



**HAL**  
open science

# IMPACT OF DISSOLVED GAS ON DRY ANAEROBIC DIGESTION OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES

Elisabeth Anne Cazier

► **To cite this version:**

Elisabeth Anne Cazier. IMPACT OF DISSOLVED GAS ON DRY ANAEROBIC DIGESTION OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES. Environmental Engineering. Université de Montpellier 2, 2015. English. NNT: . tel-02060619v1

**HAL Id: tel-02060619**

**<https://theses.hal.science/tel-02060619v1>**

Submitted on 30 Nov 2016 (v1), last revised 7 Mar 2019 (v2)

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale  
SPSA (Sciences des Procédés, sciences des Aliments)  
et de l'unité de recherche Laboratoire de  
Biotechnologie de l'Environnement (INRA)

Spécialité : **APAB**  
(Agroressources, Procédés, Aliments, Bioproduits)

Présentée par **Elisabeth Cazier**

**ROLE DES GAZ DISSOUS DANS LA DIGESTION  
ANAEROBIE PAR VOIE SECHE DE DECHETS  
LIGNO-CELLULOSIQUES**

Soutenance prévue le 26/11/2015 devant le jury composé de :

Mr. Guillaume Bastide, ADEME	Examineur
Dr. Hassen Benbelkacem, INSA-Lyon	Invité
Prof. Denis Bouyer, Univ. Montpellier	Examineur
Prof. Pierre Buffière, INSA-Lyon	Rapporteur
Dr. Renaud Escudié, LBE-INRA Narbonne	Directeur de thèse
Dr. Pierre Fontanille, Polytech' Clermond-Ferrand	Invité
Prof. André Pauss, UTC-Compiègne	Rapporteur
Dr. Eric Trably, LBE-INRA Narbonne	Co-encadrant





---

**RESUME ETENDU :**

**ROLE DES GAZ DISSOUS DANS LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE DE DECHETS  
LIGNO-CELLULOSIQUES**

---

La digestion anaérobie permet la conversion et la valorisation de la matière organique à l'aide de microorganismes en énergie sous forme de biogaz, composé de méthane et de dioxyde de carbone, et en un digestat qui peut être utilisé comme amendement organique ou engrais pour les sols. La digestion anaérobie est un procédé complexe, faisant intervenir de nombreuses réactions biologiques sous l'action d'une communauté microbienne complexe. Ces réactions biologiques peuvent être simplifiées en 4 étapes biologiques principales : (1) l'hydrolyse, où la matière organique est hydrolysée en monomères et oligomères solubles, grâce à des enzymes extracellulaires, (2) l'acidogénèse où les acides aminés, les sucres et les acides gras obtenus durant l'hydrolyse sont transformés en acides gras volatils (AGVs) comme l'acétate, en acides organiques et alcools, (3) l'acétogénèse où les AGVs (sauf l'acétate) sont transformés en acétate, en dioxyde de carbone et en hydrogène et (4) la méthanisation où l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone sont transformés en méthane et en dioxyde de carbone. La digestion anaérobie par voie sèche correspond à une teneur en matière sèche de plus de 15%. Ce procédé est à la fois avantageux (diminution de la quantité d'eau et d'énergie nécessaires...) mais avec des inconvénients (hétérogénéité plus importante du milieu et inhibition au-delà de 30% de matière sèche). Cette inhibition serait due à la baisse du transfert gaz-liquide, ce qui provoquerait des accumulations locales de gaz dissous pouvant être inhibiteurs.

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier le rôle des gaz dissous dans la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique et mésoscopique. Une première étude a porté sur les effets des gaz dissous (hydrogène et dioxyde de carbone) à l'échelle locale lors de la digestion anaérobie par voie sèche, sans les effets des transferts de matières (diffusion et transfert gaz-liquide) qui pourraient être limitants. Une deuxième étude a porté sur les effets des gaz dissous à l'échelle mésoscopique lors de la digestion anaérobie par voie sèche, en prenant en compte les effets des transferts de matière. Ainsi, la diminution du transfert gaz-liquide et la mise en place de gradients de concentrations de molécules dissoutes au sein du milieu ont été étudiées ainsi que les effets des accumulations de gaz dissous lors d'une baisse du transfert gaz-liquide au sein du milieu.

