



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Département fédéral de l'environnement, des transports,
de l'énergie et de la communication DETEC

Office fédéral de l'énergie OFEN

Rapport final Décembre 2011

Optimisation des tests standardisés de digestibilité dans des réacteurs batch

Mandant:

Office fédéral de l'énergie OFEN
Programme de recherche énergétique
CH-3003 Berne
www.bfe.admin.ch

Cofinancement:

Services Industriels de Genève / Fonds COGENER, CH-1211 Genève
Axpo Kompogas AG, CH- 8152 Glattbrugg

Mandataire:

EPFL, Laboratoire de Biotechnologie Environnemental (LBE)
1015 Lausanne
<http://lbe.epfl.ch/>

Auteurs:

Nathalie Bachmann, EREP SA, nathalie.bachmann@erep.ch
Marc Deront, EPFL LBE, marc.deront@epfl.ch
Hélène Fruteau, Ingénieure indépendante, helene_fruteau@yahoo.fr
Christof Holliger, EPFL LBE, christof.holliger@epfl.ch
Yves Membrez, EREP SA, yves.membrez@erep.ch
Arthur Wellinger, Nova Energie, arthur.wellinger@novaenergie.ch

Responsable de domaine de l'OFEN: Sandra Hermle

Chef de programme de l'OFEN: Sandra Hermle

Numéro du contrat et du projet de l'OFEN: 154365/103311

Les auteurs de ce rapport portent seul la responsabilité de son contenu et de ses conclusions.

Résumé

Des protocoles et normes pour des tests de digestibilité des matières organiques (tests BMP = Biomethane Potential) sont disponibles depuis bientôt 25 ans. Cependant les résultats de ces tests doivent être utilisés avec précaution suite à une sous- ou surestimation fréquente de la production de biogaz. Ceci est dû aux préparations et conditions de test BMP qui varient selon la norme et le matériel appliqué, ainsi que des coutumes de chaque laboratoire.

L'objectif du projet est une évaluation de paramètres susceptibles d'être à l'origine de ces variations. La meilleure compréhension des interactions devra permettre d'améliorer les protocoles de test BMP, dans l'objectif de les rendre plus homogènes et fiables.

Les études préalables au travail expérimental (état de l'art et comparaison inter-laboratoire) ont clairement confirmées l'existence de lacunes et des besoins d'harmonisation des tests BMP. Des écarts jusqu'à 30% de la valeur théorique pour un substrat de référence (cellulose) et jusqu'à 75% pour des substrats plus complexes – réalisés dans des laboratoires renommés et sérieux - ne laissent plus de doute sur le besoin d'investigation.

Un protocole de base a été élaboré pour mener les tests expérimentaux. Les conditions fixes clés étaient le rapport $MSV_{inoculum} / MSV_{substrat}^*$ à 4:1, la concentration de MSV_{totale} à environ 40 g/L et l'absence de tout supplément de test (vitamines, éléments traces, sels minéraux). L'influence de la provenance de l'inoculum et l'adaptation de ce dernier ont été analysées. Des inocula de digesteur de STEP, UASB, agricole et industriel ont été utilisés, sans et avec adaptation au substrat de test (adaptation par étape 20%, 40%, 100%).

Les résultats ont montré que ce protocole permet une conduite robuste des tests BMP. La provenance de l'inoculum n'était pas déterminante, à condition que l'inoculum soit de bonne qualité et que le test soit mené à la même température que dans le digesteur source. Dans ces conditions, l'adaptation de l'inoculum n'avait pas non plus d'influence significative sur le résultat, mais uniquement sur la cinétique dans quelques cas.

A la suite des expériences, un catalogue de recommandations a été formulé, mettant en évidence l'état d'art des connaissances au niveau des tests BMP. Pour la validation et l'application du protocole retenu, une comparaison entre résultats au laboratoire et production de gaz dans les installations de taille réelle devra être réalisée.

* MSV = Matière Sèche Volatile

Zusammenfassung

Vergärbarkeitstests existieren seit bald 25 Jahren und trotzdem sind die Resultate oft unzuverlässig, da die Methanproduktion regelmässig über- oder unterschätzt wird. Dafür verantwortlich sind die Testbedingungen, welche von der verwendeten Norm und den spezifischen Laborgewohnheiten abhängen.

Ziel dieses Projekts war, die Parameter zu analysieren, die zu solchen Unsicherheiten führen. Das bessere Verständnis des Testverfahrens soll erlauben, genauere Anweisungen zu umstrittenen Punkten zu geben und damit die Verlässlichkeit der Resultate zu verbessern.

Die Literaturstudie sowie die Resultate von zwei Ringtests haben klar gezeigt, dass Lücken bestehen bei den Anweisungen zu Vergärbarkeitstests. Abweichungen der Resultate bis 30% bei einem Referenzsubstrat (Cellulose) und bis 75% bei komplexeren Substraten mussten festgestellt werden.

Zur Durchführung der Experimenten wurde ein Protokoll erarbeitet mit folgenden fixen Schlüsselparametern: Ein Verhältnis der $\text{oTS}_{\text{Inokulum}} / \text{oTS}_{\text{Substrat}}^*$ von 4:1, eine Konzentration der $\text{oTS}_{\text{gesamt}}$ von ca. 40g/L und die Abwesenheit von jeglichen Zusätzen wie Mineralsalze, Vitamine, und Spurenelemente. Der Einfluss der Herkunft und Adaptierung des Inokulums wurden im Rahmen der Studie analysiert. Gärschlamm aus Faultürmen in ARA, UASB, Landwirtschaft und Industrie wurden getestet, mit und ohne Adaptierung an das Gärsubstrat (etappenweise Adaptierung mit Zugabe von 20%, 40%, und 100% Gärsubstrat).

Die Resultate haben gezeigt, dass das definierte Protokoll eine robuste Testführung gewährt. Die Herkunft des Inokulums war nicht massgebend, unter der Bedingung, dass es von guter Qualität ist und dass die Temperatur des Tests mit derjenigen des Faulturms übereinstimmt. Unter den gegebenen Bedingungen hatte auch die Adaptierung des Inokulums keinen bedeutenden Einfluss auf das Testresultat; nur auf die Kinetik in einigen Fällen.

In Folge der Experimente wurde ein Empfehlungskatalog zu den Vergärbarkeitstests gemäss dem Stand der Technik erstellt. Zur Validierung und Anwendung des erarbeiteten Protokolls wäre es interessant die Übereinstimmung von Laborresultaten und erzielten Methanausbeuten in Grossanlagen zu prüfen.

* oTS = organische Trockensubstanz

Table des matières

PARTIE I: INTRODUCTION

1.	Introduction	7
2.	Objectifs et démarche	7

PARTIE II: ETAT DE L'ART

3.	Revue bibliographique	9
3.1.	<i>Activités de recherche</i>	9
3.2	<i>Systèmes de tests BMP</i>	10
4.	Protocoles pour les tests BMP	10
5.	Contexte européen et mondiale	12
5.1.	<i>Le groupe de travail de l'IWA</i>	12
5.1.1.	<i>L'étude inter-laboratoire de Raposo et al.</i>	12
5.1.2.	<i>L'étude inter-laboratoire de l'ABAI group en cours</i>	15
5.2.	<i>Conclusion</i>	17
6.	Etat de l'art – conclusion	17

PARTIE III: TRAVAIL EXPERIMENTAL

7.	Définitions	18
8.	Conditions des expériences	19
8.1.	<i>Conditions fixes: protocole de test</i>	19
8.2.	<i>Conditions variables</i>	20
8.3.	<i>Substrats de test</i>	21
8.4.	<i>Matrice expérimentale</i>	22
9.	Méthodes et matériel	22
9.1.	<i>Inoculum : échantillonnage, caractérisation et préparation</i>	22
9.2.	<i>Substrat : stockage, caractérisation et préparation</i>	23
9.3.	<i>Tests de digestibilité</i>	23
9.3.1.	<i>Principe : préparation des tests</i>	23
9.3.2.	<i>Matériel</i>	24
9.4.	<i>Mesure de la production de méthane</i>	24
9.4.1.	<i>Principe : mesure de la production de méthane</i>	24
9.4.2.	<i>Matériel</i>	26
9.5.	<i>Saisie des données</i>	26
9.5.1.	<i>Traitement des données</i>	26
10.	Hypothèses	27
11.	Résultats	27
11.1.	<i>Production de méthane par quatre inocula sur deux substrats simples</i>	27
11.2.	<i>Production de méthane par trois inocula différents sur deux substrats complexes</i>	28
11.3.	<i>Analyse statistique</i>	30
11.3.1.	<i>Traitement statistique no.1 : Substrats facilement dégradables</i>	30
11.3.2.	<i>Traitement statistique no.2 : Substrats complexes</i>	31

<i>11.3.3. Traitement statistique no.3 : Inoculum STEP</i>	322
<i>11.3.4. Traitement statistique no.4 : Substrat cellulose</i>	333
<i>11.3.4. Réponses statistiques</i>	34

PARTIE IV: CONCLUSIONS PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

12. Conclusions	35
13. Recommandations	37
14. Perspectives	41
 Bibliographie	 42

Annexes

ANNEXE I:	Publications
ANNEXE II:	Systèmes de test
ANNEXE III:	Comités de standardisation
ANNEXE IV:	Protocole standard proposé par l'IWA
ANNEXE V:	Liste des laboratoires participants à l'étude de l'ABAI group
ANNEXE VI:	Résumé des mesures et méthodes
ANNEXE VII:	Méthodes de caractérisation
ANNEXE VIII:	Caractérisation des inocula
ANNEXE IX:	Caractérisation des substrats
ANNEXE X:	Matrice expérimentale
ANNEXE XI:	Courbes de production de méthane
ANNEXE XII:	Réponses expérimentales
ANNEXE XIII:	Suivi des expériences
ANNEXE XIV:	Analyse statistique

PARTIE I :

INTRODUCTION

1. Introduction

La production d'énergie par digestion anaérobie gagne d'avantage d'importance, en Suisse comme dans le monde entier. L'amélioration des connaissances biologiques et de la technologie a permis le développement des installations de biogaz performantes et efficaces. Des substrats organiques d'origines et de compositions diverses sont utilisés dans ces installations. Ils sont transformés partiellement en biogaz par les microorganismes, dépendant de la qualité et de l'accessibilité de la matière organique.

Lors de la planification et de la gestion d'une installation de biogaz, il est important de connaître à l'avance la quantité de biogaz, respectivement de méthane, qui sera produite à partir des substrats utilisés. D'une part cela permet de dimensionner correctement l'unité de valorisation de biogaz, d'autre part cela permet de prévoir la recette liée à la vente de l'énergie, qui conditionne, pour partie, la viabilité économique de l'installation.

Pour cela, on fait appel à des tests de digestibilité qui sont réalisés au laboratoire. Les procédés souvent utilisés sont les tests de potentiel méthanogène (tests BMP – biomethane potential), où le substrat concerné est digéré dans un « mini-réacteur » sous conditions définies. Cependant, les résultats de ces tests ne sont souvent pas satisfaisants, suite à une sous- ou surestimation de la production de biogaz menant à des incertitudes voire des erreurs dans la planification des installations.

La présente étude visait une amélioration de ces tests BMP au travers d'expériences en laboratoire et à l'investigation de paramètres susceptibles d'influencer les résultats. Une meilleure compréhension des enjeux au laboratoire devra permettre de formuler des recommandations concernant la méthodologie de test et ainsi diminuer les incertitudes.

2. Objectifs et démarche

L'objectif global du projet était une amélioration des tests BMP destiné aux substrats pour la digestion anaérobie. Les résultats de recherche devaient permettre d'établir un protocole de test menant à une estimation de la production de biogaz plus fiable et plus réaliste.

Les étapes du projet et les objectifs spécifiques étaient les suivants :

Etat de l'art

- Prise de connaissance des recherches menées et de la situation du marché
- Identification et comparaison des normes et protocoles existants
- Identification des groupes de travail actifs dans le même domaine
- Description du contexte européen et présentation des études inter-laboratoires

Montage des expériences

- Définir un protocole de base robuste
- Choisir les paramètres à tester
- Définir la matrice expérimentale
- Définir les méthodes et appareils de mesure
- Mettre en place les expériences

Tests de digestibilité

- Réaliser les tests BMP au laboratoire
- Confirmer ou améliorer les méthodes définies

Analyse des résultats

- Analyses statistiques des réponses expérimentales et formulation des résultats
- Conclusions des expériences

Conclusions et recommandations

- Elaboration des recommandations pour améliorer les protocoles de tests BMP
- Conclusions globales

PARTIE II :

ETAT DE L'ART

Dans cette partie un état d'art du domaine des tests BMP est présenté. Il permet de comprendre la situation dans la recherche, sur le marché et au niveau des conditions cadres. Ces informations ont donné la base pour la suite du travail. En fonction des connaissances existantes, les conditions du travail expérimental ont pu être mieux définies.

3. Revue bibliographique

3.1. Activités de recherche

L'existence de diverses publications concernant les tests de digestibilité témoigne d'un intérêt pour ce sujet depuis plus d'une dizaine d'années. Le *Specialist Group on Anaerobic Digestion* [26] de l'Agence Internationale de l'Eau (IWA) ont publié plusieurs articles dans « Reviews in Environmental Science and Bio/Technology » en 2004, présentant les méthodes et le matériel utilisés pour les tests de digestibilité.

Au niveau du travail expérimental il existaient peu de résultats. Seule l'influence du prétraitement des substrats (diamètre des particules) était considérée dans quelques études; toutefois les résultats ne sont pas harmonieux.

Les publications sont citées dans le tableau 1, regroupées en fonction de leur nature. Un résumé de chaque publication est donné en annexe I.

Tableau 1: Publications scientifiques

Description de méthodes ou protocoles	Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. [14] Standardized methods for anaerobic biodegradability testing. [9]
Comparaison d'équipement ou d'approches	Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. [1] Equipment used for testing anaerobic biodegradability and activity. [6] Comparison of test systems for the determination of the biodegradability of organic materials under anaerobic conditions. [7]
Evaluation d'erreurs	Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion process. [17]
Influence du diamètre des particules	Wheat straw milling effect on biogas production. [4] Effects of particle size on anaerobic digestion of tomato solids waste. [8] Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. [10] Influence of the seize reduction of organic waste on their anaerobic digestion. [11] Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials. [12]

Quelques conclusions sont intéressantes dans le contexte de la présente étude :

- Le matériel utilisé pour la mesure du gaz peut influencer la quantité relevée [17]
- La conversion du volume de gaz en conditions normales peut être une source d'erreurs [17]

- La taille des particules du substrat peut avoir une influence sur le potentiel méthanogène [4], [8], [10], [11], [12]

En même temps, la revue bibliographique confirme le manque de travail expérimental et de connaissances fondamentales au niveau de l'influence des paramètres. Les avis scientifiques divergent et une nécessité d'harmonisation des systèmes de test est évoquée à plusieurs reprises.

3.2 Systèmes de tests BMP

Des systèmes sont proposés par différents fabricants pour assister ou faciliter la détermination du potentiel méthanogène d'un substrat. Les « AMPTS » ou « BCS-CH₄ biogas » (tableau 2) sont des systèmes complets sous forme de kits. La mesure du biogaz et de la teneur en méthane se font automatiquement le long du test et sont enregistrés en ligne.

D'autres systèmes sont moins complets, comme le « continuous fixed-bed reactor » qui a été développé en 1996 pour les tests en continu (sans mesures automatiques) ou l'eudiomètre qui permet uniquement la mesure du volume de gaz. Le système OxyTop mesure la demande biochimique en oxygène (DBO) pour ensuite calculer le potentiel méthanogène. Le tableau 2 résume les systèmes. En annexe II figure une description plus détaillée de chacun.

Tableau 2: Systèmes de test

Système	Fabricant	Description
AMPTS (Automatic Methane Potential Test System)	Bioprocess Control (Suède)	Test BMP complet (batch)
BCS-CH ₄ biogas	BlueSens-gas sensor GmbH (Allemagne)	Test BMP complet (batch)
Continuous fixed-bed reactor	EMPA (Suisse)	Test BMP complet (continu)
OxiTop	WTW (Allemagne)	Mesure de la DBO
Eudiomètre	TUHH (Technische Universität Hamburg - Harburg)	Mesure du volume de gaz

Il est en dehors du périmètre de ce projet de juger la qualité de ces systèmes. Pour des petits laboratoires les systèmes élaborés sont certainement peu adaptés puisqu'ils sont chers et ne proposent qu'une seule fonction.

4. Protocoles pour les tests BMP

De nombreux comités de standardisation existent aux échelles nationales et internationales. Ainsi, un ensemble de normes et de directives sont en circulation, certaines datant d'il y a plus de 25 ans. Les comités importants intervenant dans la formulation et la vulgarisation de ces protocoles sont brièvement présentés à l'annexe III.

Le tableau 3 présente une vue d'ensemble des protocoles et de leur principales caractéristiques, permettant de voir les différences essentielles de leurs recommandations. On aperçoit rapidement une vaste divergence des méthodes présentées, ce qui donne une première idée des possibles sources d'erreurs respectivement de variation des résultats.

Les indications divergent sur quasi tous les paramètres énumérés, dont certains semblent à priori importants : volume de test, ajout de compléments, durée du test, prétraitement et adaptation de l'inoculum.

Tableau 3: Normes concernant les tests BMP

	DIN 38414 TL8 1985	VDI 4630 2006	ISO 11734 1995	ISO 15985 2004	ISO 14853 2005	ASTM D 5250 1992	ASTM D 5511 1994
Paramètre de détermination de la dégradabilité	Biogaz en phase gazeuse	Biogaz en phase gazeuse	Biogaz en phase gazeuse et carbone inorganique dissout dans la solution barrière.	Biogaz en phase gazeuse, carbone organique total	Biogaz, CO ₂ et CH ₄ , COD, CIT resp. CID, optionnel accroissement de biomasse (protéine)	Biogaz, CO ₂ et CH ₄ , carbone organique soluble COS, polymères	Biogaz, CO ₂ et CH ₄ en phase gazeuse
Substances testées	a.d.	Toutes substances organiques	Substances organiques solubles	Substances organiques à haute teneur en matière sèche	Substances organiques non solubles (si possible en forme de poudre)	Plastiques	Plastiques
Milieu de culture	Pas de milieu de culture, ev. ajout de NH ₄ Cl où NaH ₂ PO ₄ pour un ratio C:N:P de 100:6:1	Pas de milieu de culture	Tampon phosphate, milieu de culture en sel minéraux	Pas de milieu de culture	Tampon phosphate, milieu de culture en sel minéraux	Tampon carbonate-phosphate, milieu de culture en sels minéraux	Pas de milieu de culture
Volume de test	500 mL	500, 1000 ou 2000 mL	100-1000 mL	> 750 mL	250 mL	100 mL	1000 mL dans 2-L Er-lenmeyer
Supplément de vitamines	Non	Non	Non	Non	Oui (optionnel)	Non	Non
Supplément d'éléments trace	Non	Non	Oui (optionnel)	Non	Oui (optionnel)	Oui	Non
Inoculum	Boues de digestion de STEP municipale	Boues de digestion de STEP municipale ou de digesteur agricole	Boues de digestion de STEP municipale	Boues de digestion d'installation thermophile traitant des ordures ménagères	Boues de digestion de STEP municipale	Boues de digestion de STEP municipale	Boues de digestion thermophile de STEP municipale
Prétraitement de l'inoculum	a.d.	Laisser digérer/ dégrader 7 jours, lavage (optionnel)	Lavage, post-digestion	post-digestion	Lavage avec tampon phosphate	Laisser digérer/ dégrader pendant 7-14 jours	Laisser digérer/ dégrader pendant 7 jours
Adaptation de l'inoculum	a.d.	Optionnel, mais pas d'instructions précises	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.
Température	35±1	37±2 ou 55 ±1	35±2	52±2	35±2	35±2	52±2
Durée du test	20-40 jours	Jusqu'à production de < 1% de la production totale de gaz	60 jours	15 jours	60 jours	a.d.	Jusqu'à 70% de dégradation du substrat de référence
Mesure de gaz	Volumétrie	Manométrique ou volumétrie	Manométrique ou volumétrie	Volumétrie	Manométrique ou volumétrie	Manométrique ou volumétrie	Volumétrie

5. Contexte européen et mondiale

La digestion anaérobie se développe dans de nombreux pays européens, sous l'impulsion de nouvelles directives communautaires et des politiques nationales. De plus le développement de la codigestion entraîne l'utilisation de produits de plus en plus variés : effluents d'élevage, déchets de cultures, déchets et effluents organiques en provenance des industries agro-alimentaires de toutes natures, déchets organiques ménagers, de la restauration collective, des supermarchés, et également aujourd'hui cultures énergétiques.

La détermination des potentiels de production de méthane à partir de divers produits organiques est donc un problème auquel doivent faire face tous les pays qui souhaitent développer de la filière biogaz pour la production d'énergie renouvelable.

5.1. Le groupe de travail de l'IWA

L'« International Water Association » (IWA), association mondiale qui rassemble les chercheurs et les professionnels de la gestion de l'eau mais également des déchets, a créé un groupe de travail dédié à la détermination de la biodégradabilité en digestion anaérobie : « Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition » (ABAI).

L'objectif de ce groupe était de développer des standards pour la mesure des paramètres suivants :

- biodégradabilité et production maximale de biogaz
- test d'activité spécifique de la biomasse microbienne
- test d'inhibition
- test de stabilité des boues anaérobies

Le groupe a tenu sa première réunion de travail en juin 2002, en Italie, preuve que le besoin d'harmonisation était déjà patent voici presque 10 ans. Il réunissait des spécialistes du monde académique dans le domaine de la digestion anaérobie, venant essentiellement des pays de l'Union Européenne : Danemark, Portugal, Espagne, Italie, République Tchèque, Royaume Uni, Pays-Bas, Russie et Uruguay.

Quatre ans plus tard, l'ABAI group tenait son deuxième séminaire de travail à Prague. Le constat était le suivant : depuis 20 ans, un très grand nombre d'articles traitant de la biodégradabilité et de la productivité en biogaz de différents substrats organiques ont été publiés. Par ailleurs un certain nombre de normes ont été édictées dans différents pays. Cependant les procédures expérimentales diffèrent d'un texte à l'autre et produisent des résultats non comparables. A l'issue de cette deuxième réunion un projet de proposition de protocole expérimental¹ fut rédigé. Une publication plus spécifiquement axée sur les tests BMP a été élaborée par ce même groupe de travail [2]. Cependant, faute de moyens dédiés, aucune suite n'avait jusque-là été donnée à ce travail.

Au cours de la phase bibliographique du présent mandat, cette publication fut identifiée comme une des plus proches de notre propre objectif.

5.1.1. L'étude inter-laboratoire de Raposo et al.

En 2010, une étude inter-laboratoire indépendante du groupe de travail de l'IWA, portant sur la comparaison des résultats de tests BMP sur des substrats identiques et homogènes, obtenus par 20 laboratoires européens, fut publiée par Raposo au cours du 12^{ème} Congrès International sur la Digestion Anaérobie au Mexique². Bien qu'indépendante de l'ABAI group les résultats de cette étude furent discutés au cours de ce congrès avec les membres de l'ABAI group, et nous avons participé à la discussion³.

Quatre substrats ont été testés : la cellulose, l'amidon, la gélatine, et deux échantillons identiques d'haricot mungo.

¹ Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition, Task Group Meeting, 9-10 October 2006, Prague (CZ)

² Raposo, F. et al ; Proceedings of the 12th ISAD, Guadalajara-ME, September 2010

³ Compte rendu de participation à la 12^{ème} Conférence Internationale sur la digestion anaérobie, Hélène Fruteau pour l'OFEN, 2 décembre 2010

Les conditions d'expérience étaient laissées à l'appréciation des différents laboratoires, tous impliqués dans des recherches ou des prestations d'analyses incluant ces tests. Seul un paramètre était imposé, de par son influence démontrée sur les résultats des tests BMP : le ratio Inoculum/Substrat (ISR).

Il s'agit ici de la première étude de ce type publiée, destinée à comparer les résultats inter-laboratoires pour les tests BMP.

Nous allons examiner les résultats obtenus pour la cellulose, usuellement utilisé comme contrôle positif au cours des tests, et les résultats du substrat complexe dans les mêmes conditions d'ensemencement (ISR).

Cellulose

Les résultats obtenus par les différents laboratoires pour la cellulose sont reportés sur la figure 1, sur la base de la publication de Raposo et al. [13]. Le laboratoire 1 n'a pas donné de résultat et on ne considérera pas le résultat du laboratoire 15 très en dehors de la fourchette. Ces résultats montrent que la valeur moyenne pour l'ensemble des laboratoires s'établit pour la cellulose à 345 mL CH₄/g MSV ajouté, avec un écart type relatif de 10%, ce qui pourrait paraître satisfaisant à priori.

Cependant ce résultat ne nous est pas utile puisque dans la pratique c'est auprès d'un seul laboratoire que va être réalisé le test BMP.

C'est donc plutôt en termes d'écart maximum qu'il faut aborder ces résultats. Les valeurs minimales et maximales de BMP sont respectivement de 284 et 412 mL CH₄/g MSV, soit un écart de 128 mL CH₄/g MSV.

En supposant une biodégradation complète de la cellulose et l'utilisation de 10% pour la croissance de la biomasse et l'énergie de maintenance, on devrait observer une production de méthane de 90% de la production calculée à partir de la demande chimique en oxygène (DCO), soit 373 mL CH₄/g MSV. Les écarts par rapport à cette valeur théorique sont reportés sur la figure 2.

