



Rapport final

Etude inter-laboratoire internationale sur les tests « BMP »



© Source internet 2016



Date : 31 Janvier 2018

Lieu : Lausanne

Mandant :

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

Mandataires :

EPFL-Laboratoire de Biotechnologie environnementale
EPFL ENAC IIE LBE
1015 Lausanne
<http://lbe.epfl.ch/>

Auteurs :

Hélène Fruteau, Methaconsult, helene.fruteau@methaconsult.com
Christof Holliger, EPFL-LBE, christof.holliger@epfl.ch

Responsable de domaine de l'OFEN : Sandra Hermle, sandra.hermle@bfe.admin.ch

Chef de programme de l'OFEN : Sandra Hermle, sandra.hermle@bfe.admin.ch

Numéro du contrat de l'OFEN : SI/500736-02

Les auteurs sont seuls responsables du contenu et des conclusions de ce rapport.

Office fédéral de l'énergie OFEN

Mühlestrasse 4, 3063 Ittigen, Adresse postale : 3003 Berne
Tél. +41 58 462 56 11 · fax +41 58 463 25 00 · contact@bfe.admin.ch · www.ofen.admin.ch

Zusammenfassung

Sogenannte „Biomethane potential tests“ (BMP) werden verwendet, um die Gasproduktion einer zukünftigen Vergärungsanlage vorherzusagen oder um den ordnungsgemäßen Betrieb einer Anlage zu validieren. Frühere Ringversuche haben gezeigt, dass die Ergebnisse dieser BMP-Tests zwischen Laboratorien weit gestreut sind, was sehr problematisch für deren Anwendung ist. Die vorliegende Studie ist basiert auf einem 2016 in der Schweiz organisierten Workshop, der die meisten in diesem Bereich tätigen Labors auf internationaler Ebene zusammenführte, um auf eine Standardisierung von BMP-Tests hinzuarbeiten. Ziel war es, eine Ringlaborstudie mit der Methode und internen Validierungskriterien durchzuführen, die während des Workshops gemeinsam entwickelt wurden und einen großen Teil der vom VDI (Verein Deutscher Ingenieure) beschriebenen Methode einbeziehen. Dreiunddreißig Laboratorien aus 14 verschiedenen Ländern nahmen an dieser Studie freiwillig teil. Zwei Testreihen mit drei Substraten plus einer positiven Kontrolle (Cellulose) wurden durchgeführt. Die Methodik, die Substrate, die Positivkontrolle, die Minerallösungen und eine Standard-Ergebnisdatei wurden an jedes Labor geschickt. Die Ergebnisse wurden auf ihre Streuung und die Auswirkungen der internen Validierungskriterien analysiert. Die Standardabweichungen der Wiederholbarkeit und der laborinternen Reproduzierbarkeit waren ziemlich hoch (7 bis 10%) und die Standardabweichung der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit war für alle Substrate größer als 15%. Die Spannweite der Messungen, die es ermöglicht, die maximale Differenz zwischen zwei Analyseergebnissen von zwei willkürlichen Labors abzuschätzen, beträgt nahezu 100%. Die Anwendung von Validierungskriterien ermöglicht es, diese Spannweite auf signifikante Weise zu reduzieren, sie bleibt jedoch noch stehts zu hoch. Einige Labors haben Ergebnisse, die über die Kriterien der Kompetenzbewertung hinausgehen. Es scheint, dass eine verstärkte Standardisierung der Methode und eine Optimierung der Validierungskriterien benötigt wird. Der Einfluss des Inokulums könnte auch besser charakterisiert werden.

Résumé

Les tests de potentiel de production de méthane (tests BMP) sont utilisés pour prédire la production d'une future installation de digestion à partir d'un gisement donné, ou pour valider le bon fonctionnement d'une installation. De précédentes études inter-laboratoires ont montré que les résultats de ces tests sont très dispersés entre les laboratoires ce qui peut entraîner des erreurs très dommageables au niveau de leur application. La présente étude est née d'un Workshop organisé en Suisse en 2016 qui a réuni la plupart des laboratoires actifs dans ce domaine sur le plan international avec l'objectif d'aller vers une standardisation des tests BMP. Elle a pour but de réaliser une étude inter-laboratoire avec une méthode et des critères internes de validation élaborés en commun lors du Workshop, reprenant une grande partie de la méthode allemande décrite par la VDI (Verein Deutscher Ingenieure). Trente-trois laboratoires de 14 pays différents ont participé sur la base du volontariat à cette étude. Deux séries de tests ont été réalisés avec trois substrats plus un témoin positif (cellulose). La méthodologie, les substrats, le témoin positif, les solutions minérales et un fichier type de résultats ont été envoyé à chaque laboratoire. Les résultats ont été mis à niveau et analysés quant à leur dispersion et à l'impact des critères de validation internes. Il ressort que les écarts types de répétabilité et de reproductibilité intra-laboratoire sont assez élevés (7 à 10%) et que l'écart type de reproductibilité inter-laboratoires est supérieur à 15% pour l'ensemble des substrats. L'étendue des mesures, qui permet de quantifier l'écart maximal entre deux résultats d'analyse dans un laboratoire quelconque, est proche de 100% soit un résultat pouvant aller du simple au double. L'application de critères de validations permet de réduire cet écart de façon très importante, mais l'étendue reste trop élevée. Certains laboratoires ont des résultats au-delà des critères des évaluations de compétence. Il ressort qu'une standardisation plus importante de la méthode et une optimisation des critères de validation sont encore à faire. L'impact de l'inoculum pourrait être également mieux caractérisé.



Summary

Biomethane potential (BMP) tests are used to predict the production of a future anaerobic digestion plant from a given set of substrates, or to validate the proper operation of an AD plant. Previous inter-laboratory studies have shown that the results of these tests are widely dispersed between the laboratories, which can lead to very serious problems in their application. The present study is based on a workshop organized in Switzerland in 2016 which brought together most of the laboratories active in this field on the international level with the aim of moving towards a standardization of BMP tests. Its purpose was to carry out an inter-laboratory study with a method and internal validation criteria developed jointly during the workshop, taking into account a large part of the German method described by the VDI (Verein Deutscher Ingenieure). Thirty-three laboratories from 14 different countries participated on a voluntary basis in this study. Two series of tests were performed with three substrates plus a positive control (cellulose). The methodology, the substrates, the positive control, the mineral solutions and a standard result file were sent to each laboratory. The results have been analyzed for their dispersion and the impact of internal validation criteria. It appears that the standard deviations of repeatability and intra-laboratory reproducibility are quite high (7 to 10%) and that the standard deviation of the inter-laboratory reproducibility is greater than 15% for all the substrates. The range of the measurements, which makes it possible to quantify the maximum difference between two analysis results in any laboratory, is close to 100%. The application of validation criteria makes it possible to reduce this range considerably but it stays too high. Some laboratories have results beyond the criteria of competency assessments. It appears that a greater standardization of the method and an optimization of the validation criteria are still to be done. The impact of the inoculum could also be better characterized.

Annexes

Annexe 1 : Liste des laboratoires participants

Annexe 2 : Caractérisation analytique des substrats et du contrôle

Annexe 3 : Résultats unitaires des BMP pour les substrats

Annexe 4 : Z-Scores pour l'ensemble des substrats

Annexe 5 : Validation des critères pour la cellulose

Annexe 6 : Validation des critères pour le substrat A

Annexe 7 : Validation des critères pour le substrat B

Annexe 8 : Validation des critères pour le substrat C

Annexe 9 : Validation des critères par laboratoire

Annexe 10 : Ecarts entre les deux séries de mesures



Sommaire

Zusammenfassung	3
Résumé	3
Summary	4
Annexes	5
Sommaire	6
Liste des abréviations	8
1 Introduction	9
1.1 Rappel du contexte	9
1.2 Rappel du principe d'un test BMP	9
2 Etude bibliographique	10
2.1 Etude internationale de Raposo et al.	10
2.1.1 Protocole	10
2.1.2 Résultats	10
2.2 Etude de l'ADEME (FR)	11
2.2.1 Protocole	12
2.2.2 Résultats	12
2.3 L'étude du VDLUFA (DE)	13
2.3.1 Protocole	13
2.3.2 Résultats	14
2.4 Conclusions de ces trois études	15
3 Mise en place de l'étude de ce projet	16
3.1 Organisation	16
3.2 Les substrats	16
3.3 Le protocole	17
3.3.1 Inoculum	17
3.3.2 Substrats	17
3.3.3 Set-up	18
3.3.4 Présentation des résultats	18
3.4 Méthodes de calculs	18
4 Résultats	20
4.1 Mise à niveau des données	20
4.2 Etude statistique	20
4.2.1 Mesure de TS et VS	20
4.2.2 Résultats globaux des BMP	21
4.2.3 Biais de laboratoire	22
4.3 Examen des critères de validation originaux	23
4.3.1 Rappel des critères	23

4.3.2	Application sur le contrôle cellulose.....	24
4.3.3	Application sur le Substrat A.....	25
4.3.4	Application sur le Substrat B.....	25
4.3.5	Application sur le Substrat C.....	26
4.3.6	Discussion sur les critères originaux	27
4.4	Les critères de validations révisés	27
4.4.1	Synthèse des critères révisés	27
4.4.2	Application sur le contrôle cellulose.....	28
4.4.3	Application sur le Substrat A.....	28
4.4.4	Application sur le Substrat B.....	29
4.4.5	Application sur le Substrat C.....	30
4.4.6	Impact des critères originaux et révisés	31
4.5	Les critères de validation appliqués aux laboratoires.....	32
4.6	Ecart entre les deux séries	32
4.7	Application des recommandations	33
4.7.1	Les caractéristiques de l'inoculum.....	33
4.7.2	La production endogène	33
4.7.3	Les autres paramètres	34
4.7.4	Identification des problèmes	34
5	Discussion.....	35
6	Conclusions.....	36
7	Références.....	37



Liste des abréviations

BMP	Biochemical Methane Potential
AGV	Acides Gras Volatils
DCO	Demande Chimique en Oxygène
TS	Solides Totaux
VS	Solides Volatiles
ISR	Ratio Inoculum / Substrat
SD	Ecart Type (ou Variation Standard)
Step	Station d'épuration (des eaux urbaines)
ADEME	Agence de la Maîtrise de l'Energie (FR)
CV	Coefficient de Variation (Ecart type relatif ou Deviation standard relative)
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Unetsuchnugs-unf Forschungsanstalten (DE)

1 Introduction

1.1 Rappel du contexte

Le potentiel de production de méthane « BMP » (BioMethane Potential) est un test biologique utilisé pour déterminer la quantité de méthane qui peut être produite à partir d'un substrat organique. Il est utilisé notamment dans les situations suivantes :

- La production de méthane est la principale voire la seule recette des installations de méthanisation. Il est donc essentiel de pouvoir définir préalablement la production de méthane à partir d'un gisement donné afin d'établir la faisabilité économique d'un projet. De rentabilité souvent limitée un projet peut vite devenir non rentable avec déjà 15 % de recettes en moins.
- Les contrats des constructeurs d'installations incluent de plus en plus souvent au titre des garanties de performances des clauses de production observée égale à 85% à 95% du BMP des intrants.
- Certains déchets « très » méthanogènes deviennent payants : il est important pour un porteur de projet d'évaluer la recette potentielle par rapport au coût.

Ces utilisations suggèrent que l'on soit capable de déterminer un potentiel de production de méthane avec une bonne fiabilité et une bonne précision. Or de précédentes études inter-laboratoires ont montré que les résultats obtenus avec ces tests varient beaucoup entre différents laboratoires, sans que l'on ait pu identifier de façon indiscutable de paramètre responsable de cette variabilité.

Pour avancer vers une fiabilisation de ce test un workshop international a été organisé avec le soutien de l'OFEN à Leysin en Juin 2015 afin de réunir les laboratoires experts dans le domaine, dont la plupart avaient d'ailleurs déjà participé à des études inter-laboratoires.

Il n'y a pas aujourd'hui de norme utilisée internationalement pour mesurer un BMP et différentes méthodes sont utilisées par différents laboratoires. Ce workshop avait donc pour but de proposer un guideline afin d'avancer vers une standardisation de la méthode de détermination du BMP. Il s'en est suivi la rédaction d'un article « Towards a standardization of biomethane potential testst » publié dans Water Science and Technology (Holliger et al., 2016) et la mise en œuvre de ce guideline dans une étude inter-laboratoire réalisée par les participants au Workshop volontaires.

La mise en place et l'analyse de cette étude est l'objet du présent rapport.

1.2 Rappel du principe d'un test BMP

Il n'est pas inutile de rappeler les principes de base de ces tests.

Un substrat organique quelconque est ajouté à un inoculum contenant de la biomasse microbienne anaérobie, cet inoculum provenant d'un digesteur en fonctionnement.

Inoculum et substrat sont incubés dans des conditions à priori optimales pour la dégradation : on mesure la production de méthane jusqu'à ce que celle-ci devienne négligeable. Comme l'inoculum contient toujours de la matière organique résiduelle produisant aussi du méthane, on incube également l'inoculum seul (aussi appelé « blanc » ou « témoin ») et on retranche sa production.

Le résultat est exprimé en litres de méthane (conditions standard) par g de matière organique du substrat. La matière organique du substrat est en général mesurée en matière sèche volatile (VS) pour les substrats solides et demande chimique en oxygène (DCO) pour les liquides.



De nombreuses études ont tenté de mettre en évidence les différents paramètres susceptibles d'impacter les résultats des tests BMP. Citons :

- L'origine de l'inoculum, c'est à dire du digesteur dont il est extrait
- Le ratio inoculum/substrat
- La préparation du substrat (broyage, séchage, ...)
- La conditions opératoires (pH, nutriments, température, pression, agitation, ..)
- La méthode de mesure du méthane

Il est intéressant de noter que des résultats contradictoires ont été obtenus pour chacun de ces paramètres. Cependant les conditions des études sont également chaque fois différentes, rendant difficiles les comparaisons.

2 Etude bibliographique

Pour ce projet on s'est attaché à examiner en détail les études inter-laboratoires similaires afin de les prendre en compte au mieux dans l'analyse.

2.1 Etude internationale de Raposo et al.

En 2010 une étude inter-laboratoire organisée avec le support du Spanish National Research Council portant sur la comparaison des résultats de tests BMP sur des substrats solides homogènes, obtenus par 20 laboratoires européens, fut communiquée par F. Raposo au cours du 12ème ISAD.

2.1.1 Protocole

Quatre substrats avaient été envoyés aux laboratoires participants :

- la cellulose
- l'amidon, la gélatine,
- deux échantillons identiques de haricot mungo.

Les conditions d'expérience étaient laissées à l'appréciation des différents laboratoires, tous impliqués dans des activités de recherche ou des prestations d'analyses incluant ces tests.

Seuls deux paramètres étaient imposés :

- la mise en œuvre de triplicats
- un ratio Inoculum/Substrat (ISR, exprimé en VS) fixé à
 - ISR=2 pour l'amidon et la cellulose
 - ISR=3 pour la gélatine (pour tenir compte de l'inhibition potentielle de l'ammoniac)
 - ISR = 1 et 2 pour le haricot mungo

2.1.2 Résultats

Les outliers ont été définis comme les résultats <70% et > 100% du BMP théorique calculé à partir de la composition élémentaire des composés.

A noter que la valeur « théorique » n'est logiquement pas atteignable puisqu'une partie du substrat, même faible, est consommée pour la synthèse de la biomasse microbienne.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 1.

	Amidon	Cellulose	Gélatine	Mungo 2	Mungo 1
BMP théo	414	414	433	434	434
Toutes valeurs					
Moyenne	320	340	300	340	330
Mini - maxi	126 - 417	175 - 412	124 - 480	189 - 447	170 - 437
Etendue (relative)	291 (90%)	237 (70%)	356 (119%)	258 (76%)	267 (81%)
SD (CV)	77 (24%)	52 (15%)	110 (37%)	63 (18%)	78 (24%)
Nb outliers	4 / 17	3 / 17	9 / 17	5 / 17	
Hors outliers					
Mini - maxi	293 - 417	303 - 412	310 - 433	322 - 447	330 - 437
Moyenne	350	350	380	370	370
Etendue	124 (35%)	109 (31%)	123 (32%)	125 (34%)	107 (29%)
CV	33 (9%)	29 (8%)	42 (11%)	36 (10%)	35 (9%)

Tableau 1: Dispersion des résultats BMP dans l'étude Raposo et al

Il est conclu de ces résultats que la moyenne hors outliers est proche des résultats attendus, et que l'écart type de reproductibilité (hors outliers) est modérée aux alentours de 10%.