Ainsi, à l'échelle microscopique, les expériences ont été réalisées avec un milieu en couche mince afin de tester les effets inhibiteurs des gaz dissous en limitant l'impact de la diffusion et du transfert gaz-liquide. Cette étude a permis d'étudier l'impact de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique. Ainsi, l'hydrogène est un inhibiteur de l'hydrolyse pour la digestion anaérobie par voie sèche à partir de 780 mbars. De plus, le dioxyde de carbone seul accélère la production de méthane sans avoir d'effet sur les autres réactions. L'inhibition de l'hydrolyse par l'hydrogène n'a pas lieu en présence de dioxyde de carbone et est réversible lorsque le dioxyde de carbone est ajouté, avec cependant des effets rémanents inhibiteurs sur la dégradation de l'acétate et la méthanogénèse. A l'échelle mésoscopique, lorsque le transfert gaz-liquide est limitant, l'hydrolyse est inhibée, due à la présence d'hydrogène dissous sous forme de gradient de concentration dans le milieu, visible par un gradient de concentrations d'AGVs. De plus, l'ajout de dioxyde de carbone lorsque le transfert gaz-liquide est limitant augmente la concentration en AGVs et baisse le pH, ce qui inhibe la production de méthane. Ainsi, le dioxyde de carbone serait responsable de l'inhibition de la digestion anaérobie lorsque le transfert gaz-liquide est limitant pour une teneur en matière sèche importante. L'hydrogène et le dioxyde de carbone jouent donc des rôles importants dans le déroulement de la digestion anaérobie par voie sèche, pour des teneurs en matière sèche élevées.

---

**MOTS- CLES**

---

Digestion anaérobie par voie sèche, transfert de matière, inhibition par l'hydrogène, dioxyde de carbone

---

**EXTENDED ABSTRACT:**

**IMPACT OF DISSOLVED GAS ON DRY ANAEROBIC DIGESTION OF LIGNOCELLULOSIC  
RESIDUES**

---

Anaerobic digestion is a way of converting organic matter using microorganisms, into energy as biogas, consisting of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> and a digestate that can be used as an amendment and fertilizer for soils. Anaerobic digestion is a complex process involving many biological reactions produced by complex microbial communities. The biological reactions can be simplified into 4 main biological steps: (1) hydrolysis, wherein the organic material is hydrolyzed into soluble monomers and oligomers with extracellular enzymes, (2) acidogenesis where the amino acids, sugars and fatty acids obtained during the hydrolysis are converted into volatile fatty acids (VFAs) such as acetate, organic acids and alcohols, (3) acetogenesis where VFAs (except acetate) are converted into acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> and (4) methanization when acetate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are converted into CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Dry anaerobic digestion is defined by a total solid content over 15%. This process is both advantageous (decrease of the need of water and energy) and disadvantageous (higher heterogeneity of the medium and inhibition beyond 30% of total solids). This inhibition is due to the decrease of the gas-liquid transfer, which will increase local concentrations of dissolved gases and may inhibit the anaerobic digestion.

The objective of this thesis was to study the impact of dissolved gases during solid-state anaerobic digestion at microscopic and mesoscopic scales. First, a study investigated the effect of dissolved gases (hydrogen and carbon dioxide) at the local scale, during dry anaerobic digestion, without the effect of mass transfer (diffusion and gas-liquid transfer), which may be limiting. A second study investigated the effect of dissolved gases at the mesoscopic scale during dry anaerobic digestion, taking in count the limitation of mass transfers. Indeed, the decrease of mass transfers and the presence of concentration gradients of dissolved molecules were studied, with also the effect of the accumulation of dissolved gases with a decrease of the gas-liquid transfer in the medium.

