ de solution d'extraction (Triton x-100 à 0,2 %).

Agiter pendant 1h dans un bain de glace.

Tamiser à 1 mm.

Centrifuger 20 minutes à 27 000×*g* (15 000 rpm, rotor Beckman JA-20).

Conserver au frais.

ANNEXE 10 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE AMYLASIQUE

Conditions : $T_{incubation}$ = 37°C ; pH = 7,0 ; A_{540nm}

Réactifs :

- Tampon Phosphate pH 7,0

(Peser 71,6 g de $Na_2HPO_4,12H_2O$ et dissoudre dans 600 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 1ℓ dans une fiole jaugée : solution A.

Peser 13,6 g de KH_2PO_4 et dissoudre dans 300 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 500 mℓ : solution B.

Dans un grand bécher contenant la solution A, verser la solution B jusqu'à atteindre pH 7,0.)

- Solution d'amidon soluble de pomme de terre à 1 % (0,1 g/ℓ)

(Peser 1 g d'amidon, dissoudre dans l'eau distillée sous agitation et en chauffant à 90°C environ la solution jusqu'à disparition du trouble.

Ajuster à 100 mℓ dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée.)

- Solution de glucose à 1 % (0,1 g/ℓ)

(Peser 1g d'amidon, dissoudre dans l'eau distillée et ajuster à 100mℓ dans une fiole jaugée. Noter la pesée.)

- Réactif au DNS (acide dinitrosalicylique)

(Peser 2,6 g de KOH ; 1,5 g de NaOH et 1,7 g d'acide DNS. Dissoudre dans l'eau distillée sous agitation. Ajuster à 100 mℓ dans une fiole jaugée et conserver à l'abri de la lumière.)

- Extrait enzymatique

Procédure :
Allumer le bain-marie à 100°C au moins 4h avant son utilisation.
Allumer le bain-marie réglé à 37°C et le spectrophotomètre.

- Préparation de la gamme étalon de glucose (1 %) :

[Glucose] (mg/tube)	0	2	4
$V_{Tampon\ pH\ 7.0}$ (mℓ)	1	1	1
$V_{Solution\ glucose\ (1\%)}$ (mℓ)	0	0,2	0,4
$V_{Eau\ distillée}$ (mℓ)	1	0,8	0,6
V_{DNS} (mℓ)	1	1	1

- Milieu réactionnel :

6 tubes à essai sont nécessaires afin de réaliser le zéro et l'essai en triple. Ils doivent contenir :

- Tampon pH 7,0 (1 mℓ)
- Solution d'amidon soluble de pomme de terre à 1 % (1 mℓ)
- Barreau aimanté

Les tubes sont placés sous agitation dans le bain marie afin d'atteindre 37°C.

- Extrait enzymatique (1 mℓ).

→ Incubation 1h à 37°C

Arrêt de la réaction par ajout du réactif DNS (1 mℓ) dans les essais. Dans les tubes indiquant le zéro d'activité, le DNS est ajouté juste avant l'extrait enzymatique.
Vortexer tous les tubes (gamme + essai), les porter au bain marie à 100°C pendant 10 minutes puis les refroidir immédiatement dans une bain de glace.
Ajouter 4 mℓ d'eau distillée à chaque tube pour atténuer la coloration.
Lire l'absorbance à 540 nm.

Calculs :

$\Delta DO_{540\ nm} = \Sigma DO_{540nm\ essai}/3 - \Sigma DO_{540nm\ zéro}/3$

La $\Delta DO_{540\ nm}$ est convertie en g de glucose formé grâce à l'équation de la droite d'étalonnage.

Activité = g de glucose formé/[temps d'incubation(mn)*masse de digestat extraite(g)]

<u>Unité</u> : g de glucose formé/mn.g de digestat^{-1}

L'activité enzymatique peut également être exprimée en :

- g de glucose formé/mn.g de Matière Sèche (mesurée sur le digestat)
- g de glucose formé/mn.g de protéines (mesurée dans l'extrait) → activité spécifique

ANNEXE 11 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE CELLULASIQUE

Conditions : $T_{incubation}$ = 37°C ; pH = 7,0 ; $A_{520\ nm}$

Réactifs :

- Tampon Phosphate pH 7,0

(Peser 71,6 g de $Na_2HPO_4,12H_2O$ et dissoudre dans 600 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 1 ℓ dans une fiole jaugée : solution A.

Peser 13,6 g de KH_2PO_4 et dissoudre dans 300 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 500 mℓ : solution B.

Dans un grand bécher contenant la solution A, verser la solution B jusqu'à atteindre pH 7,0.)