On remarquera cependant plusieurs points :

- L'utilisation de composition élémentaire pour le calcul d'une production théorique n'est possible que si le substrat est complètement biodégradable
- L'écart d'outliers sur la base d'une production insuffisante n'est justifié que pour un témoin positif ou le calcul de la moyenne : elle ne peut être appliquée en conditions réelles quand une mesure est réalisée par un laboratoire
- La gélatine présente la plus grande dispersion de résultats et la moitié est considérée comme outliers. On peut conclure que la gélatine pose un problème spécifique et on peut de là s'interroger sur la validité du test avec un substrat protéique.
- Bien que l'écart type de reproductibilité varie de 15% à 37% l'étendue relative des mesures varie quant à elle de 70% à 120% de la moyenne

L'analyse des résultats de cette étude, 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 sur les résultats. On notera cependant quelques résultats importants :

- Aucune différence significative n'a été trouvée entre les inocula provenant de Step et les autres
- Aucune différence significative n'a été trouvée entre les tests réalisés en thermophile et en mésophile

2.2 Etude de l'ADEME (FR)

Une autre étude inter-laboratoire a été réalisé en 2012-2014 en France avec le soutien de l'Agence de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), pilotée par les laboratoires de l'ITE-Narbonne et INSA-Toulouse. Elle a concerné 11 laboratoires français et avait pour but l'analyse statistique des résultats et l'identification des facteurs de variabilité. Ici on présente un résumé d'un rapport interne.



2.2.1 Protocole

Quatre substrats ont été envoyés aux laboratoires participants:

- Un mélange protéines-amidon-fibres envoyé brut
- Le même mélange mais séché et broyé (< 0.5 mm)
- La paille
- La mayonnaise

Deux campagnes avec des protocoles différents sont réalisées. Le nombre de réplicats est fixé à 3. Chaque campagne comprend 2 séries de tests réalisées successivement, soit 6 mesures par substrat

Dans la 1^{ère} campagne expérimentale chaque laboratoire a utilisé son propre protocole.

Dans la 2^{ème} campagne un protocole partiellement harmonisé a été défini et appliqué par l'ensemble des laboratoires :

- Addition d'une solution nutritive et d'une solution tampon carbonate
- Réalisation d'un témoin pour le contrôle de l'activité méthanogène : acétate de sodium
- Ratio Inoculum/Substrat IRS = 2
- Toutes les mesures en triplicats
- Arrêt des mesures quand l'augmentation du potentiel méthanogène n'excède pas 1%

Quatre critères de validation ont de plus été introduits dans la 2^{ème} campagne :

- Coefficient de variation de la répétabilité pour les 3 mesures < 10%
- pH en fin d'essai > 6.5
- activité endogène (inoculum seul) < 1/3 de la production de méthane des essais
- activité méthanogène (acétate de Na) comprise entre 90 et 100% de la valeur théorique

Les outliers sont considérés mesure par mesure (c'est-à-dire 1 bouteille) et sont retirés après discussion avec le laboratoire si et seulement si une raison objective permet de les écarter.

- Si CV < 10% avec 2 mesures proches (CV sur 2 mesures < 10%) : on élimine 1 seule mesure
- Si CV < 10% avec 3 mesures dispersées : on élimine les 3 mesures
- On élimine 1 mesure ou 1 série de mesures si justification technique (par exemple fuite)

2.2.2 Résultats

L'étude statistique est basée sur les normes ISO 13528 et ISO 5725-1

Les résultats statistiques, après retranchement des outliers sont représentés dans les tableaux 2 et 3.

	Mélange brut	Mélange sec broyé	Paille
Nb valeurs	50	68	59
Outliers	4	0	8
Moyenne	425	403	267
Mini-maxi	289 - 629	250 - 481	175 - 370
Etendue (relative)	340 (80%)	231 (57%)	195 (73%)
Répétabilité intra-laboratoire	7%	4%	6%
Reproductibilité intra-laboratoire	9%	6%	8%
Reproductibilité inter-laboratoire	20%	17%	20%

Tableau 2 : Dispersion des résultats dans l'étude ADEME – 1^{ère} campagne sans protocole fixé

	Mélange sec broyé	Paille	Mayonnaise
Nb valeurs	69	53	56
Outliers	6	16	13
Moyenne (NI/g VS)	405	277	848
Mini – maxi (NI/g VS)	260 - 525	195 - 370	660 - 1026
Etendue relative	265 (65%)	175 (63%)	366 (43%)
Répétabilité intra-laboratoire	4%	4%	4%
Reproductibilité intra-laboratoire	5%	7%	5%
Reproductibilité inter-laboratoire	19%	21%	13%

Tableau 3 : Dispersion des résultats dans l'étude ADEME – 2^{ème} campagne avec protocole partiellement harmonisé

Les mesures dans un même laboratoire sont répétables et assez reproductibles. Un nombre important d'outliers a été identifié pour la paille et la mayonnaise : variabilité importante (selon critères définis), valeur très faible ou très élevée. Le témoin positif (acétate de Na) est abandonné car les résultats ne sont pas exploitables. La reproductibilité inter-laboratoire n'est pas améliorée par l'emploi d'un protocole en partie harmonisé.

L'étude des facteurs de variabilité montre que :

- Dans la 1^{ère} campagne : seule l'addition de solution nutritive avait un effet significatif sur les 3 substrats
- A noter qu'il n'y a pas d'impact significatif du séchage et broyage à 5 mm sur les résultats.
- Dans la 2^{ème} campagne le mode de mesure du méthane a un impact significatif : les valeurs sont environ 15% inférieures avec la mesure automatique AMPTS qu'avec les mesures manuelles

2.3 L'étude du VDLUFA (DE)

Depuis plusieurs années la VDLUFA réalise en Allemagne une étude inter-laboratoire sur les paramètres utilisés pour la caractérisation des substrats en digestion. Les paramètres étudiés sont : la teneur en matière sèche (TS), la teneur en matière organique volatile (VS), la productivité en biogaz, la teneur en CH₄ et la productivité en méthane (BMP).

L'étude rapportée ici est celle réalisée en 2015 mais il n'y a pas de différence fondamentale avec celle de 2014. Elle a concerné 25 laboratoires. Ici on présente un résumé d'un rapport interne.

2.3.1 Protocole

Quatre échantillons sont testés :

- Cellulose
- maïs ensilage
- son de blé
- digestat à 20°C et 37°C

Inoculum :

- 1 à 3% de TVS
- Au moins 50% de TS/VS
- AGV < 500 mg/l en HAc



- Préincubation de l'inoculum pour diminuer sa production de méthane de façon qu'elle soit < 20% de la production globale au cours du test

Témoin positif : Cellulose microcristalline

Substrat :

- Doit être < 10mm, sinon broyer
- Mesure de TS à 105° et VS à 550 °C, correction si présence de composés organiques volatils acides organiques et alcools (abaque pour la correction de TS et VS)

Procédure

- Les mesures sont faites en triplicat
- ISR ≥ 2 en VS (ou ISR ≥ 1 si peu de composés rapidement dégradables)
- Purge avec un gaz inerte (azote ou argon)
- Température 37 °C ± 2 °C
- Mesure de pH finale pour s'assurer qu'il n'y a pas d'acidification
- Agitation : au moins une fois/jour

Durée du test : le plus contraignant de ces 2 conditions :

- Minimum 25 jours
- Production de biogaz < 0.5% de la production globale pendant au moins 3 jours consécutifs

Critères de validation

- BMP de la cellulose comprise entre 90% et 110% de la valeur de référence de 745 NI gaz/kg TVS, soit 372.5 NI méthane pour 50% CH₄ dans biogaz → cellulose comprise entre **335 et 410 NI CH₄ /kg TVS**

2.3.2 Résultats

Seuls les résultats sur la productivité en méthane (BMP) sur les substrats organiques sont reportés dans le tableau 4.

.	cellulose	maïs	Son blé
P laboratoires	26	27	26
P1 labo valides	20	23	22
N résultats unitaires	85	90	87
N1 résultats valides	66	77	74
Moyenne	368	353	360
Tolérance (moy $\pm 2 S_R$)	318 – 417	265 - 440	286 - 435
CV répétabilité	3.01 %	4.11%	3.92%
CV reproductibilité	6.76 %	12.4%	10.33%
Toutes valeurs			
Mini-maxi (sur moy)	243 - 406	249 – 427	281 – 425
Etendue (relative)	163 (44%)	178 (50%)	144 (40%)
Hors outliers			
Mini-maxi	331 - 406	249 – 427	292 - 425
Etendue (relative)	75 (20%)	178 (50%)	133 (37%)

Tableau 4 : Dispersion des résultats dans l'étude VDLUFA 2015

Sur la cellulose 6 laboratoires /25 ont été écartés comme outliers: 4 ne satisfont pas au critère de production minimale pour le biogaz, et 2 ont des BMP trop basses / autres laboratoires.

Sur le maïs les 4 laboratoires : les 4 qui ne satisfont pas au critère biogaz sur la cellulose ont été écartés

Sur le son de blé : les 4 qui ne satisfont pas au critère biogaz sur la cellulose ont été écartés

Les coefficients de répétabilité et reproductibilité sont globalement assez bons mais l'étendue des mesures reste importante.

2.4 Conclusions de ces trois études

La première étude a été réalisée avec les méthodes propres des laboratoires et sans appliquer de critère de validation. L'étendue des résultats est très importante. La répétabilité et la reproductibilité n'ont pas été calculées. Le substrat protéique semble poser problème avec un laboratoire sur 2 identifié comme outlier.

La deuxième étude a montré que la répétabilité intra-laboratoire (entre 3 réplicats) et la reproductibilité intra-laboratoire (entre 2 séries de mesure) est satisfaisante avec un écart type relatif < 7%, sauf pour le mélange non homogène où il est de 9%. Par contre la reproductibilité inter-laboratoire est insuffisante avec des écarts types de l'ordre de 20% et une étendue relative des mesures de 43 à 80%. Une homogénéisation partielle des méthodes ne suffit pas à améliorer la reproductibilité. L'impact de la méthode de mesure du méthane dans la 2^{nde} campagne est à prendre avec prudence, compte tenu du petit nombre de laboratoires.

L'étude allemande utilise un protocole défini plus précisément (qualité de l'inoculum, durée du test) mais surtout un témoin positif : la cellulose. La répétabilité est bonne (< 5%) et la reproductibilité est meilleure que pour l'étude précédente (< 12.5%). L'étendue des mesures, quoique plus resserrée est encore importante (40-50% sans retranchement d'outliers)

Cependant ces résultats, s'ils décrivent la dispersion des résultats pour un ensemble de laboratoires participants, ne permettent pas d'atteindre le but recherché dans la présente étude, à savoir fiabiliser le résultat d'une mesure réalisée dans un laboratoire quelconque.

La prise en compte d'outliers sur la base d'une différence à la valeur de référence est également un aspect qui ne peut pas être considéré lors de la validation d'un résultat de mesure dans un seul laboratoire.

Le présent projet se propose donc d'harmoniser le plus possible les méthodes mais également de déterminer l'impact de critères de validations internes.



3 Mise en place de l'étude de ce projet

3.1 Organisation

Trente-trois laboratoires se sont portés volontaires pour cette étude. La liste figure en annexe 1.

Deux séries de tests successives sont réalisées à un intervalle de 1 – 2 mois, avec la même méthode. Trois laboratoires n'ont pas participé à la deuxième série.

Les substrats à tester ainsi que le témoin positif, une solution d'éléments traces et une solution de vitamines ont été envoyés à chaque laboratoire participant, ainsi qu'un fichier de résultats type.

Mise en place de la 1^{ère} série de tests

La procédure, le fichier type, les échantillons de substrats et de produits complémentaires ont été envoyés aux 33 laboratoires volontaires mi-Octobre 2016.

En Avril 2017 l'ensemble des laboratoires partenaires avaient transmis leurs résultats pour le test 1.

Mise en place de la 2^{ème} série de tests

Une deuxième série de tests a été lancée en Janvier 2017.

En Juillet 2017 l'ensemble des laboratoires avaient transmis leurs résultats pour le test 2. Toutefois une relance a dû être réalisée pour valider l'expression des résultats et les résultats finaux n'ont été disponibles qu'en novembre 2017.

3.2 Les substrats

Ils ont été choisis sur la base des critères suivants :

- stabilité pour permettre les envois longue distance : donc secs de préférence
- Homogénéité : produits déjà broyés de préférence < 1 mm
- composition variée

Nous avons rencontré la société CARGILL qui fabrique et commercialise des aliments pour animaux. Parmi les différents produits proposés à la vente nous en avons retenu trois qui satisfont aux critères définis.

Ces 3 produits ont fait l'objet d'une analyse élémentaire afin de déterminer leur production théorique selon la formule de Buswell.



Substrat A

Substrat C

Substrat B

a. *Substrat A = aliments pour porcs*

Il contient : blé 30%, Triticale 19%, orge 15%, pois protéagineux 8%, Son granulé 6.7%, tourteaux de colza 5%, tourteaux de soja 4.9%, graisse 1.2% et le solde en minéraux, acides aminés, oligoéléments

- Formule élémentaire : C₁₇H₃₁O₁₃N
- Production théorique de méthane : 428 mL CH₄/g VS

b. *Substrat B = Farine fourragère*

Elle contient 44 % de cellulose, 37.8% d'amidon et 15% de matières azotées totales.

- Formule élémentaire : $C_{23}H_{38}O_{16}N$
- Production théorique de méthane : 454 mL CH₄/g VS

c. *Substrat C = aliment complet pour bovin (Probos)*

Il s'agit d'un mélange à forte teneur en protéines et en lipides contenant : 19% d'huile de foie de morue, 14% tourteaux de tournesol, 12% tourteaux de colza, 12% tourteaux de soja, 10% tourteaux de lin, 4% de Ca₂PO₄, 3% germe de blé, 2.8% NaCl, 2% avoine, 1% levure de bière, le reste farine fourragère et son ?

- Formule élémentaire : $C_{18}H_{32}O_8N$
- Production théorique de méthane : 608 mL CH₄/g VS

3.3 Le protocole

Le protocole est basé sur l'article « Towards a standardization of biomethane potential tests » rédigé à l'issue du Workshop de Leysin. On rappelle ici les principaux points ainsi que les paramètres imposés et les recommandations complémentaires pour cette étude.

3.3.1 Inoculum

C'est un aspect essentiel du test : il est important que l'inoculum contienne une biomasse active et diversifiée.

- L'inoculum provient d'un digesteur en conditions d'équilibre, alimenté avec un substrat complexe de façon à contenir une large diversité de biomasse : de préférence des boues d'épuration urbaines ou une co-digestion agricole.
- L'inoculum devrait subir le moins de manipulations possibles mais être cependant homogène (particules < 5 mm).
- L'analyse de TS et VS est obligatoire. La teneur en VS doit être ajustée entre 15 et 40 g/l
- Il est recommandé que le digesteur dont est issu l'inoculum présente les caractéristiques suivantes :
 - pH entre 7.0 et 8.5
 - AGV < 1 g/l HAc
 - NH₄ < 2.5 g/l N-NH₄
 - Alcalinité > 3 g/l CaCO₃
- Le stockage de l'inoculum devrait être de 2 à 5 jours à température ambiante ou température du test avant utilisation
- l'inoculum doit avoir une production endogène ≤ 20% de la production globale (inoculum+substrat)

3.3.2 Substrats

- Les 3 substrats et la cellulose comme contrôle positif sont envoyés à tous les laboratoires
- L'analyse de TS et VS est obligatoire, l'analyse de DCO est optionnelle
- Les substrats peuvent être stockés à 4-15°C dans le noir et à un endroit sec



3.3.3 Set-up

- Tous les essais doivent être réalisés en triplicats
- Les volumes réactionnels doivent être suffisants pour travailler avec au moins 2 g de substrat
- La solution nutritive est fournie et utilisée à raison de 1ml/l. Si l'alcalinité est < 3 g/l CaCO₃ du bicarbonate de sodium doit être ajouté pour atteindre cette concentration
- Le gaz de purge utilisé est de préférence un mélange N₂/CO₂ (20-40% CO₂)
- La concentration totale en VS devrait être de 20 – 60 g/l
- Le ratio inoculum / substrat (ISR) doit être obligatoirement 2 pour les substrats A et B et 4 pour le substrat C
- La température d'incubation doit être de 37°C ± 2°C. Une agitation est obligatoire, au minimum manuelle 1 fois/jour
- Mesure de la production de méthane
Pas de restriction sur la méthode
Si la gaz doit être analysé, il le sera à chaque relevé
A chaque mesure la pression et la température ambiante doivent être relevées
Si un AMPTS II est utilisé, inactiver l'option « eliminate overestimation», remplir les bouteilles à 450 ml et purger avec un mélange N₂/CO₂
- Durée : le test est terminé quand la production de méthane journalière est < 1% de la production cumulée (substrat – blanc) durant 3 jours consécutifs

3.3.4 Présentation des résultats

- Le volume de méthane doit être exprimé en méthane sec dans les conditions standards
- Fournir la production de chaque bouteille, sans retrancher de blanc ou ramener à une quantité de VS

3.4 Méthodes de calculs

- Production nette de méthane par bouteille = (production brute de la bouteille) – (moyenne de la production des 3 réplicats du blanc)
La production de méthane des blancs est recalculée pour chaque bouteille en fonction de la quantité d'inoculum rajoutée par bouteille
 - BMP par bouteille = production nette de méthane / masse VS du substrat
 - Moyenne des BMP des 3 réplicats pour un test et un substrat
 - Ecart type des BMP est calculé comme suit :

$$SD_{BMP} = \sqrt{SD_{blanc}^2 + SD_{substrat/control}^2} \quad \text{avec}$$

- (1) SD_{blanc}^2 = Variance de la production de méthane brute des blancs (corrigée le cas échéant par la quantité de VS des blancs)
- (2) $SD_{substrat/control}^2$ = Variance de la production de méthane brute des substrats (corrigée le cas échéant par la quantité de VS des substrats)

Pour la suite des calculs statistiques on notera :

- BMP d'1 bouteille = x_i
 - Nombre de réplicats = n (=3)
 - 1 cellule = les 3 résultats des réplicats
 - moyenne des BMP d'une cellule = \bar{x}
 - écart type des BMP d'une cellule = s
 - nombre de laboratoires = p
- Estimation de la moyenne des BMP d'une cellule

$$\bar{x} = \sum_1^n x/n$$

- Estimation de l'écart type des BMP d'une cellule

$$s = \sqrt{\sum_1^n (x - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

- Estimation de l'écart type de répétabilité s_r

Il s'agit de l'écart entre les 3 réplicats d'un même test. Dans cette étude toutes les cellules ont le même nombre de réplicats, ce qui simplifie les calculs.