Les écarts maximums observés pour la productivité en méthane de la cellulose sont de -25% et +10% de la valeur théorique, soit une amplitude totale de 35% de la valeur théorique.

Les écarts autour de chaque valeur (correspondant à l'écart type entre les réplicats, exprimé en % de la moyenne) sont également importants : on voit que les variations entre les réplicats atteignent $\pm 20\%$ (si l'on excepte la valeur très en dehors du laboratoire 12).

Les écarts observés avec un protocole strictement identique et pour un même laboratoire, sont donc également loin d'être négligeable.

Figure 1: Productivité en méthane de la cellulose pure : résultats des tests BMP de 20 laboratoires en Europe (données de Raposo et al [13])

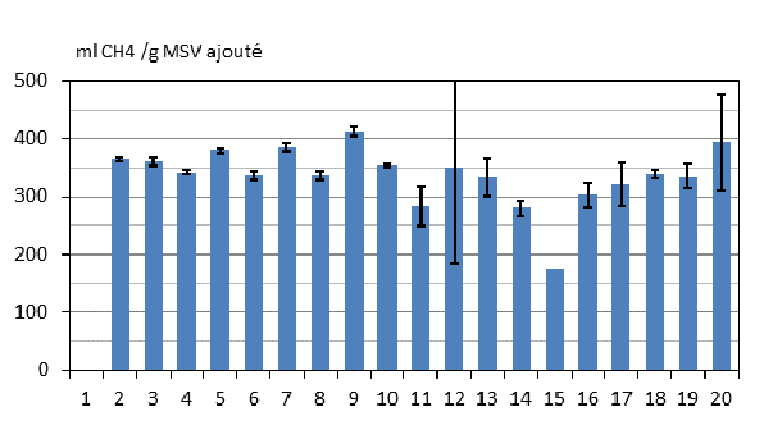
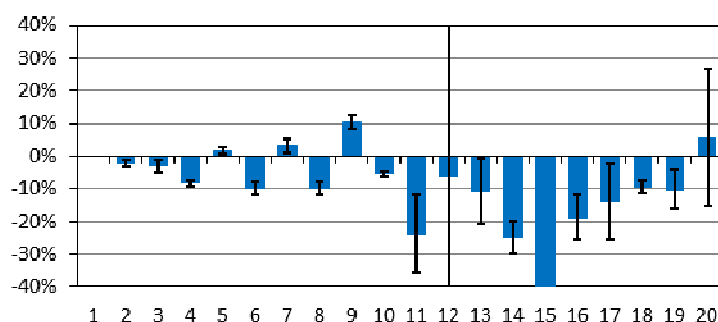


Figure 2: Ecart par rapport à la valeur théorique pour la cellulose, exprimés en % (sur la base des données de Raposo et al. [13])



Haricot Mungo

Les résultats obtenus au cours de cette même étude pour un substrat complexe, le haricot Mungo, sont représentés sur la figure 3.

Le laboratoire 20 n'a pas donné de résultats et on ne considèrera pas le résultat du laboratoire 10 très en dehors de la fourchette.

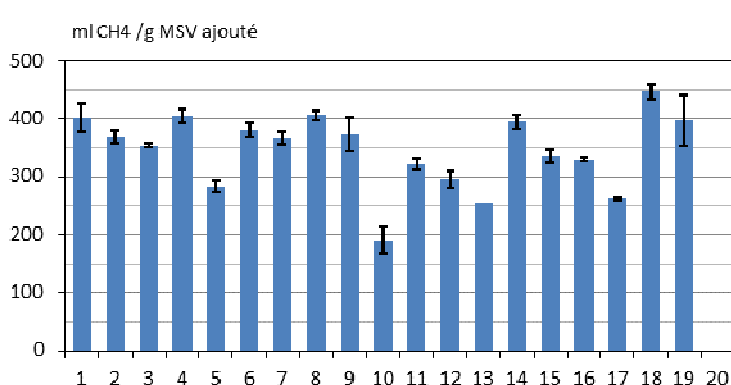
Ces résultats montrent une valeur moyenne de 354 mL CH₄ /g MSV pour le haricot mungo, avec une dispersion des résultats de 18%.

De la même façon que précédemment, on considèrera plutôt les valeurs extrêmes pour la signification de l'étude. Les valeurs minimales et maximales de BMP sont respectivement de 255 et 447 mL CH₄/g MSV, soit une amplitude maximale de 192 mL CH₄ /g MSV.

Comme on ne dispose pas pour ce substrat de valeur théorique, on rapporte chaque résultat à la valeur moyenne de tous les laboratoires. Les écarts maximums observés sont de cette façon de -28% et +26% autour de la moyenne, soit une amplitude totale de 54%.

On remarque que l'écart autour de la moyenne pour chaque laboratoire, est plus faible cette fois : au maximum 11%.

Figure 3: Productivité en méthane du haricot Mungo, pour 19 des 20 laboratoires en Europe (sur la base des données de Raposo et al. [13])



L'analyse des résultats de l'étude inter-laboratoire par Raposo, avec l'objectif de déterminer les paramètres pouvant influencer les résultats du test, n'a pas permis d'identifier un ou plusieurs facteurs ayant une influence significative.

De même nous avons tenté, par une approche différente basée sur l'analyse multicritère, d'identifier un ou des facteurs déterminants mais sans succès.

5.1.2. L'étude inter-laboratoire de l'ABAI group en cours

Les résultats obtenus par l'étude inter-laboratoire Raposo étaient une justification supplémentaire pour poursuivre la définition d'un protocole plus standardisé. C'est pourquoi il nous a semblé important dans le cadre de l'étude de participer activement aux travaux de l'ABAI group de l'IWA dans ce domaine.

Nous avons donc proposé de réaliser, à partir du protocole de l'IWA, une autre étude inter-laboratoire impliquant cette fois des laboratoires participant à l'ABAI group, le laboratoire de M. Raposo et le LBE. Le protocole de l'IWA est proche de celui utilisé à l'EPFL pour l'étude expérimentale (voir partie IV). Pour permettre la réalisation de ce travail, nous avons proposé d'en assumer la coordination, en partie dans le cadre du présent contrat.

Ce travail est aujourd'hui en cours de réalisation. Nous avons obtenu l'autorisation de l'ABAI group d'utiliser leurs résultats expérimentaux préliminaires afin de les intégrer dans ce rapport. Les résultats ne sont pas complets à ce jour, mais nous présentons ici les résultats obtenus avec le substrat de référence cellulose, pour 7 des 10 laboratoires participants (liste des laboratoires en annexe V).

Matériel et méthode

Le protocole retenu est celui décrit dans la publication d'Angelidaki et al. [2], montré en annexe IV. Plusieurs paramètres sont là encore laissés à l'appréciation du laboratoire, notamment :

- l'origine de l'inoculum
- la préparation de l'inoculum (dilution, complémentation avec une solution nutritive et/ou tamponnée)
- les volumes mis en œuvre
- la purge du volume gazeux
- le mode de mélange
- la méthode de mesure de la production de méthane

Le ratio inoculum/substrat (ISR) n'est pas imposé, mais le protocole recommande de réaliser plusieurs ratios afin de vérifier l'absence de phénomène d'inhibition par le substrat. En effet dans le cas d'une faible proportion d'inoculum (donc une forte proportion de substrat) des inhibitions dues à la présence d'un composé inhibiteur dans le substrat peuvent se manifester.

Pour cette raison nous avons choisi dans la définition de notre protocole un ratio inoculum/substrat élevé. Nous avons ajouté une contrainte au protocole de l'IWA sur le ISR, afin d'avoir au moins une série de résultats par laboratoires avec le même ratio que celui que nous avons retenu dans notre protocole standard, soit 4:1 en MSV. Ainsi cela nous permettra de valider notre choix avec des résultats extérieurs. Les substrats utilisés sont la cellulose pure en poudre, la farine animale, la farine de paille et la farine de luzerne.

Résultats

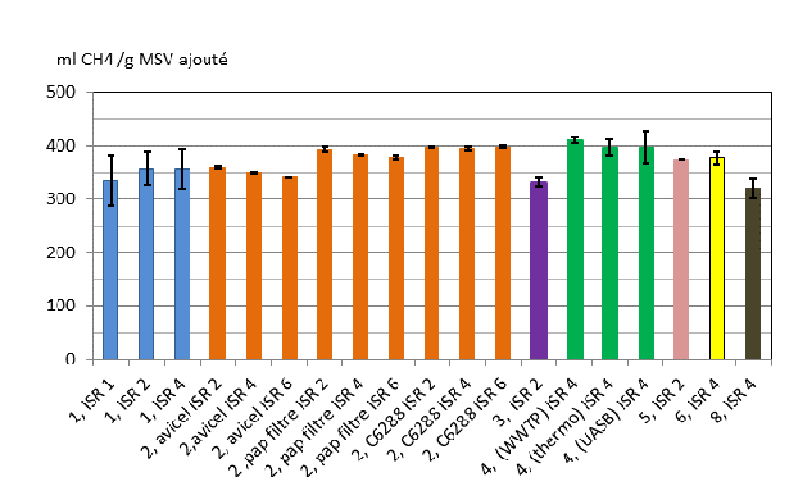
Les résultats avec la cellulose obtenus par 7 des 10 laboratoires participants sont représentés sur la figure 4.

Les laboratoires n°1 et n°2 ont testé trois ratios inoculum/substrat : ISR=1, ISR=2, ISR=4 et ISR=2, ISR=4, ISR=6 respectivement.

Le laboratoire n°2 a testé trois types de cellulose différents : l'avicel, le papier filtre et la cellulose Sigma C6288. Les autres laboratoires ont utilisé l'avicel.

Le laboratoire n°4 a testé trois types d'inoculum différents : WWTP = boues digérées de station d'épuration, Thermo = digestat de biodéchets thermophile ; UASB= boues granulaires d'un réacteur UASB.

Figure 4: Productivité en méthane de la cellulose pure mesurée par 7 laboratoires avec différents ISR

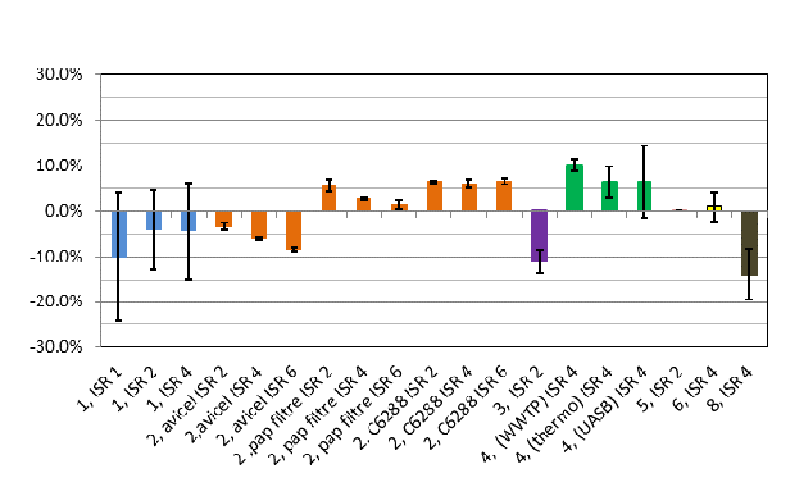


Le résultat moyen obtenu pour la productivité en méthane de la cellulose est de 371 mL CH₄/g MSV, très proche du maximum théorique calculé à partir de la DCO, de 373 mL CH₄/g MSV.

Les valeurs minimales et maximales observées sont respectivement de 321 et 410 mL CH₄/g MSV. Soit une amplitude de 89 mL CH₄/g MSV.

La figure 5 représente les résultats sous la forme des écarts par rapport à la valeur théorique de 373 mL CH₄/kg MSV. Les écarts maximums sont de -14% et +10% de la valeur théorique, soit une amplitude totale de 24%. Cette amplitude est du même ordre que la variation observée entre les répliquats du laboratoire n°1 qui atteignent $\pm 14\%$ autour de la valeur moyenne.

Figure 5: Ecart par rapport à la valeur théorique pour la cellulose. Sur la base des résultats préliminaires de l'ABAI group élargi



Un premier examen des résultats montre qu'on ne voit pas à priori d'effet significatif du ratio inoculum/substrat sur les résultats avec la cellulose, les différences restant inférieures à 10% de la valeur théorique. Ceci conforte notre choix de ne retenir qu'un seul ratio (ISR=4) pour le protocole standard. De même le type de cellulose a un impact de moins de 10% sur le résultat final. Enfin le type d'inoculum a également un effet très limité sur les résultats.

5.2. Conclusion

Le protocole proposé par l'ABAI group de l'IWA permet, d'après les résultats préliminaires, d'obtenir des résultats avec une dispersion d'environ 25% avec la poudre de cellulose pour les 7 laboratoires considérés. Ce résultat est à comparer avec la dispersion de 35% obtenue dans l'étude de Raposo et al., et montre une amélioration.

On rappelle que le protocole que nous avons retenu dans la présente étude est tout à fait compatible avec celui proposé par l'IWA.

Ces premiers résultats avec la cellulose montrent également que les variations intra-laboratoires peuvent atteindre le même ordre de grandeur que les variations inter-laboratoires, c'est-à-dire 20 à 30%, observation qui sera à prendre en compte.

Les résultats complémentaires et une analyse ultérieure nous diront si on peut mettre en évidence l'influence de certaines conditions expérimentales dans ce protocole.

6. Etat de l'art – conclusion

La présente partie de l'étude a pu mettre en évidence les activités, problèmes et lacunes dans le domaine des tests BMP. De manière générale, le manque de connaissances fondamentales et un besoin de recherche ont été confirmés. Les conclusions principales sont les suivantes :

- Dans la littérature, des besoins d'harmonisation des systèmes de test BMP sont évoqués.
- Au niveau expérimental, peu de recherche a eu lieu jusqu'à présent.
- Les publications scientifiques concernant l'influence du diamètre d'un substrat présentent des conclusions divergentes.
- Un ensemble de protocoles existent, donnant des instructions différentes sur la conduite d'un test BMP.
- Deux études inter-laboratoires ont illustré des différences réelles dans les résultats de tests BMP, confirmant le besoin d'un protocole plus précis.

PARTIE III :

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Le travail expérimental a eu lieu entre septembre 2010 et juillet 2011 dans le Laboratoire de Biotechnologie Environnementale (LBE) de l'EPFL. Les expériences représentent le cœur du projet, devant permettre de comprendre l'influence de certains paramètres de test sur le potentiel de production de méthane d'un substrat.

Le résultat d'un test BMP est influencé par un nombre quasi infini de paramètres, commençant à l'échantillonnage du substrat et allant jusqu'à l'interprétation des résultats. L'objectif des normes et directives est de standardiser les procédures de test; cependant, comme il a été montré au chapitre 4, les instructions pour les tests BMP divergent et certains aspects potentiellement importants ne sont pas considérés. Dans le cadre de ce projet, les paramètres de laboratoire les moins connus jusqu'à présent ont été ciblés, afin de déterminer s'il y a besoin de mieux les décrire dans les protocoles standard et si ces derniers peuvent être à la source des divergences des résultats de test BMP.

Pour mener l'analyse, des séries de test BMP ont été effectués, appliquant un protocole de base très strict (cf. tableau 4) et faisant varier les paramètres d'étude (cf. tableau 5). L'analyse statistique des résultats devait permettre par la suite d'identifier si un paramètre a une influence significative sur le résultat ou pas.

7. Définitions

Pour être au clair avec l'utilisation des termes, un glossaire est proposé dans ce chapitre. Il n'est pas exhaustif, mais reprend les expressions utilisées au cours du travail expérimental.

Test de digestibilité	Un test qui évalue la dégradation d'une matière en milieu anaérobie. Il fait référence à la transformation de la MSV en CH ₄ et en CO ₂ .
Test de potentiel méthano-gène / Test BMP	Un test qui vise spécifiquement le potentiel de production de méthane d'une matière. Le résultat est exprimé en L CH ₄ /kg MSV.
Expérience	Une expérience fait référence à un substrat testé sur un inoculum. Elle comprend donc 3 réplicats et les blancs correspondants.
Test	Un test fait référence à une seule bouteille dans laquelle a été ajouté un substrat.
Blanc	Un blanc fait référence à une seule bouteille à laquelle n'a pas été ajouté du substrat (détermination de la production propre de l'inoculum).
Batch / bouteille / flacon	Un batch, une bouteille ou un flacon fait référence à une seule bouteille – sans préciser si c'est un test ou un blanc.
Contrôle positif	Le contrôle positif fait référence à l'expérience effectué avec un substrat de référence (cellulose) qui sert à valider la qualité de l'inoculum et ainsi les expériences avec les substrats de test.

Conditions normales	On exprime un volume de gaz en conditions normales afin de s'affranchir des variations de température et de pression qui ont une influence sur ce dernier ; c.à.d. on ramène le volume à une température de 0 C (273,15 K) et une pression de 1 atm (1,01325 bar).
Niveau de test	Un niveau désigne une variante sur laquelle un paramètre est testé (p.ex. « sans adaptation » et « avec adaptation »).

8. Conditions des expériences

8.1. Conditions fixes: protocole de test

Un protocole de test BMP a été élaboré, basé sur les protocoles existants et les connaissances actuelles sur le sujet. L'objectif était de formuler un protocole robuste, également adapté à l'utilisation en dehors de ce projet. Les paramètres sont décrits dans le tableau 4, donnant une explication pour chaque choix.

Tableau 4: Description des conditions fixes pour le protocole de test BMP

Paramètre	Description	Justification
Inoculum		
Prétraitement	L'inoculum est épuisé pendant au minimum une semaine. Si la teneur en matière sèche est élevée : ajouter de l'eau désoxygénée	L'épuisement permet de diminuer la production de méthane propre de l'inoculum. On veut atteindre $MSV_{inoculum} \approx 32$ g/L
Analyse de qualité	Mesure des AGVs, NH_4 et alcalinité. En plus, un contrôle positif est effectué.	Les contrôles permettent de garantir que le milieu microbien dans l'inoculum est d'une bonne qualité.
Test de digestibilité		
Volume de test	Le volume des bouteilles est d'environ 1000 mL (ici 1235 mL) Phase aqueuse : env. 400 mL Ciel gazeux : env. 600 mL (ici env. 835 mL)	1L est considéré comme volume minimal pour mener un test BMP. Des volumes plus importants doivent être utilisés pour des substrats hétérogènes. Le ciel gazeux est dominant pour laisser suffisamment de l'espace de stockage au gaz produit.
Réplicats	Chaque test est effectué avec 3 réplicats. Les blancs sont effectués en duplicats.	
Ratio Inoculum /Substrat (ISR)	Le ratio $MSV_{inoculum}/MSV_{substrat}$ est fixé à 4/1.	Ce ratio élevée garanti un milieu de digestion robuste et peu sensible à une acidification.
MSV_{totale}	La teneur en MSV_{totale} (inoculum+substrat) est de l'ordre de 40 g/L ($MSV_{inoculum} \approx 32$ g/L, $MSV_{substrat} \approx 8$ g/L).	Ceci évite une trop forte production de gaz (trop fortes pressions) et évite un milieu trop dilué. Il n'est pas important de le respecter au gramme près.

Complémentation du milieu	Aucun supplément n'est utilisé.	Le rajout de nutriments, vitamines ou éléments traces peut optimiser la dégradation par rapport à la dégradation dans les conditions réelles, ce qu'on veut éviter.
Ciel gazeux	En début du test le dôme de la bouteille test est rincé avec un mélange des N ₂ et CO ₂ au ratio 60% / 40% (v / v).	Le rinçage permet d'évacuer l'oxygène. Le ratio appliqué maintient le système carbonate à l'équilibre entre phase aqueuse et gazeuse (pour éviter le dégazage de CO ₂).
Durée du test	La durée de test n'est pas définie mais est à priori de 21 jours. Si la production de gaz continue à ce moment, le test est prolongé.	La durée ne doit pas limiter le résultat; ceci en faisant l'hypothèse qu'en réalité les temps de résidence sont adaptés aux substrats.
Agitation	La bouteille de test est mélangée une fois par jour, en le retournant manuellement.	
Mesure du gaz	Mesure de la pression dans la bouteille, puis transformation en volume (conditions normales). La pression est ramenée à la pression ambiante en laissant sortir la surpression par une aiguille. Analyse de la composition par gaz chromatographie. La fréquence des mesures dépend de l'intensité de production de gaz.	Des pressions trop importantes sont à éviter (danger d'explosion de la bouteille).

8.2. Conditions variables

Deux paramètres de test ont été définis: la provenance et l'adaptation de l'inoculum. Il est supposé qu'ils peuvent avoir une influence significative sur le résultat d'un test BMP et il n'existe à présent pas de données expérimentales les considérant. Ils sont expliqués plus en détail ci-dessous et dans le tableau 5 sont illustrés les niveaux testés et les recommandations données dans les normes.

Provenance de l'inoculum

La plupart des directives exigent l'utilisation d'une boue digérée de station d'épuration comme inoculum. En réalité, d'autres boues sont également utilisées, comme par exemple les boues granulaires (cf. publications scientifiques). L'analyse de ce paramètre permet d'évaluer si le milieu microbien spécifique à une installation influence la capacité de dégradation d'un substrat.

Adaptation de l'inoculum

La possibilité de l'adaptation de l'inoculum est très peu évoquée dans les directives. Les normes ISO 11734 [23] et la directive VDI 4630 [24] indiquent cette possibilité, mais fournissent peu de renseignements sur la procédure. Ce paramètre est testé dans l'idée qu'un inoculum adapté arrive mieux à dégrader certaines substances et risque moins une acidification du milieu.

Tableau 5: Paramètres de test BMP variables et testés par des expériences

Paramètre	Proposition dans les normes	Niveaux
Provenance de l'inoculum	Boues digérées de STEP	– Boue digérée d'une STEP (sans co-digestion) – Boue d'une installation agricole avec co-digestion – Boue granulaire d'une installation industrielle de type UASB – Boue d'une installation industrielle thermophile (digestion sèche)
Adaptation de l'inoculum	Pas ou peu de renseignements	– Sans adaptation – Adaptation par étape (ajout de 20%, 40%, et ensuite 100% du substrat à tester)

8.3. Substrats de test

Les substrats employés dans les installations de biogaz varient largement en termes de leur composition et consistance. Certains sont accessibles et facilement dégradables, d'autres sont moins accessibles ou peuvent être transformés en sous-produits freinant la digestion. Par conséquent, le choix de substrats adéquats est essentiel pour le déroulement des expériences.

Les substrats ont donc été choisis dans le but de créer des situations différentes avec accessibilité facile et difficile, ainsi qu'avec et sans risque d'acidification. On fait la distinction entre les substrats simples et les substrats complexes retenus :

Substrats simples et facilement dégradable

Deux substrats simples et facilement dégradables ont été choisis, la cellulose et le lait en poudre. Le premier, avec une structure très simple, est souvent utilisé comme substrat de référence afin de valider l'inoculum lors d'un test (contrôle positif). Le deuxième est un peu plus complexe que la cellulose car il contient des glucides, protéines et graisses.

Ce sont des substrats bien connus et admettent une observation des comportements « basiques » des expériences. Les résultats de ces tests permettent de valider le protocole de base ainsi que d'observer d'éventuelles différences majeures en termes de performance de digestion anaérobie entre les inocula et les niveaux d'adaptation.

Substrats complexes, difficiles à dégrader ou pouvant poser des problèmes lors de la dégradation

Des substrats complexes à différents niveaux ont été définis. D'un côté, une composition ligno-cellulosique a été recherchée ; celle-ci présente une structure difficilement accessible et il est supposé que la dégradation est influencée par la communauté microbienne (origine, adaptation). Les substrats retenus sont la paille et le foin en forme de poudre. La luzerne en forme de poudre a également été testée avec un inoculum, puisque ce substrat avait été utilisé pour l'étude inter-laboratoire.

D'un autre côté, un substrat avec haute teneur en graisses et protéines a été recherché. Ces derniers sont susceptibles de provoquer une inhibition du processus de digestion due à une trop forte production d'ammonium ou la présence des acides gras long-chainés. Le substrat retenu est une farine animale.

Les substrats choisis sont effectivement utilisés fréquemment dans des installations de biogaz. Ils permettent de voir si la digestibilité dans ces conditions plus extrêmes est différente entre les différents inocula et les niveaux d'adaptation. Les caractéristiques détaillées de chaque substrat ainsi que leur provenance sont données en annexe IX.

8.4. Matrice expérimentale

La matrice expérimentale a été construite à l'aide d'une méthodologie d'optimisation des plans d'expérience permettant de minimiser le nombre de tests pour en tirer un maximum d'information. Cependant, la matrice construite de cette manière s'est avérée comme non-réalisable, les caractéristiques des inocula requises ne pouvant pas être trouvée parmi les installations de biogaz Suisse (p.ex. pas d'installation thermophile agricole ou en STEP).

L'approche a donc été inversée et la matrice a été construite basée sur les inocula à disposition, impliquant la perte de certaines informations qu'on voulait tirer des expériences. Par exemple, le paramètre température de test (thermo- ou mésophile) n'a pas pu être pris en compte, puisqu'une isolation de cette information n'a pas été possible. Dans la matrice retenue, il y a néanmoins un inoculum thermophile ; mais un comportement différent ne pourra pas être attribué uniquement à la température, mais à l'entité des conditions régissant dans cette installation (digestion solide, système à flux-piston, thermophile, etc.), regroupé sous la notion « source de l'inoculum ».

La matrice expérimentale complète est donnée en annexe X. Au total, 92 tests batch ont été réalisés de novembre 2010 à juillet 2011.