Indeed, at microscopic scale, a thin layer of medium was used during the experiments, to test the effects of dissolved gases without the limiting effect of diffusion and gas-liquid transfer. During these studies, the effect of hydrogen and carbon dioxide on dry anaerobic digestion at the local scale was studied. Hydrogen is an inhibitor of the hydrolysis step during dry anaerobic digestion over 780 mbars. Moreover, carbon dioxide alone increased the methane production rate without any effect on other reactions. The inhibition of the hydrolysis step by hydrogen did not happen when carbon dioxide was added at the same time and this inhibition was reversible when carbon dioxide was added, with remaining inhibitory effect on acetate degradation and the methanogenesis. At the mesoscopic scale, when gas-liquid transfers are limiting, the hydrolysis step was inhibited, due to dissolved hydrogen, with a concentration gradient in the medium, visible by a concentration gradient of VFAs. Moreover, adding carbon dioxide when gas-liquid transfers are limiting, increased the VFAs concentration and decreased the pH, which inhibited the methane production. Indeed, carbon dioxide seems to be responsible of the inhibition of anaerobic digestion for a high total solid content. Hydrogen and carbon dioxide have a high impact on the performances of anaerobic digestion for a high total solid content.

---

**KEYWORDS**

---

Solid-state anaerobic digestion, mass transfer, hydrogen inhibition, dioxide de carbone

---

## REMERCIEMENTS

---

Voici maintenant les remerciements, qui ont sans doute été la partie la plus difficile à rédiger et qui est une part importante de ma thèse. En effet, sans les personnes citées ici, je n'aurais pas pu accomplir autant de choses en trois ans !

Je tiens à remercier Renaud Escudié, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé pendant ma thèse. Merci pour ta disponibilité, l'autonomie que tu m'a laissé ainsi que les conseils que tu m'as donné. Je te remercie aussi pour le temps pris pour discuter de mes résultats, ainsi que pour la relecture de mes écrits.

Je tiens aussi à remercier Eric Trably, mon co-encadrant de thèse. Merci pour ta rigueur scientifique et ton point de vue souvent différent du mien (toujours plus positif) ! Merci pour ces discussions, parfois prises de têtes mais qui m'ont permis de progresser en tant que chercheur, en améliorant ma manière de penser et ma vision des choses.

Un grand merci aux membres du jury de thèse : Denis Bouyer de l'Université de Montpellier, Pierre Buffière de l'INSA de Lyon et André Pauss de l'Université de Technologie de Compiègne, pour leurs investissements dans la correction et l'évaluation de mon travail. Merci également aux scientifiques ayant participé aux comités de thèse : Pierre Fontanille de Polytech' Clermont-Ferrand, Hassen Benbelkacem de l'INSA de Lyon, Claire Dumas du LISBP, Nicolas Bernet et Philippe Delgenès du LBE, pour vos conseils et vos implications dans ma thèse. Merci aussi à l'ADEME pour le financement de ma thèse et en particulier à Guillaume Bastide pour le suivi de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier les techniciens qui m'ont aidé pendant ma thèse. Je remercie donc Gaëlle Gevaudan pour les analyses microbiologiques de cette thèse et surtout pour ta patience lorsque j'essayais d'expliquer mes expériences et mes nombreuses annotations et questions. Je tiens aussi à remercier Guillaume Guizard pour la conception et la fabrication de la cellule de diffusion, ainsi que pour son aide lors de la recherche des fuites de gaz !

Merci aussi à Eric Latrille et Julie Jimenez pour leur aide lors de la modélisation, et leur patience malgré mes nombreuses questions sur Gompertz, R, l'ADM1 et les ANOVA...

Merci à Jean-Philippe Steyer pour la direction du LBE qui le rend assez accueillant et qui laisse la place aux doctorants de s'épanouir. Merci aussi pour ton écoute pour ces questions ne portant pas sur ma thèse mais souvent pour l'après-thèse.