- Substrat cellulose-Azure rincé et séché

- TCA 5 %

(Peser 25 g de TCA et dissoudre dans l'eau distillée. Ajuster à 500 mℓ dans une fiole jaugée.)

- Extrait enzymatique

Procédure :

➢ Rinçage de la cellulose-azure

Peser 0,14 g de cellulose-Azure dans un tube à centrifuger et ajouter 7 mℓ d'eau distillée (ou faire autre suspension à 20 mg/mℓ).

Centrifuger 20 mn à 3 000×*g* (5 000 rpm, rotor Beckman JA-20) et éliminer le surnageant dont l'absorbance à 520 nm doit être inférieure à 0,3. Répéter donc l'ajout d'eau distillée et la centrifugation jusqu'à ce que cet objectif soit atteint.

La cellulose-Azure récupérée est ensuite séchée une nuit à l'étuve à 60°C puis conservée au réfrigérateur.

➢ Milieu réactionnel :

6 tubes à essais sont nécessaires afin de réaliser le zéro et l'essai en triple. Ils doivent contenir :

- Tampon pH 7,0 (1 mℓ)
- Cellulose-azure (0,01 g ± 0,005 g)
- Barreau aimanté

Les tubes sont placés sous agitation dans le bain marie afin d'atteindre 37°C.

- Extrait enzymatique (1 mℓ)

→ Incubation 30min à 37°C

Arrêt de la réaction par ajout de TCA 5% (1 mℓ) dans les essais. Dans les tubes indiquant le zéro d'activité, le TCA est ajouté juste avant l'extrait enzymatique.
Laisser décanter puis filtrer dans une cuve à spectrophotomètre sur membrane de Nylon (0,45 µm de porosité).

Mesure de l'absorbance à 520 nm.

Calculs :

$\Delta DO_{520nm} = \Sigma DO_{520nm\ essai}/3 - \Sigma DO_{520nm\ zéro}/3$

Activité = ΔDO_{520nm} /[temps d'incubation(mn)*masse de digestat extraite(g)]

<u>Unité</u> : ΔDO_{520nm} /mn.g de digestat^{-1}

ANNEXE 12 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE PROTEINASIQUE (SUBSTRAT BSA)

CONDITIONS : $T_{INCUBATION}$ = 37°C, pH = 8,0

Réactifs :

- Tampon pH 8,0

(Peser 71,6 g de $Na_2HPO_4,12H_2O$ et dissoudre dans 600 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 1 ℓ dans une fiole jaugée : solution A.

Peser 13,6 g de KH_2PO_4 et dissoudre dans 300 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 500 mℓ : solution B.

Dans un grand bécher contenant la solution A, verser la solution B jusqu'à atteindre pH 8,0.)

- Solution de BSA à 1 % (0,1 g/ℓ)

(Peser 0,2 g de BSA, dissoudre dans du tampon pH 8,0 sous agitation douce pour éviter la formation de mousse et ajuster à 20 mℓ avec le tampon dans une fiole jaugée.)

- TCA à 5 %

(Peser 25 g de TCA et dissoudre dans l'eau distillée. Ajuster à 500 mℓ dans une fiole jaugée.)

- Solution de carbonate de sodium 0,5 M

(Peser 5,3 g de carbonate de sodium, dissoudre dans l'eau distillée sous agitation et ajuster à 100 mℓ dans une fiole jaugée.)

- Réactif de Folin-Ciocalteu 1N

(Diluer au ½ la solution commerciale.)

- Extrait enzymatique

Procédure :

➢ Gamme étalon de BSA digérée:

Une solution de BSA à 1 % (soit 10 g/ℓ ou 10 mg/mℓ) correspondant à celle qui sera additionnée au milieu réactionnel est préparée. Elle constituera la borne supérieure de la gamme et sera utilisée comme solution mère pour l'élaboration des dilutions intermédiaires à 2 ; 4 ; 6 et 8 mg/mℓ. Les tubes de la gamme sont préparées de la façon suivante :

[BSA] (mg/tube)	0	2	4	6	8	10
$V_{Tampon\ pH\ 8.0}$ (mℓ)	4	3	3	3	3	3
$V_{Dilution}$ (mℓ)	0	1	1	1	1	1
$V_{Protéase}$ (µl)	20	20	20	20	20	20

Les tubes sont préchauffés au bain marie à 55°C puis 20 µℓ d'une solution de protéase commerciale est ajoutée. Une incubation d'une durée d'une heure est effectuée afin de permettre la dégradation complète de la BSA présente dans chaque tube. Les acides aminés libérés sont ensuite dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu de la même façon que les essais hormis les étapes de décantation et de centrifugation.