9. Méthodes et matériel

Les méthodes et le matériel employés prennent une importance particulière dans ce projet. En effet, l'épreuve des méthodes simples et la formulation de recommandations concernant l'application de méthodes et de matériel fait partie intégrante de ce projet.

Lors des expériences de digestibilité il a été très important d'appliquer une démarche rigoureuse, afin de pouvoir attribuer une variation du résultat à la variation d'un paramètre (et non aux manipulations). Dans les sous-chapitres qui suivent sont décrits les méthodes et le matériel testés et appliqués dans les différentes étapes du déroulement des tests de digestibilité. En annexe VI et VII sont présentés un tableau résumant les mesures effectuées et les méthodes appliquées.

9.1. Inoculum : échantillonnage, caractérisation et préparation

L'échantillonnage de l'inoculum se fait immédiatement avant la préparation des tests, afin d'éviter son stockage en milieu aérobie. Un récipient en plastique était utilisé dont le volume correspond idéalement au volume de l'échantillon – ceci également pour éviter au maximum le contact avec l'air.

L'inoculum est pris à l'intérieur du digesteur ou sur la conduite d'évacuation, juste après le digesteur. Afin d'éviter de prendre des vieilles boues (se trouvant dans la canalisation), il faut laisser couler le liquide pendant un certain temps. En remplissant le récipient, on peut sentir la température élevée à travers les parois, ce qui indique que les boues proviennent de l'intérieur du digesteur.

Une fois que le récipient est rempli à ras bord, le couvercle est fermé. Lors de longs transports, il est conseillé de laisser échapper le gaz de temps à autre (chaque heure).

A l'arrivée au laboratoire, les caractéristiques sont immédiatement déterminées. La teneur en matière sèche (MS) et matière sèche volatile (MSV) indiquent la siccité; si elle est élevée, l'inoculum peut être dilué avec de l'eau désoxygéné pour atteindre une teneur en MSV de l'ordre de 32 g/L. La MS et MSV sont déterminés selon des méthodes standards, décrites en détail en annexe VII.

Si des matières grossières sont présentes, ces dernières sont écartées à l'aide d'un tamis à grandes mailles ($\varnothing$ 5mm), permettant d'obtenir un inoculum homogène.

La détermination de l'alcalinité, de la teneur en ammonium et en acides gras volatils (AGV) permet de vérifier la bonne qualité de l'inoculum, un facteur important pour la bonne conduite d'un test de digestibilité.

L'ammonium a été mesuré à l'aide d'un kit Merck. La qualité du résultat s'est avérée suffisante et une bonne reproductibilité des résultats a pu être constatée. Plus d'informations concernant le kit Merck sont données en annexe VII. La valeur à ne pas dépasser a été fixée à :

- Ammonium < 2500 mg/L

Les AGV ont d'abord été mesurés également à l'aide d'un autre kit Merck. Mais dans ce cas, le résultat du test n'était ni reproductible, ni stable dans le temps. La méthode n'a donc pas été retenue. A la place, une titration a été appliquée, ce qui a permis de déterminer l'alcalinité en même temps. La méthode appliquée (décrite en annexe VII) ressemble à la méthode FOS / TAC souvent employée par les laboratoires. La différence est les deux points de titration et le calcul effectué par la suite. Il a été montré que les résultats de ces deux méthodes sont du même ordre de grandeur. Pour les deux variantes il est important de dire que le résultat indique un ordre de grandeur, pas un résultat absolu. Pour une valeur plus précise, il faudrait faire des mesures avec un chromatographe ionique, un HPLC ou un gaz chromatographe, des appareils qui ne font souvent pas partie d'un laboratoire de test BMP.

Les valeurs seuils ont été définies comme suit:

- AGV totaux < 2500 mg/L
- Alcalinité (capacité tampon) > 3000 mg CaCO₃ /L

9.2. Substrat : stockage, caractérisation et préparation

Tous les substrats utilisés étaient de nature sèche et facile à conserver. Ils étaient tenus dans des récipients fermés à température ambiante. La matière sèche et la matière organique étaient déterminées, ce qui a permis de doser le substrat en respectant strictement le ratio $MSV_{inoculum}/MSV_{substrat}$ de 4/1.

La DCO des substrats était également déterminée, ceci à l'aide d'un Kit (décrit en annexe VII). Pour la mesure, il fallait 2 mL d'échantillon, contenant une concentration DCO de maximum 1500 mg/L. L'hétérogénéité de la farine de paille en suspension dans l'eau impliquait une incertitude au niveau de l'échantillonnage et ne permettait la détermination de la DCO de ce substrat qu'avec beaucoup d'incertitude.

La DCO était ensuite utilisée pour calculer la production théorique de méthane à partir des substrats. La formule utilisée pour cela est décrite ci-après :

Production théorique de méthane :

$$V_{CH_4} = \frac{MSV}{[kg]} * \frac{DCO}{[kg \text{ DCO} / kg \text{ MSV}]} * \frac{350}{[L \text{ CH}_4 / kg \text{ DCO}]}$$

Cette valeur théorique n'est qu'à titre estimatif. La formule empirique ne tient pas compte de l'accessibilité du substrat. En plus, dans le cas présent, la valeur de la DCO est également indicative.

Le substrat a été pesé à l'aide d'une balance de précision et conservé dans un récipient fermé jusqu'à l'utilisation.

9.3. Tests de digestibilité

9.3.1. Principe : préparation des tests

La préparation des tests est une étape très délicate, puisque les conditions de départ déterminent de manière importante le déroulement du test.

L'inoculum a été homogénéisé, puis 400mL – mesurés dans une jauge en verre – ont été introduits dans la bouteille. Lors du versement de l'inoculum, la bouteille a été penchée de manière à ce que l'inoculum coule sur la paroi de la bouteille pour éviter l'oxygénation de l'inoculum.

Pour les boues granulaires, la préparation s'est avérée plus difficile. Les granules sédimentent rapidement et il est délicat d'obtenir des batch avec la même proportion entre la phase solide (granules) et la phase liquide. Pour cette raison, les deux fractions étaient séparées par décantation dans un premier temps. Ensuite, dans chaque batch était ajouté la même proportion de fraction solide et liquide.

Trois batch (triplicats) ont été préparés par expérience. En plus, pour chaque inoculum il fallait préparer des « blancs » (sans substrat, uniquement l'inoculum) afin de connaître la production de méthane propre de l'inoculum – valeur qui doit être soustraite des résultats des tests. Les blancs ont été effectués en duplicats. En cas d'adaptation de l'inoculum, des blancs avec adaptation ont été réalisés.

Les batch sans adaptation ont été fermés et leur dôme a été rincé au N_2/CO_2 , ensuite elles ont été incubées à température du test (35 ou 52°C) pour une semaine d'épuisement. Après cela, ils ont été ré-ouverts pour ajouter le substrat selon la procédure décrite plus loin pour les bouteilles avec adaptation. Les blancs étaient également ouverts (sans ajouter du substrat) pour que les conditions de départ soient identiques dans toutes les batch.

Dans les batch avec adaptation, une première portion de substrat (20%) a été ajoutée. Pour ce faire, un entonnoir était placé sur la bouteille et le substrat (sec), préalablement mesuré, était versé dedans. Dès que la production de gaz devenait faible (aplatissement de la courbe), la même procédure était répétée avec 40% du substrat.

9.3.2. Matériel

Des bouteilles en verre d'un volume de 1 L (col compris: 1235 mL ; VWR International, Nyon) servaient de récipients (photo 1). Elles étaient fermées avec des septa en butyl-elastomer d'une épaisseur de 10mm (Maagtechnic, Dübendorf) fixés avec un couvercle métallique, troué au milieu pour permettre de transpercer le septum avec une aiguille.

Le rinçage du ciel gazeux avec a été effectué à l'aide d'une station à gaz (photo 2) avec un mélange de N_2/CO_2 à 60%/40% (v/v).

Des étuves de la marque Memmert étaient employées pour l'incubation des batchs et garantissaient le maintien d'une température stable (35 et 52°C).



Photo 1: Bouteille de test



Photo 2: Station de gaz

9.4. Mesure de la production de méthane

9.4.1. Principe : mesure de la production de méthane

De nombreuses méthodes pour la mesure de la production de méthane existent. Celle employée lors de ce projet est relativement simple et s'est avérée rigoureuse et fiable. Elle se déroule en quatre étapes décrites ci-après. La fréquence de ces mesures dépend de l'intensité de production. En début du test, une mesure journalière voire 2 fois par jour peuvent être nécessaires.

a) Mesure de la pression dans la bouteille à l'aide d'un manomètre

Avant la mesure, la bouteille est légèrement agitée pour que le gaz s'homogénéise (pour éviter une poche de méthane ou de CO_2 dans le col de la bouteille).

Une aiguille est placée à la pointe du manomètre et introduite dans la bouteille à travers le bouchon. Le manomètre (photo 3) indique la pression en milliampères. La conversion en $\text{bar}_{\text{effectifs}}$ est linéaire : $4\text{mA} = 0 \text{ bar}_{\text{eff}}$, $20\text{mA} = 1 \text{ bar}_{\text{eff}}$.

Avec le manomètre toujours branché à la bouteille, un échantillon de gaz (environ 1 mL) est prélevé à l'aide d'une seringue, équipée d'une vanne et d'une aiguille (photo 4).

Ensuite, l'aiguille – toujours dans le bouchon de la bouteille – est séparée du manomètre. Ceci induit le dégazage de la bouteille jusqu'à pression atmosphérique. A ce point, l'aiguille est retirée et la bouteille est directement remise dans l'étuve.

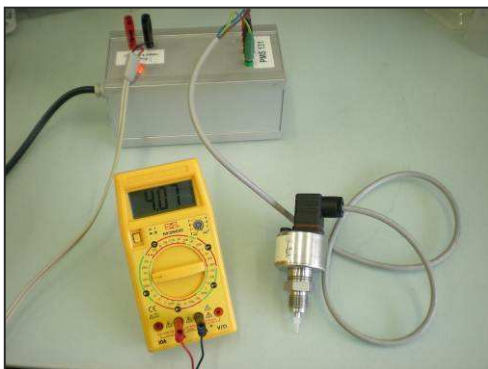


Photo 3: Manomètre



Photo 4: Seringue

Afin d'éviter une perte de température dans le milieu de digestion, cette manipulation doit se dérouler rapidement. La préparation de tout le matériel nécessaire avant de sortir la bouteille de l'étuve aide à effectuer rapidement l'opération.

b) Mesure de la composition du gaz à l'aide d'un gaz chromatographe (GC)

La seringue contenant le gaz est placée sur le GC immédiatement après la prise d'échantillon. Le gaz est injecté et analysé sur sa teneur en CH_4 , CO_2 et N_2/O_2 . Le résultat est donné en pourcentage volumique de la présence de chaque composant.

Le pourcentage de méthane mesuré correspond aux conditions dans le dôme de la bouteille (et pas au pourcentage du gaz produit). Au début du test les valeurs sont très faibles, suite au mélange du biogaz avec le gaz présent dans la bouteille (N_2/CO_2). Au cours du test, les teneurs des gaz initiales deviennent de plus en plus faibles et la teneur en méthane dans le dôme augmente.

c) Calcul de volume à température et pression normale

Dans un premier temps, le volume de biogaz est calculé en température et pression normales (TPN), ce qui permet de s'affranchir des variations de ces deux paramètres selon le lieu et le temps considérés. TPN spécifie une température de 0°C (273,15 K) et une pression de 1 atm (1,01325 bar).

Pour ce faire, l'équation des gaz parfaits est utilisée, ceci donne lieu à la relation montrée dans l'équation (1). L'indice 1 fait référence aux conditions dans la bouteille, l'indice 2 fait référence aux conditions normales.

$$\frac{P_1 \cdot V_1}{T_1} = \frac{P_2 \cdot V_2}{T_2} \quad \text{équation 1}$$

Mettant en évidence V_2 (= le volume de biogaz en conditions normales, produit depuis la dernière mesure) l'équation s'écrit ainsi :

$$V_2 = \frac{P_1 \cdot V_1}{T_1} \cdot \frac{T_2}{P_2} \quad \text{équation 2}$$

P_1 est donc la pression indiquée par le manomètre, V_1 est le volume du milieu gazeux dans la bouteille (0.835 L), T_1 est la température de digestion (en kelvin), T_2 la température normale (273.15 K) et P_2 la pression normale (1,01325 bar).

Pour calculer le volume de méthane, produit depuis la dernière mesure, le pourcentage de CH_4 mesuré est appliqué au volume total présent dans la bouteille (en conditions normales) et il en est déduit la quantité de méthane présent dans la bouteille après la dernière mesure (CH_4').

$$V_{CH_4} = \%_{CH_4} \cdot (V_2 + V_1) - \%_{CH_4'} \cdot V_1 \quad \text{équation 3}$$

Les volumes de chaque mesure au cours du test sont cumulés. A la fin, le résultat est encore normalisé par rapport à la production par kg de matière organique [NL CH_4 cumulé / kg MSV].

d) Soustraction du « blanc »

Les étapes a) à c) sont effectuées pour chaque batch. Afin de connaître la production de méthane engendrée par le substrat (et sans celle de l'inoculum lui-même), le résultat du blanc doit être soustrait de celui du test.

9.4.2. Matériel

Des seringues et des aiguilles de TERUMO® étaient utilisées (photo 4). Les seringues avaient un volume de 2 mL, les aiguilles étaient de 0.45 * 23mm (diamètre, longueur). Une vanne faisait le joint entre les deux et permettait d'éviter des échanges de gaz entre le moment d'échantillonnage et celui de la mesure.

Pour la mesure de la pression, un multimètre digital (Mastech M3900) était utilisé (photo 3). Il indique la pression en milliampères, qui peuvent ensuite être converti dans l'unité souhaité.

9.5. Saisie des données

Une saisie des données claire et reproductible est importante. Chaque valeur mesurée doit être accompagnée par l'indication de la date, de l'heure et du nom de la personne qui a effectué la mesure et d'éventuelles observations particulières. Cela permet une reproduction facilitée en cas d'irrégularités.

La fiche de laboratoire utilisée figure en annexe XIII. Les données ont été reportées ensuite dans une feuille Excel, où sont effectuées les calculs de transformation.

9.5.1. Traitement des données

Les expériences ont été effectuées en triplicats, ce qui donne lieu à 3 résultats par test. Sur les courbes de production de méthane (en annexe XI) la moyenne des trois valeurs et leur variance est illustrée (à l'aide des barres d'erreur).

La réponse expérimentale est définie comme la production cumulée de méthane. L'objectif est de déterminer si la variation des paramètres induit une influence significative sur la réponse expérimentale. Afin de pouvoir répondre à cette question, une analyse statistique des données expérimentales a été effectuée. Celle-ci est décrite ci-après.

Pour évaluer l'influence des paramètres, une *étude de criblage* combinée à une *étude des effets principaux et des interactions* a été effectuée. L'étude de criblage permet de déterminer le poids de chaque paramètre au vu de son influence sur la réponse expérimentale. L'étude des effets principaux et des interactions évalue l'influence des paramètres pris deux à deux. Elle permet de préciser si les paramètres pris seuls ont une influence significative sur la réponse expérimentale ainsi que de détecter d'éventuelles corrélations.

Le logiciel NEMROD (Windows version 2007, développé par le LPRAI, Marseille, France) [25] est utilisé pour le traitement des données. Ce dernier est basé sur l'analyse de la variance (démarche ANOVA – Analysis Of VAriance).

10. Hypothèses

Suite à la définition des conditions cadres, le choix des paramètres et des démarches de test, des hypothèses ont été formulés :

- H1. On attend que l'influence de la provenance de l'inoculum soit négligeable. Les inocula devraient être capables de produire la même quantité de méthane et ceci indépendamment de la température si on travaille avec un inoculum mésophile sous conditions mésophiles et avec un inoculum thermophile sous conditions thermophiles.
- H2. Si on utilise des substrats plus complexes ou si les substrats simples se dégradent trop vite et induisent une acidification du milieu, on attend que les inocula adaptés arrivent à mieux dégrader les substrats et qu'on va observer une différence dans la réponse expérimentale comparé avec les inocula non-adaptés.

Si les hypothèses sont justes, on pourrait travailler avec tout type d'inoculum, à condition de faire une adaptation avant le test. Par conséquent, le processus d'adaptation devrait être mieux élaboré dans les normes et protocoles de test.

11. Résultats

11.1. Production de méthane par quatre inocula sur deux substrats simples

La production de méthane a été testée sur cellulose et poudre de lait entier avec quatre inocula :

IN1 = Boue digérée d'une STEP sans codigestion

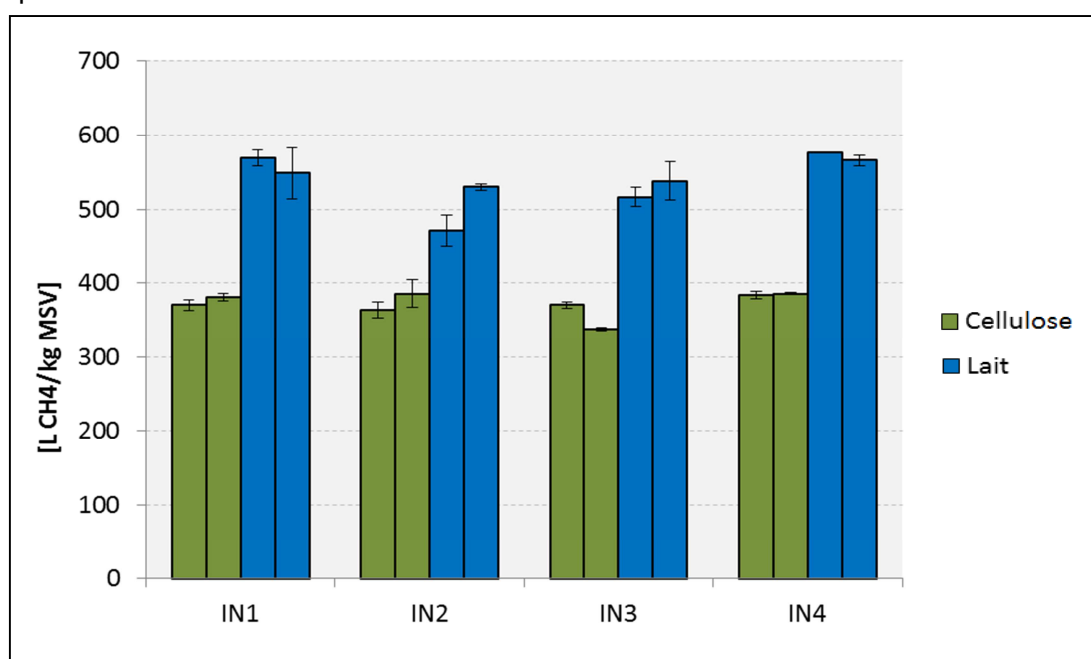
IN2 = Boue granulaire d'une installation de type UASB (industrie laitière)

IN3 = Boue d'une installation agricole avec codigestion

IN4 = Boue d'une installation industrielle thermophile (digestion par voie sèche)

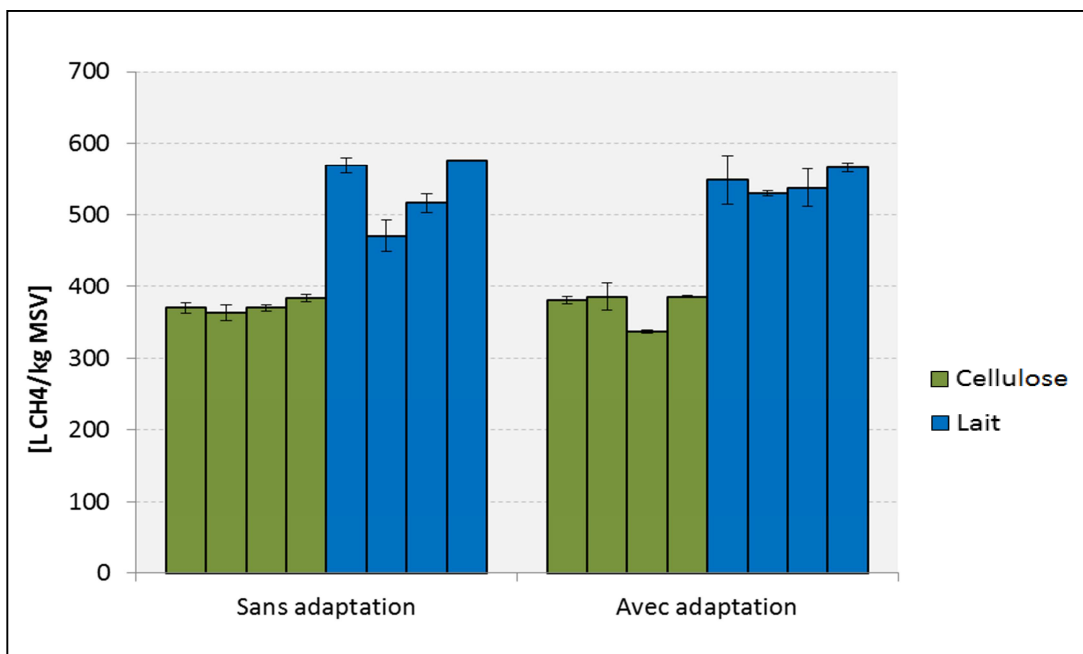
Les figures 6 à 9 résument les résultats des expériences. Chaque barre indique la moyenne d'une expérience, l'écart-type est montré par une barre d'erreur. Les courbes de production de méthane et des réponses expérimentales pour chaque expérience sont données en annexe XI et XII. La montre les réponses des expériences avec les substrats simples, groupées selon les quatre inocula utilisés.

Figure 6: Production de méthane avec les substrats simples cellulose et poudre de lait entier par quatre inocula différents



La figure 7 montre les mêmes réponses que la, cette fois groupées selon les niveaux d'adaptation.

Figure 7: Production de méthane avec les substrats simples cellulose et poudre de lait entier par quatre inocula différents sans et avec adaptation



En observant les résultats des substrats simples, on peut constater des différences en fonction des inocula et du niveau d'adaptation. La production de méthane à partir de la cellulose est assez homogène, seul l'inoculum 3 (agricole) donne un résultat clairement plus faible que les autres. Pour le lait en poudre, on peut observer des différences lorsque l'inoculum n'est pas adapté. Ici, c'est l'inoculum 2 (UASB) qui marque la plus grande différence. Ceci est étonnant puisque l'UASB en question traite des effluents d'industrie laitière et on ne s'attendrait pas à un besoin d'adaptation dans ce cas. Les valeurs les plus homogènes (petite variance) et les plus élevées se retrouvent avec l'inoculum 4 (industriel).

Cette première série d'expériences a pu confirmer le protocole de test et le matériel de laboratoire utilisé. En moyenne, la différence observée entre les répliques était de 3.4%, ce qui témoigne d'une très bonne reproductibilité des résultats. En plus, les réponses expérimentales correspondent bien aux valeurs attendues de potentiel méthanogène (annexe XI).

11.2. Production de méthane par trois inocula différents sur deux substrats complexes

La production de méthane a été testée sur la farine de paille et la farine animale avec les trois inocula IN1, IN2' et IN4.

IN1 = Boue digérée d'une STEP sans codigestion

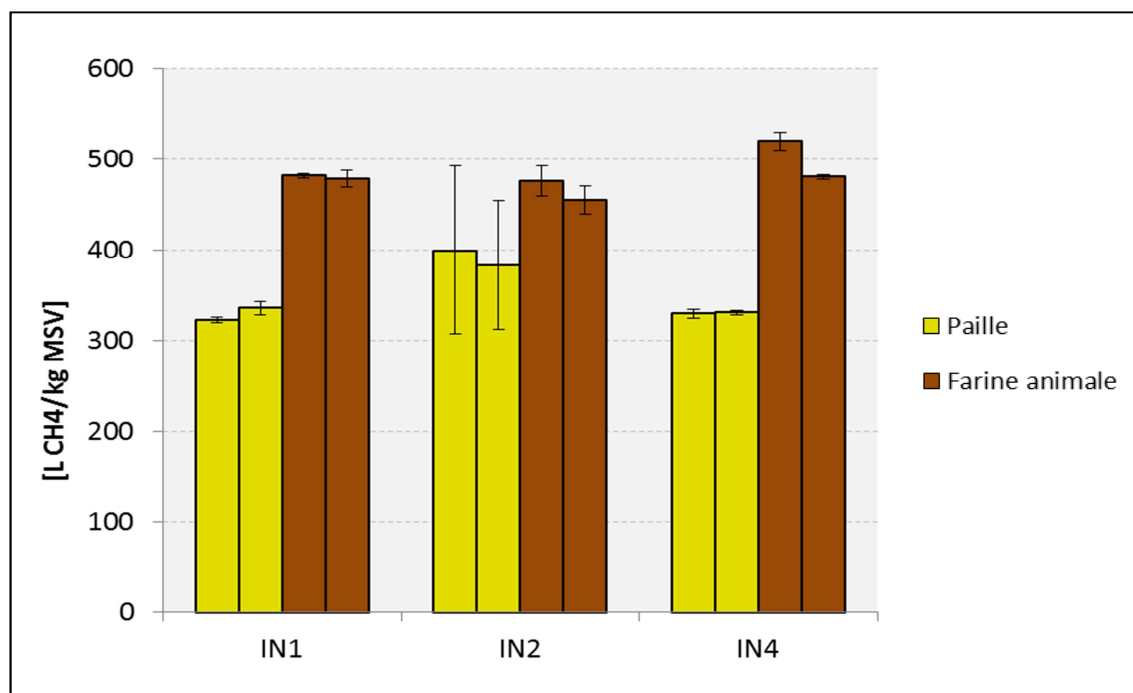
IN2' = Boue granulaire d'une installation de type UASB (industrie du papier)

IN4 = Boue d'une installation industrielle thermophile (digestion par voie sèche)

IN2' provient d'un autre réacteur UASB qu'IN2. Ceci est dû aux problèmes de fonctionnement de ce dernier lors de cette deuxième série d'expérience.