Je remercie aussi ceux avec qui j'ai passé de bons moments au labo mais aussi en dehors : Violette, Elsa, Quentin, Alice, Wendy, Diane, Thibault, Lucille, Marie-Lou, Cyrille, Gabriel, Angel, Amandine, Géraldine...et à tout le personnel du LBE, doctorants, post-doctorant et stagiaires durant ces trois dernières années.

Cette thèse n'aurait jamais eu lieu sans le soutien de ma famille. Je tiens donc à remercier mes parents, Martine et Olivier Cazier, pour leur soutien dans mes études, ainsi que leur écoute lors de mes discours enflammés sur ma thèse (et surtout sur les problèmes), même si la compréhension était parfois difficile ! Je tiens à remercier mon frère, Nicolas Cazier, à qui je peux parler des problèmes de thèse sans problème même si les lasers sont assez éloignés de la méthanisation ! Je tiens aussi à remercier mes grands-parents Odette et Michel Cazier, Michelle et Pierre Perrot, avec

un remerciement particulier pour ma grand-mère Michelle, professeur de biologie, qui a éveillé mon goût pour la science et en particulier la biologie lors des vacances d'été, en regardant son sang au microscope !

Je tiens aussi à remercier mes amies, Anne Quélin, Louise Routier, Déborah Vidal, ainsi que celles qui ont été dans le même cas que moi (vive la thèse), Nadège Durban et Odrade Nougé pour leur soutien pendant ces trois ans ! Merci aussi pour votre écoute lorsque je vous parlais de ma thèse (même si cela ne vous parlait pas du tout) ! Une pensée pour Gwladys Bahri, j'aurais aimé que tu sois là.

---

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>- 1 -</b>
<b>CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1.1 FILIERES DE VALORISATION DES DECHETS EN EUROPE</b>	<b>- 4 -</b>
1.1.1 FILIERES DE VALORISATION DES DECHETS ET SPECIFICITES DE LA VALORISATION DES DECHETS LIGNO-CELLULOSIQUES EN EUROPE	- 4 -
1.1.1.1 Filières de valorisation des déchets en Europe	- 4 -
1.1.1.2 Part des résidus ligno-cellulosiques parmi les déchets organiques en Europe	- 7 -
1.1.1.3 Filières de valorisation des déchets ligno-cellulosiques	- 8 -
1.1.2 PAILLE DE BLE : SUBSTRAT MODELE DES DECHETS LIGNO-CELLULOSIQUES	- 9 -
1.1.2.1 Structure moléculaire de la paille de blé	- 10 -
1.1.2.1.1 Cellulose	- 11 -
1.1.2.1.2 Hémicelluloses	- 12 -
1.1.2.1.3 Lignines	- 14 -
1.1.2.2 Hétérogénéité de la paille de blé	- 17 -
1.1.2.2.1 Influence de la structure macroscopique de la paille de blé	- 17 -
1.1.2.2.2 Influence de la structure moléculaire de la paille de blé	- 18 -
1.1.3 CONCLUSION SUR LES DECHETS	- 19 -
<b>1.2 PRINCIPES DE LA DIGESTION ANAEROBIE</b>	<b>- 21 -</b>
1.2.1 REACTIONS MICROBIOLOGIQUES	- 21 -
1.2.1.1 Hydrolyse	- 22 -
1.2.1.2 Acidogénèse	- 22 -
1.2.1.3 Acétogénèse	- 23 -
1.2.1.4 Méthanogénèse	- 24 -
1.2.2 PARAMETRES INFLUENÇANT LA DIGESTION ANAEROBIE	- 25 -
1.2.2.1 Température	- 25 -
1.2.2.2 pH	- 26 -
1.2.2.3 Inoculation	- 27 -
1.2.3 INHIBITEURS DE LA DIGESTION ANAEROBIE	- 28 -
1.2.3.1 Acides gras volatils	- 28 -
1.2.3.2 Hydrogène	- 29 -
1.2.3.3 Dioxyde de carbone	- 30 -
1.2.3.4 Autres inhibiteurs	- 31 -
1.2.4 CONCLUSION SUR LA DIGESTION ANAEROBIE	- 32 -
<b>1.3 SPECIFICITE DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE</b>	<b>- 33 -</b>
1.3.1 PLACE DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE DANS L'INDUSTRIE	- 34 -
1.3.1.1 Procédés industriels de digestion anaérobie par voie sèche	- 34 -
1.3.1.2 Développement industriel de la digestion anaérobie par voie sèche	- 38 -
1.3.2 PARAMETRES-CLES OPERATOIRES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE	- 39 -
1.3.2.1 Teneur en matière sèches	- 40 -
1.3.2.2 Taille des particules	- 41 -