Dans le cas de cette étude où 2 séries ont été réalisées successivement, on a considéré pour l'écart type de répétabilité intra-laboratoire l'ensemble des résultats des p laboratoires pour les 2 séries

$$s_r = \sqrt{\sum_1^{p'} s^2 / p'}$$

où p'= nombre total de tests indépendants soit $\sim 2p$

- Estimation de l'écart type de reproductibilité inter-laboratoire s_R

$$s_R = \sqrt{s_L^2 + s_r^2}$$

- Estimation de l'écart type des moyennes des cellules entre laboratoires

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\sum_1^{p'} (\bar{x} - \bar{\bar{x}})^2 / (p' - 1)}$$

$$\text{Où } \bar{\bar{x}} = \sum_1^{p'} \bar{x} / p'$$

- Estimation de la variance entre laboratoire s_L^2

$$s_L^2 = s_{\bar{x}}^2 - s_r^2 / n$$

- Estimation de l'écart type de "reproductibilité intra-laboratoire s_{Rs} "

Il s'agit de l'écart type de la reproductibilité entre les 2 séries réalisées par le même laboratoire, mais qui ne sont pas strictement sous des conditions de répétabilité.

$$s_{Rs} = \sqrt{s_m^2 + s_r^2}$$

- Estimation de la variance entre série s_m^2

$$s_m^2 = s_{s1-s2}^2 - s_r^2 / n$$

Estimation de l'écart type des moyennes des séries (calcul simplifié pour 2 séries)

$$s_{s1-s2} = (\bar{x}_{s1} - \bar{x}_{s2}) / \sqrt{2}$$



Où \bar{x}_{s1} et \bar{x}_{s2} sont les moyennes des cellules des séries 1 et 2 respectivement, par laboratoire

- Z-Score

C'est la mesure normalisée du biais de laboratoire.

On utilisera la moyenne robuste et l'écart-type robuste pour le calcul du Z-score, obtenus à l'aide l'algorithme A de la norme ISO 2725-5:1998. Cet algorithme permet de ne pas tenir compte des valeurs extrêmes sans passer par l'utilisation de test statistique préalable comme le test de Grubbs pour l'élimination des outliers.

Soit D l'estimation du biais de laboratoire:

$$D = \bar{x} - \bar{x}^*$$

où \bar{x} est le BMP moyen d'une cellule

et \bar{x}^* est la moyenne robuste des cellules

$$\text{Z-score} = D / s_{\bar{x}}^*$$

où $s_{\bar{x}}^*$ est l'écart type robuste entre les cellules

4 Résultats

4.1 Mise à niveau des données

Malgré l'envoi d'un fichier type pour la présentation des résultats, de nombreux laboratoires ont exprimé leurs résultats de façon différente. Une première analyse a permis de mettre en évidence des incohérences au niveau de l'expression d'un certain nombre de résultats. De multiples échanges ont ensuite été nécessaires afin de valider l'ensemble des résultats et de les exprimer de manière homogène.

Les dernières confirmations de la part des laboratoires participants ont été reçues en novembre 2017. Malgré les rappels, certains laboratoires avaient toujours exprimé leurs résultats de façon différente, par exemple les volumes rapportés à la quantité de VS.

Beaucoup de laboratoires n'ont pas fait 3 mesures de TS et VS sur l'inoculum et les substrats. De même les analyses de qualité de l'inoculum (ou le digesteur dont il est issu) ont rarement été faites.

4.2 Etude statistique

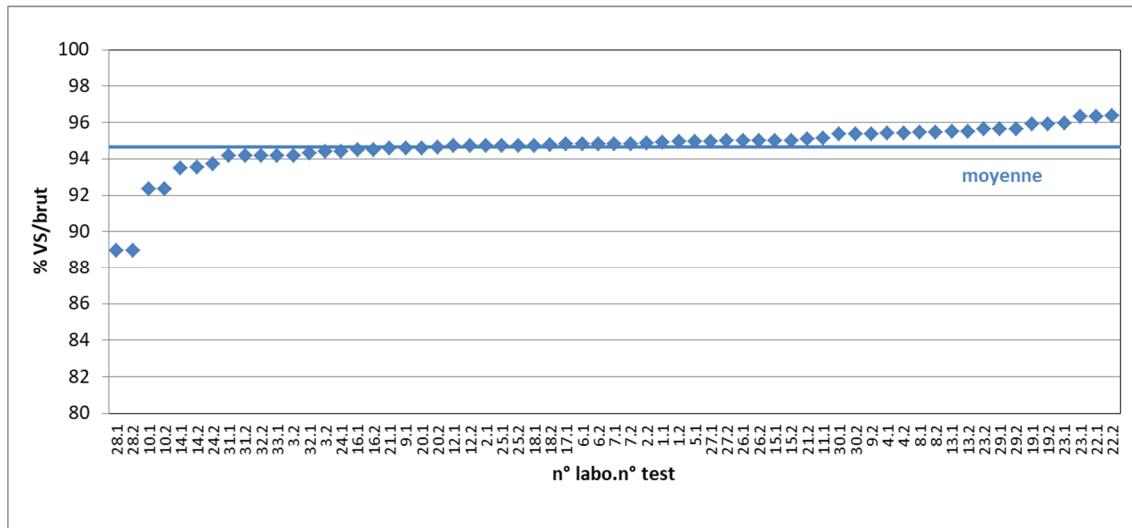
4.2.1 Mesure de TS et VS

Seule une moyenne et un écart type inter-laboratoire sont considérés, car peu de laboratoires ont réalisé plusieurs mesures. Elles sont reprises dans le tableau 5.

	cellulose	SA	SB	SC
TS moy \pm CV (%)	94.94 \pm 0.79%	88.81 \pm 0.64%	89.04 \pm 0.63%	92.28 \pm 0.76%
VS/TS moy \pm SD (%)	99.82 \pm 1.00%	91.89 \pm 4.33%	95.81 \pm 3.90%	87.08 \pm 2.60%
VS moy \pm SD (%)	94.68 \pm 1.38%	81.61 \pm 4.30%	85.82 \pm 3.95%	80.35 \pm 2.56%

Tableau 5 : caractérisation des substrats et du contrôle

La figure 1 montre la variation de la teneur VS/brut mesurée pour la cellulose. Les variations pour chaque substrat/contrôle sont représentées en annexe 2.





Les paramètres statistiques sont reportés dans le tableau 7.

	cellulose	SA	SB	SC
Nb laboratoires	33	33	33	33
Nombre de séries	2	2	2	2
Nombre de réplicats par série	3	3	3	3
Nombre de mesures moyennes	63	62	59	62
Rappel BMP théorique calculé	414	428	457	608
Moyenne brute	365.3	380.8	388.9	494.5
Médiane	367.9	376.2	380.3	490.4
Mini-maxi (des moyennes)	236.8 668.8	272.7 717.7	304.7 691.7	301.9 683.1
Etendue des moyennes (relative)	432.1 (118%)	445.0 (117%)	387.0 (100%)	381.2 (77%)
Moyenne robuste (1)	362.8	375.6	383.2	490.4
Ecart type robuste (1)	27.6	27.7	34.4	44.0
CV répétabilité (2)	8.8%	7.0%	6.9%	9.2%
CV reproductibilité intra-laboratoire (3)	10.5%	8.4%	8.1%	9.5%
CV reproductibilité interlaboratoire	17.1%	15.8%	15.1%	15.3%

Tableau 7 : Paramètres statistiques de dispersion pour l'ensemble des résultats

(1) Moyenne et écart type calculés avec l'algorithme A de la norme ISO 5725 permettant d'écartier les valeurs aberrantes sans tests statistiques préalables

(2) les tests avec 1 ou 2 réplicats sont écartés

(3) les labos avec 1 seule série ne sont pas pris en compte

Le test avec un Z-score de 12 pour la cellulose a été retranché.

Il est intéressant de noter que la dispersion est plus importante pour le contrôle cellulose, ce qui suggère peut-être que l'échantillon n'était pas suffisamment homogène.

Le coefficient de répétabilité est assez élevé par rapport aux études ADEME et VDLUFA mais il faut noter qu'un seul test aberrant a été retiré pour l'ensemble des substrats et un test avec inhibition pour le substrat B : tous les autres ont été conservés et aucun outlier n'a été retranché.

La reproductibilité inter-laboratoire est intermédiaire entre les études ADEME et VDLUFA.

Cependant ces résultats, s'ils décrivent la dispersion des résultats pour un ensemble des laboratoires participants, ne permettent pas d'atteindre le but recherché, à savoir fiabiliser le résultat d'une mesure réalisée dans un laboratoire quelconque.

4.2.3 Biais de laboratoire

Le Z-score est la mesure normalisée du biais de laboratoire, calculée à partir de la valeur assignée (ici la moyenne robuste) et de l'écart-type (ici écart type robuste) pour l'évaluation de l'aptitude lors d'un test inter-laboratoire.

Dans le cadre d'une évaluation de compétence on considère qu'un Z-score <-2 et >2 doit donner lieu à un avertissement au laboratoire considéré et qu'un Z-score <-3 ou >3 doit donner lieu à une action spécifique de la part de ce laboratoire.

La figure 3 représente le Z-score pour la cellulose. Un laboratoire a clairement un résultat aberrant sur un des deux tests. La représentation des Z-scores pour l'ensemble des substrats se trouve en annexe 4.

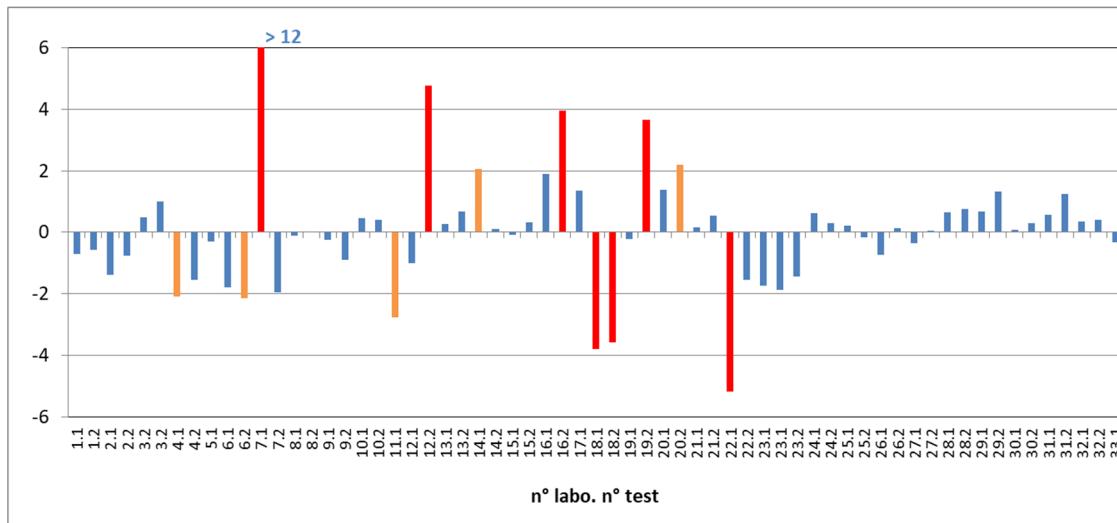


Figure 3 : Z-score pour la cellulose

Le tableau 6 synthétise les résultats des Z-scores pour les 3 substrats et le contrôle sur les 2 séries.

Nb de laboratoires	cellulose	SA	SB	SC
Avec Z-score <-3 ou >3 pour au moins 1 des 2 séries	6	4	2	4
Avec Z-score <-2 ou >2 pour au moins 2 des 2 séries	5	4	4	4
Total Z-score défavorables	11	8	6	8
Avec Z-score >-2 et <2 pour les 2 séries	22	25	27	25

Tableau 6 : Nombre de laboratoires avec au moins un Z-score non satisfaisant

Selon les substrats un quart à un tiers des laboratoires présentent des Z-scores défavorables. Dans le cadre d'une démarche d'évaluation de compétences, un entretien avec les laboratoires présentant un Z-score défavorable serait à envisager.

4.3 Examen des critères de validation originaux

Outre une standardisation plus poussée de la méthode, les critères de validation constituent une voie pour fiabiliser les résultats.

Comme on l'a vu en introduction les mesures de BMP devraient être suffisamment fiables pour permettre une utilisation dans un objectif économique, voire contractuel.

Plus que la dispersion des résultats, un paramètre important est l'étendue des mesures, ou encore les valeurs minimales et maximales. En effet quand un utilisateur veut faire analyser un BMP il envoie un échantillon à un laboratoire donné. Le résultat qu'il reçoit peut donc se situer n'importe où dans l'étendue des mesures. Il importe donc avant tout de réduire cette étendue.

4.3.1 Rappel des critères

Ils sont basés sur les éléments proposés dans l'article de WST :



- Critère 1 : CV (coefficient de variation ou écart type relatif) entre les réplicats des blancs $\leq 5\%$
- Critère 2 : CV (coefficient de variation ou écart type relatif) entre réplicats des substrats/ contrôle $\leq 5\%$ (substrats homogènes)
- Critère 3 : BMP moyen (moyenne des 3 réplicats) du contrôle cellulose comprise entre 85% et 100% de la valeur théorique de 414 NI/gVS, soit ≥ 352 NI/gVS and ≤ 414 NI/gVS
- Déviation standard pour les BMP calculé comme

$$SD_{BMP} = \sqrt{SD_{blanc}^2 + SD_{substrat/control}^2}$$

4.3.2 Application sur le contrôle cellulose

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries.

L'annexe 5 présente les figures représentant les résultats de la cellulose, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 8. Les paramètres relatifs sont ramenés en % de la moyenne robuste.