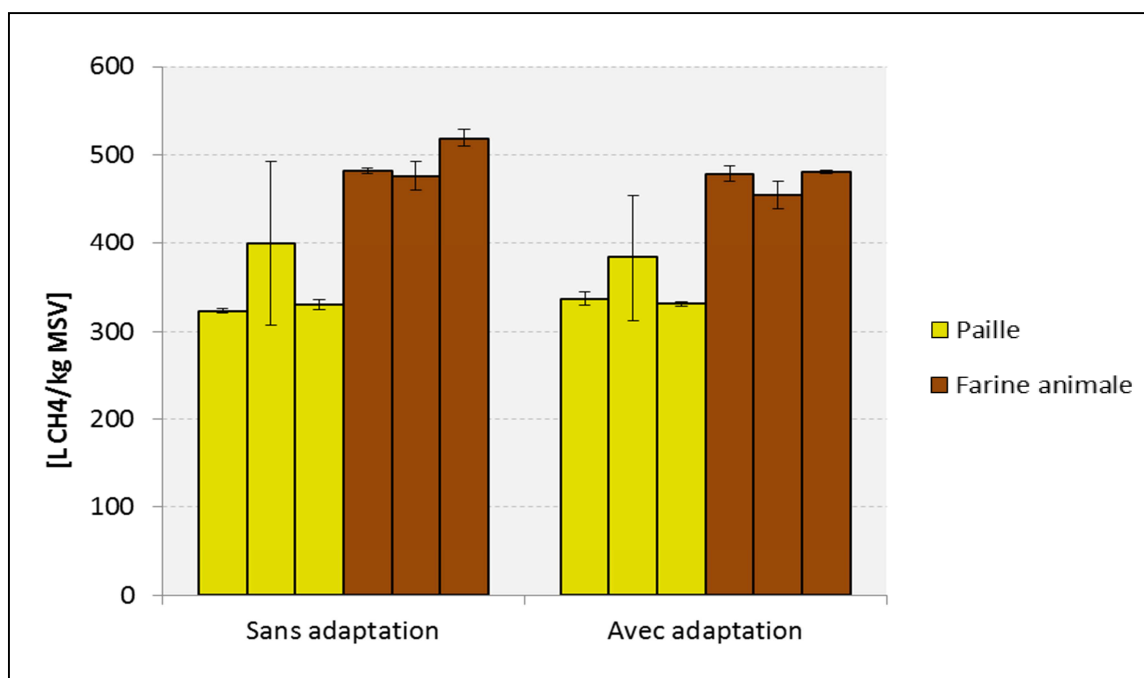
La figure 8 montre les réponses des expériences avec les substrats complexes, groupées par les inocula utilisés.

Figure 8: Production de méthane avec les substrats complexes avec trois inocula différents



La Figure 9 montre les mêmes réponses que la figure 8, cette fois groupées selon les niveaux d'adaptation.

Figure 9: Production de méthane avec les substrats complexes par trois inocula différents sans et avec adaptation



En observant les résultats des substrats complexes, on peut à nouveau constater certaines différences : l'inoculum 2 (UASB) engendre les variances les plus élevées. Ceci peut être liée aux difficultés de préparation de batchs identiques au départ des expériences, compte tenu de l'hétérogénéité de cet inoculum (granules qui sédimentent rapidement, c.f. également annexe VIII). Une amélioration pourrait être apportée en écrasant les granules, ce qui donnerait lieu à un milieu plus homogène. Pour la farine de paille, l'inoculum 2 donne des

réponses nettement plus élevées que les deux autres. En effet, l'UASB en question traite des effluents d'une industrie du papier et carton, riches en matières ligno-cellulosiques. Pour la farine animale, c'est à nouveau l'inoculum 4 (industriel) qui montre les résultats les plus élevés.

En moyenne, la différence observée entre les réplicats était de 5.1%, ce qui témoigne à nouveau d'une bonne reproductibilité des résultats.

L'adaptation ne semble apporter aucune amélioration de la digestibilité pour les substrats complexes. Au contraire, certains résultats sont légèrement plus faibles que sans adaptation.

11.3. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée pour évaluer si une variation de résultat est due à un paramètre et si cette variation est significative (et non dans le domaine de variance expérimentale). L'influence a été analysée au niveau de chaque paramètre (effet principal) et ensuite au niveau des interactions des paramètres, c.à.d. les paramètres sont pris deux par deux ce qui permet de détecter d'éventuelles synergies ou antagonismes.

Elle devait répondre aux questions suivantes :

- Q1. Est-ce que la source de l'inoculum a une influence (significative) sur la réponse expérimentale? Si oui, quelle est l'importance?
- Q2. Est-ce que l'adaptation de l'inoculum a une influence (significative) sur la réponse expérimentale? Si oui, quelle est l'importance?

Il est important de noter que les résultats de cette analyse sont valables pour les conditions de test données, c.à.d. dans le cadre du protocole de test appliqué.

Des analyses ont eu lieu à des moments et sur des jeux de données différents. Les résultats de chaque analyse sont décrits ci-après. Un effet est considéré :

- **négligeable** : si le poids du paramètre est plus faible que l'incertitude expérimentale (seuil de significativité)
- **faible** : si le poids du paramètre dépasse légèrement le seuil de significativité (moins que le double)
- **avéré** : si le poids du paramètre dépasse clairement le seuil de significativité (plus que le double)

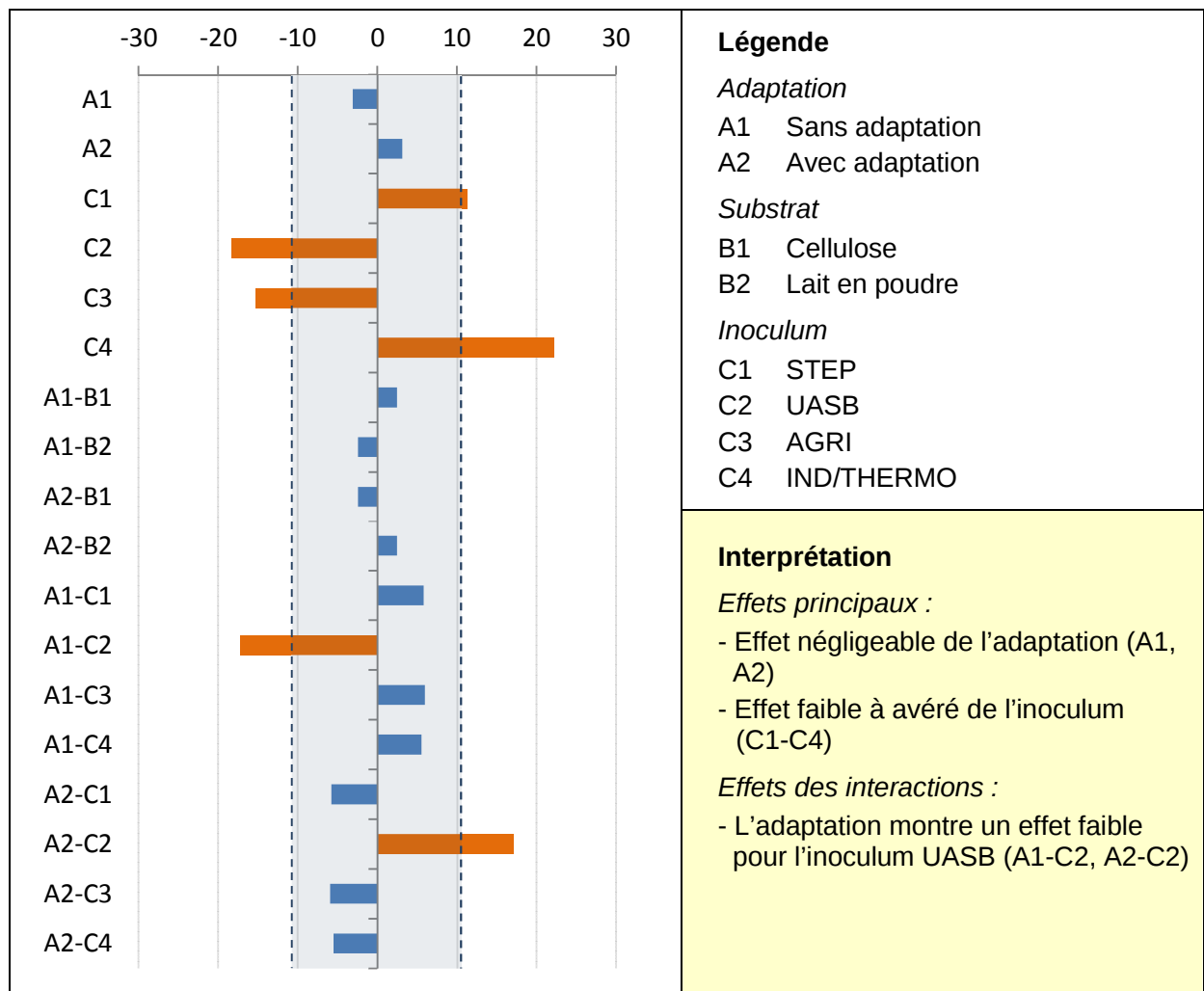
Des détails sur la démarche statistique sont donnés en annexe XIV.

11.3.1. Traitement statistique no.1 : Substrats facilement dégradables

Ce traitement a été effectué après la première série d'expériences prenant compte des réponses expérimentales impliquant cellulose et poudre en lait comme substrat.

Les résultats de l'analyse sont illustrés dans la figure 10. Elle montre le poids de chaque paramètre pris seul et le poids des paramètres pris deux par deux. La ligne discontinue indique le seuil où un poids devient significatif (également signalé par la couleur orange de la barre).

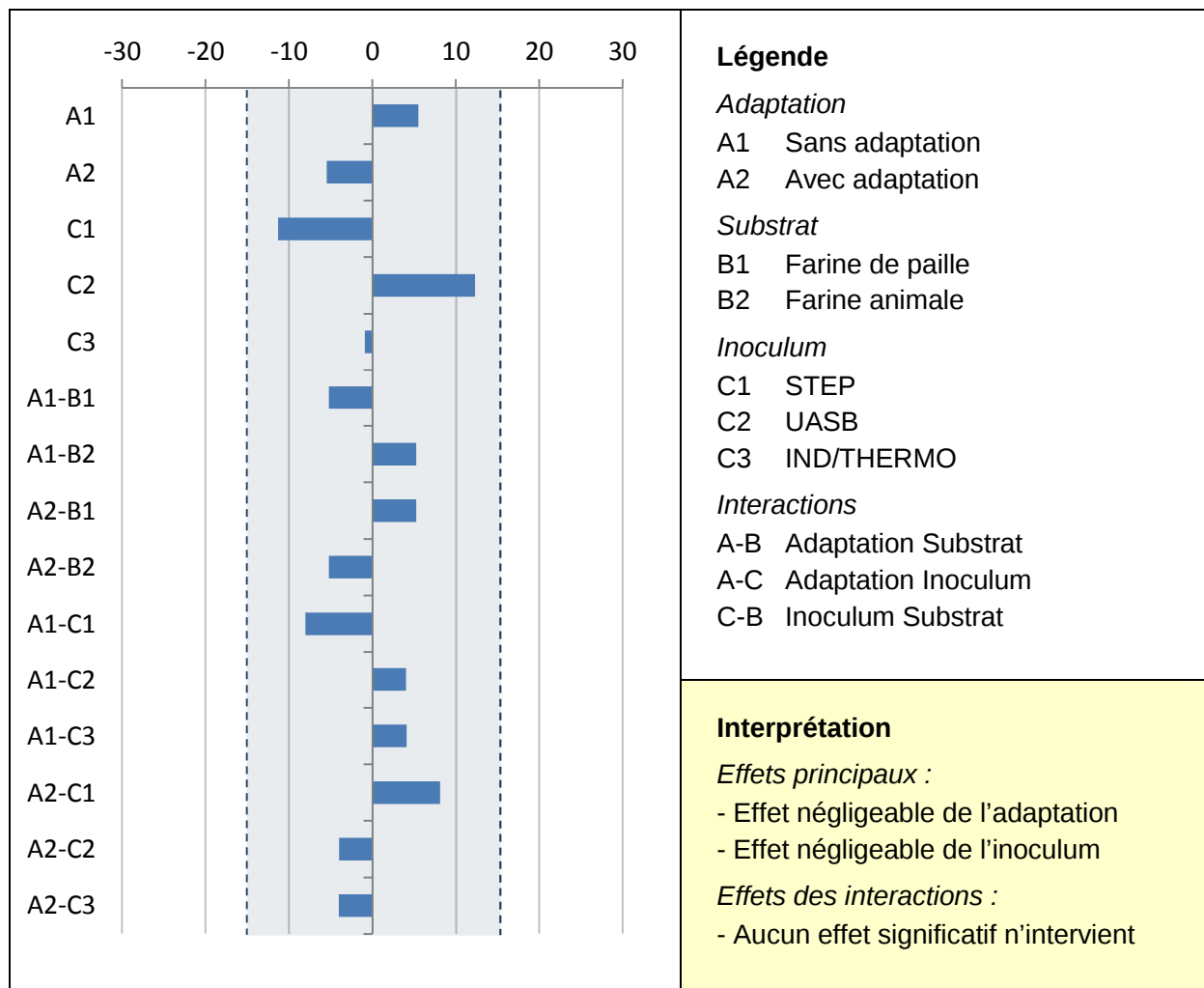
Figure 10: Poids des paramètres – substrats facilement dégradables



11.3.2. Traitement statistique no.2 : substrats complexes

Le même type de traitement a été effectué sur les réponses expérimentales impliquant les substrats complexes (farine de paille, farine animale); illustré en figure 11.

Figure 11: Poids des paramètres – substrats complexes

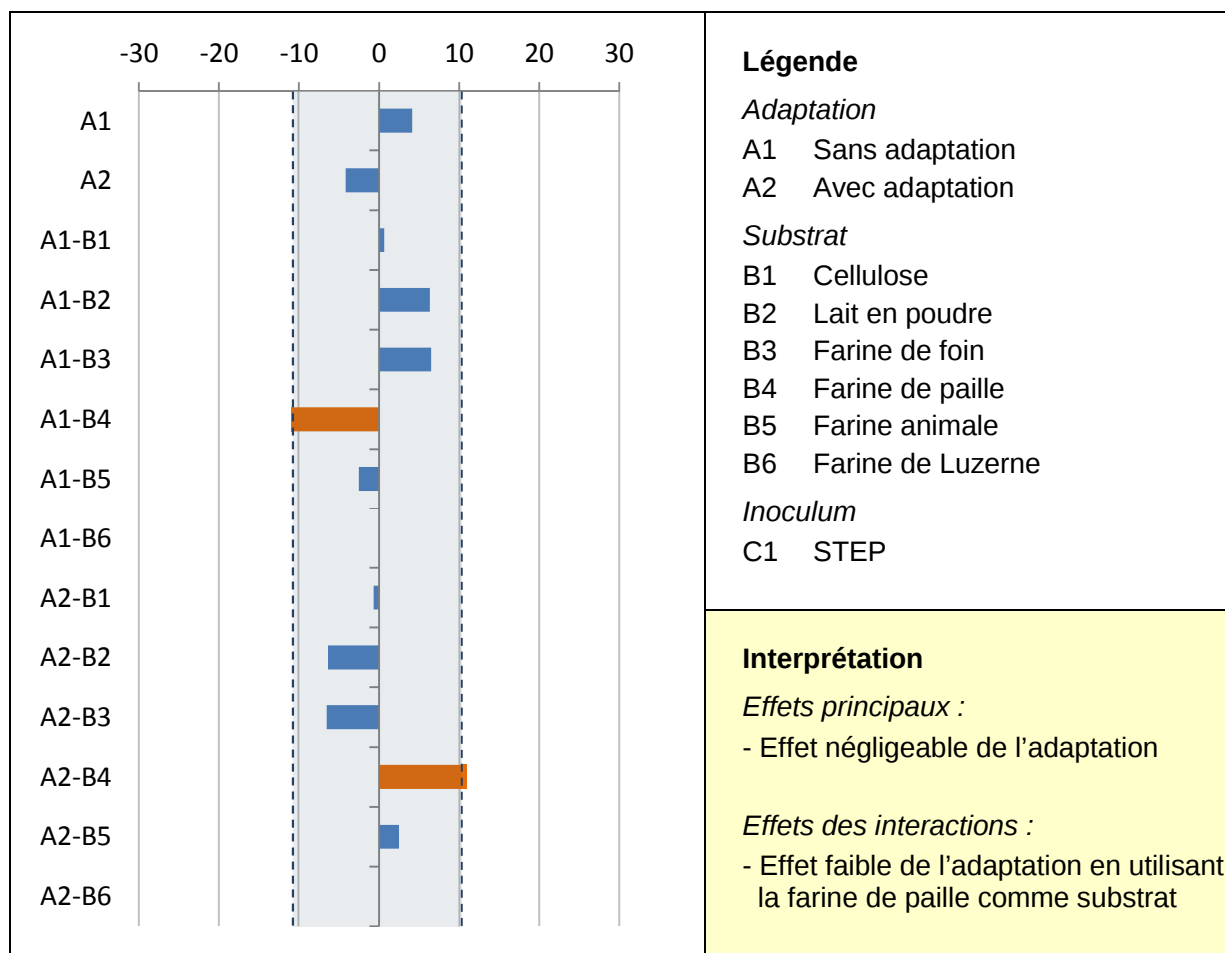


11.3.3. Traitement statistique no.3 : Inoculum STEP

Le troisième traitement était fait sur un seul inoculum (IN1, STEP), mais prenant compte de tous les substrats testés (figure 12). En effet, les tests avec la farine de foin et de luzerne était uniquement menés avec l'inoculum en question – pour des raisons de besoin de symétrie dans la matrice d'analyse, les réponses n'ont pas pu être considérées dans les traitements précédents.

Ce traitement permet d'analyser l'influence de l'adaptation sous un autre angle.

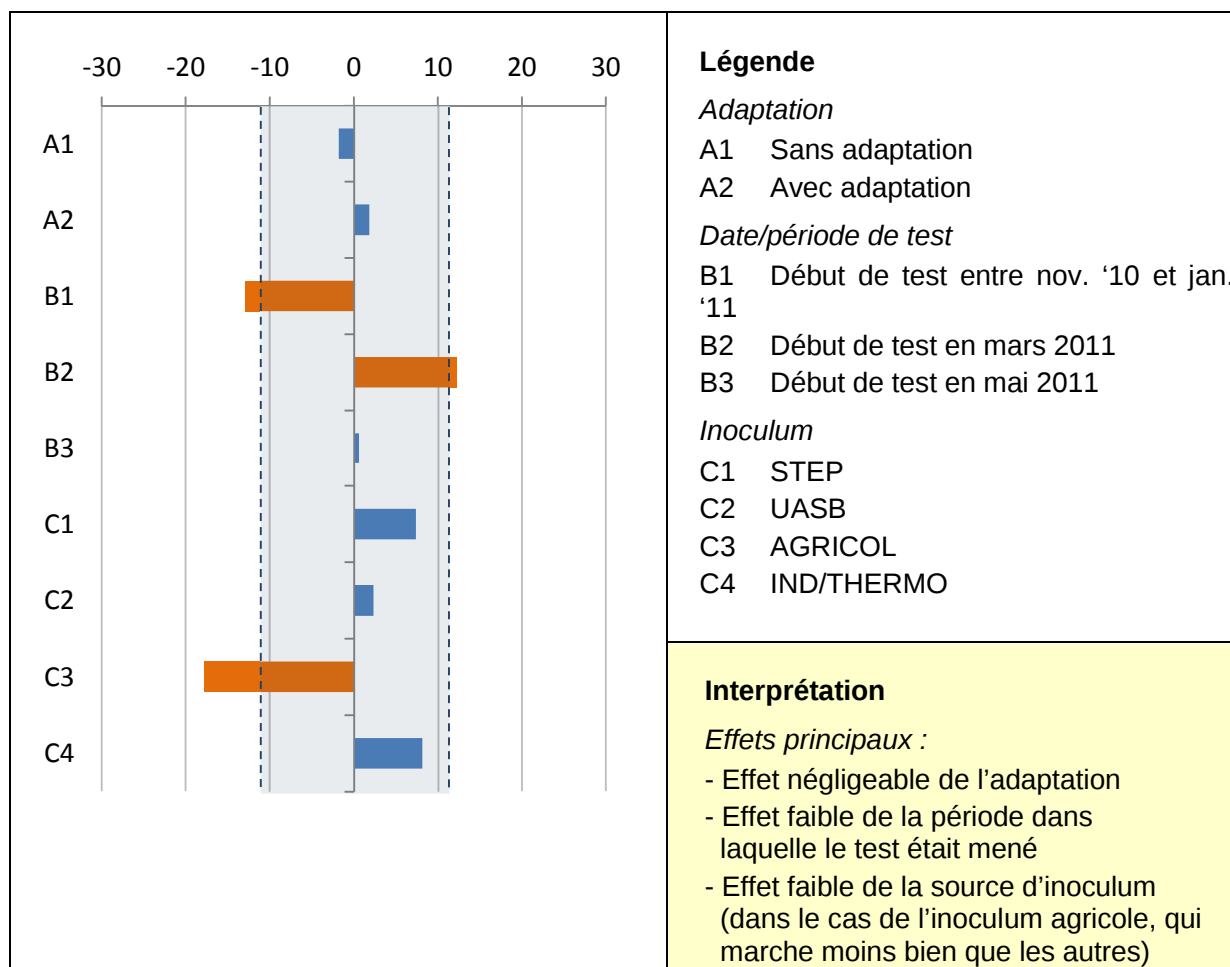
Figure 12: Poids des paramètres – Inoculum STEP



11.3.4. Traitement statistique no.4 : Substrat cellulose

La qualité des inocula étaient à chaque fois testés à l'aide d'un substrat de référence : la cellulose. Par conséquent, beaucoup de réponses expérimentales existent pour ce substrat, ce qui permet une analyse statistique plus représentative. L'effet de l'adaptation, de l'origine de l'inoculum et également de la période dans laquelle le test était mené ont pu être analysés (figure 13). Ce dernier paramètre afin de détecter une influence soit par les conditions de test (qui auraient éventuellement évolués), soit par une modification du milieu biologique dans les digesteurs.

Figure 13: Poids des paramètres – Substrat cellulose



11.3.4. Réponses statistiques

De manière générale, l'analyse statistique a mis en évidence qu'aucun des paramètres testés n'exerce une influence significative sur le résultat. Les effets observés sont de nature faible, c.à.d. à la limite de la significativité. Les substrats complexes n'ont pas accentué l'impact sur le résultat, tel qu'il était attendu.

Les réponses aux questions initiales sont les suivantes :

- Q1. Est-ce que la source de l'inoculum a une influence sur la réponse expérimentale? Si oui, quelle est l'importance?
- R1. La première série d'expérience avec les substrats simples a montré qu'un effet faible peut être occasionné par le type d'inoculum. Celui provenant d'une installation de biogaz industrielle thermophile a donné lieu à la réponse expérimentale la plus élevée, suivi par celui d'un digesteur de STEP. Les inocula provenant d'un réacteur UASB et d'une installation agricole ont produit moins de méthane. Cet effet n'a pas été confirmé lors des tests avec les substrats complexes.
- Q2. Est-ce que l'adaptation de l'inoculum a une influence sur la réponse expérimentale? Si oui, quelle est l'importance?
- R2. Au niveau de l'adaptation, un effet faible a pu être observé à deux reprises : pour l'inoculum de UASB en utilisant le lait en poudre et pour l'inoculum de STEP en utilisant de la paille. Dans tous les autres cas, les inocula n'ont pas montré de sensibilité à l'adaptation.

PARTIE IV:

CONCLUSIONS, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

A travers le regard sur les activités de recherche, les conditions cadres et les résultats réels des laboratoires, un besoin d'harmonisation et d'amélioration des tests de digestibilité a clairement été confirmé. Les recherches de l'IWA, de l'EPFL et d'une étude en partenariat, initiée au cours du présent projet, ont produit un ensemble de données et de résultats, permettant de mieux comprendre les enjeux complexes entre les conditions de test et des résultats des tests BMP.

12. Conclusions

L'ensemble des informations acquises au cours du projet, permettent de conclure ce qui suit :

a) Choix de l'inoculum

On a testé dans cette étude des inocula provenant de 4 différents types de digesteurs : boues de station d'épuration, codigestion agricole, méthanisation sèche thermophile de bio-déchets, et des boues granulaires traitant des effluents laitiers et des effluents de papeterie.

On a montré que la nature de l'inoculum peut avoir un effet faible à avéré sur la production de méthane. Cependant dans tous les cas cet effet reste modéré.

On peut donc en conclure que le type d'inoculum n'est pas déterminant pour le résultat du test BMP.

b) Influence de la température de test

L'étude a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre un test en mésophile utilisant un inoculum mésophile et un test en thermophile utilisant un inoculum thermophile. La zone de température n'est donc pas un critère pour le degré d'expression du BMP.

c) Prétraitement de l'inoculum

La concentration en MSV de l'inoculum retenue était de 30 à 40 g/L. Une concentration élevée en MSV engendre une production de méthane plus importante par l'inoculum seul (le blanc), ce qu'on veut éviter. L'épuisement pendant une semaine permettait de diminuer la production de méthane par l'inoculum mais elle continuait pendant la durée complète des tests BMP, même pour ceux qui ont duré six semaines.

d) Adaptation de l'inoculum

Dans le cas de l'utilisation d'un ratio $MSV_{inoculum} / MSV_{substrat}$ élevé (4), l'adaptation ne semble pas avoir une influence majeure. Cette étude a seulement pu mettre en évidence une influence faiblement significative pour quelques cas.