1.3.2.3	Transferts de matières	- 43 -
1.3.2.3.1	Convection	- 43 -
1.3.2.3.2	Diffusion	- 44 -
1.3.2.3.3	Transfert gaz-liquide	- 44 -
1.3.2.3.4	Hypothèses de structuration spatiale de la digestion anaérobie par voie sèche	- 47 -
1.3.3	MICROORGANISMES DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE	- 49 -
1.3.4	CONCLUSION SUR LA SPECIFICITE DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE	- 50 -
<b>1.4</b>	<b>CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>- 51 -</b>

---

**CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES** **- 53 -**

<b>2.1</b>	<b>CARACTERISATION DU SUBSTRAT ET DE L'INOCULUM</b>	<b>- 54 -</b>
2.1.1	MESURE DU POURCENTAGE DE MS ET DE MV	- 54 -
2.1.2	PREPARATION DE L'INOCULUM	- 54 -
2.1.3	MESURE DE L'AZOTE (NTK)	- 54 -
2.1.4	PRETRAITEMENT DE LA PAILLE DE BLE	- 55 -
<b>2.2</b>	<b>DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX</b>	<b>- 56 -</b>
2.2.1	EHELLE MICROSCOPIQUE: TESTS EN COUCHE MINCE	- 56 -
2.2.1.1	Conditions expérimentales	- 56 -
2.2.1.2	Ajout de l'hydrogène et du dioxyde de carbone en couche mince en début d'expérience	- 57 -
-		
2.2.2	EHELLE MESOSCOPIQUE : TESTS EN COUCHE EPAISSE	- 58 -
2.2.2.1	Conditions expérimentales de l'étude de la digestion anaérobie en voie sèche à échelle mésoscopique	- 58 -
2.2.2.2	Conditions expérimentales de l'effet des gaz à l'échelle mésoscopique en digestion anaérobie par voie sèche	- 59 -
<b>2.3</b>	<b>MESURES DES PARAMETRES GLOBAUX</b>	<b>- 61 -</b>
2.3.1	MESURES DES GAZ PAR $\mu$ CPG	- 61 -
2.3.2	MESURES DES GAZ PAR CPG	- 61 -
2.3.3	ANALYSE DES ECHANTILLONS DE MILIEU	- 62 -
2.3.3.1	Mesure des métabolites, des sucres solubles et du pH	- 62 -
2.3.3.2	Analyses microbiologiques	- 63 -
2.3.3.2.1	Echantillonnage	- 64 -
2.3.3.2.2	Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)	- 64 -
2.3.3.2.3	Profils des communautés microbiennes	- 66 -
2.3.3.2.4	PCR quantitative (qPCR)	- 66 -
2.3.3.2.5	Séquençage	- 67 -
<b>2.4</b>	<b>ANALYSES STATISTIQUES</b>	<b>- 68 -</b>
2.4.1	ANALYSES DE VARIANCES (ANOVA)	- 68 -
2.4.2	ANALYSES EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP)	- 68 -