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	63	237 - 669	432	56
Critère 1	39	237 - 669	432	66
Critère 2	38	295 - 479	183	29
Critère 1+2	28	312 - 479	167	30
Critère 3	38	354 - 413	59	14.4
Critère 1+2+3	19	354 - 379	25	8.3

Tableau 8: Application des critères originaux sur le contrôle-cellulose

La figure 4 présente les résultats finaux pour la cellulose

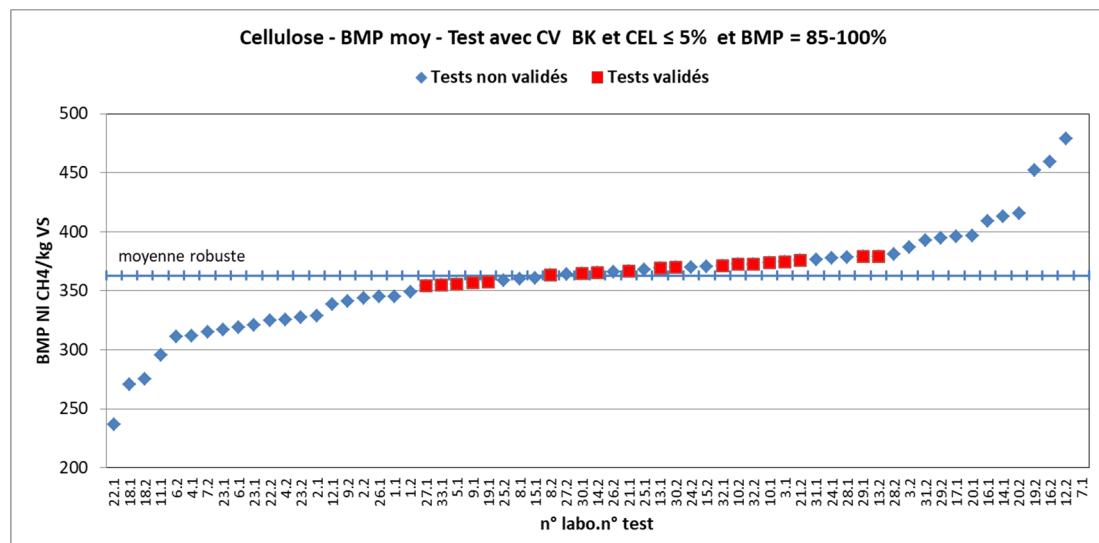


Figure 4 : Application des critères originaux pour la cellulose

4.3.3 Application sur le Substrat A

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries.

- Tous les tests pour lesquels le contrôle cellulose n'est pas validé sont écartés.
- Le critère 2 reprend le CV de 5% pour les triplicats du substrat A

L'annexe 6 présente les figures représentant les résultats du substrat A, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 9.

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	62	273 - 718	445	55
Critères contrôle >0	19	332 - 409	76	21
Critère 2	40	330 - 443	114	23
Tous critères	16	332 - 409	76	21

Tableau 9: Application des critères originaux sur le substrat A

La figure 5 présente les résultats finaux sur le substrat A.

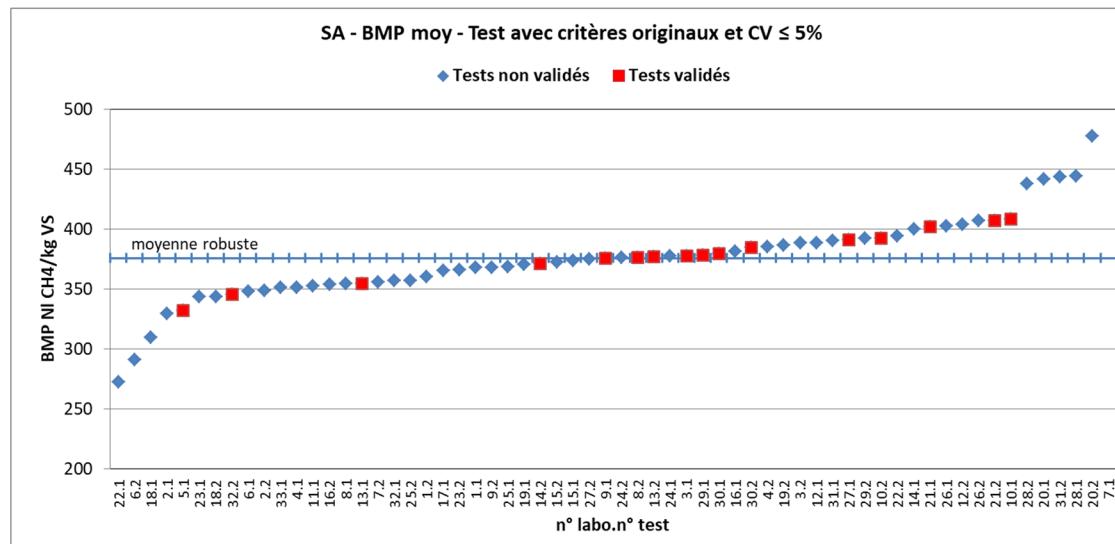


Figure 5 : Application des critères originaux sur le substrat A

4.3.4 Application sur le Substrat B

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries : seul les tests du laboratoire 12, séries 1 et 2 sont écartés en raison d'une inhibition identifiée (mais non expliquée). En temps normal ces résultats n'auraient pas été rendus.

- Tous les tests pour lesquels le contrôle cellulose n'est pas validé sont écartés.
- Le critère 2 reprend le CV de 5% des triplicats du substrat B

L'annexe 7 présente les figures représentant les résultats du substrat B, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.



Les résultats sont synthétisés dans le tableau 10.

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	59	305 - 692	387	54
Critères contrôle >0	19	318 - 440	122	27
Critère 2	37	318 - 488	170	33
Tous critères	15	318 - 415	97	26

Tableau 10 : Application des critères originaux sur le substrat B

La figure 6 présente les résultats finaux sur le substrat B.

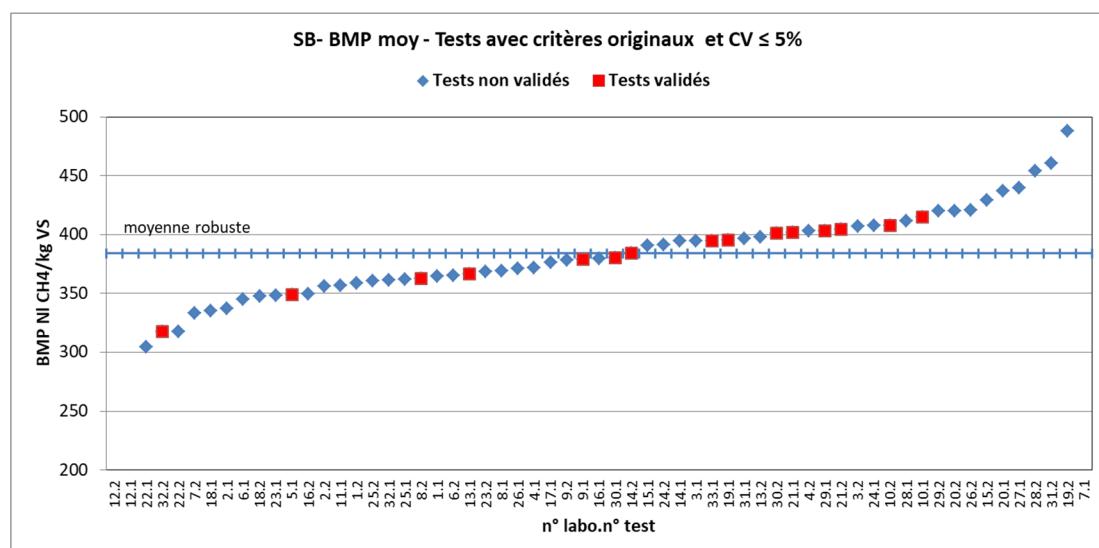


Figure 6 : Application des critères originaux sur le substrat B

4.3.5 Application sur le Substrat C

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries .

- Tous les tests pour lesquels le contrôle cellulose n'est pas validé sont écartés.
- Le critère 2 reprend le CV de 5% des triplicats du substrat C

L'annexe 8 présente les figures représentant les résultats du substrat C, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 11.

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	62	302 - 683	382	65
Critères contrôle >0	19	381 - 538	156	44
Critère 2	39	302 - 683	382	64
Tous critères	17	381 - 538	156	40

Tableau 11: Application des critères originaux sur le substrat B.

La figure 7 présente les résultats finaux sur le substrat C.

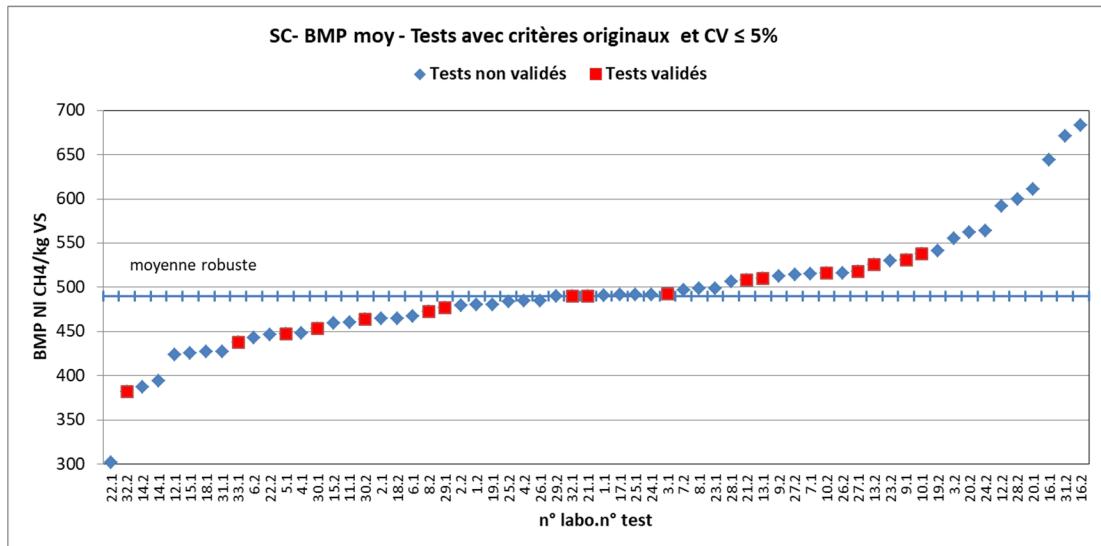


Figure 7 : Application des critères originaux sur le substrat C

4.3.6 Discussion sur les critères originaux

On peut voir que moins d'1 test sur 3 est validé sur la base de ces critères. Ceci suggère que, peut-être, les critères définis sont trop contraignants.

Concernant le critère 1, l'écart type relatif sur l'inoculum est en fait d'autant plus important que sa production des blancs est faible. Cela pénalise donc les laboratoires qui respectent la recommandation sur une production maximum des blancs de 20%. De plus l'écart sur la production des blancs est prise en compte dans le calcul de l'écart sur le BMP tel que calculé ici. L'application du critère 1 ne réduit pas l'écart maximum entre les résultats de mesure pour la cellulose. On propose donc d'écartier ce critère.

Le critère 2, l'écart type relatif sur la cellulose, est validé pour 38 tests sur 63 seulement. On peut là aussi réfléchir à l'assouplissement de ce critère, par exemple retenir un CV de 10%.

Le critère 3 concerne la fourchette admissible du BMP du contrôle cellulose. Avec une moyenne robuste à 363 NI/kg VS, une limite basse à 352 NI/kg VS comme définie initialement paraît bien proche de la limite basse admissible.

On propose d'abaisser cette limite à 80% de la production théorique, soit 334 NI/g VS, ce qui correspond à environ 90% de la valeur moyenne observée.

4.4 Les critères de validations révisés

4.4.1 Synthèse des critères révisés

- Critère 1 : non considéré
- Critère 2 : CV (deviation standard entre réplicats) des substrats/ contrôle 10 % (substrats homogènes)
- Critère 3 : BMP moyen (moyenne des 3 réplicats) du contrôle cellulose comprise entre 80% et 100% de la valeur théorique de 414 NI/gVS, soit ≥ 334 NI/gVS et ≤ 414 NI/gVS



- Déviation standard pour les BMP calculé comme

$$SD_{BMP} = \sqrt{SD_{blanc}^2 + SD_{substrat/control}^2}$$

4.4.2 Application sur le contrôle cellulose

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries.

L'annexe 5 présente les figures représentant les résultats de la cellulose, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 12. Les paramètres relatifs sont ramenés en % de la moyenne robuste

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	63	237 - 669	432	56
Critère 2	50	237 - 479	242	35
Critère 3	44	339 - 413	74	17.0
Critère 2+3	39	339 - 413	74	16.7

Tableau 12 : Application des critères révisés sur le contrôle-cellulose

La Figure 8 présente les résultats finaux pour la cellulose.

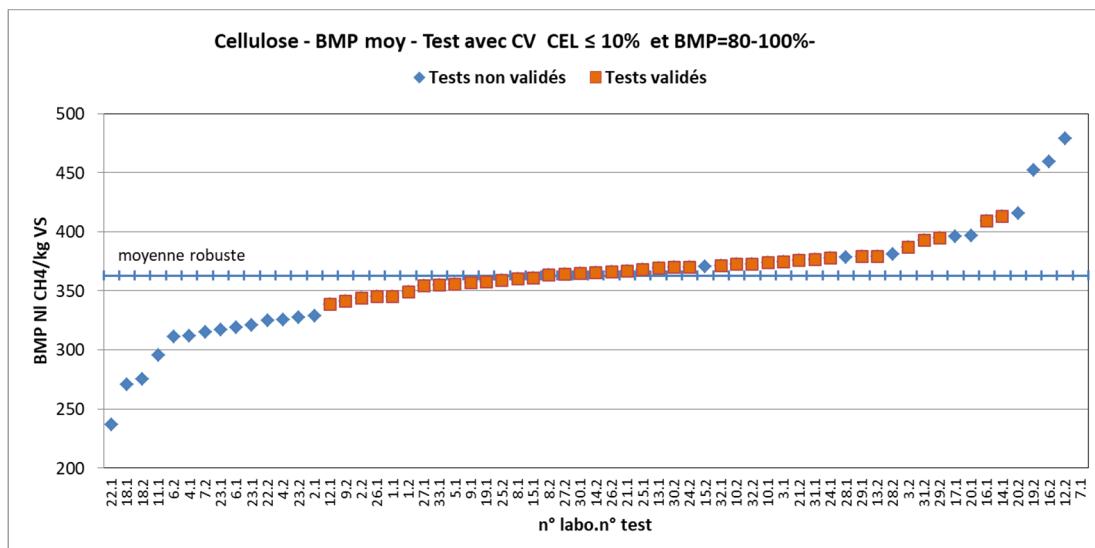


Figure 8: Application des critères révisés sur la cellulose

4.4.3 Application sur le Substrat A

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries.

- Tous les tests pour lesquels le contrôle cellulose n'est pas validé sont écartés.
- Le critère 2 reprend le CV de 10 % pour les triplicats du substrat A

L'annexe 6 présente les figures représentant les résultats du substrat A, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 13.

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	62	273 - 718	445	55
Critères contrôle >0	39	332 - 444	111	21
Critère 2	52	273 - 478	205	31
Tous critères	39	332 - 444	111	21

Tableau 13 : Application des critères révisés sur le substrat A

La Figure 9 présente les résultats finaux pour le substrat A

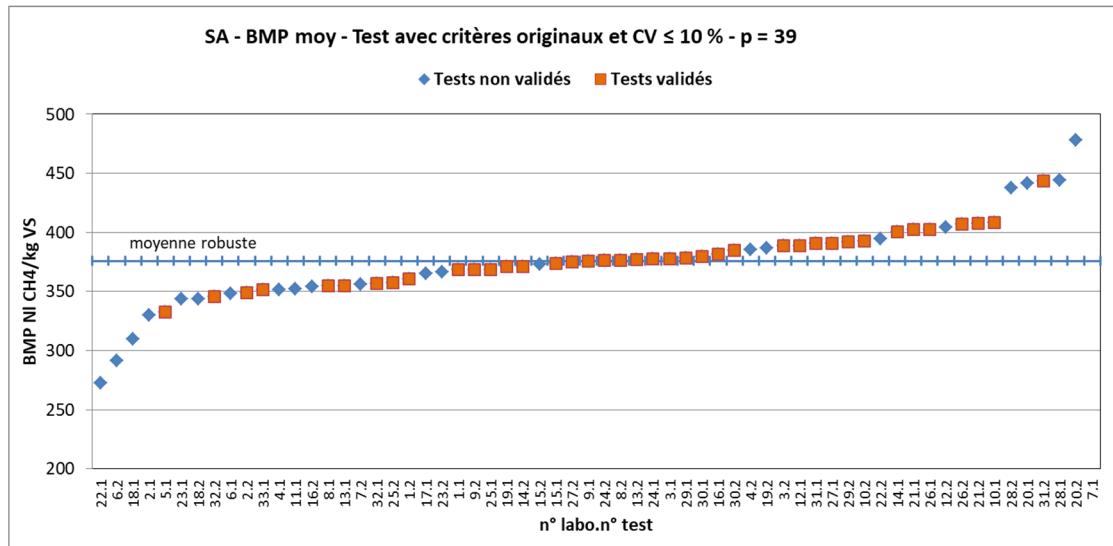


Figure 9 : Application des critères révisés sur le substrat A

4.4.4 Application sur le Substrat B

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries : seul les tests du laboratoire 12, séries 1 et 2 sont écartés en raison d'une inhibition identifiée (mais non expliquée). En temps normal ces résultats n'auraient pas été rendus.