Là encore on peut en conclure que l'adaptation n'est pas déterminante pour les résultats du test.

Cependant on ne peut pas exclure qu'en cas de digestion de substrats particuliers donnant lieu à des phénomènes d'inhibition, l'adaptation puisse avoir un effet positif.

e) Complémentation en éléments traces, milieu de culture

Les résultats obtenus avec la référence cellulose et les différents inocula indiquent que l'addition d'éléments traces ou de milieu de culture n'est pas nécessaire dans les conditions retenues pour le test BMP.

f) Stockage du substrat

Le stockage du substrat peut avoir une influence sur le test BMP, suite à une dégradation partielle du substrat (-), perte de matières volatiles (-) et désintégration de matières difficilement accessibles (+). Par contre, le poids de cette influence ne peut pas être quantifié en l'état des connaissances actuelles.

g) Prétraitement du substrat

La granulométrie du substrat a probablement une influence importante sur le test BMP. Cet aspect n'a pas été abordé dans la présente étude et les substrats étudiés avaient des caractéristiques compatibles avec un prélèvement représentatif (farines) et probablement une accessibilité relativement élevée pour la biodégradation.

h) Ratio inoculum / substrat

Le ratio inoculum/substrat avait été fixé à 4/1, exprimé en MSV. Ce ratio élevé garantit un milieu de digestion robuste. Malgré une production de méthane relativement élevée par le blanc ceci n'a pas posé de problèmes pour l'obtention des résultats reproductibles.

i) Utilisation d'un contrôle positif

Les tests BMP réalisés avec la cellulose ont clairement montré l'utilité de ces contrôles positifs. Avec tous les batchs on a atteint la production maximale théorique dans moins de trois semaines ce qui a montré que les inocula étaient dans un bon état et que les techniques de mesure étaient fiables.

j) Mesure du méthane produit

Dans cette étude, on a mesuré la pression dans la bouteille, puis transformé en volume (conditions normales). La teneur en CH₄ était analysée par gaz chromatographie. On a mesuré les deux paramètres très régulièrement ce qui semblait être important pour obtenir des résultats reproductibles et fiables.

On ne peut bien sûr pas exclure d'autres méthodes de mesures. La validation de celle-ci peut être basée sur les résultats obtenus avec le contrôle positif, ici la cellulose. En effet un résultat satisfaisant avec le contrôle montre que non seulement l'inoculum est actif et ne présente ni limitation ni inhibition, mais également que la mesure du méthane est correcte.

k) Durée du test

La durée du test est un paramètre important et il est essentiel que l'expérience ne soit pas arrêtée de manière précipitée. Aussi après la phase initiale de production de méthane rapide, des quantités importantes peuvent encore être produites, surtout sur des substrats complexes comme la paille ou le foin. Pour la grande majorité des tests la production de méthane était négligeable après une durée de cinq semaines.

l) Mise à l'écart d'une valeur ou d'une expérience

La production de méthane était très reproductible dans la majorité des réplicats. Il y avait un seul cas avec des boues granulaires où l'écart entre les réplicats atteignait des valeurs autour de 20-25%. Tous les autres tests ont montrés des écarts faibles avec une moyenne de 2,1±1,8%. On pourrait donc conclure qu'un test avec un écart de plus de 5% est à écarter.

13. Recommandations

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude permet d'édicter des recommandations pour la réalisation des tests BMP sur des substrats organiques solides ou concentrés. Elles sont présentées ci-après sous la forme d'un document qui pourrait être mis à disposition des laboratoires intéressés.

RECOMMANDATIONS POUR LA REALISATION DE TEST BMP (Potentiel de Bio-Méthane)

Préambule

Ce protocole est destiné à la détermination du potentiel de production de méthane de substrats organiques solides ou riches en matières en suspension, dans des conditions optimales et non-limitantes de digestion.

Il ne peut pas être utilisé pour déterminer une éventuelle inhibition par le substrat testé, ni pour déterminer une éventuelle limitation ou carence dans sa composition. Pour cela, un autre protocole devra être élaboré. Il n'est pas non plus optimisé pour le test de substrats liquides dilués.

Les aspects d'échantillonnage et de représentativité des substrats ne sont pas abordés dans ce protocole. On suppose que les échantillons à tester sont représentatifs.

Matériel

- ❖ Bouteilles étanches au gaz permettant de contenir un volume utile de liquide d'au moins 400 ml.

Si la mesure du gaz produit implique une surpression dans la bouteille, en tenir compte pour le volume total qui devra être alors d'au moins 1000 ml.

- ❖ Un dispositif permettant de mesurer le volume de méthane produit précisément :
 - soit directement, par chromatographie quantitative [16] ou après absorption du CO₂ dans une solution de soude [27].
 - soit indirectement par mesure du volume de biogaz et de sa teneur en méthane.

La mesure du biogaz peut être réalisée par manométrie (mesure de la surpression engendrée par la production gazeuse dans un volume constant) ou par volumétrie (mesure du volume produit par déplacement d'un liquide à pression constante). La mesure de la teneur en méthane peut être réalisée par chromatographie. Elle doit être effectuée sur le volume précédemment mesuré, pour éviter les erreurs dues à la variation rapide de la teneur en méthane notamment les premiers jours.

- ❖ Un dispositif pour maintenir la température dans les bouteilles à la valeur de consigne $\pm 1^\circ\text{C}$ (Incubateur ou bain marie)
- ❖ Mélange gazeux N₂/CO₂ (environ 60%/40% ; v/v) pour purger les bouteilles
- ❖ Etuve à 105°C et four à 550°C pour la mesure de la matière sèche volatile (MSV)
- ❖ Tamis à 5mm et 3mm
- ❖ Eventuellement broyeur

Inoculum : prélèvement et préparation

L'inoculum doit provenir d'un digesteur en continu fonctionnant sans problème apparent, de préférence un digesteur de boues de station d'épuration. En effet les boues digérées présentent une bonne garantie de contenir un large spectre de micro-organismes et l'ensemble des nutriments nécessaires à la digestion. Lors de son prélèvement il faut s'assurer d'avoir un échantillon qui n'a pas stagné trop longtemps dans les tuyaux. Pour cela on vérifiera la température au moment du prélèvement.

L'inoculum doit être prélevé au maximum 7 jours avant la réalisation du test et conservé à température ambiante en minimisant le contact avec l'air.

Pour s'assurer du bon fonctionnement du digesteur en l'absence de résultats de suivi d'exploitation, il est recommandé de réaliser sur le digestat prélevé des analyses de pH, AGV/TAC et azote ammoniacal. Ceux-ci doivent idéalement respecter les seuils suivants :

pH = 7.0 à 8.0

AGV_{tot} < 3500 mg/l HAc

TAC > 5'000 mg/l CaCO₃

N-NH₄ < 3'000 mg/l

L'inoculum ne doit pas contenir des particules de plus de 5mm afin de garantir une répartition homogène. Si nécessaire le passer au travers d'un tamis à maille de 5mm.

L'inoculum est analysé, éventuellement après tamisage, pour sa teneur en matière sèche volatile.

Il est stocké le minimum de temps (maximum quelques jours) à température ambiante dans l'attente des résultats d'analyses.

Substrat de référence

Afin de s'assurer de la bonne qualité de l'inoculum (biomasse microbienne active, absence de composés inhibiteurs, présence des éléments nutritifs nécessaires), et de la validité des mesures un contrôle positif est réalisé avec un composé de composition définie : de la poudre de cellulose Avicel.

La production de méthane théorique attendue de la cellulose est de 373 ml CH₄/ g MSV, soit 90% de la production maximale si 100% était transformé en biogaz.

Substrats à tester

Les substrats doivent être homogènes pour permettre un prélèvement représentatif. Compte tenu des faibles quantités mises en jeu, on définit une taille maximale des particules de 3mm : la totalité du substrat doit passer dans un tamis à mailles de 3mm.

Si nécessaire le substrat doit être préalablement broyé ou mixé.

Le substrat (après broyage éventuel) est analysé pour sa teneur en matière sèche volatile (MSV).

Il est stocké à 4°C dans un récipient fermé pendant au maximum 7 jours.

Température d'incubation

Le test est réalisé dans la gamme de la température de fonctionnement du digesteur source. Ainsi un inoculum mésophile sera incubé en mésophile et un inoculum thermophile sera incubé en thermophile.

Organisation du test

Une expérience doit comporter au moins :

- un set de blanc : inoculum seul
- un set de contrôle positif : inoculum + cellulose
- un ou plusieurs set(s) d'essais : inoculum + substrat(s) à tester

Chaque set comporte trois réplicats.

Préparation de l'inoculum

La teneur finale en MSV dans les bouteilles doit être de 40 g/l environ.

L'inoculum final doit avoir une teneur en MSV de 30 à 35 g/l. Si nécessaire le diluer avec de l'eau désoxygénée.

La quantité d'inoculum par bouteille est de 300 à 400 ml. Elle doit être identique pour toutes les bouteilles d'une expérience, c'est dire correspondre à un set de blancs.

L'inoculum est prélevé sous agitation afin de garantir sa répartition homogène dans toutes les bouteilles.

Le ciel gazeux est purgé avec un mélange gazeux de N_2/CO_2 (environ 60%/40% ; v/v).

L'inoculum seul est incubé à la température de consigne afin de consommer la matière organique résiduelle digestible. Pendant ce temps la production de méthane est suivie au moins 2 fois par semaine.

Dans les conditions du test, on considère que l'inoculum est épuisé lorsque la production de méthane moyenne atteint moins de 75 ml/jour et par litre d'inoculum (soit 30 ml CH_4 /j pour 400 ml inoculum)

Si à la fin de la période d'épuisement on constate des différences importantes entre les bouteilles : re-mélanger la totalité de l'inoculum dans un récipient extérieur et les répartir à nouveau dans les bouteilles.

Introduction des substrats

Le rapport Inoculum/Substrat (ISR) est fixé à 4/1, exprimé en MSV. Cette valeur garantit l'absence de phase d'acidification, préjudiciable au bon déroulement de la digestion.

Pour 400 ml d'inoculum à 30 g/l de MSV, on introduira par exemple 3 g MSV de substrat (cellulose et substrat(s) test(s)).

Le volume final dans chaque bouteille doit être mesuré précisément, ou ajusté à un volume donné préalablement déterminé avec de l'eau désoxygénée. Ceci afin de ne pas introduire d'erreur dans le volume gazeux et le calcul ultérieur de la production de méthane.

De ce fait le test au cours de la même expérience, de substrats avec des concentrations en MSV très différente n'est pas conseillé.

Toutes les bouteilles sont purgées avec N_2/CO_2 , y compris le set de blancs, et incubées à la température choisie.

Suivi du test et calcul des résultats

Les bouteilles seront agitées au moins une fois par jour afin de rendre leur contenu homogène. Une agitation manuelle est suffisante.

Les conditions opératoires du test sont choisies pour que la production de méthane soit maximale durant les premiers jours. Pour cette raison, la production de méthane sera mesurée tous les jours durant les 7 premiers jours au moins.

La méthode de calcul pour la production de méthane dépend de la méthode de mesure. Dans tous les cas, le volume de méthane produit par chaque bouteille doit être ramené aux conditions normales de pression et de température, soit 1 atmosphère et 0°C.

La production des blancs est retranchée de celles des essais. Pour chaque point de mesure on procède comme suit :

- La production de méthane des 3 réplicats de blancs est moyennée
- On retranche à la production de chaque bouteille avec substrat (test ou contrôle) la production moyenne des blancs
- La production des 3 réplicats de chaque essai (cellulose et substrat test) est moyennée et on note la moyenne et l'écart type

Les résultats sont représentés en courbe pour chaque substrat (cellulose et substrat test) sous la forme de la production cumulée de méthane moyenne (blanc retranché) en fonction du temps, avec les barres d'erreurs pour les écarts types

Durée du test

Le suivi se poursuit jusqu'à ce que la production résultante de chaque essai (blanc retranché) soit négligeable, ce qu'on définit comme une variation de la production cumulée par jour inférieure à 3%.

A titre indicatif, la durée du test dans les conditions de ce protocole (après addition des substrats) est en général de 3 semaines et au maximum de 5 semaines.

Validation de l'expérience

Validité des résultats de chaque set de réplicats

Pour une précision satisfaisante des résultats, l'écart type pour chaque set de triplicats ne doit pas être supérieur à 5%.

Si un écart type supérieur à 5% est observé, il faut en rechercher la raison :

- Si 1 des triplicat est très différent des 2 autres (soit plus de 20% d'écart), on peut supprimer cette valeur et conserver la valeur moyenne des 2 autres triplicats, si leur écart type n'est pas supérieur à 5%.
- Sinon le résultat du set n'est pas pris en compte

Examen des courbes

Si on observe une diminution significative (plus de 5%), même transitoire, de la production cumulée de méthane : le résultat associé au substrat est invalidé.

Il se peut qu'il y ait eu une erreur de mesure, ou une inhibition due au substrat en question, ou encore que l'inoculum ne se comporte pas de façon homogène.

Contrôle positif

La série est considérée comme valide si la production obtenue pour le contrôle positif (ici la cellulose) est comprise entre 90% et 105% de la production théorique attendue soit 373 ml CH₄/g MSV ajoutée.

Si la production est inférieure à 90% ou supérieure à 105%, on considère que les mesures n'étaient pas correctes ou que l'inoculum ne présentait pas les qualités requises.

Rendu final des résultats

Le potentiel de production de méthane pour chaque substrat testé est exprimé en :

Volume de CH₄ (en conditions normales) par g MSV du substrat

On mentionne obligatoirement la moyenne et l'écart type entre des triplicats.

Les informations suivantes doivent également obligatoirement figurer sur le rendu des résultats :

- Source et caractérisation de l'inoculum
- Préparation et caractérisation du substrat
- Méthode de mesure du volume de méthane
- Température d'incubation
- Durée du test
- Résultat du contrôle positif
- Courbes de production de méthane en fonction du temps, associées aux résultats (moyenne et barres d'erreur)

14. Perspectives

La présente étude a permis de préciser certains points fondamentaux pour la standardisation d'un test de BMP, notamment en ce qui concerne l'inoculum. On a ainsi pu montrer, grâce à une approche statistique originale, que l'hypothèse selon laquelle l'origine et l'adaptation de l'inoculum avaient une influence déterminante pour le potentiel de production de méthane, n'était pas confirmée. Cette conclusion permet de simplifier considérablement le protocole du test.

A partir des résultats obtenus, ainsi que d'un examen approfondi de la littérature, des recommandations ont été édictées pour la réalisation des tests BMP. Ces recommandations pourraient être mises à disposition des laboratoires en Suisse susceptibles de réaliser des tests de BMP.

Les éventuelles remarques en retour de ces laboratoires pourraient être prises en compte dans une phase ultérieure de normalisation du protocole. De la même façon on se réserve la possibilité de préciser ou de modifier certains points du protocole lors de cette phase.

Parallèlement le travail inter-laboratoire, piloté par le groupe de travail ABAI de l'IWA, se poursuit. Les résultats de la présente étude font partie intégrante de ce travail. Ils ont permis d'ajouter la contribution de la Suisse à celle des 8 pays engagés dans le groupe de travail. En retour, les résultats qui seront obtenus pourront être utilisés dans la phase d'optimisation.

La présente étude s'inscrit dans le contexte plus général de l'optimisation de la filière de méthanisation. En effet la fiabilisation de la prévision de la production énergétique est un élément de base pour l'économie de la filière. Dans cette optique, la comparaison des résultats obtenus lors des tests en laboratoire avec des résultats de digesteurs à échelle réelle permettrait la validation finale de la méthode.

Bibliographie

Publications scientifiques

- [1] I. Angelidaki, W. Sanders (2004) Assesment of the anaerobic biodegradability of macropolluants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 117-129.
- [2] I. Angelidaki, M. Alves, D. Bolzonella, L. Borzacconi, J. L. Campos, A. J. Guwy, S. Kalyuzhnyi, P. Jenicek, J. B. van Lier (2009) Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic waste and energy crops : a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology* 59(5), 927-934.
- [3] U. Baumann, M. T. Müller (1997) Determination of anaerobic biodegradability with a simple continuous fixed-bed reactor. *Water Research* 31, 1513-1517.
- [4] C. Dumas, G. Ghizzi Damasceno da Silva, X. Rouau, H. Carrère, J.P. Steyer (2010). Wheat straw milling effect on biogas production. *Proceedings of 12th International Symposium on Anaerobic Digestion*, Guadalajara, Mexiko, October 2010.
- [5] J.-M. Fürbringer (2004) *Méthodologie des Plans d'Expériences*. Polycopié, notes de cours, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- [6] A. J. Guwy (2004) Equipement used for testing anaerobic biodegradability and activity. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 131-139.
- [7] J. Heerenklage, F. Colobmo, R. Stegmann (2004) Comparison of test systems for the determination of the biodegradability of organic materials under anaerobic conditions. *Orbit Articles* 01/01 2004.
- [8] D. J. Hills, K. Nakano (1984) Effects of particle size on anaerobic digestion of tomato solids waste. *Agricultural Wastes*, 10, 285-295.
- [9] W. R. Müller, I. Frommert, Ralf Jörg (2004) Standardized methods for anaerobic biodegradability testing. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3: 141-158.
- [10] A. Mshandete, L. Björnsson, K. A. Kivaisi, M.S.T. Rubindamayugi, B. Mattiasson (2005) Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable Energy* 31: 2385-2392.
- [11] L.M. Palmowky, J.A. Müller (2000) Influence of the seize reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology* 41(3), 155-162.
- [12] S. Pommier, A. Manas Llambas, X. Lefebvre (2010) Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials. *Bioresource Technology* 101, 463-468.
- [13] F. Raposo, V. Fernandez-Cegri, M.A. De la Rubia, R. Borja, F. Béline, C. Cavinato, G. Demirer, B. Fernandez, M. Fdz-Polanco, J.C. Frigon, R. Ganesh, P. Kaparaju, J. Koibova, R. Mendez, G. Menin, A. Peene, P. Scherer, M. Torrijos, H. Uellendahl, I. Wierinck, V. de Wilde (2011) Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 1088-1098.
- [14] A. Rozzi, E. Remigi (2004) Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 93-115.
- [15] W. T. M. Sanders, G. Geerink, G. Zeeman, G. Lettinga (2000) Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates. *Water Science and Technology* 41(3), 17-24.
- [16] S. Tait, J. Telmer, B. Edgerton, D. J. Batstone (2009) Anaerobic digestion of spent bedding from deep litter piggery housing. *Bioresource Technology* 100, 2210-2218.
- [17] M. Walker, Y. Zhang, S. Heaven, C. Banks (2009) Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 100, 6339-6346.

Normes

- [18] Deutsche Norm, DIN 38414 (1985). Sludge and sediments, determination of the amenability to anaerobic digestion.
- [19] International Standard, ISO 14853 (2005). Plastics – determination of the ultimate anaerobic biodegradation of plastic in an aqueous system – Method by measurement of biogas production.
- [20] International Standard, ISO 15985 (2004). Plastics – determination of the ultimate anaerobic biodegradation under high-solids anaerobic digestion conditions – Method by analysis of released biogas.
- [21] International Standards Worldwide, ASTM D 5511 (1994). Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials under High-Solids Anaerobic-Digestion Conditions.
- [22] International Standards Worldwide, ASTM D 5250 (1992). Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials in the Presence of Municipal Sewage Sludge.
- [23] Norme Suisse SN, EN ISO 11734 (1995). Qualité de l'eau – Evaluation de la biodégradabilité anaérobie « ultime » des composés organiques dans les boues des digesteurs – Méthode par mesurage de la production de biogaz.
- [24] Verein Deutscher Ingenieure, VDI 4630 (2006). Vergärung organischer Stoffe - Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche.

Sites internet

- [25] Site internet de la société LPRAI : <http://www.nemrodw.com/>
- [26] Site internet du *Specialist Group on Anaerobic Digestion* de l'IWA : <http://www.deb.uminho.pt/iwa/>
- [27] Site internet du « automatic methane potential test system AMPTS II » sur <http://www.bioprocesscontrol.com>

ANNEXES

ANNEXE I: PUBLICATIONS

a. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review

Alberto Rozzi (†), Enrico Remigi (2004) *Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 93-115.

La publication résume les différentes méthodes de test pour déterminer l'activité et l'inhibition microbienne en conditions anaérobies. Une distinction est proposée selon les méthodes directes physico-chimiques, directes microbiologiques et indirectes. Ainsi, les méthodes volumétrique et manométrique de mesure de gaz sont décrites.

Une liste des facteurs clés influençant les tests de production de biogaz est présentée, résumée dans le tableau A1.

Tableau A6: Facteurs clés influençant les tests de biodégradabilité

Facteur	Description
Equipement	Type du test biologique, forme de la cuve de réaction
Conditions de test	Configuration (e.g. ratio gaz-liquide); température, pH, potentiel redox, fréquence d'échantillonnage, etc.
Méthodes d'analyse	Principes de détection, appareils de mesure, variables surveillées
Conditions de test	Propriétés physico-chimiques (e.g. solubilité), caractérisation (e.g. teneur en carbone)
Inoculum	Source (municipal, industriel, ...), structure physique (flocons, granules, ...)
Solution nutritive	Nutriments, éléments minéraux et de trace, cosubstrat

b. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants

Irini Angelidaki, Wendy Sanders (2004) *Assesment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 117-129.

Les facteurs influençant la biodégradation et leur mode d'action sont décrits dans cette publication. Un résumé des approches pour des tests de digestibilité est présenté dans le tableau A2 ci-après.

Il a été constaté que le résultat de l'expérience varie selon la méthode appliquée, ainsi qu'en fonction des problèmes qui peuvent apparaître au cours d'une expérience.

Tableau A2: Approches pour déterminer la biodégradabilité anaérobie

Élément	Approche
Montage de l'expérience:	Batch ou continu
Inoculum:	- Provenance: Souvent une boue digérée est utilisée, mais sous certaines conditions, des microorganismes spécifiques sont nécessaires - Quantité d'inoculum: 60 – 90 % w/w. Une formule pour calculer la quantité minimum d'inoculum est indiquée afin d'éviter une acidification dans le réacteur
Echantillon :	Taux de dilution (différentes dilutions sont utilisées pour remarquer si l'échantillon est toxique)
Medium:	Un medium synthétique contenant des micronutriments, vitamines et métaux en trace (mais pas de carbone organique) peut être ajouté lors de l'expérience pour permettre la croissance des micro-organismes.
pH :	Le pH se trouve entre 6.0 et 8.3. En dehors du pH optimal et sans capacité tampon il peut apparaître une inhibition. Le pH influence également les pourcentages de CO ₂ et CH ₄ dans le gaz produit.
Détermination de la dégradation anaérobie :	Mesure de la formation de produits (biogaz) ou de la dégradation du substrat (MO, DOC, COD, etc.).
Paramètre mesuré :	Biogaz ou méthane (Suite à la solubilité du CO ₂ , la mesure du méthane est plus fiable).

c. Standardized methods for anaerobic biodegradability testing

Wolf-Rüdiger Müller, Irene Frommert, Ralf Jörg (2004) *Standardized methods for anaerobic biodegradability testing. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 141-158.

Une vue d'ensemble des guidelines et des méthodes de test standardisés est proposée. Comme directive importante est évoquée celle de la Communauté Européenne 67/548/EEC, bien qu'elle ne présente seulement deux méthodes dans le domaine de la dégradation anaérobie : 'Transformation aérobie/anaérobie dans le sol' et 'Transformation aérobie/anaérobie dans les sédiments', ce qui ne couvre qu'une très petite partie du domaine. Auprès des organisations de standardisation internationales sont nommées ASTM, CEN et ISO. D'autres structures importantes sont le DIN (institut allemand de normalisation), OECD- et ECETOC - guidelines.

D'après cet article, les principaux facteurs qui varient d'une méthode à l'autre sont la température de test (10 à 52°C), les concentrations de digestion, la méthode de mesure du gaz (volumétrique, manométrique ou combinaison) et l'utilisation ou non d'un milieu de culture. Un sondage international a montré que la reproductibilité d'un test à l'intérieur d'un laboratoire est satisfaisante, par contre les résultats des différents laboratoires variaient de l'ordre de 45 %. Ceci démontre le besoin d'harmonisation des méthodes et de l'équipement des tests de dégradabilité.

d. Equipement used for testing anaerobic biodegradability and activity

A.J. Guwy (2004) *Equipment used for testing anaerobic biodegradability and activity. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 131-139.

Les équipements de test sont décrits, faisant la distinction entre les méthodes se basant sur la mesure de gaz et les méthodes se basant sur l'analyse de la consommation de substrat ou formation de produits.

Il est évoqué que la plupart des méthodes développées ne sont pas commercialisées et restent des outils de recherche. Les systèmes commerciaux basés sur la norme ISO 11734 sont faciles à utiliser et évitent les problèmes de dissolution de CO₂. Par contre, ils présentent une sensibilité de mesure réduite.

e. Comparison of test systems for the determination of the biodegradability of organic materials under anaerobic conditions

J. Heerenklage, F. Colobmo, R. Stegmann (2004) Comparison of test systems for the determination of the biodegradability of organic materials under anaerobic conditions. Orbit Articles 01/01 2004.