- Milieu réactionnel :

6 tubes à essai sont nécessaires afin de réaliser le zéro et l'essai en triple. Ils doivent contenir :

- Solution de BSA 1 % (1 mℓ)
- Barreau aimanté

Les tubes sont placés sous agitation dans le bain marie afin d'atteindre 37°C.

- Extrait enzymatique (1 mℓ)

→ Incubation à 37°C

Les tubes correspondant au zéro sont incubés une minute et ceux de l'essai durant 10 minutes.

Arrêt de la réaction par ajout de TCA (2 mℓ) et agitation douce.
Laisser décanter 30 minutes puis transférer environ 1,5 mℓ de surnageant dans un tube Eppendorf (1,5 mℓ).
Centrifuger 10 minutes à 5 000 rpm (MiniSpin-Eppendorf).
Prélever 0,5 mℓ de surnageant, ajouter 2,5 mℓ de solution de carbonate de sodium à 0,5 M puis 0,5 mℓ de réactif de Folin-Ciocalteu 1 N. Vortexer et conserver à l'obscurité 2h.
Lire l'absorbance à 660 nm.

N.B. : La même méthode peut être mise en œuvre en utilisant la caséine comme substrat mais sa dissolution s'avère plus difficile.

Calculs :

$\Delta DO_{660nm} = \Sigma DO_{660nm\ essai}/3 - \Sigma DO_{660nm\ zéro}/3$

La ΔDO_{660nm} est convertie en µg de BSA dégradée grâce à l'équation de la droite étalon.

Activité = µg de BSA dégradée/[temps d'incubation(mn)*masse de digestat extraite(g)]

<u>Unité</u> : µg de BSA dégradée/mn.g de digestat^{-1}

ANNEXE 13 : PROTOCOLE DE MESURE D'ACTIVITE LIPASIQUE

CONDITIONS : ***$T_{INCUBATION}$ = 34°C, pH = 7,0***

Réactifs :

- Tampon pH 7,0

(Peser 71,6 g de $Na_2HPO_4,12H_2O$ et dissoudre dans 600 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 1 ℓ dans une fiole jaugée : solution A.

Peser 13,6 g de KH_2PO_4 et dissoudre dans 300 mℓ d'eau distillée.

Ajuster à 500 mℓ : solution B.

Dans un grand bécher contenant la solution A, verser la solution B jusqu'à atteindre pH 7,0.)

- Emulsion trioléine (10 %) - alcool polyvinyle (PVA ; 2 %)

(Peser 4 g de PVA, dissoudre dans l'eau distillée sous agitation et chauffage jusqu'à dissolution complète du produit. Ajuster à 200 mℓ dans une fiole jaugée.

Peser 20 g de trioléine et diluer dans la solution de PVA. Ajuster à 200 mℓ dans une fiole jaugée.

Passer la solution aux ultrasons à une amplitude de 40 % durant 5 minutes dans un bain de glace.)

- Solution d'arrêt acétone - éthanol (1:1 v/v)

(Prélever 100 mℓ de chaque produit et conserver dans une bouteille en verre.)

- Solution titrante de soude à 0,05 M

(Peser 1 g de NaOH et dissoudre dans de l'eau distillée. Ajuster à 500 mℓ dans une fiole jaugée.

- Solution de thymolphtaléine (indicateur coloré)

(Peser 0,1 g de thymolphtaléine et dissoudre dans l'éthanol sous agitation. Ajuster à 100 mℓ dans une fiole jaugée.

Procédure :

- Milieu réactionnel : bouteille en verre

- Emulsion trioléine-PVA (5 mℓ)
- Tampon pH 7,0 (4 mℓ)

Placer les bouteilles à l'étuve à 34°C afin qu'elles s'équilibrent à cette température.

- Extrait enzymatique (1 mℓ)

→ Incubation à 34°C

Arrêt de la réaction par ajout de 20 mℓde la solution acétone-éthanol.

Dans le cas du zéro d'activité, la solution d'arrêt est ajoutée avant l'extrait enzymatique.

Centrifugation 10 minutes à 3 000×*g*.

Prélèvement de 20 mℓ de surnageant et ajout de quelques gouttes de thymolphtaléine.

Titration par la soude 0,05 M en surveillant l'apparition et le maintien d'une coloration bleue.

Calculs :

1 mole de soude réagit avec 3 moles d'acide oléique.

D'où $3V_aC_a = V_bC_b$ soit $C_a = (V_bC_b) / 3V_a$

Avec V_b = Volume de soude versé ; C_b = 0,05 M (corriger avec la pesée)

V_a = Volume de la prise d'essai (soit 20 mℓ)

Activité = C_a/[temps d'incubation(mn)*masse de digestat extraite(g)]

<u>Unité</u> : µmoles d'acide oléique formées/mn.g de digestat^{-1}