- Tous les tests pour lesquels le contrôle cellulose n'est pas validé sont écartés.
- Le critère 2 reprend le CV de 10 % des triplicats du substrat B

L'annexe 7 présente les figures représentant les résultats du substrat B, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 14

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	59	305 - 692	387	54
Critères contrôle >0	37	318 - 460	142	27
Critère 2	51	318 - 488	170	32
Tous critères	36	318 - 460	142	26

Tableau 14 : Application des critères révisés sur le substrat B



La Figure 10 présente les résultats finaux pour le substrat B.

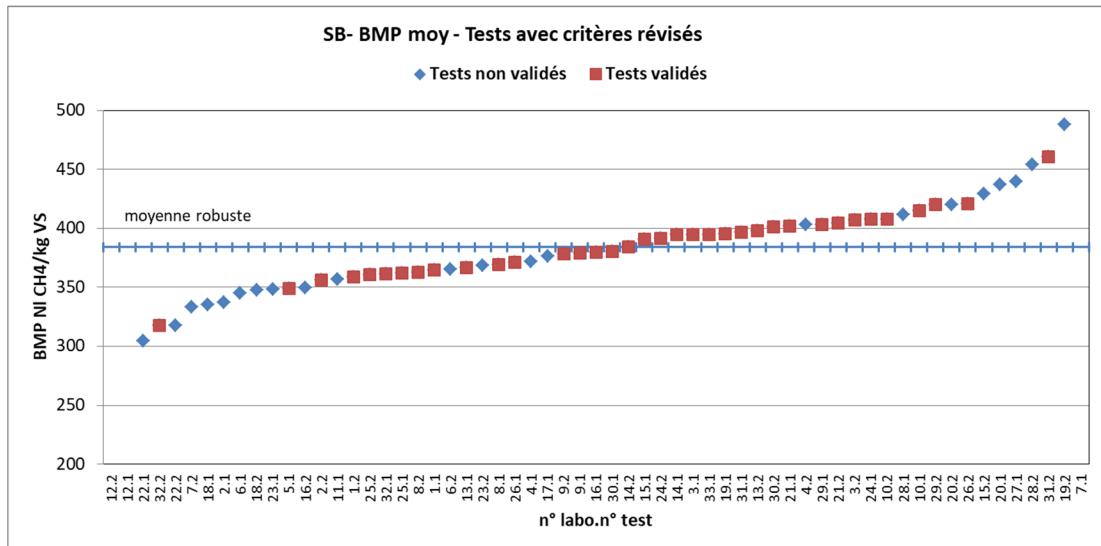


Figure 10 : Application des critères révisés sur le substrat B

4.4.5 Application sur le Substrat C

On considère ici l'ensemble des résultats des 2 séries .

- Tous les tests pour lesquels le contrôle cellulose n'est pas validé sont écartés.
- Le critère 2 reprend le CV de 5% des triplicats du substrat C

L'annexe 8 présente les figures représentant les résultats du substrat C, avant et après application des critères, triés par ordre croissant.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 15

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	SD
Pas de critère	62	302 - 683	381	65
Critères contrôle >0	39	382 - 671	289	58
Critère 2	51	302 - 683	381	64
Tous critères	37	382 - 671	289	54

Tableau 15 : Application des critères révisés sur le substrat C

La Figure 11 présente les résultats finaux pour le substrat C

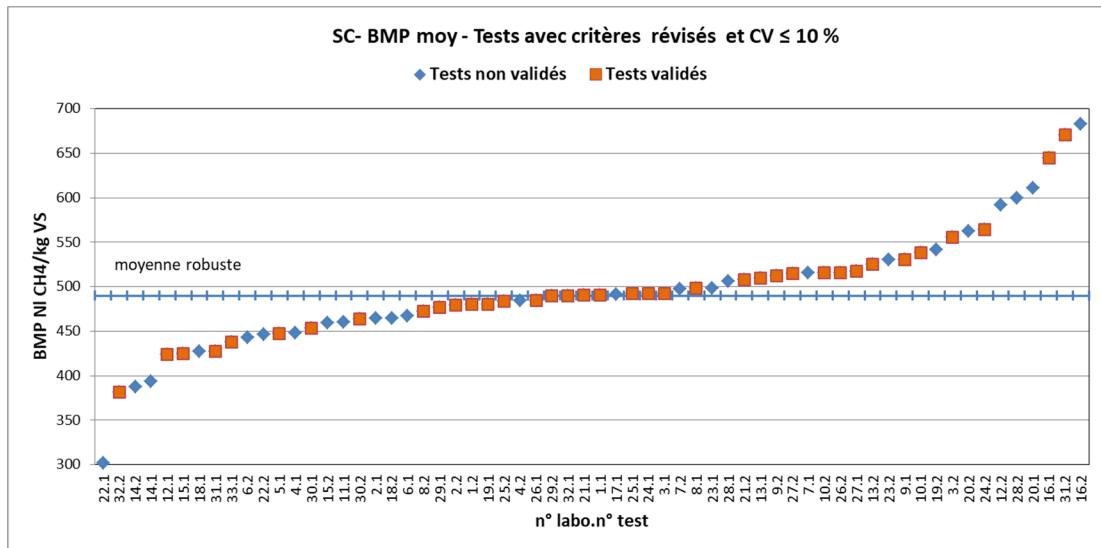


Figure 11 : Application des critères révisés sur le substrat C

4.4.6 Impact des critères originaux et révisés

L'impact des critères de validation sur le nombre de tests validés, l'étendue des mesures et l'écart type relatif de reproductibilité est reporté sur la tableau 16.

	Nb de tests validés	Mini-maxi	Etendue	CV reproductibilité
Substrat A				
Pas de critère	62	273 - 748	445	15.8%
Critères originaux	16	332 - 409	76	
Critères révisés	39	332 - 444	111	8.1%
Substrat B				
Pas de critère	59	305 - 692	387	15.1%
Critères originaux	15	318 - 415	97	
Critères révisés	36	318 - 460	142	8.8%
Substrat C				
Pas de critère	62	302 - 683	381	15.3%
Critères originaux	17	381 - 538	156	
Critères révisés	37	382 - 671	289	12.7%

Tableau 16: Comparaison de l'impact des critères originaux et révisés

L'application des critères de validation originaux permet de réduire considérablement l'étendue des mesures. Les critères révisés permettent une réduction moins importante de l'étendue des mesures mais ils permettent de valider environ 60% des tests, soit plus que deux fois plus que les critères originaux.

Cependant l'étendue des valeurs résultante reste trop importante pour une utilisation fiable des résultats de BMP. Il ressort que la définition de ces critères pourrait être encore optimisée.



A la différence des autres études qui ont appliqué des tests statistiques pour l'élimination d'outliers « uniques » à l'intérieur d'un triplicat, les résultats ne présentant que 1 ou 2 mesures ont été systématiquement éliminés dans cette étude au motif de CV non conforme.

Il faut noter que l'on n'a par contre enlevé aucun outlier sur les résultats des substrats pour motif d'écart trop important à la moyenne « vraie ». En effet il est apparu important de ne conserver que des critères pouvant être appliqués sur une mesure dans un seul laboratoire.

L'application des critères de validation révisés permet de réduire également le coefficient de reproductibilité inter-laboratoire, cependant de façon moins évidente pour le substrat C.

4.5 Les critères de validation appliqués aux laboratoires

On se limite à l'analyse de la validation des critères sur le contrôle cellulose car c'est la contrainte principale. On prend en compte les 2 séries pour le contrôle cellulose.

La validation des critères par laboratoire est présentée en annexe 9. Le tableau 17 résume les résultats.

	Critères originaux	Critères révisés
Laboratoires ayant validé tous les test (1/1 ou 2/2)	7	18
Laboratoires ayant validé 1 test /2	7	5
Laboratoire ayant validé 0 test	19	10

Tableau 17: Synthèse de la validation des critères par laboratoire

Par rapport aux critères originaux :

- 7 laboratoires ont validés tous les tests cellulose (5 labos ont validé 2 tests/2 et 2 labo 1 test/1)
- 7 laboratoires ont validés 1 test/2
- 19 laboratoires n'ont validé aucun test

Par rapport aux critères révisés :

- 18 laboratoires ont validés tous les tests cellulose (16 labos ont validés 2 tests/2 et 2 labos ont validé 1 test/1)
- 5 laboratoires ont validés 1 test/2
- 10 laboratoires n'ont validé aucun test

Il ressort que dans la plupart des cas les laboratoires valident tous les tests ou aucun, ce qui suggère que l'erreur sur la mesure n'est pas aléatoire mais liée à la méthode du laboratoire. Par méthode il faut entendre aussi l'influence de la nature/de la qualité de l'inoculum.

4.6 Ecart entre les deux séries

L'écart entre les deux séries de tests, caractérisée précédemment comme la reproductibilité intra-laboratoire, ne fait pas partie des paramètres de dispersion tels que décrits dans les études inter-laboratoires. Cependant il est intéressant de regarder à quel point le coefficient moyen de reproductibilité se répartit entre les laboratoires.

La figure 12 illustre les écarts intra-laboratoires des BMP moyen entre les deux séries pour la cellulose.

L'ensemble des résultats pour les substrats se trouvent en annexe 10.

L'écart inter-série est faible pour la plupart des laboratoires mais important pour un petit nombre de laboratoires. Ceci suggère que la méthode utilisée, y inclus l'inoculum, n'est pas la seule source de variation dans les résultats, car les laboratoires ont utilisé le même inoculum pour les deux séries.

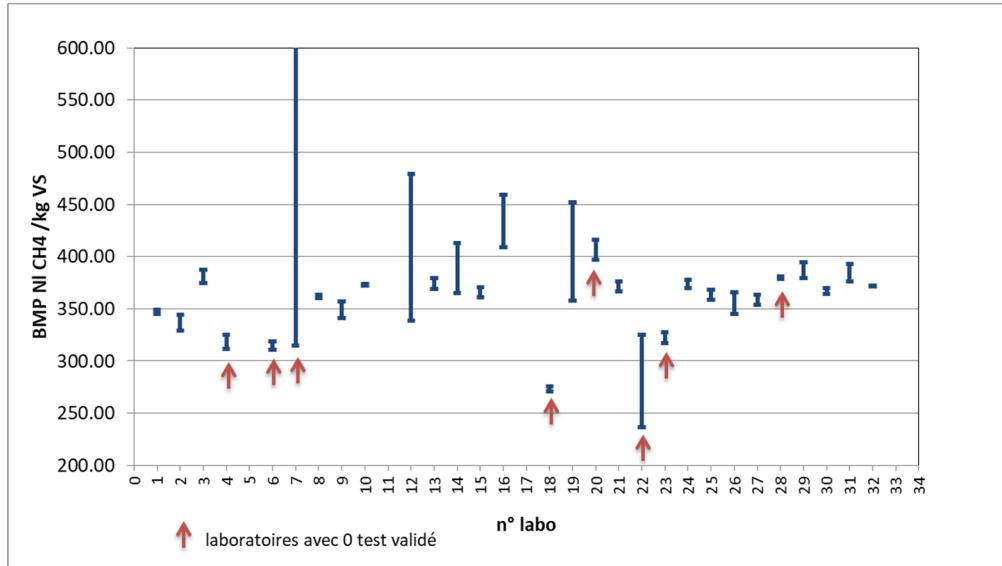


Figure 12 : Ecart entre les deux séries de tests pour la cellulose

4.7 Application des recommandations

4.7.1 Les caractéristiques de l'inoculum

	Nb de laboratoires
Origine de l'inoculum :	
Boues de Step	16
Co-digestion agricole	6
Effluents élevage	5
Granules UASB	3
Labo-batch	2
Plug-flow thermo	1
Concentration en VS	
< 10 g/l :	2
> 50 g/l :	3
10 à 15 ou 40 à 50 g/l :	4
15 à 40 g/l :	24
Critères qualité inoculum	Trop peu de résultats

Les inocula ont des origines variées, mais la majorité provient de station d'épuration comme il était recommandé.

La grande majorité des laboratoires ont une teneur en VS de l'inoculum entre 10 et 50 g/l.

Les critères de qualité de l'inoculum sont très peu renseignés : seul un laboratoire a indiqué une concentration excessive en AGV et ses résultats n'ont pas été validés.

4.7.2 La production endogène

Elle est exprimée en % de la production globale (blanc + cellulose), basée sur une moyenne des triplicats. Elle est représentée pour les différents tests sur la figure 13.



		Nb de tests
Production	< 20% :	16
	20 -30 % :	28
	30 - 40% :	11
	< 40% :	8

Dans seulement ¼ des tests la production endogène est inférieure à 20%. Par contre dans la majorité des cas la production est inférieure à 30%. On peut donc se demander si le critère de recommandation ne devrait pas évoluer.

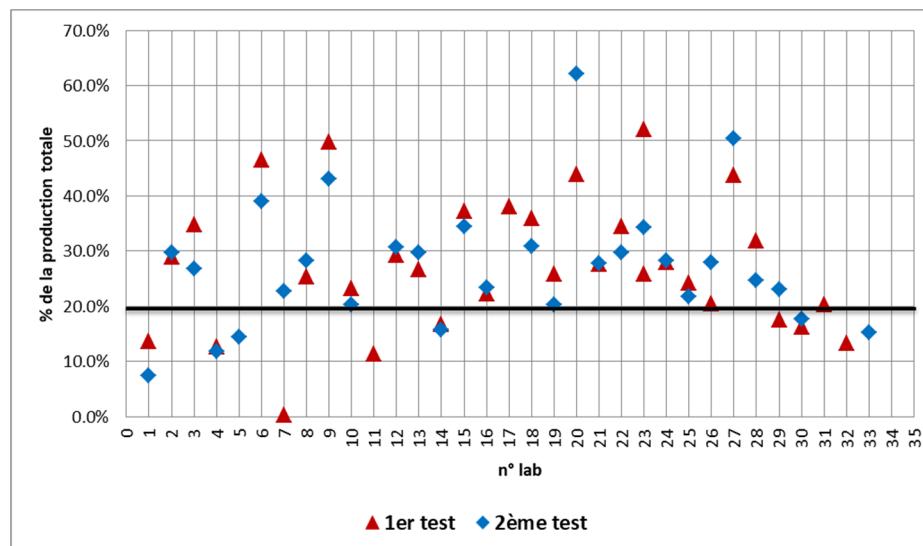


Figure 13: Production endogène par rapport à la production total (recommandation : <20%)

4.7.3 Les autres paramètres

		Nb de laboratoires
Quantité substrat / cellulose utilisée	> 2g :	28
	1 à 2 g :	2
	< 1g :	3

Un certain nombre de recommandations n'ont pas été suivies par les laboratoires, ce qui laisse une possibilité d'amélioration si ces recommandations sont rendues obligatoires.

4.7.4 Identification des problèmes

En outre il faut noter que des problèmes sont apparus au cours de l'étude, concernant notamment :

- la durée du test : certains laboratoires ayant poursuivi le test non pas dès que la production de méthane est inférieure à 1% du cumulé durant 3 jours, mais jusqu'à ce l'arrêt complet. Ils ont trouvé une différence de 5 à 6% entre les deux résultats. Il faut préciser ici qu'il s'agit de la production nette, c'est-à-dire après retranchement du blanc, car ce dernier peut produire de faible débit de gaz durant des mois.
- se pose également la question du test simultané de produits à cinétique différente : le fichier de résultats supposait un blanc pour tous les substrats/contrôle. Or la cinétique de production étant différente l'arrêt de production ne se produit pas en même temps pour tous les substrats : il faut donc avoir la production du blanc correspondant à la durée de production de chaque substrat.

5 Discussion

Un premier constat est la difficulté d'obtenir l'ensemble des résultats sous la forme demandée, les laboratoires ayant l'habitude de réaliser les tests selon leurs propres méthodes.

La présente étude se rapproche dans la démarche des tests inter-laboratoires réalisés en Allemagne avec des paramètres fixés identiques ou proches, et l'application de critères de validation impliquant un contrôle cellulose. Toutefois l'objectif est différent : alors que les tests allemands ont plutôt pour but de valider la compétence des laboratoires d'essais sur la base d'une méthode normalisée, on a recherché ici une méthode pour fiabiliser le résultat du test lors d'une analyse dans un laboratoire quelconque.

Par rapport aux études existantes, on a cherché ici à évaluer l'application de critères de validation sur la dispersion. Et parmi les paramètres de dispersion, un critère important est l'étendue des résultats de mesure.