Des tests de biodégradabilité ont été effectués avec deux systèmes de test différents : un système volumétrique de TUHH (Eudiometer), et un système manométrique (Sensomat). Des plastiques (PHB, PCL et sachets en plastic) sous forme de poudre ou de particules inférieures à 5mm étaient utilisés comme substrats. Après une période de 30 jours, les profils de production de biogaz des deux systèmes ont été comparés. L'évolution de la production ainsi que le volume total de gaz produit ont été très similaires, présentant des taux de dégradation de 65 % et 67 % de la dégradation maximale théorique.

f. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion process

Mark Walker, Yue Zhang, Sonia Heaven, Charles Banks (2009) Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion process. Biosource Technology 100, 6339-6346.

L'étude évoque les problèmes liés à la mesure des débits de gaz et à l'application des facteurs de correction standard – deux procédures qui sont fréquemment à la source d'erreurs. Elle propose une assistance au choix de solutions barrières et des types de gazomètres. Trois types de gazomètres de déplacement de liquide, un gazomètre à poids et un gazomètre à bouteille sont analysés.

L'étude relève comme problème principal la dissolution du biogaz dans la solution barrière, voir sa pénétration. La vitesse de diffusion du gaz est fonction de la solution utilisée, c'est pourquoi les solutions avec une teneur ionique élevée sont les plus appropriées. La solution NaCl (75 %) acidifiée préserve au mieux la composition et le volume du biogaz.

Une autre source d'erreur fréquente est la conversion du volume de gaz en STP (standard temperature and pressure). De plus, une sensibilité insuffisante de la balance (weight gasometer), une mauvaise calibration par rapport au volume et la diffusion du gaz (height gasometers) résultent en des sous- ou surestimations du potentiel de biogaz.

g. Publications concernant l'influence du diamètre d'un substrat

Les conclusions de six publications concernant l'influence du diamètre du substrat sur le potentiel méthanogène sont résumées dans tableau A3 ci-après :

Tableau A3: Conclusions de publications concernant l'influence du diamètre d'un substrat

Substrate	Classification	Ø before treatment	Ø after treatment	Results	Ref.
Mixture of potatoes, apples & carrots	easily degradable	2 x 2 x 2 cm	rubbed with a grater	no influence	[11]
Meat	easily degradable	2 x 2 x 2 cm	ground by cutting stress	no influence	[11]
Sunflower seeds	substrate with outer protection	whole seeds (5mm)	ground by cutting stress, x50=2.04mm	increase of gas production of ~20 %	[11]
Maple leaves	high fiber content	2 x 2 cm	ground by shear stress, x50=120 µm	increase of gas production of ~15 %	[11]
Hay stems	high fiber content	1.5 cm	ground 1h in a stirred ball mill with water	increase of gas production of ~18 %	[11]
Paper and cardboard	high fiber content	"large pieces"	<1mm	No influence on methane potential or on production rates	[12]
Straw	high fiber content		centrifugal milling: 804 to 45 µm	No improvement on methane potential but significant influence on the biodegradation kinetics	[4]
Sisal fibre	high fiber content	untreated sisal fibre	2mm fibres	Increase of 23% of BG prod. Methane yield was inversely proportional to particle size.	[10]
Potatoe (fresh) Starch from Hatch	Starch		x50=46.6 µm x50=17.9 µm x50=32.1 µm	Hydrolysis rate constant per unit surface area available	[15]
Tomatoes (peel, seeds, stem)	-	2cm	0.13 cm	Hydrolysis rate constant per unit surface area available	[8]
Conclusions					
Easily degradable Substrates:		no influence of particle diameter			
High fiber content:		in the range of µm: no influence on straw Untreated vs. mm: significant influence on sisal fiber, no influence on paper/cutboard			
Starch:		in the range of µm: influence on potato			
→ in the range of µm: not relevant for our study, because it is too difficult to apply in real installations.					
→ in the range of mm: different results on sisal fiber and paper/ cutboard					

ANNEXE II: SYSTÈMES DE TEST

Automatic Methane Potential Test System - AMPTS

Fabriqué par Bioprocess Control (Suède), ce système de test est commercialisé depuis juillet 2009. Jusqu'à 15 bouteilles de 500 mL peuvent être utilisées simultanément. La mesure de gaz est effectuée selon le principe de déplacement de liquide. Le volume de gaz (biogaz ou méthane) ainsi que le débit sont automatiquement enregistrés au cours de l'expérience. Ces données peuvent être exportées sur Excel.

Ce système de test est simple à monter et nécessite peu de maintien pendant l'exploitation.

Figure A14: AMPTS



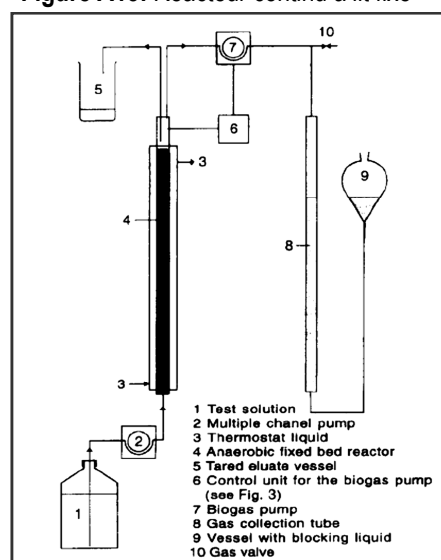
BCS-CH₄ biogas

Fabriqué par BlueSens-gas sensor GmbH (Allemagne), ce système de test permet la saisie automatique de la production de méthane en temps réel. BSC-CH₄ biogas est équipé de cuves de taille variable (min. 500 mL), de senseurs de gaz infrarouge commandés par microprocesseur, de compteurs de volume de précision et d'un logiciel BACVis pour la saisie de données. Des compteurs de volume de précision MilliGascounter® sont utilisés. Ces derniers fonctionnent à l'aide d'un axe basculant, où le nombre de basculements permet de connaître le volume du gaz. La précision de la mesure est de 1 mL.

Continuous fixed-bed reactor, EMPA

L'EMPA (laboratoire pour l'essai des matériaux de construction) a proposé en 1996 un réacteur continu à lit fixe pour déterminer la biodégradabilité anaérobie des substances solubles et des eaux usées. Le réacteur consiste en un tube chargé d'un tissu trompé dans une boue anaérobie. Le gaz s'accumule dans un premier temps en haut de la colonne ; quand la pression atteint un certain seuil, le gaz est conduit dans un tube de mesure rempli d'hydroxyde de sodium pour l'absorption du dioxyde de carbone. La hauteur de la solution est proportionnelle au volume de gaz produit. Le système est illustré à la figure a15.

Figure A15: Réacteur continu à lit fixe



OxiTop

Le système OxiTop® Control de l'entreprise WTW permet la détermination de la biodégradabilité basée sur la mesure de la DBO (Demande Biochimique en Oxygène). Il consiste en 6 ou 12 flacons, des têtes de mesure OxiTop®-C, le système d'agitation Inductif Stirring et un contrôleur OxiTop® Controller OC110. La mesure fonctionne selon le principe respirométrique basé sur une mesure manométrique. La saisie et l'enregistrement des valeurs de me-

sure s'effectuent dans la tête de mesure. Ces données sont transmises sans fil au contrôleur, par infrarouges, et sont dépouillées en une valeur DBO. Ce système de mesure est fréquemment utilisé dans les laboratoires pour l'analyse des eaux usées. Comme le mesure est manométrique on peut aussi utiliser le système pour le mesure d'une production de gaz au lieu d'une consommation comme pour l'analyse de la DBO.

Eudiomètre (pour mesure du volume de gaz uniquement)

L'eudiomètre est un tube en verre gradué mesurant la variation de volume d'un mélange gazeux suite au déplacement d'un liquide (solution barrière). Selon l'utilisation, l'appareil peut prendre des formes variées.

En général, il a une forme similaire à une éprouvette scellée à l'extrémité supérieure et dont l'autre extrémité est immergée dans la solution barrière. Le liquide emprisonne un échantillon de gaz dans le tube et la graduation permet la mesure du volume de gaz.

Un eudiomètre adapté aux tests de biodégradation anaérobie est fabriqué par la TUHH (Technische Universität Hamburg - Harburg).

Autres

D'autres systèmes de test ont été recensés dans la littérature, comme le ORI-Biogasomat de Ori Wassertechnik GmbH & Co ou le Sensomat de Aqualytic. Ces appareils ne sont plus disponibles sur le marché (raisons inconnues) et ne sont par conséquent pas décrits ici.

ANNEXE III: COMITÉS DE STANDARDISATION

Organisation Internationale de Normalisation ISO

ISO est le plus grand producteur et éditeur mondial de normes internationales. Le secrétariat central, situé à Genève, assure la coordination d'un réseau d'instituts nationaux de normalisation de 162 pays. Trois normes ISO prennent de l'importance pour les tests de biodégradabilité anaérobie: ISO 14853 pour substances organiques non solubles, ISO 11734 pour substances organiques solubles et ISO 15985 pour substrats à haute teneur en matière sèche.

ASTM International (North American Test Methods)

Fondé il y a plus de cent ans, ASTM est une organisation internationale de développement de standards dont le siège se situe aux Etats-Unis. Experts, industries, gouvernements et hautes écoles de plus de 120 pays participent à l'ASTM. Deux normes, ASTM 5250 et 5511 concernent la biodégradation de plastiques.

Comité Européen de Normalisation CEN

Le comité a été créé afin d'harmoniser les normes élaborées en Europe. Tous les Etats membres sont également membres de l'ISO. Les normes adoptées sont signalées par les lettres EN (European Norms). La norme ISO sur la biodégradabilité anaérobie est ainsi nommée EN ISO 14853.

Deutsches Institut für Normung DIN

Cet institut, dont le siège est à Berlin, élabore des normes à l'échelle nationale. DIN représente l'Allemagne auprès du Comité Européen de Normalisation CEN. La norme DIN 38414 TL8 concerne les tests de biodégradation anaérobie.

Verein Deutscher Ingenieure VDI

L'association des ingénieurs allemands (VDI) a élaboré plus de 1700 directives techniques. Avec l'édition de la VDI 4630 en 2006, l'harmonisation des pratiques de laboratoire au niveau des tests de dégradabilité en milieu anaérobie était visée.

European community directive 67/548/EEC

L'annexe V de cette directive contient environ 85 méthodes de test contraignantes pour les états membres de l'Union Européenne. Une procédure formelle appelée 'Adaption to technical process' permet la mise à jour régulière avec des nouvelles méthodes. Deux méthodes sur la biodégradabilité anaérobie figurent dans la directive; ils concernent la transformation anaérobie dans les sols et sédiments.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

Ce guide relève les méthodes de test en accord international. Il est utilisé par des gouvernements, industriels et laboratoires. Les méthodes de test sont harmonisées avec les directives EEC. De même que ces dernières, le guide ne présente que deux méthodes d'analyses pour la biodégradabilité anaérobie.

ANNEXE IV: PROTOCOLE STANDARD PROPOSÉ PAR L'IWA

I. Angelidaki, M. Alves, D. Bolzonella, L. Borzacconi, J. L. Campos, A. J. Guwy, S. Kaluzhnyi, P. Jenicek, J. B. van Lier (2009) Defining the bio-methane potential (BMP) of solid organic waste and energy crops : a proposed protocol for batch assays. Water Science and Technology 59(5), 927-934.

Suggested standard protocol

a. Objective

The objective of the protocol is to provide important experimental guidelines to carry out an accurate assessment of the anaerobic biodegradability of any compound or material to methane and carbon dioxide.

b. Inoculum type

The inoculum should be “fresh” i.e. inoculum that is not stored for periods longer than a few days, from any type of active anaerobic reactor e.g. sludge reactors, manure reactors or sludge bed reactors, such as UASB.

The inoculum should have a “broad trophic” microbial composition in order to ensure that the anaerobic conversion of different substrates is not limited. Where the inoculum originates from a reactor which is fed with a simple feed composition, different inocula should be mixed with the sampled inoculum, e.g. sewage sludge inoculum together with granules. Both mesophilic and thermophilic inocula can be used; however, inocula originating from reactors treating similar substrates are preferable, as it reduces the risk for inhibition due to non-adapted microbial populations.

c. Treatment of the inoculum

The inoculum should be “degassed” i.e. pre-incubated in order to deplete the residual biodegradable organic material. The pre-incubation should be carried out at the same temperature as the process from which the inoculum originated. Degassing should be performed until no further significant methane production, typically this point may take between 2 to 5 days of incubation. In some cases, for example when the inoculum is taken from a reactor fed with relatively high fat/oil concentration, higher periods of pre-incubation may be required, in order to eliminate all the residual (adsorbed/entrapped) substrate.

The inoculum should be a close representation of the one sampled from the reactor, and **SHOULD NOT** be washed to remove residual substrate material and IC compounds.

d. Activity of the inoculum

The quality of inoculum could be examined by performing activity tests on acetate and cellulose, immediately preceding the biodegradability test (see below activity tests). Activity test of the inoculum is not necessary, if the inoculum is originated from a “healthy” reactor, as indicated by a high biogas production rate and low volatile fatty acids level.

e. Amount of Inoculum

The volume of inoculum can be from 10 to 80% of the total test volume, depending on the activity and biomass concentration of the inoculum. For instance an inoculum taken from a manure digester has typically 2 to 3% VS and a drained granular sludge has typically 10%VS or more. Furthermore, in granular sludge, most of the VS consists of microbial biomass, whilst in manure, the inoculum VS is mainly represented by recalcitrant lignocellulosic residues and not active microbial biomass. Therefore, inoculation according to a specific amount of VS of inoculum is inappropriate, unless the ratio of microbial biomass to recalcitrant VS is known.

General recommendations for the type and concentration of inoculum that should be used in anaerobic biodegradability assays are as follows.

The inoculum concentration in the test vessel should be high (typically be 70% to 80% of the total liquid used in the test) if relatively low activity inocula such as digested manure or sludge are used (SMA around 0,1g COD-CH₄/gVSS/day). For highly active inocula such as granular biomass (SMA around 0.5 g COD-CH₄/gVSS/day), the inoculum concentration should be relatively low (10% to 20% of the total liquid used in the test). The duration of the test will be dependent on strength of the inoculum and, in both cases, the higher the inoculum concentration, the fastest the anaerobic conversion of the substrate will occur and the quicker the test will be completed.

f. Medium

Necessary nutrients/micronutrient/vitamins are required for optimal performance of anaerobic microorganisms. Nutrient medium containing macro- & micronutrients, buffers, vitamins etc. should be added, unless it can be documented that they are present in inoculum or substrate. An example of a basic anaerobic medium is given in table A4

Table A4 Basic Anaerobic Medium (Angelidaki and Sanders 2004).

Description of Anaerobic Basic Medium

The basic medium is prepared from the following stock solutions, (chemicals given below are concentrations in g/L, in distilled water).

- (A) NH₄Cl, 100; NaCl, 10; MgCl₂ 6H₂O, 10; CaCl₂ 2H₂O, 5
- (B) K₂HPO₄ 3H₂O, 200
- (C) resazurin 0.5
- (D) trace-metal and selenite solution: FeCl₂ 4H₂O, 2; H₃BO₃, 0.05; ZnCl₂, 0.05; CuCl₂ 2H₂O, 0.038; MnCl₂ 4H₂O, 0.05; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O, 0.05; AlCl₃, 0.05; CoCl₂ 6H₂O, 0.05; NiCl₂ 6H₂O, 0.092; ethylenediaminetetraacetate, 0.5; concentrated HCl, 1 mL; Na₂SeO₃ 5H₂O, 0.1
- (E) vitamin mixture (components are given in mg/L): Biotin, 2; folic acid, 2; pyridoxine acid, 10; riboflavin, 5; thiamine hydrochloride, 5; cyanocobalamin, 0.1; nicotinic acid, 5; P-aminobenzoic acid, 5; lipoic acid, 5; DL-pantothenic acid.

To 974 mL of distilled water, the following stock solutions should be added (A), 10 mL; (B), 2 mL; (C), 1 mL; (D), 1 mL and (E), 1 mL. The mixture is gassed with 80% N₂ - 20% CO₂. Cysteine hydrochloride, 0.5 g and NaHCO₃, 2.6 g, are added and the medium is dispensed to serum vials and autoclaved if necessary. Before inoculation the vials are reduced with Na₂S 9H₂O to a final concentration of 0.025%.

g. Experimental vessels

The assay is performed in closed vessels (100 mL up to 2 litres) depending on the homogeneity of the substrate i.e. the more homogeneous the substrate the smaller the volume of the vessel is required. (Figure A3).

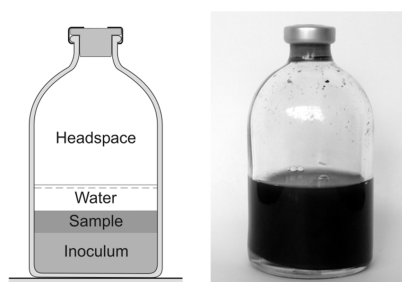


Figure A3: Example of an assay vessel for anaerobic biodegradability test.

h. Substrate

The characteristics of the substrate to be assayed should be always analysed and the total solids (TS) and volatile solids (VS) should be quantified and controlled. In the case of an acidic waste, for example, putrescible kitchen waste, attention should be given during drying of the sample as volatile compounds can be lost during TS determination. In this case VS can be underestimated due to VFA losses during the analysis of total solids. For materials such as this, the TS determination should be made after increasing the pH of the waste to decrease volatility of volatile fatty acids. Additionally, for very volatile samples, drying during TS determination should be performed at a maximum temperature of 90°C instead of 105°C, until constant weight.

i. Blank and controls

The background methane production from the inoculum, determined in blank assays with medium or water and no substrate, is subtracted from the methane production obtained from the sample assays. The blank and the control should be carried out in triplicate. The control vessels should contain a cellulose standard substrate or gelatin or both depending on the nature of the tested substrate. A cellulose standard should be used for crops or municipal biowaste whilst gelatin should be used when testing meat, fish and other similar wastes.

j. Assay set up

The assay should be performed at least in triplicate at each dilution used, depending on the complexity (homogeneity) of the substrate and reproducibility of the tests. When using substrates with high heterogeneity more than three replicates should be used.

For new substrates with unknown degradation characteristics, a number of different dilutions of the substrate (with water) are required. Dilutions ensure that the methane potential of the substrates is not underestimated due to overload or potential inhibition. Samples should be tested at concentrations from 5% to 100% (undiluted samples). When the maximum methane potential is the same in at least two different dilutions of the dilution series, it can be assumed that the inoculum is not overloaded or inhibited. If the specific potential continues to increase with increasing dilution (decreased concentration of substrate), additional dilutions are required.

k. Assay procedure

Prior to analysis the assay vessels should be flushed continuously with N₂/CO₂ (80/20%V/V) (80/20% gas mixture is resulting in neutral pH) before adding the substrate to the vessel. The substrate can be accurately transferred either by volume or weight, depending on the substrate and consistency and homogeneity. The inoculum is then distributed anaerobically to each assay vessel. The inoculum should be continuously stirred and kept under anaerobic conditions during the process of transfer. Typically N₂/CO₂ (80/20%V/V) is flushed through the headspace of the inoculum storage vessel and the same gas is used to flush the assay vessels. The inoculum can be transferred either directly and diluted with the medium/water (see medium description) or diluted with medium or water prior to transfer.

The transfer of inoculum is typically achieved by using a graduated 100 mL syringe with a large orifice to which a suitable length of tubing is fixed to allow the bottom of the inoculum storage bottle to be reached. In the case of granular inoculum, the granules are first drained using a suitable sieve with a sufficient mesh size to retain the granules. Once drained a specific granular volume can be transferred using a spoon, ensuring that the same volume is distributed to each assay vessel. After transferring the inoculum, substrate and medium, the assay vessels are sealed using a thick butyl rubber stopper held in place with an aluminium crimp.

l. Data collection

In the biodegradability assay, the methane accumulated in the headspace of the closed vessel should be measured by gas chromatography (GC). For that, a sample volume of e.g. 100

μL should be collected with a gas-tight syringe and injected into the GC. Either a Thermal Conductivity Detector (TCD) or a Flame Ionization Detector (FID) can be used. The obtained peak area should be compared to that obtained by injecting the same volume of a standard gas mixture of the known composition. The standard gas mixture should be injected at the atmospheric pressure because if the gas sample is taken with a gas tight over pressurised syringe, and compared with a gas standard injected under atmospheric pressure the methane percentage will be more than 100%.

The volume of methane produced is obtained by multiplying the headspace volume by the % of CH_4 in the headspace as determined by GC analysis. For publication and comparison with other studies, the values are often calculated to STP conditions i.e. converted to 0°C and 1 atm.

m. Data interpretation and reporting

The anaerobic biodegradability results should always be accompanied by a clear description of inoculum source, activity and VS or VSS content, medium composition, waste (water) composition or description, and dilutions used. The methane production profiles with respect to time together with the profiles for the blank and control assays should be presented.

In the final report, the following items should be considered:

- date, time of start and end of the test;
- tested substrate, amount or quantity and chemical-physical characteristics;
- inoculum, origin and activity, amount or quantity and chemical-physical characteristics;
- test conditions (temperature, inoculum/substrate ratio, volume of the vessel, number of replicates...);
- results of blank and controls biogas production (report graphics);
- methane production in the triplicate and average and standard deviations;
- specific methane production: volume of CH_4 per gram VS; or CH_4 per gram COD, or CH_4 g sample.

ANNEXE V: LISTE DES LABORATOIRES PARTICIPANTS À L'ÉTUDE DE L'ABAI GROUP

Laboratoires participants à l'étude de l'ABAI Group, ayant communiqué leurs résultats au moment de la rédaction du présent rapport:

- Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark
- Department of Chemical Engineering, University of Santiago de Compostella, Spain
- Department of Science and Technology, University of Verona, Italy
- Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic
- Institute of la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Sevilla, Spain
- The QUESTOR Centre and School of Chemistry and Chemical Engineering, The Queen's University of Belfast, Northern Ireland
- Laboratoire de Biotechnologie Environnementale, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse

ANNEXE VI: RÉSUMÉ DES MESURES ET MÉTHODES

Le tableau A5 présente un résumé des mesures effectuées, méthodes appliquées et l'objectif recherché.

Tableau A5: Mesures et méthodes –vue d'ensemble

Objet	Paramètre	Méthode	Objectif
Inoculum	Ammonium	Kit Merck	Validation de l'inoculum: Ammonium < 2500 mg/L
	AGV totaux	Titration	AGV < 2500 mg/L
	Alcalinité	Titration	Capacité tampon > 3000 mg CaCO ₃ /L
Inoculum, sub- trat	MS	Sécher 1 nuit à 105 °C	MSV _{totale} = 40 g/L
	MSV	Calciner 2h à 550 °C	MSV _{inoculum} / MSV _{substrat} = 4/1
	pH	pH-mètre	Comparaison avant et après digestion
Ciel gazeux	N ₂ /CO ₂		60% / 40% v/v
Etuve	Température	Thermomètre	Contrôle
Gaz (volume)	Température Pression	Thermomètre Manomètre	calcul STP (Standart Temperature and Pressure) du volume de gaz
Gaz (composi- tion)	%CH ₄ / %CO ₂	Chromatographie gazeuse ou détecteur en ligne	Production cumulée et profil de production (biogaz et méthane)

ANNEXE VII: MÉTHODES DE CARACTÉRISATION

Matières sèches (MS)

Matériel

- Creusets de porcelaine (150 mL) préalablement séchés à 105° et conservés au dessiccateur
- Etuve à 105 °C
- Dessiccateur garni de gel de silice avec indicateur d'humidité
- Balance de précision, lecture au mg pour les eaux, lecture au dixième de g pour les boues.

Mode opératoire

- Choisir un creuset, le peser (A)
- Introduire environ 100 mL de l'échantillon fraîchement prélevé et mélangé puis le peser (B)
- Sécher le contenu du creuset dans l'étuve à 105°C pendant la nuit
- Placer le creuset dans le dessiccateur et laisser refroidir 1 heure
- Peser le creuset (masse C)
- Remettre le creuset au dessiccateur ou directement calciner au four si on souhaite les résultats de MSV (voir la procédure plus loin)

Expression des résultats

A	creuset vide	[mg] ou [g]
B	creuset rempli	[mg] ou [g]
C	creuset rempli après séchage	[mg] ou [g]

$$MS [\%] = (C-A) / (B-A) * 100$$

Matières sèches volatiles (MSV)

Matériel

- 1 four allant jusqu'à 650 °C ou plus
- creusets contenant les matières sèches (MS)
- 1 pince à creuset
- 1 dessiccateur garni de dessiccant
- 1 balance de précision

Mode opératoire

- Placer les creusets contenant les matières sèches dans le four
- Chauffer le four à 550 °C
- Calciner durant 2 heures (voir démo "Four1024.exe")
- Retirer les creusets du four
- Mettre les creusets à refroidir 10 minutes dans le dessiccateur
- Peser les creusets (D)

Expression des résultats

A	creuset vide	[mg] ou [g]
B	creuset rempli	[mg] ou [g]
C	creuset rempli après séchage	[mg] ou [g]
D	creuset rempli après calcination	[mg] ou [g]

$$\text{MSV } [\%] = (C-D) / (B-A) * 100$$

Ammonium

Pour la mesure de l'ammonium le Kit Merck a été utilisé. Toutes les indications sont données dans le mode d'emploi du Kit. Le matériel (en plus de ce qui est fourni par le Kit) est le suivant :

Matériel

- Spectrophotomètre
- Portoir métallique

Acides gras volatiles et alcalinité

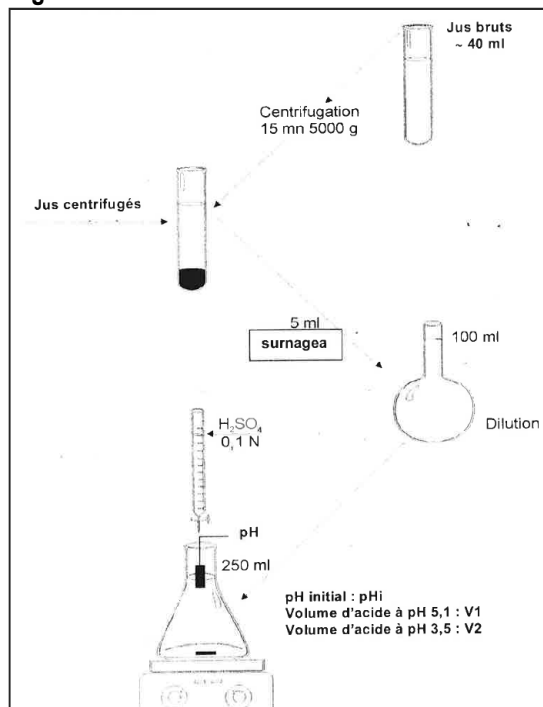
Matériel

- Centrifugeuse
- Appareil de titration
- pH mètre
- Acide sulfurique 0.1 N
- Agitateur magnétique

Mode opératoire

- Mesurer le pH du jus brut
- Centrifuger 15min à 5000*g dans des tubes de 20 mL pour séparer la matière en suspension
- Le surnagea est dilué 20 fois en introduisant 5 mL dans une fiole jaugée de 100 mL complétée à 100 mL avec de l'eau déminéralisée
- La solution est placée dans un erlenmeyer de 250 mL et agité avec un agitateur magnétique ; le pH initial est prélevé
- L'acide sulfurique est coulé doucement en agitant jusqu'à obtenir un pH de 5.1 ; on note alors le volume d'acide versé (V1) ; on fait couler ensuite l'acide jusqu'au pH 3.5 et on note le volume d'acide total (V2)

FigureA4: Titration AGV



Calcul

Vs	=	Volume de l'échantillon (ml)
pHi	=	pH initial de l'échantillon après dilution
V1	=	Volume d'acide au pH 5,10 (ml)
V2	=	Volume d'acide au pH 3,50 (ml)
NA	=	Acide normalisé (N)
K1	=	Constante Thermodynamique des bicarbonates = $4,8 \cdot 10^{-7}$ M
K2	=	Constante Thermodynamique des Acides Gras Volatiles = $1,76 \cdot 10^{-5}$ M
H1	=	10^{-pHi}
H2	=	$10^{-5,10}$
H3	=	$10^{-3,50}$
		$C1 = \frac{V1 \times NA}{Vs} = H_2SO_4 \text{ quantité à pH } 5,10 \text{ en mEq}$
		$C2 = \frac{V2 \times NA}{Vs} = H_2SO_4 \text{ quantité à pH } 3,50 \text{ en mEq}$
A1	=	$(H2 - H1) / (K2 + H2)$
A2	=	$(H3 - H1) / (K2 + H3)$
B1	=	$(H2 - H1) / (K1 + H2)$
B2	=	$(H3 - H1) / (K1 + H3)$
AGV ionisés	=	$X1 = [C2B1 - C1B2] / [B1A2 - B2A1] \times 1\,000 \text{ en mEq/l}$
Total AGV	=	$X2 = X1 (H1 + K2) / K2 \text{ en mEq/l}$
Total AGV	=	$X2 \times 60 / 1\,000 \text{ en g/l équivalent acétate}$
Bicarbonates	=	$Y = [C1A2 - C2A1] / [B1A2 - B2A1] \times 1\,000 \text{ en mEq/l}$
Bicarbonates	=	$Y \times 50 / 1\,000 \text{ en g/l CaCO}_3 \text{ équivalent}$

Demande chimique en oxygène (DCO)

Matériel

- Appareil à DCO
- Tubes contenant les réactifs gamme 1500 ppm
- Solution étalon
- Pointes de pipettes 2 mL

Mode opératoire

Sécurité: Les tubes contiennent de l'acide sulfurique concentré et des sels de mercure. Il faut donc les manier avec précaution, car leur contenu est toxique et corrosif.

- Allumer le réacteur DCO et préchauffer à 150°C
- Préparer des tubes HACH contenant la solution de digestion pour DCO (gamme 0-1500 mg·L⁻¹) : un pour le blanc (eau), un pour la solution étalon (100 mg·L⁻¹) et un pour chacun des échantillons
- Tenir le tube légèrement incliné au-dessus d'un évier, dévisser le bouchon et pipeter 2 mL d'eau, de solution étalon ou d'échantillon
- Fermer hermétiquement le bouchon, puis retourner le tube plusieurs fois en le tenant par le bouchon. Attention: le tube devient très chaud lors du mélange Et il y a risque de surpression
- Placer les tubes dans le réacteur DCO, noter leur emplacement, puis laisser pendant au moins 1h30 à 150 °C

- A la fin du chauffage, retourner plusieurs fois chaque tube pendant qu'il est encore chaud, puis placer les tubes sur un portoir métallique
- Allumer le photomètre HACH DR-2000, puis entrer le numéro de programme pour la DCO et régler la longueur d'onde adéquate
- Pour calibrer l'appareil, placer le tube d'essai à blanc dans le photomètre, couvert avec le capuchon, puis appuyer sur la touche ZERO
- Placer successivement les différents tubes dans le photomètre comme précédemment, appuyer sur la touche READ/ENTER, puis lire le résultat qui s'affiche en mg DCO/L
- Eteindre le réacteur DCO.

Expression des résultats

DCO en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

ANNEXE VIII: CARACTÉRISATION DES INOCULA

1. Boues de STEP (IN1)

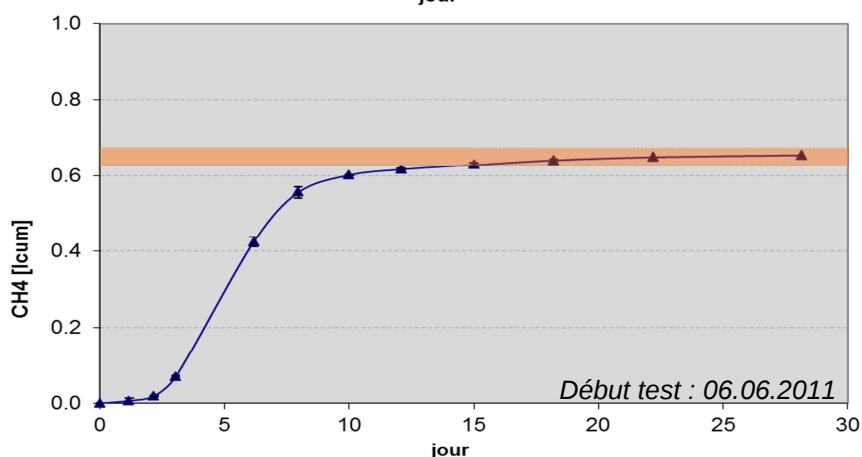
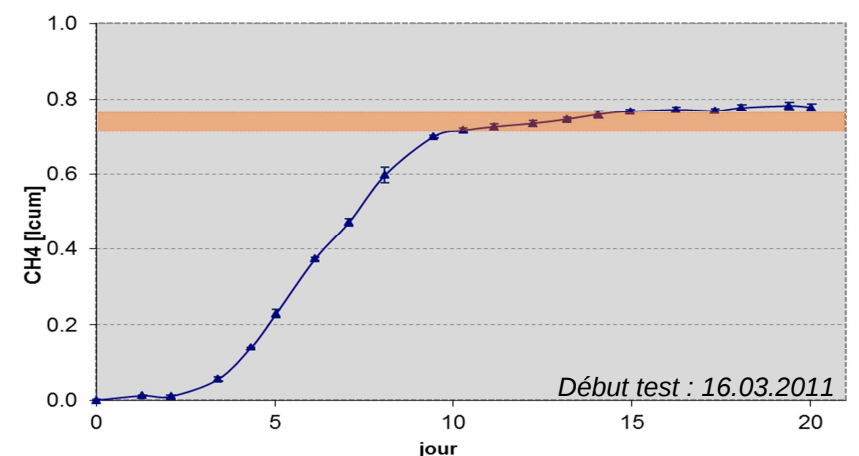
Provenance: L'inoculum provient des digesteurs de la STEP de Morges, fonctionnant à température mésophile. Les 2 réacteurs sont disposés en série. L'échantillon a été prélevé à la sortie du deuxième digesteur (conduite d'évacuation). La STEP traite principalement des eaux usées domestiques et il n'y a pas de cosubstrats ajoutés dans le digesteur.

Prétraitement : Les boues ont été utilisées sans prétraitement.

Caractéristiques: 09.11.2010 (Série 1) : 09.03.2011 (Série 2) :

MS :	3.5 %	MS :	3.4 %
MO :	54.6 % MS	MO :	55.8 % MS
pH :	7.5	pH :	7.4
AGV _{tot} :	640 mg/L	AGV _{tot} :	-
NH ₄ :	2090 mg/L	NH ₄ :	1710 mg/L

Validation : Test avec substrat de référence (cellulose). En orange est indiqué le domaine dans lequel on attend le résultat.



2. Boues de réacteurs UASB (IN2)

Des boues de deux réacteurs UASB différents ont été utilisées pour les séries 1 et 2 :

Série 1, IN2 :

Provenance : L'inoculum provient du réacteur UASB (BIOPAQ®-IC) de l'entreprise Emmi à Dagmersellen (LU) qui traite les effluents de fromagerie et de laiterie. Dans son volume de 160m³, une charge de 2'800 kg DCO /jour est traité en moyenne par digestion mésophile. L'échantillon a été prélevé à l'intérieur du réacteur, à une hauteur de 6m.

Prétraitement : Aucun prétraitement n'a été effectué.

Caractéristiques: Mesurées le 23.11.2010

MS :	5.7%	AGV _{tot} :	400 mg/L
MO :	77.5% MS	NH ₄ :	224 mg/L
pH :	7.43		

Validation : Cet inoculum était utilisé uniquement pour la série 1 où la cellulose était substrat de test. Un test avec substrat de référence n'était donc pas nécessaire.

Série 2, IN2' :

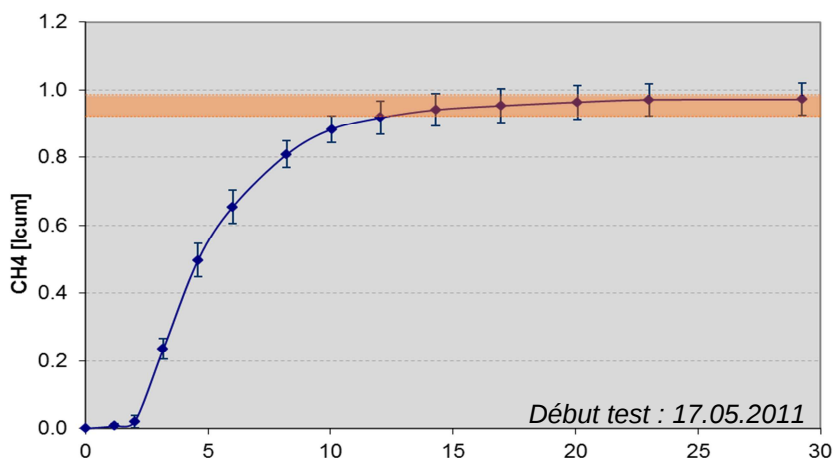
Provenance : L'inoculum provient du réacteur UASB (BIOPAQ®) de l'entreprise Aare-papier SA à Niedergösgen (SO) qui traite les effluents de cette industrie de fabrication de carton. Dans son volume de 280 m³, une charge de 3'300 kg DCO/jour est traité en moyenne par digestion anaérobie mésophile. L'échantillon a été prélevé à l'intérieur du réacteur, à une hauteur de 2m.

Prétraitement : Aucun prétraitement n'a été effectué.

Caractéristiques: Mesurées le 30.05.2011

MS :	3.1%	AGV _{tot} :	665 mg/L
MO :	78.9% MS	NH ₄ :	-
pH :	7.0		

Validation : Test avec substrat de référence (cellulose).

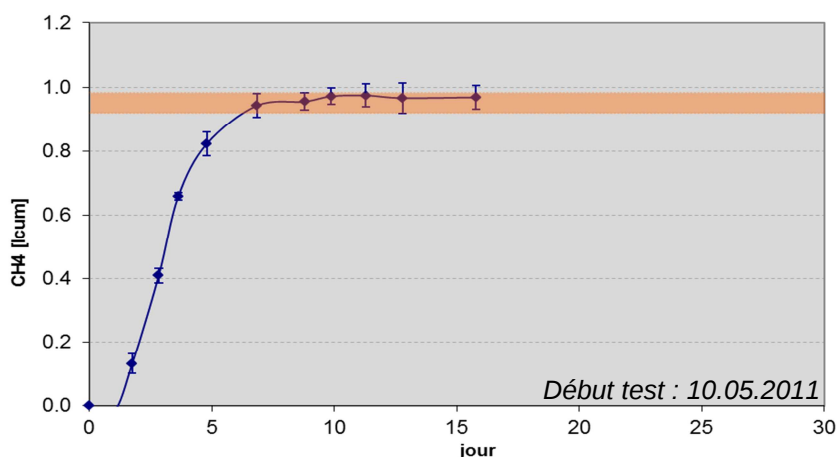


3. Boues agricoles (IN3)

Provenance:	L'inoculum provient de l'installation de biogaz de la ferme des Saugéalles, appartenant à la ville de Lausanne. Cette installation mésophile, d'un volume de 400 m ³ , traite environ 2'500 t d'effluents agricoles et 250 t de cosubstrats (gazons, lavures, huiles de friture) par année. L'échantillon a été prélevé de l'intérieur du digesteur.		
Prétraitement :	Les particules grossières (brins de paille et autres) ont été enlevées par tamisage à travers une maille de 5mm.		
Caractéristiques:	<i>Mesurées le 01.12.2010</i>		
	MS :	6 %	AGV _{tot} : -
	MO :	68.6 % MS	NH ₄ : -
	pH :	7.39	
Validation :	Cet inoculum était utilisé uniquement pour la série 1 où la cellulose était substrat de test. Un test avec substrat de référence n'était donc pas nécessaire (c.f. courbe de production de méthane pour cellulose en annexe X).		

3. Boues industrielles (IN4)

Provenance:	L'inoculum provient de l'installation de biogaz à Lavigny, fonctionnant en mode sèche thermophile (procédé Kompogas), avec un volume de 1000m ³ . L'échantillon a été prélevé à la sortie du digesteur, après la séparation de phase (fraction liquide).			
Prétraitement :	Dilution des boues avec de l'eau désoxygénée à 1 :1.			
Caractéristiques:	<i>19.01.2011 (Série 1) :</i>		<i>03.05.2011 (Série 2) :</i>	
	MS :	5.4 %	MS :	4.8 %
	(avant dilution 10.8 %)			
	MO :	62.6 % MS	MO :	51.7 % MS
	pH :	7.7	pH :	7.9
	AGV _{tot} :	1019 mg/L	AGV _{tot} :	1917 mg/L
	NH ₄ :	1790 mg/L	NH ₄ :	-
Validation :	Test avec substrat de référence (cellulose).			



ANNEXE IX: CARACTÉRISATION DES SUBSTRATS

1. Cellulose

Informations fabricant :	SIGMA, Cellulose alpha fiber	
Caractérisation :	Matière sèche	94.8 %
	Matière organique	99.2 % MS
	Demande chimique en oxygène	1.11 (± 0.04) kg /kg MS

2. Lait en poudre

Informations fabricant :	NESTLE, Nido - Instant full cream milk powder Protéines 257g/kg, lactose 376 g/kg, graisses 281 g/kg	
Caractérisation :	Matière sèche	96.7 %
	Matière organique	92.9 % MS
	Demande chimique en oxygène	1.52 (± 0.05) kg /kg MS

3. Farine de foin

Informations fabricant :	Promivi Kliba SA, transformation de céréales. Prélèvement de la farine directement après transformation, avant l'ajout de vitamines ou éléments de trace.	
Caractérisation :	Matière sèche	91.3 %
	Matière organique	91.4 % MS
	Demande chimique en oxygène	0.981 (± 0.10) kg /kg MS
	Granulométrie	voire figure A5

4. Farine de paille

Informations fabricant : Promivi Kliba SA, transformation de céréales.
Prélèvement de la farine directement après transformation, avant l'ajout de vitamines ou éléments de trace.

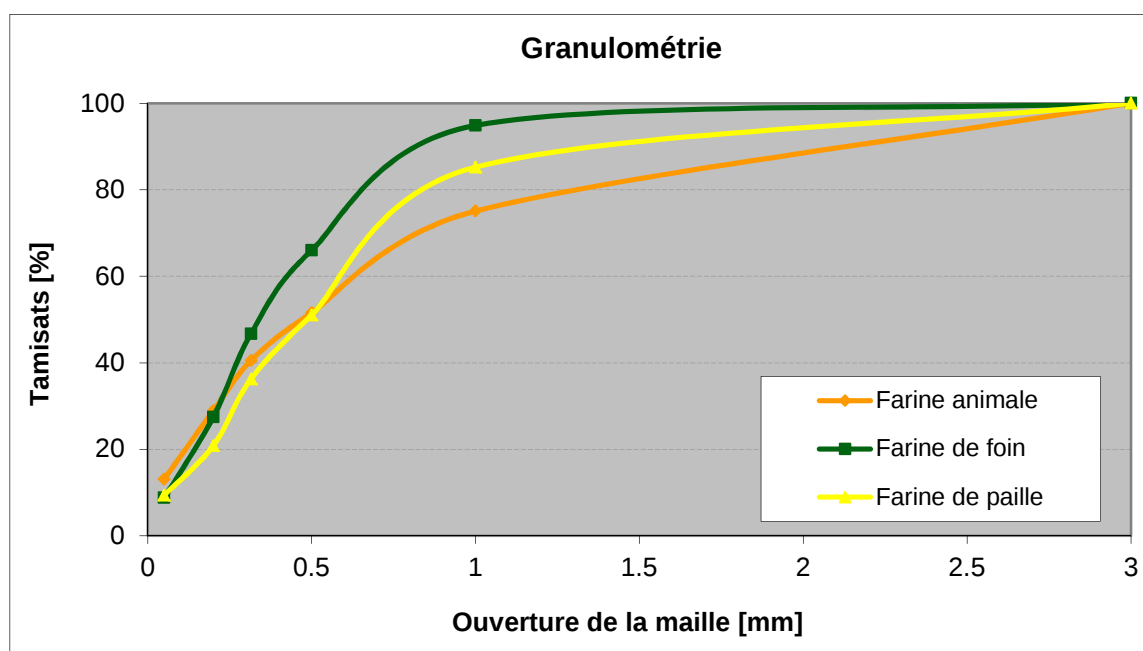
Caractérisation :	Matière sèche	89.7 %
	Matière organique	88.2 % MS
	Demande chimique en oxygène	0.947 (± 0.15) kg /kg MS
	Granulométrie	voire figure A5

5. Farine animale

Informations fabricant : TMF - Bazenheid

Caractérisation :	Matière sèche	94.7 %
	Matière organique	75.8 % MS
	Demande chimique en oxygène	1.001 (± 0.06) kg /kg MS
	Granulométrie	voire figure A5

Figure A5: Granulométrie des substrats de test



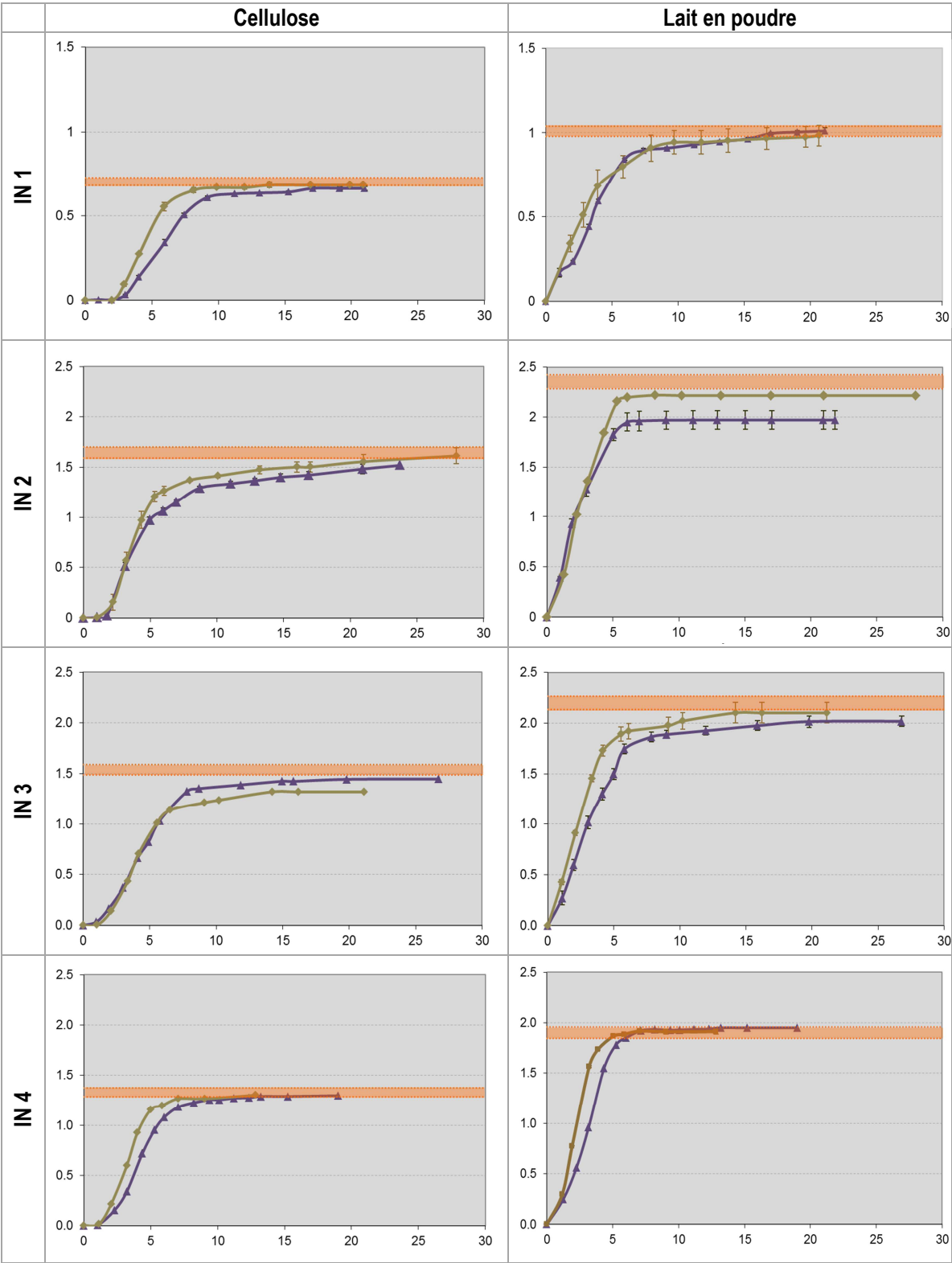
ANNEXE X: MATRICE EXPÉRIMENTALE

Série 1 : Substrats simples					
Inoculum	Substrat	Adaptation	Répliques	Début	Fin
STEP	Cellulose	Non	3 + 2 Blancs	09.11.2010	17.11.2010
	Cellulose	Oui	3 + 2 Blancs		
	Lait en poudre	Non	3		
	Lait en poudre	Oui	3 + 2 Blancs		
UASB	Cellulose	Non	3 + 2 Blancs	23.11.2010	04.01.2011
	Cellulose	Oui	3 + 2 Blancs		
	Lait en poudre	Non	3		
	Lait en poudre	Oui	3 + 2 Blancs		
Agricole	Cellulose	Non	2 + 2 Blancs	01.12.2010	04.01.2011
	Cellulose	Oui	2		
	Lait en poudre	Non	2		
	Lait en poudre	Oui	2		
Industriel	Cellulose	Non	2 + 2 Blancs	19.01.2011	14.02.2011
	Cellulose	Oui	2		
	Lait en poudre	Non	2		
	Lait en poudre	Oui	2		
Série 2 : Substrats complexes					
Inoculum	Substrat	Adaptation	Répliques	Début	Fin
STEP	REF (Cellulose)	Non	3 + 2 Blancs	09.03.2011 06.06.2011	13.05.2011
	Foin	Non	2		
	Foin	Oui	3		
	Farine animale	Non	3		
	Farine animale	Oui	3 + 2 Blancs		
	Paille	Non	3		
	Paille	Oui	3 + 2 Blancs		
	Luzerne	Non	3		
	Luzerne	Oui	3 + 2 Blancs		
UASB	REF (Cellulose)	Non	3 + 2 Blancs	17.05.2011	03.08.2011
	Foin	Non	3		
	Foin	Oui	3 + 2 Blancs		
	Farine animale	Non	3		
	Farine animale	Oui	3 + 2 Blancs		
	Paille	Non	3		
	Paille	Oui	3 + 2 Blancs		
Industriel	REF (Cellulose)	Non	3 + 2 Blancs	10.05.2011	07.07.2011
	Foin	Non	3		
	Foin	Oui	3 + 2 Blancs		
	Farine animale	Non	3		
	Farine animale	Oui	3 + 2 Blancs		
	Paille	Non	3		
	Paille	Oui	3 + 2 Blancs		