En effet les critères de dispersion sont souvent évalués à l'aide des déviations standards, qui dépendent entre autre du nombre de laboratoires participants. Mais dans les faits l'analyse est confiée à un seul laboratoire, et la question qui se pose à l'utilisateur est: « quelle est l'erreur maximale à laquelle je peux m'attendre si je fais analyser un échantillon à un laboratoire quelconque ?»

L'examen des paramètres statistiques de notre étude, avant prise en compte des critères de validation, montre une dispersion importante. Les Z-scores, qui représentent une estimation normalisée du biais de laboratoire, se révèlent défavorables pour environ un tiers des laboratoires.

Un point important pour l'examen des paramètres de dispersion est le traitement des outliers. Dans la présente étude le partit a été pris d'éliminer uniquement des mesures qui ne font pas intervenir de comparaison avec d'autres laboratoires : ainsi on n'a enlevé aucun outlier sur un écart trop important à la moyenne « vraie ». En effet il est apparu important de ne conserver que des critères pouvant être appliqués sur une mesure dans un seul laboratoire.

L'application des critères de validation permet de réduire considérablement l'étendue des mesures.

Les critères retenus à l'origine de l'étude ont montré que seul un tiers des tests était validé, ce qui suggère qu'ils étaient peut-être trop contraignants. Une révision de ces critères a donc été envisagée et appliquée. Les critères révisés permettent une réduction moins importante de l'étendue des mesures mais ils permettent de valider environ 60% des tests, soit deux fois plus que les critères originaux.

Cependant l'étendue des valeurs résultante reste trop importante pour une utilisation fiable des résultats de BMP. Il ressort que la définition de ces critères pourrait être encore optimisée.

Un paramètre important susceptible d'impacter le biais des laboratoires reste bien entendu l'inoculum. Les études réalisées à ce jour sont contradictoires et ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer cet impact.

Le regroupement des inocula en catégories, comme nous l'avons réalisé dans cette étude, n'est malheureusement pas réellement significatif car de plus en plus de digesteurs fonctionnent avec des mélanges en proportion variable. Seules les boues digérées des stations d'épuration présentent une certaine homogénéité. Aussi on pourrait imaginer définir d'autres paramètres permettant de caractériser un inoculum.

Notons cependant que certains laboratoires ont rapporté des résultats très différents entre les deux séries de tests, à priori réalisées avec le même type d'inoculum. Ceci suggère que d'autres sources d'erreur sont en cause.

Il faut également rappeler ici que le principe de la mesure est basé sur un certain nombre d'hypothèses :

- L'inoculum contient tous les groupes trophiques nécessaires à la dégradation complète du substrat, même si certains groupes sont initialement peu (ou pas) actifs.

Dans ce cas l'origine de l'inoculum n'impacte pas le résultat final mais seulement la cinétique de



dégradation, et des laboratoires avec des inocula différents peuvent réaliser des tests supposés semblables

- Les productions de méthane sont strictement additives : la production du substrat est obtenue en retranchant la production de l'inoculum seul de la production de (inoculum + substrat).
Or il est possible que l'addition du substrat, dont généralement au moins une partie est rapidement dégradable, modifie la dégradation des composés organiques résiduels présents dans l'inoculum (par exemple la retarde au moment où il n'y a plus de MO rapidement disponible). Le retrait de la production de l'inoculum seul ne correspondrait alors pas à la réalité.
- Le ratio inoculum/substrat exprimé en VS est représentatif et comparable pour les différents inocula et substrats.
Ce n'est pas vraiment une hypothèse dans la mesure où il est bien évident que le contenu en VS de l'inoculum ne représente pas la biomasse microbienne active.
La concentration en microorganismes de l'inoculum n'est pas connue car difficile à mesurer. On sait qu'il ne s'agit là que d'une estimation très grossière puisqu'une grande partie est représentée par de la matière organique récalcitrante du substrat d'origine.
A ce jour on ne dispose pas de mesure simple permettant d'exprimer ce ratio avec une meilleure représentativité.
- Il n'y a pas de limitation nutritionnelle ni d'inhibition durant le test, les transferts de matière ne sont pas limitants.

6 Conclusions

Cette étude internationale sur les tests BMP a montré que l'application des critères de validation comme défini dans les guidelines publié dans WST&T diminue considérablement la variabilité des résultats des tests BMP. La variabilité reste par contre importante malgré la prise en compte de conditions homogènes et de critères de validation.

Les résultats obtenus ne permettraient donc pas d'utiliser les BMP ainsi mesurés avec les objectifs de départ, c'est-à-dire prédire la production sur une installation industrielle à partie d'un gisement donné, ou encore utiliser le BMP comme paramètre de validation du bon fonctionnement d'une installation. En effet l'incertitude du résultat est encore beaucoup trop importante car la reproductibilité n'est pas bonne.

On a pu mettre en évidence dans cette étude les aspects sur lesquels une optimisation est possible :

- standardiser encore plus la méthode de mesure
- définir des critères de validation plus adaptés
- s'entretenir avec les laboratoires présentants les écarts les plus importants à la moyenne pour en identifier l'origine

Un point reste l'influence de l'inoculum utilisé pour le test sur les résultats, puisque chaque laboratoire utilise un inoculum différent et que celui n'est que très peu caractérisé.

Afin de poursuivre dans cette voie de standardiser et finalement fiabiliser les tests BMP il a été décidé qu'un deuxième workshop serait organisé en avril 2018 à Freising en Allemagne.

7 Références

Holliger, C., M. Alves, D. Andrade, I. Angelidaki, S. Astals, U. Baier, C. Bougrier, P. Buffière, M. Carballa, V. de Wilde, F. Ebertseder, B. Fernández, E. Ficara, I. Fotidis, J.-C. Frigon, H. Fruteau de Laclos, D. S. M. Ghasimi, G. Hack, M. Hartel, J. Heerenklage, I. Sarvari Horvath, P. Jenicek, K. Koch, J. Krautwald, J. Lizasoain, J. Liu, L. Mosberger, M. Nistor, H. Oechsner, J. V. Oliveira, M. Paterson, A. Pauss, S. Pommier, I. Porqueddu, F. Raposo, T. Ribeiro, F. Rüsch Pfund, S. Strömborg, M. Torrijos, M. van Eekert, J. van Lier, H. Wedwitschka, and I. Wierinck. 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*. 74:2515-2522.

Raposo F., Fernández-Cegrí V., De la Rubia M. A., Borja R., Béline F., Cavinato C., Demirer G., Fernández B., Fernández-Polanco M., Frigon J. C., Ganesh R., Kaparaju P., Koubova J., Méndez R., Menin G., Peene A., Scherer P., Torrijos M., Uellendahl H., Wierinck I. & de Wilde V. 2011
Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: Evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86, 1088–1098.

Annexe 1 : Liste des laboratoires participants

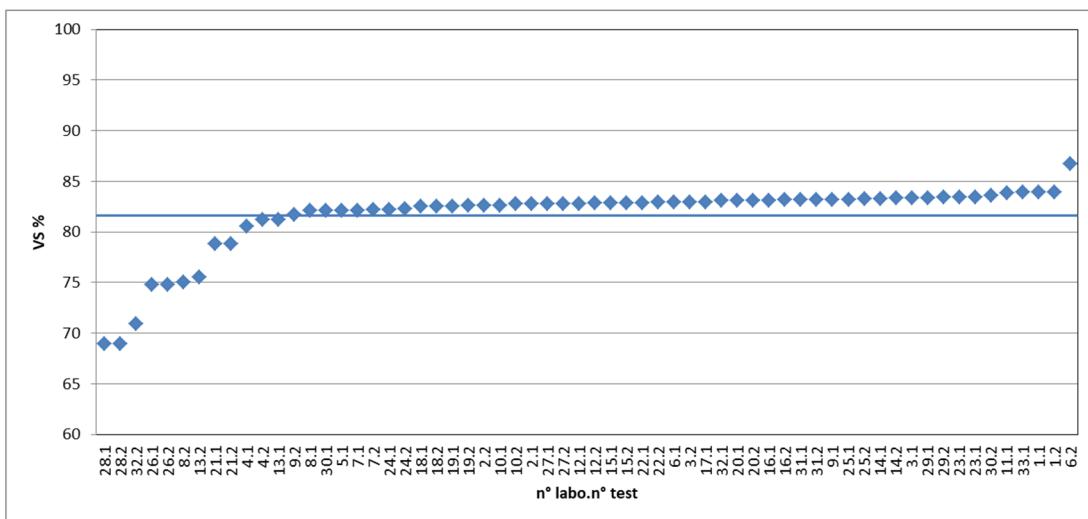
Remarque préalable : La numérotation des laboratoires dans les résultats ne correspond pas à l'ordre alphabétique présentée ici. Ainsi, l'anonymat des laboratoires en lien avec leurs résultats est garanti.

- Advanced Water Management Center, The University of Queensland, Brisbane, Australia;
- Bavarian State Research Center for Agriculture, Freising, Germany;
- Bioprocess Control AB, Lund, Sweden,
- Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal;
- Chair of Urban Water Systems Engineering, Technical University of Munich, Garching, Germany,
- CREA – San Cesario sul Panaro, Modena, Italy
- CRPA - Research Centre on Animal Production, Reggio Emilia, Italy
- DBFZ Deutsches BiomasseForschungsZentrum, Leipzig, Germany,
- Delft University of Technology, Delft, The Netherlands,
- Department of Biotechnology University of Verona, Verona - Italy
- Department of Chemical Engineering, Institute of Technology, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain,
- Dept. of Chemical Engineering, Environmental Technology and Biotechnology, University of Southern Denmark, Odense M, Denmark.
- ENAC IIE Laboratory for Environmental Biotechnology, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland;
- Hamburg University of Technology (TUHH), Institute of Environmental Technology and Energy Economics Harburger Hamburg, Germany,
- Innotech Alberta, Hwy 16A & 75 Street, Vegreville, Alberta, Canada
- INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Narbonne, France,
- INSA – DEEP, INSA de Lyon, Villeurbanne Cedex France
- Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, Département des Sciences et Techniques Agro-Industrielles, Beauvais, France,
- Institute for Chemistry and Biotechnology, ZHAW School of Life Sciences and Facility Management, Wädenswil, Switzerland
- Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Seville, Spain,
- IRTA, Barcelona, Spain,
- LeAF, Wageningen, The Netherlands,
- LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France,
- National Research Council Canada, Montréal, Canada,
- OWS nv, Gent, Belgium.
- Politecnico di Milano-DICA, Milano, Italy,
- Sorbonne Universités, EA 4297 TIMR UTC/ESCOM, Compiègne, France,

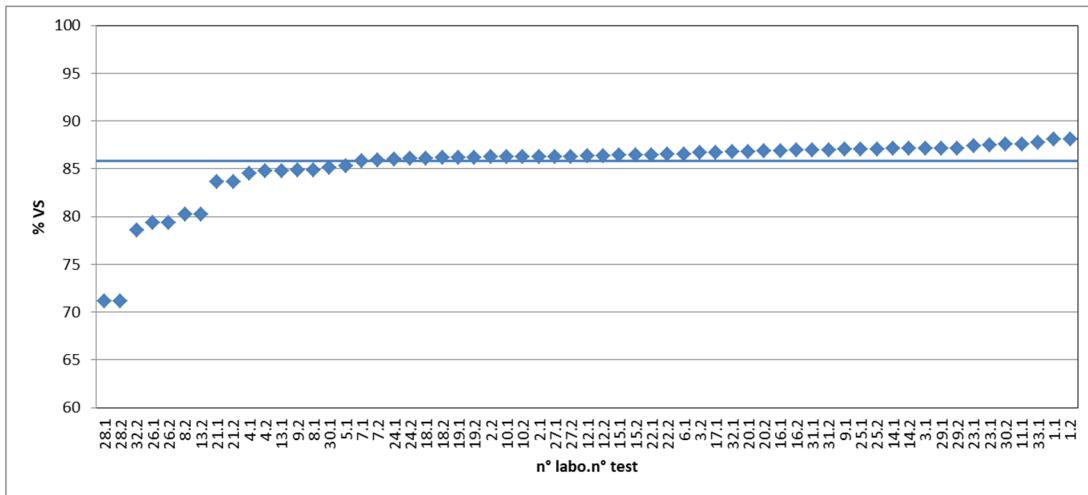
- State Institute of Agricultural Engineering and Bioenergy, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany
- Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark;
- The Swedish Centre for Resource Recovery, University of Borås, Borås, Sweden,
- University of Chemistry and Technology Prague, Prague, Czech Republic,
- University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria,
- VERI (Veolia), Limay, France



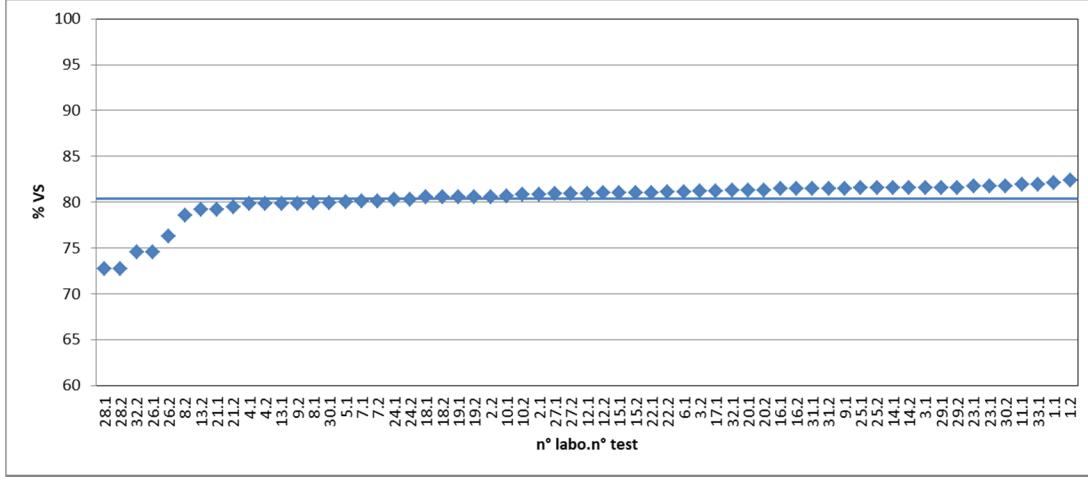
Annexe 2 : Caractérisation analytique des substrats