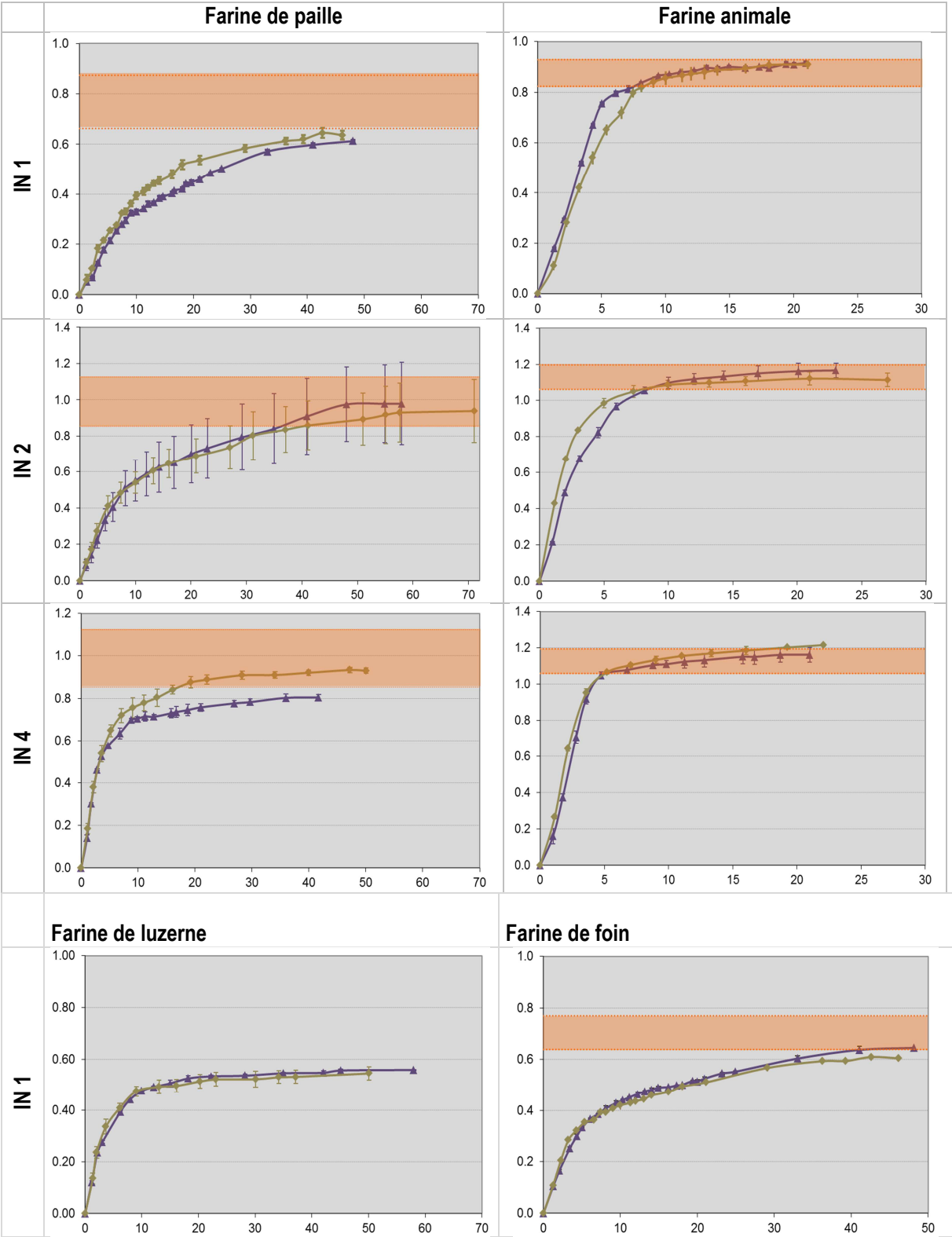
ANNEXE XI: COURBES DE PRODUCTION DE MÉTHANE

Note explicative :
Les surfaces orangées dans les diagrammes qui suivent correspondent aux fourchettes de production de méthane théorique, basé sur les mesures de DCO des substrats en supposant une biodégradabilité totale.

Série 1 : Substrats simples



Série 2 : Substrats complexes



ANNEXE XII: RÉPONSES EXPÉRIMENTALES

Inoculum	Substrat	Adaptation	R1, R2, R3	Moyenne
IN1 (STEP)	Cellulose	Non	366.45 365.50 379.18	370.4
		Oui	386.12 376.38 379.84	380.8
	Lait	Non	560.16 568.05 581.24	569.8
		Oui	530.25 588.14 528.14	548.8
	Paille	Non	325.55 322.11 320.47	322.7
		Oui	344.51 334.27 330.02	336.3
	Farine ani- male	Non	480.26 479.76 484.75	481.6
		Oui	468.07 483.58 483.27	478.3
	Foin	Non	336.50 342.96	339.7
		Oui	326.81 317.41 311.07	318.4
	Luzerne	Non	333.05 334.55 335.63	334.4
		Oui	312.38 323.78 342.55	326.2
IN2 (UASB)	Cellulose	Non	363.81 374.36 352.57	363.6
		Oui	405.91 383.18 368.80	386.0
	Lait	Non	446.12 486.04 481.73	471.3
		Oui	527.62 534.53 528.19	530.1
	Paille	Non	312.63 388.89 497.13	399.55
		Oui	302.00 434.33 412.89	383.07

	Farine ani- male	Non	461.79 494.14 472.06	476.00
		Oui	439.85 453.63 470.07	454.52
IN3 (AGRI)	Cellulose	Non	373.43 367.59	370.51
		Oui	339.34 336.53	337.94
	Lait	Non	507.38 526.14	516.76
		Oui	519.73 556.45	538.09
IN4 (IND)	Cellulose	Non	380.64 387.62	384.13
		Oui	384.64 386.81	385.72
	Lait	Non	577.43 577.20	577.31
		Oui	570.86 561.40	566.13
	Paille	Non	334.42 330.68 323.77	329.63
		Oui	332.30 328.06 332.57	330.98
	Farine ani- male	Non	522.31 527.64 509.16	519.70
		Oui	477.95 481.00 481.48	480.14

Contrôles positives

La réponse du contrôle positive est comparée à la valeur théorique de la production méthanogène: 373 NL CH₄/kg MSV.

Inoculum	[%] du résultat théorique	
IN1	99	Série 1 (SA)
	102	Série 1 (AA)
	110	Série 2 (REF)
	105	Série 2 (REF)
IN2	97	Série 1 (SA)
	103	Série 1 (AA)
	106	Série 2 (REF)
IN3	99	Série 1 (SA)
	91	Série 1 (AA)
IN4	103	Série 1 (SA)
	103	Série 1 (AA)
	106	Série 2 (REF)

ANNEXE XIII: SUIVI DES EXPÉRIENCES

Carnet de laboratoire :

ID test : _____ Adaptation 20%: _____ [g]

Substrat : _____ [g] 40%: _____ [g]

Date	Heure		Pression	Air / CH ₄ [%]	Remarques	Mesuré par
		R1				
		R2				
		R3				
		R1				
		R2				
		R3				
		R1				
		R2				
		R3				
		R1				
		R2				
		R3				

ANNEXE XIV: ANALYSE STATISTIQUE

Traitement statistique no.1 : Substrats facilement dégradables

Domain expérimental :

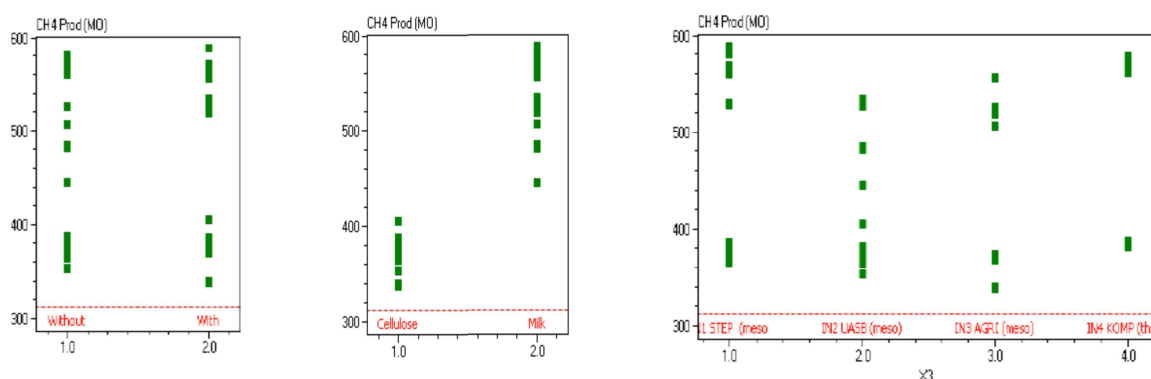
Facteur	Nombre de niveaux	Niveaux
Adaptation	2	sans - avec
Substrat	2	cellulose - lait en poudre
Origine	4	STEP – UASB – AGRICOLE - THERMO

Modèle utilisé :

$$Y = b_0 + b_1A * (X1A) + b_2A * (X2A) + b_3A * (X3A) + b_3B * (X3B) + b_3C * (X3C) + b_1A2A * (X1A*X2A) + b_1A3A * (X1A*X3A) + b_1A3B * (X1A*X3B) + b_1A3C * (X1A*X3C) + b_2A3A * (X2A*X3A) + b_2A3B * (X2A*X3B) + b_2A3C * (X2A*X3C)$$

Où: X1 - adaptation, X2 - substrat, X3 - origine de l'inoculum

Illustration des réponses sous différents angles :

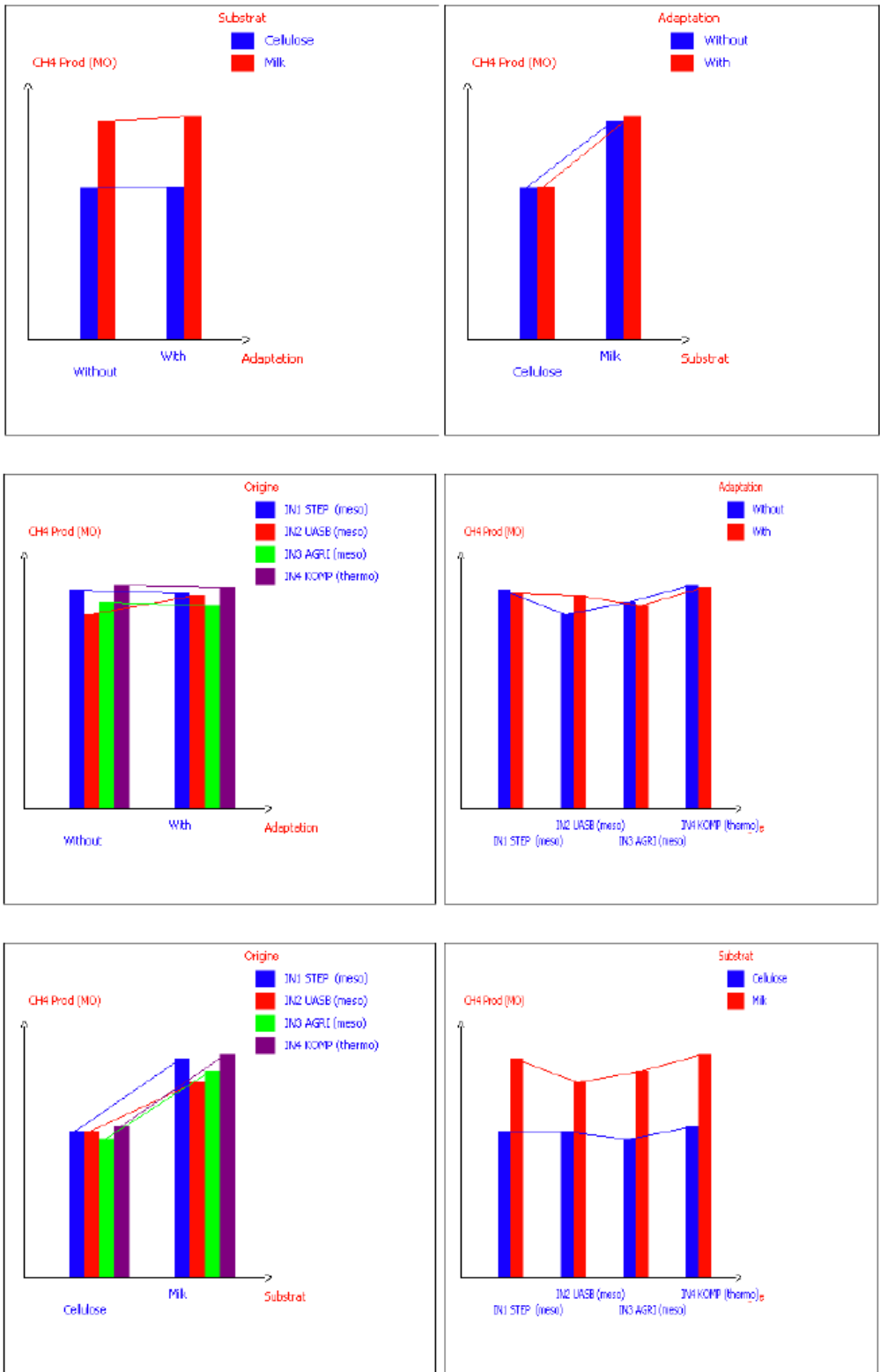


Analyse de la variance et des résidus :

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif
Régression	2.95450E+0005	12	2.46209E+0004	105.9575	< 0.01 ***
Résidus	8.61204E+0003	27	3.18965E+0002		
Validité	3.03527E+0003	3	1.01175E+0003	4.3542	1.39 *
Erreur	5.57677E+0003	24	2.32365E+0002		
Total	3.04062E+0005	39			

Ceci indique que le modèle est en mesure d'expliquer de façon significative (par rapport à la variance expérimentale de la mesure) la variabilité des réponses. Cette caractéristique autorise à pouvoir donner crédit aux coefficients calculés des effets. L'analyse des résidus confirme la bonne qualité de la régression du modèle sur les vecteurs de réponse.

Effets principaux et d'interactions :



Traitement statistique no.2 : Substrats complexes

Domain expérimental :

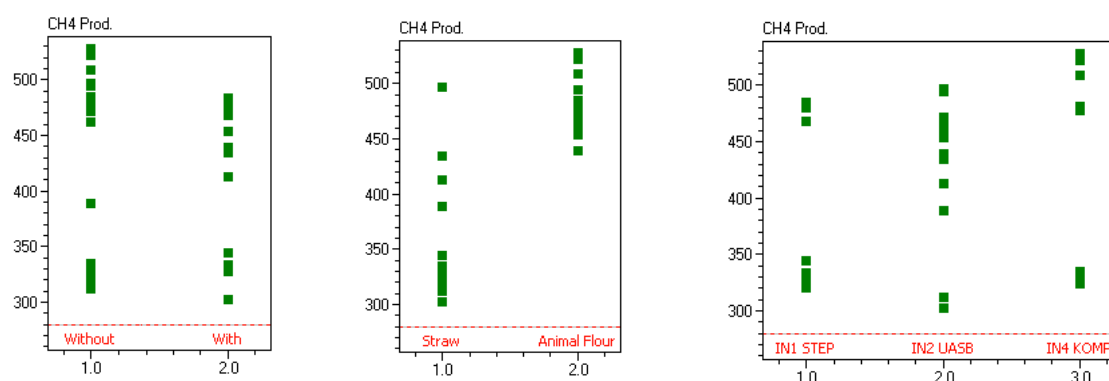
Facteur	Nombre de niveaux	Niveaux
Adaptation	2	sans - avec
Substrat	2	Farine de paille – Farine animale
Origine	3	STEP – UASB – THERMO

Modèle utilisé :

$$Y = b_0 + b_1A * (X1A) + b_2A * (X2A) + b_3A * (X3A) + b_3B * (X3B) + b_1A2A * (X1A*X2A) + b_1A3A * (X1A*X3A) + b_1A3B * (X1A*X3B) + b_2A3A * (X2A*X3A) + b_2A3B * (X2A*X3B)$$

Où: X1 - adaptation, X2 - substrat, X3 - origine de l'inoculum

Illustration des réponses sous différents angles :

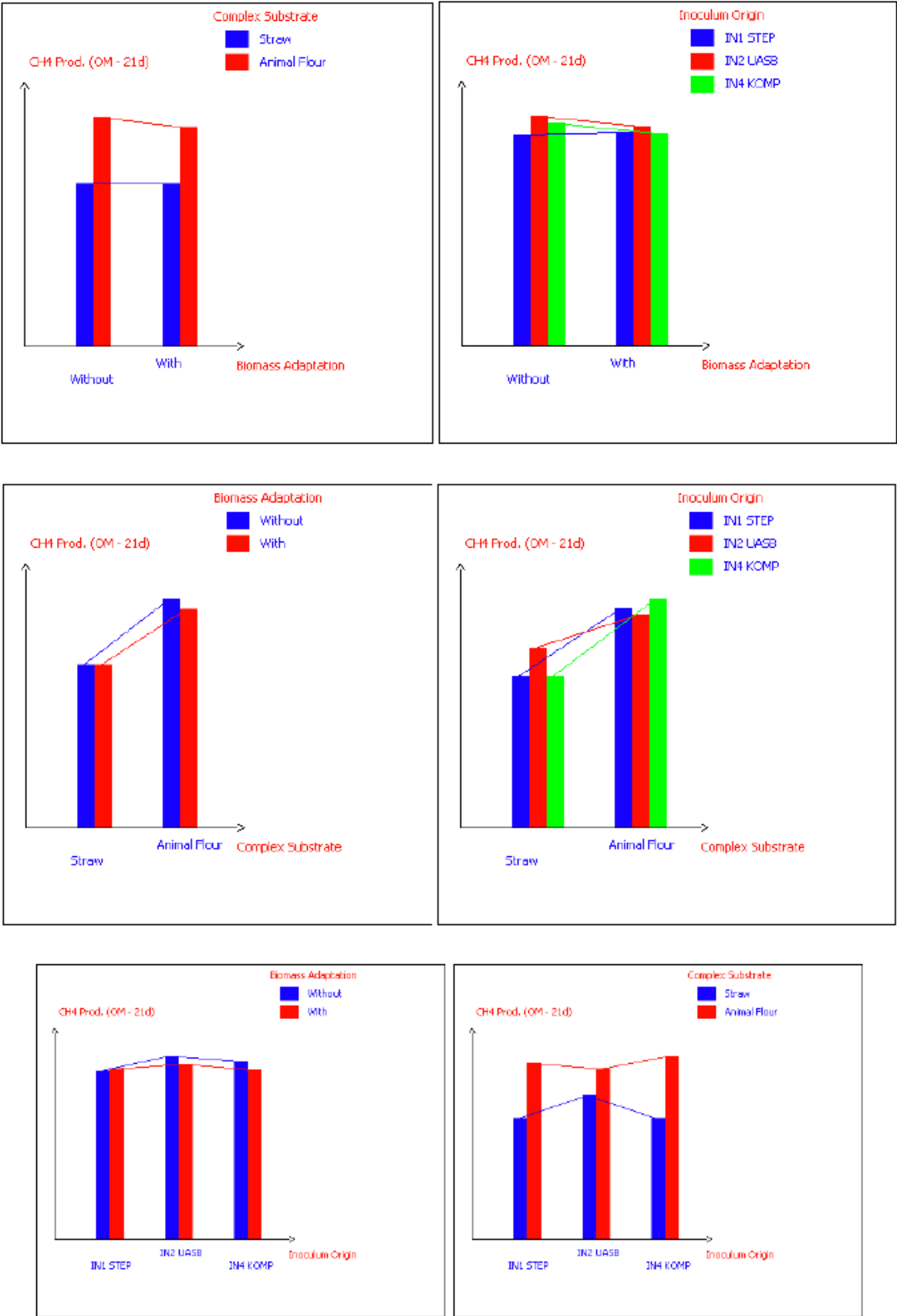


Analyse de la variance et des résidus :

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif
Régression	1.77221E+0005	9	1.96912E+0004	17.4481	< 0.01 ***
Résidus	2.93425E+0004	26	1.12856E+0003		
Validité	5.02290E+0002	2	2.51145E+0002	0.2090	81.3
Erreur	2.88403E+0004	24	1.20168E+0003		
Total	2.06564E+0005	35			

Ceci indique que le modèle est en mesure d'expliquer de façon significative (par rapport à la variance expérimentale de la mesure) la variabilité des réponses. Cette caractéristique autorise à pouvoir donner crédit aux coefficients calculés des effets. L'analyse des résidus confirme la bonne qualité de la régression du modèle sur les vecteurs de réponse.

Effets principaux et d'interactions :



Traitement statistique no.3 : Inoculum STEP

Domain expérimental :

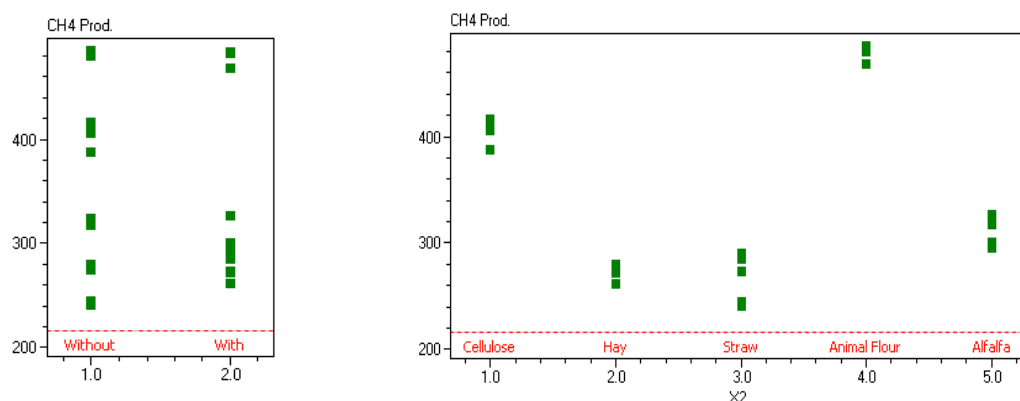
Facteur	Nombre de niveaux	Niveaux
Adaptation	2	sans – avec
Substrat	6	cellulose – lait – paille – foin – luzerne - farine animale
Origine	1	STEP

Modèle utilisé :

$$Y = b_0 + b_1A * (X1A) + b_2A * (X2A) + b_2B * (X2B) + b_2C * (X2C) + b_2D * (X2D)$$

Où: X1 - adaptation, X2 - substrat, X3 - origine de l'inoculum

Illustration des réponses sous différents angles :



Analyse de la variance et des résidus :

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif
Régression	1.98323E+00 05	5	3.96645E+00 04	630.2859	< 0.01 ***
Résidus	4.22285E+00 03	22	1.91948E+00 02		
Validité	3.15302E+00 03	5	6.30604E+00 02	10.0206	0.0133 ***
Erreur	1.06983E+00 03	17	6.29310E+00 01		
Total	2.02545E+00 05	27			

Traitement statistique no.4 : Substrat cellulose

Domain expérimental :

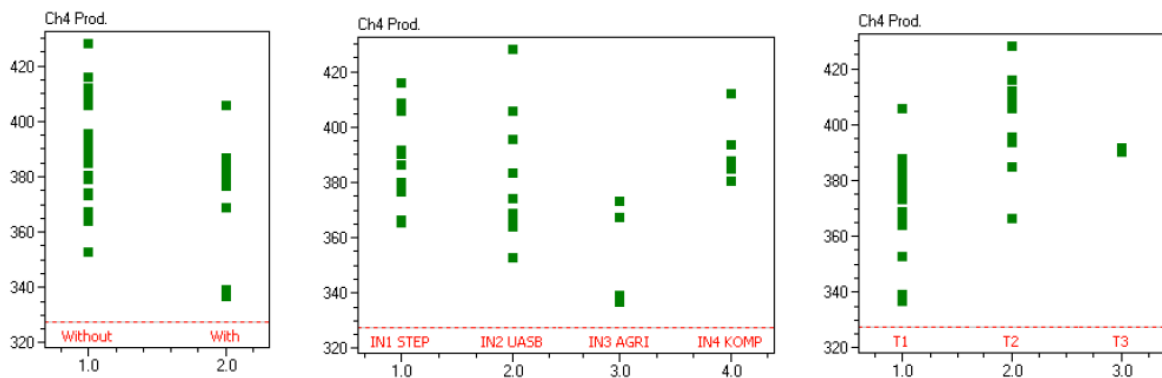
Facteur	No. de niveaux	Niveaux
Adaptation	2	sans – avec
Substrat	1	cellulose – lait – paille – foin – luzerne - farine animale
Origine	1	STEP – UASB – AGRICOLE - THERMO
Date/période	3	B1 – B2 – B3

Modèle utilisé :

$$Y = b_0 + b_{1A} * (X_{1A}) + b_{2A} * (X_{2A}) + b_{2B} * (X_{2B}) + b_{3A} * (X_{3A}) + b_{3B} * (X_{3B}) + b_{3C} * (X_{3C})$$

Où: X1 - adaptation, X2 - phase, X3 - origine de l'inoculum

Illustration des réponses sous différents angles :



Analyse de la variance et des résidus :

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif
Régression	7.09435E+00 03	6	1.18239E+00 03	4.8152	0.235 **
Résidus	5.89330E+00 03	24	2.45554E+00 02		
Validité	2.80173E+00 03	10	2.80173E+00 02	1.2687	33.2
Erreur	3.09157E+00 03	14	2.20827E+00 02		
Total	1.29876E+00 04	30			