Substrat A : Variations des mesures de VS

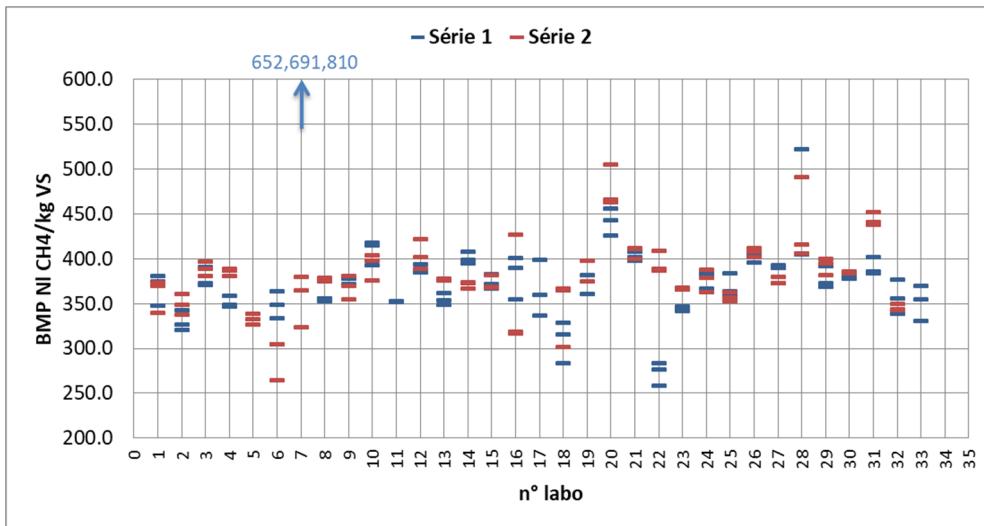


Substrat B : Variations des mesures de VS

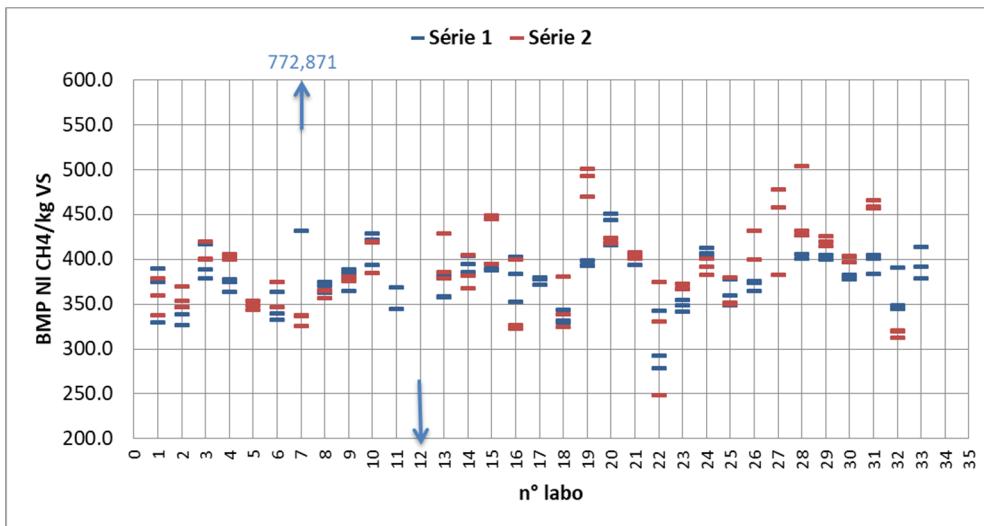


Substrat C : Variations des mesures de VS

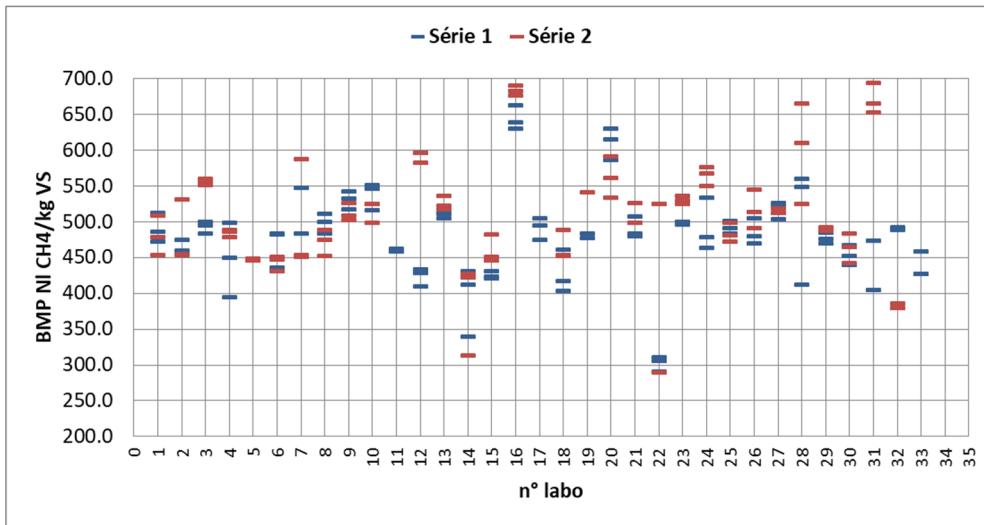
Annexe 3 : Résultats unitaires des BMP



Substrat A : Résultats unitaires des BMP



Substrat B : Résultats unitaires des BMP



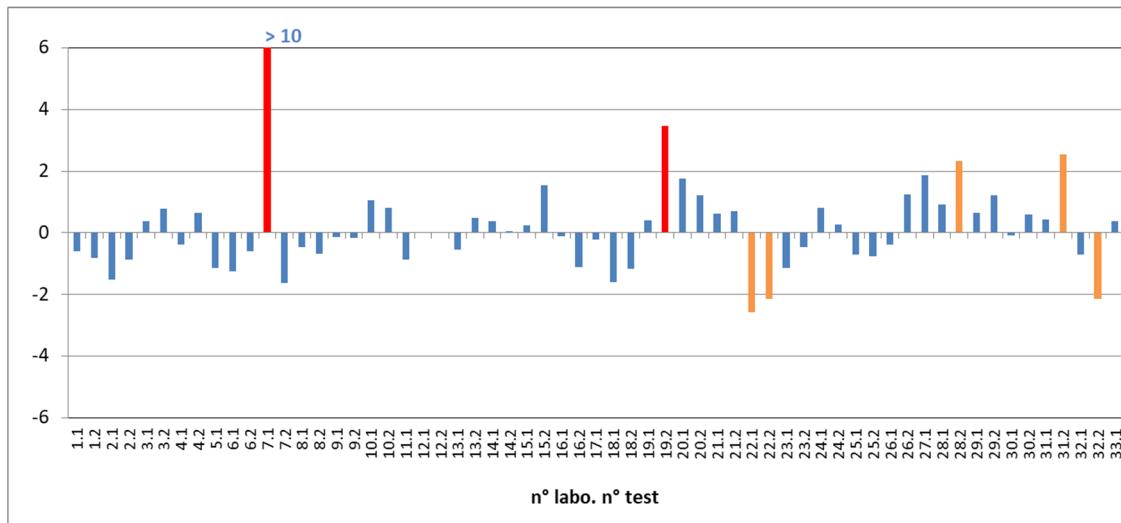
Substrat C : Résultats unitaires des BMP



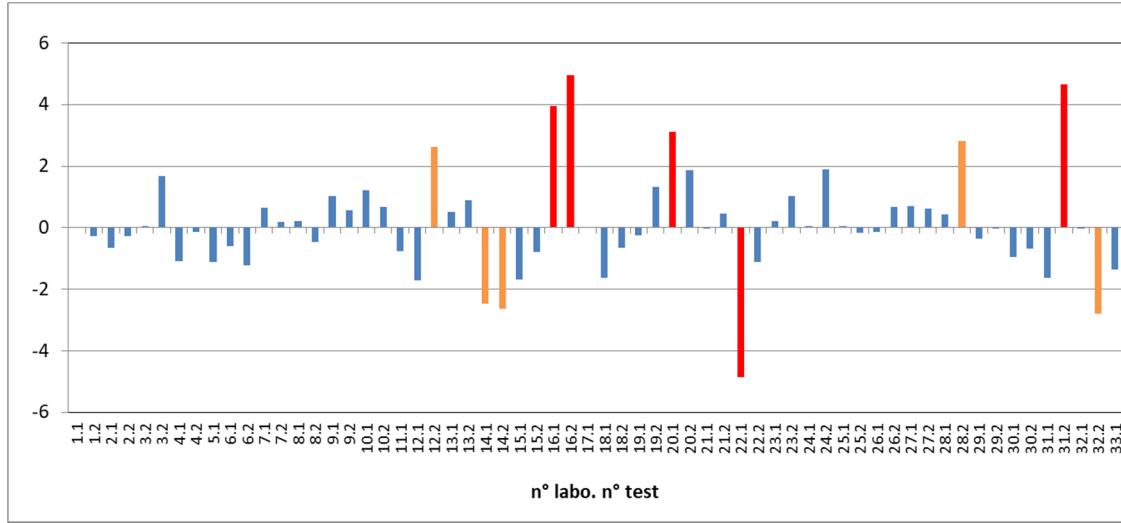
Annexe 4 : Z-Scores pour l'ensemble des substrats



Substrat A : Z-Score

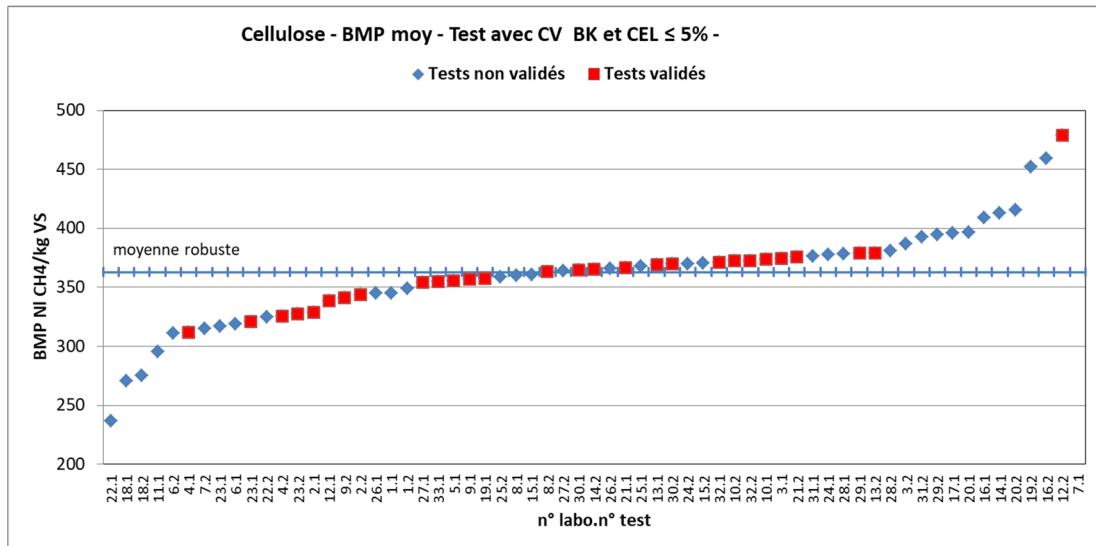


Substrat B : Z-Score

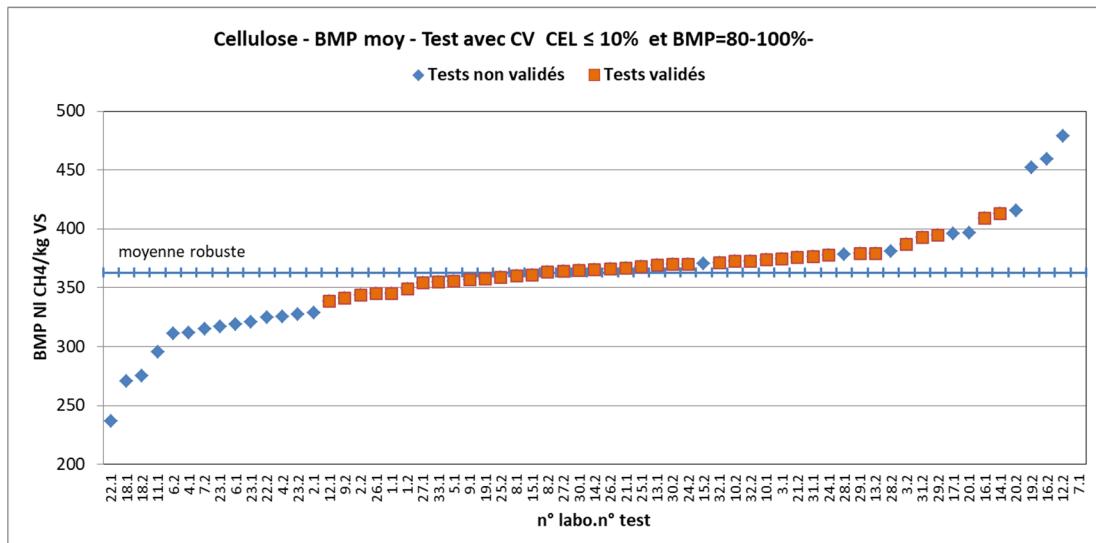


Substrat C : Z-Score

Annexe 5.1 : Validation des critères de validation pour la cellulose



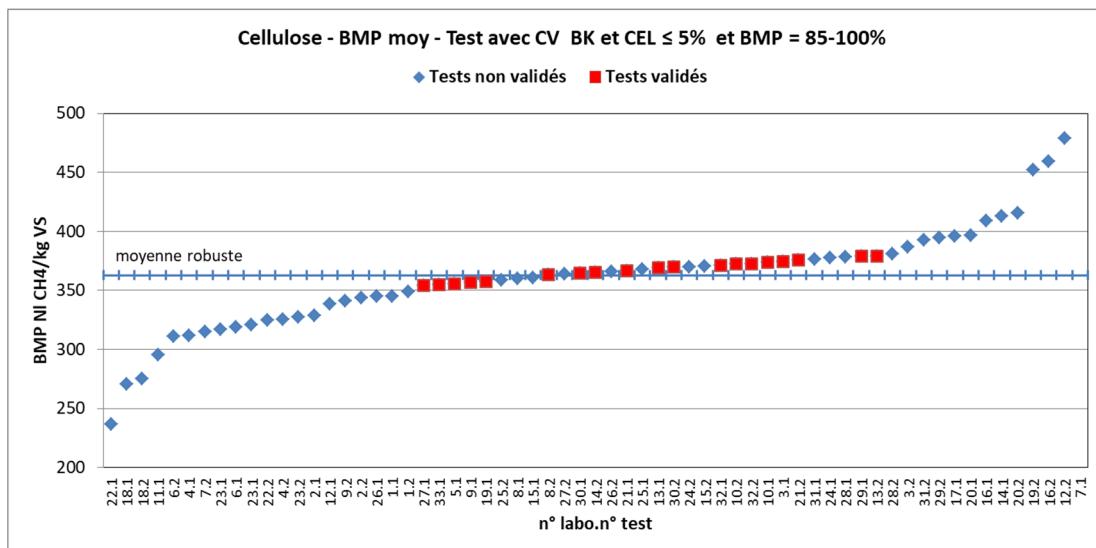
Application des critères 1 et 2 originaux : CV des blancs et CV de la cellulose < 5%



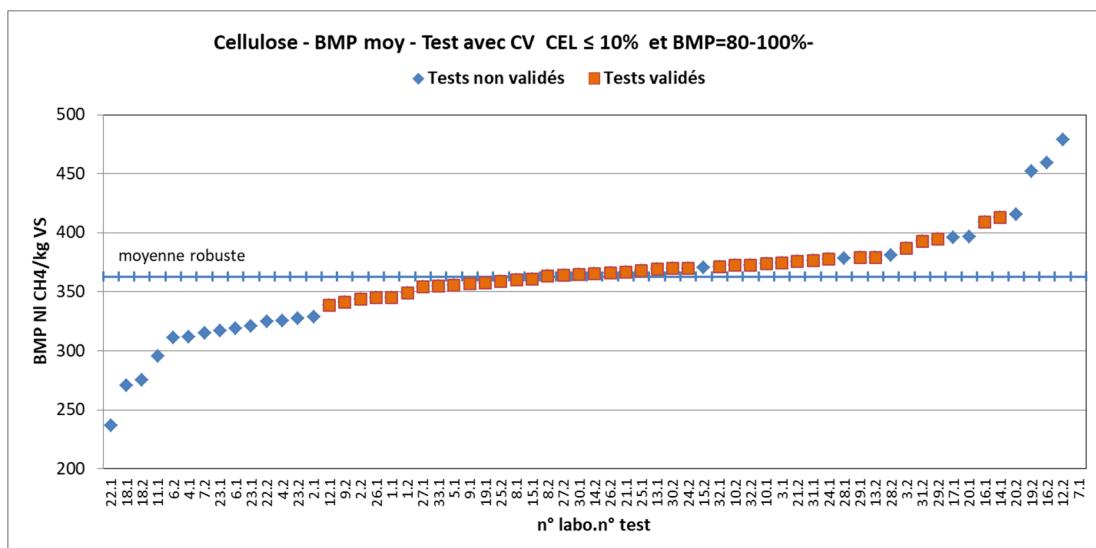
Application des critères 1 et 2 révisés : CV de la cellulose < 10%



Annexe 5.2 : Application des critères de validation pour la cellulose

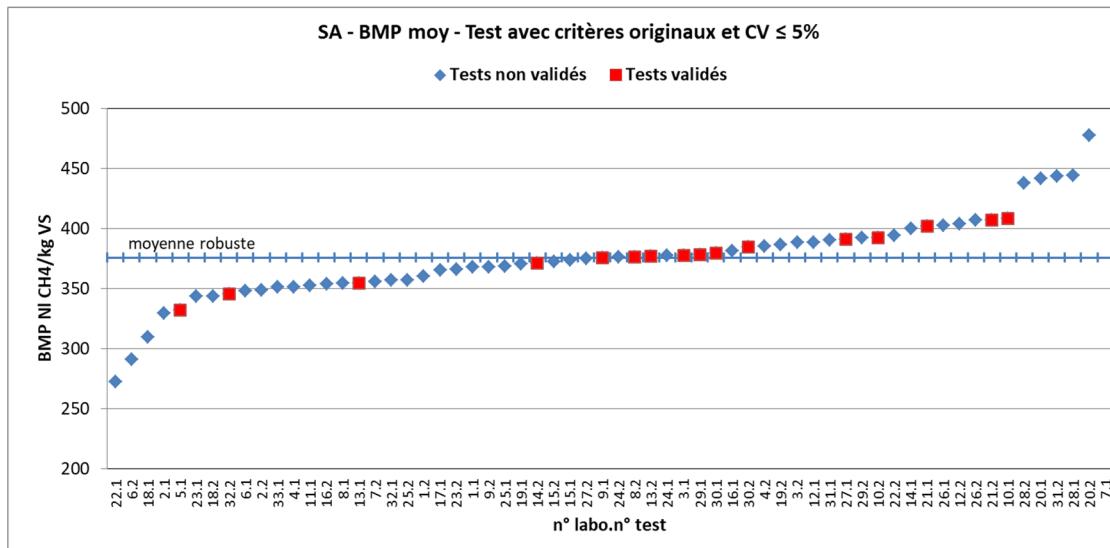


Application des critères 1, 2 et 3 originaux : CV blancs et cellulose $< 5\%$ et BMP 85-100% du BMP théorique

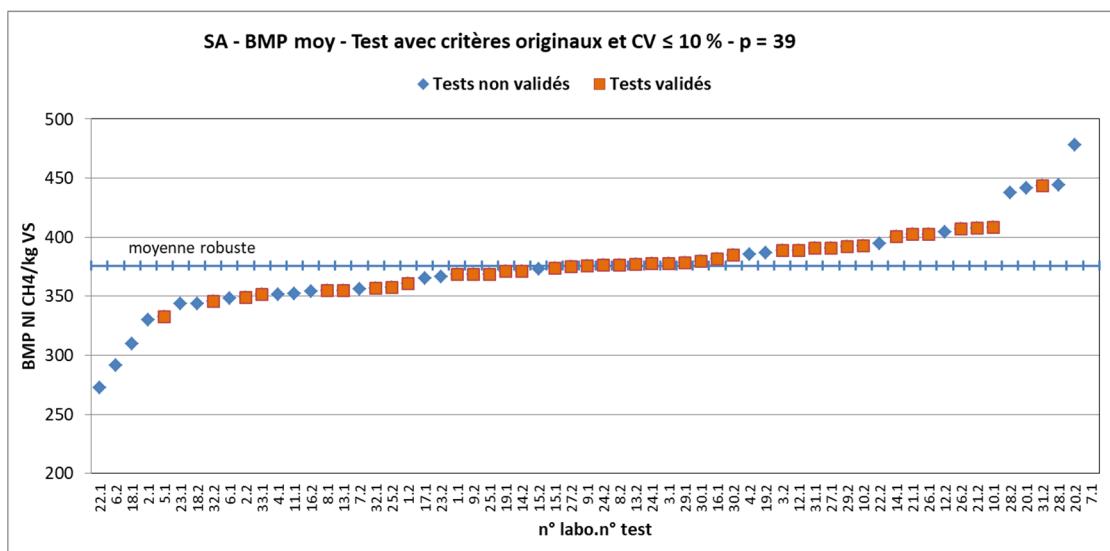


Application des critères 1, 2 et 3 révisés : CV cellulose $< 10\%$ et BMP 80-100% du BMP théorique

Annexe 6 : Application des critères de validation pour le substrat A



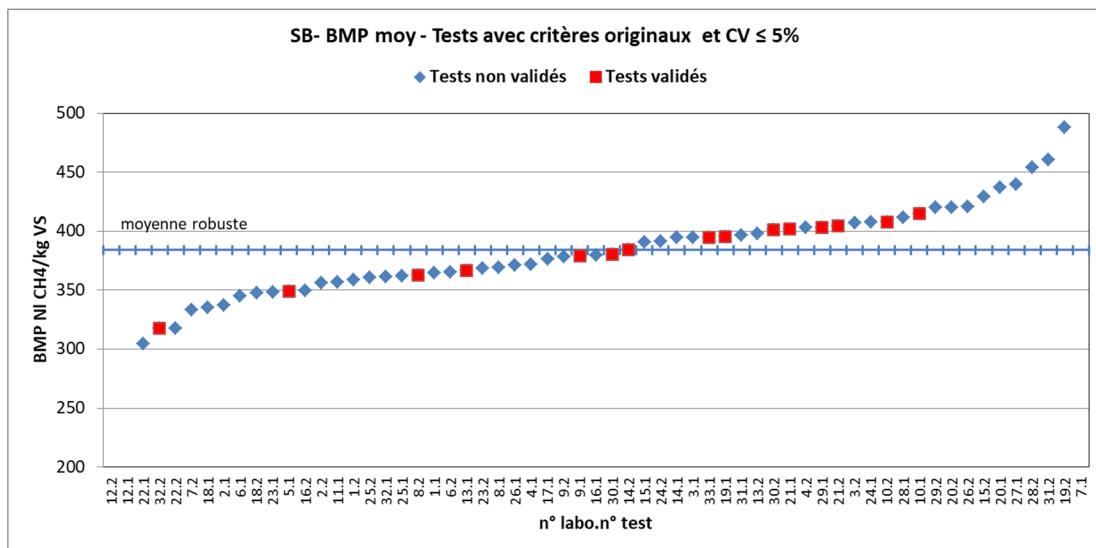
Application des critères originaux : validation des critères originaux cellulose et CV < 5%



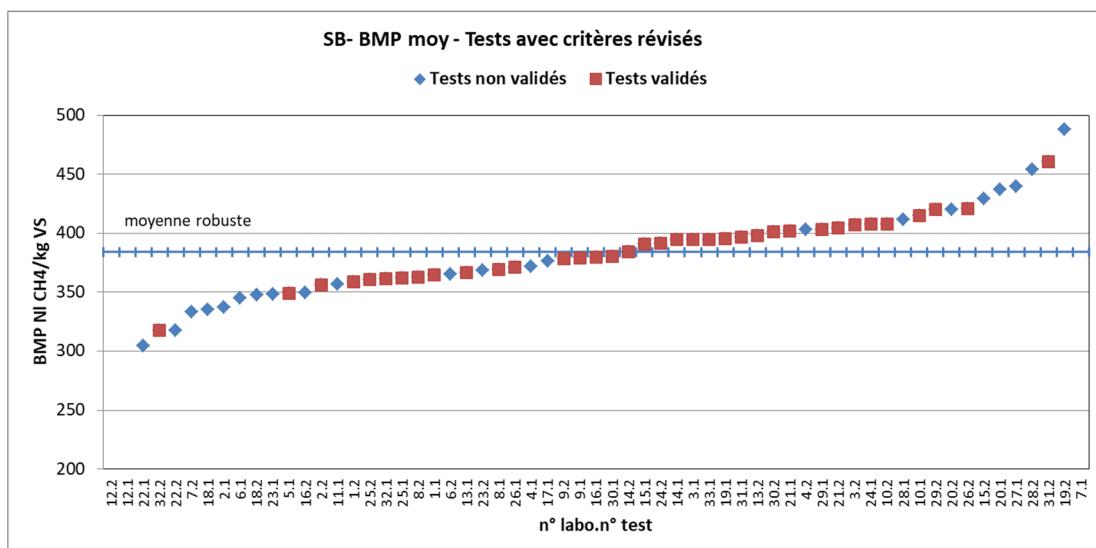
Application des critères révisés : validation des critères révisés cellulose et CV < 10%



Annexe 7 : Application des critères de validation pour le substrat B

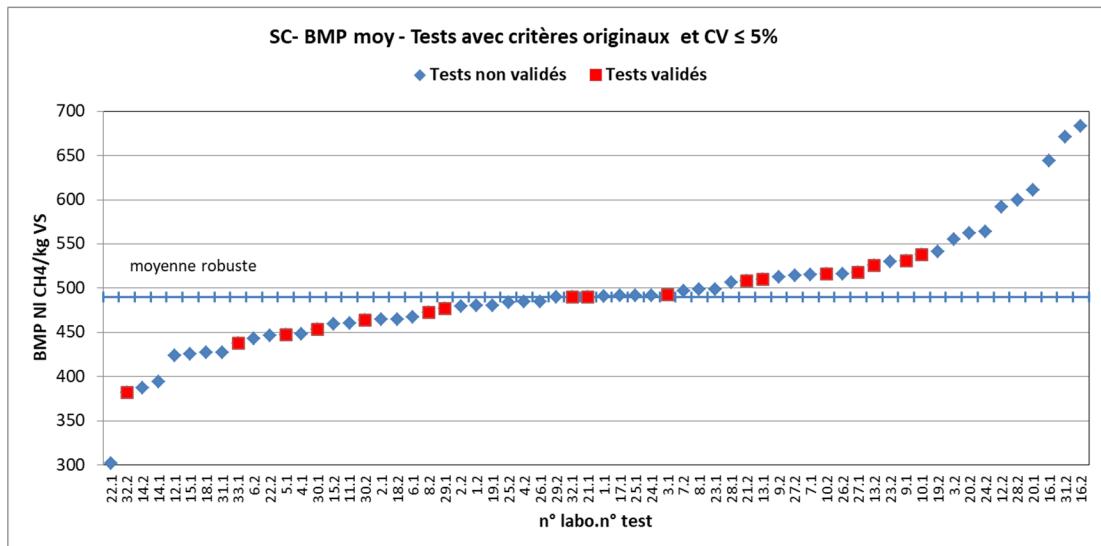


Application des critères originaux : validation des critères originaux cellulose et CV < 5%

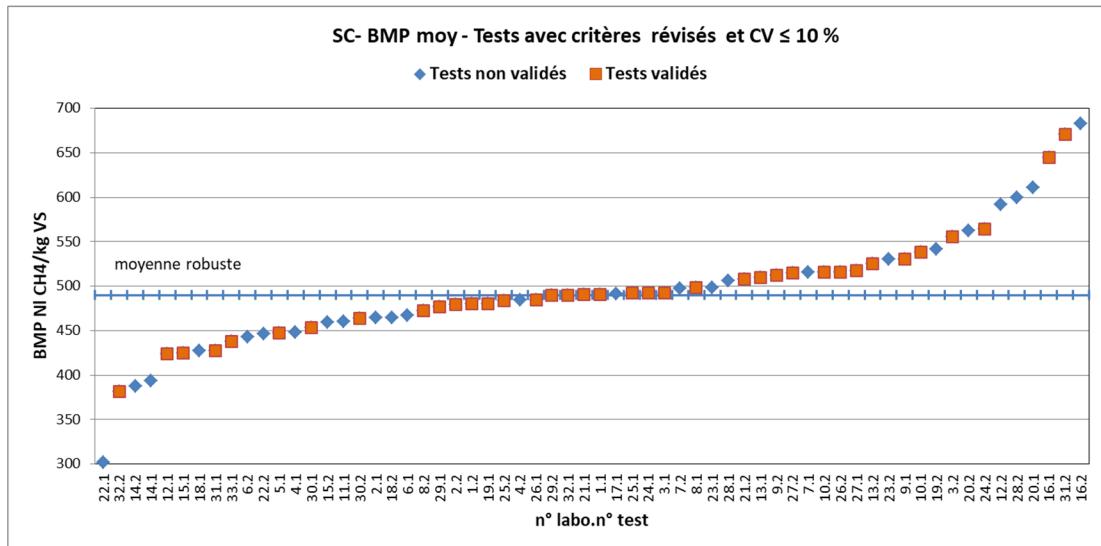


Application des critères révisés : validation des critères révisés cellulose et CV < 10%

Annexe 8 : Application des critères de validation pour le substrat C



Application des critères originaux : validation des critères originaux cellulose et CV < 5%



Application des critères révisés : validation des critères révisés cellulose et CV < 10%

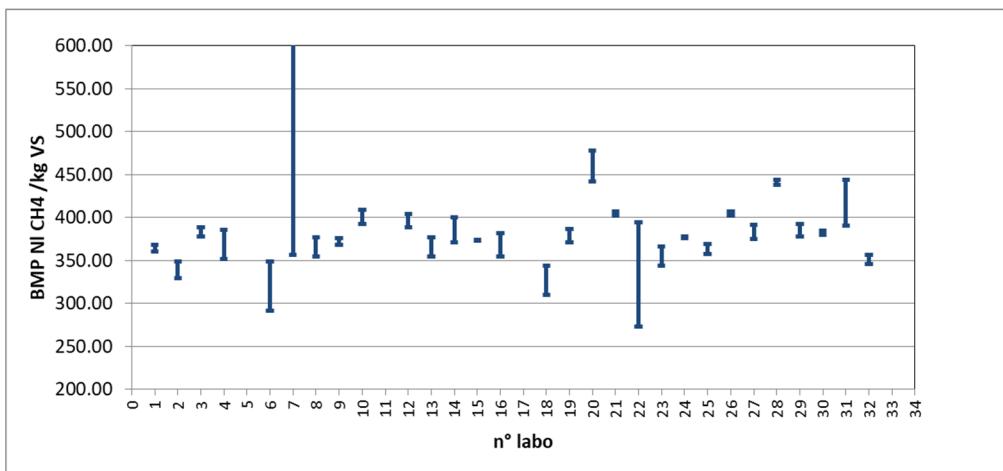


Annexe 9 : Validation des critères par laboratoire

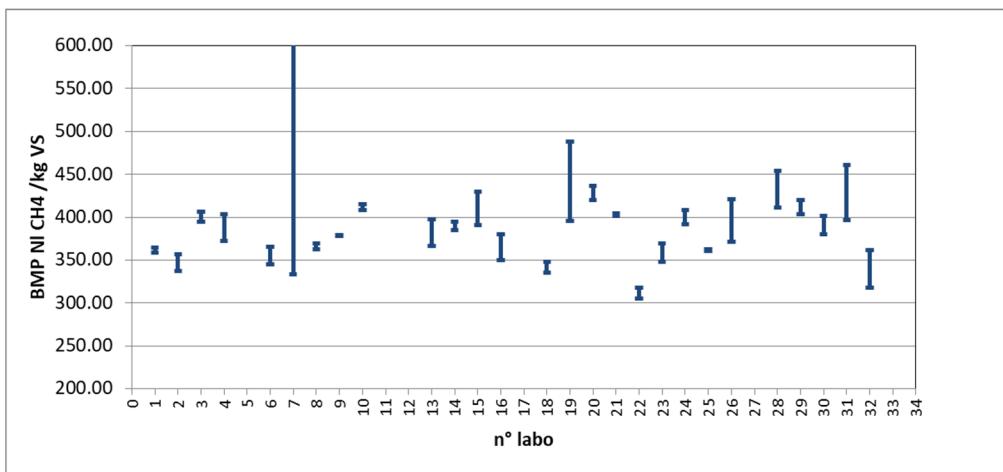
Laboratoire n°	Nb tetst	Validés crit originaux	Validés crit revisés
1	2	0	2
2	2	0	1
3	2	1	2
4	2	0	0
5	1	1	1
6	2	0	0
7	2	0	0
8	2	1	2
9	2	1	2
10	2	2	2
11	1	0	0
12	2	0	1
13	2	2	2
14	2	1	2
15	2	0	1
16	2	0	1
17	1	0	0
18	2	0	0
19	2	1	1
20	2	0	0
21	2	2	2
22	2	0	0
23	3	0	0
24	2	0	2
25	2	0	2
26	2	0	2
27	2	1	2
28	2	0	0
29	2	1	2
30	2	2	2
31	2	0	2
32	2	2	2
33	1	1	1

En vert : laboratoires ayant validés tous leurs tests.

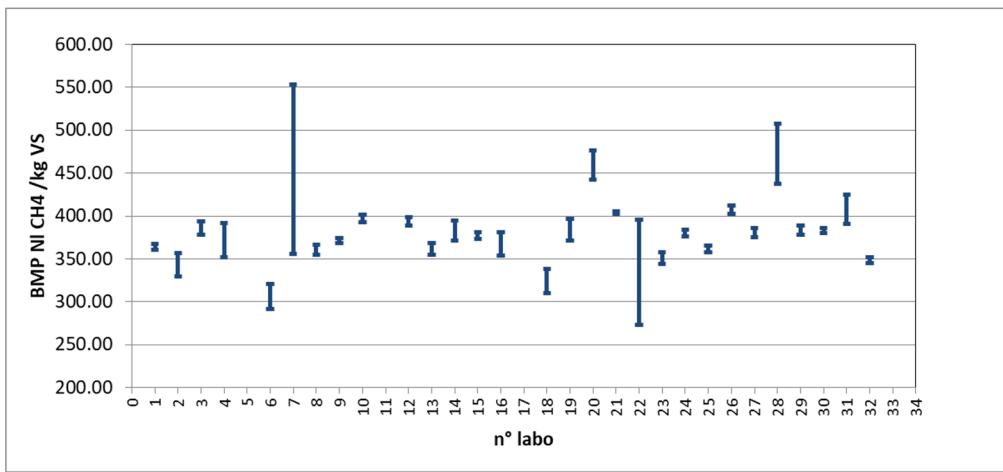
Annexe 10 : Ecart entre les deux séries de mesures



Ecart pour le substrat A



Ecart pour le substrat B



Ecart pour le substrat C