---

**CHAPITRE 3: INFLUENCE DES GAZ DISSOUS SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE A L'EHELLE MICROSCOPIQUE** **- 69 -**

<b>3.1 BIOMASS HYDROLYSIS INHIBITION AT HIGH HYDROGEN PARTIAL PRESSURE IN SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION</b>	<b>- 72 -</b>
3.1.1 AVANT-PROPOS	- 72 -
3.1.2 ABSTRACT	- 73 -
3.1.3 INTRODUCTION	- 73 -
3.1.4 MATERIALS AND METHODS	- 75 -
3.1.4.1 Substrate preparation	- 75 -
3.1.4.2 Operating conditions of the batch tests	- 75 -
3.1.4.3 Analytical methods	- 76 -
3.1.4.4 Data analysis	- 77 -
3.1.5 RESULTS AND DISCUSSION	- 78 -
3.1.5.1 Impact of high $P_{H_2}$ on methanogenesis	- 78 -
3.1.5.2 Effect of adding $CO_2$ with $H_2$ on solid state AD	- 83 -
3.1.6 CONCLUSION	- 85 -
3.1.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL	- 86 -
3.1.7.1 Effect of $P_{H_2}$ on Bacteria and Archaea communities	- 86 -
3.1.7.2 Effect of $P_{H_2}$ on the cumulated $CH_4$ production, substrate degradation and remaining $H_2$ and $CO_2$ (Standard deviation and ANOVA)	- 89 -
3.1.8 RESULTATS MAJEURS	- 91 -
<b>3.2 REVERSIBILITY OF HYDROLYSIS INHIBITION BY HYDROGEN PARTIAL PRESSURE IN SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION</b>	<b>- 92 -</b>
3.2.1 AVANT-PROPOS	- 92 -
3.2.2 ABSTRACT	- 92 -
3.2.3 INTRODUCTION	- 93 -
3.2.4 MATERIALS AND METHODS	- 94 -
3.2.4.1 Substrate	- 94 -
3.2.4.2 Operating conditions of the batch tests	- 94 -
3.2.4.3 Analytical methods	- 95 -
3.2.4.4 Data analysis	- 95 -
3.2.5 RESULTS AND DISCUSSION	- 96 -
3.2.5.1 Impact on methanogenesis	- 96 -
3.2.5.2 Impact of $P_{H_2}$ on metabolites production	- 99 -
3.2.5.3 Impact on the overall substrate degradation	- 101 -
3.2.6 CONCLUSION	- 103 -
3.2.7 RESULTATS MAJEURS	- 104 -
<b>3.3 L'EFFET DU DIOXYDE DE CARBONE SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE A L'ECHELLE MICROSCOPIQUE-</b>	<b>105 -</b>
3.3.1 AVANT-PROPOS	- 105 -
3.3.2 INTRODUCTION	- 105 -
3.3.3 RESULTATS ET DISCUSSIONS	- 106 -
3.3.4 CONCLUSION	- 108 -
<b>3.4 DISCUSSION DU CHAPITRE 3</b>	<b>- 109 -</b>
3.4.1 HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA PAILLE DE BLE	- 110 -
3.4.2 EFFETS DIFFERENTS DE LA $P_{H_2}$ SUR LES MICROORGANISMES DANS UN ECOSYSTEME COMPLEXE	- 112 -
3.4.3 DE L'ECHELLE MICROSCOPIQUE A L'ECHELLE MACROSCOPIQUE	- 113 -

<b>3.5 CONCLUSION DU CHAPITRE 3</b>	<b>- 116 -</b>
-------------------------------------	----------------

---

<b>CHAPITRE 4: INFLUENCE DES GAZ DISSOUS SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE A L'ECHELLE MESOSCOPIQUE</b>	<b>- 119 -</b>
---	----------------

---

<b>4.1 METABOLITES GRADIENT IN SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION OF WHEAT STRAW</b>	<b>- 121 -</b>
4.1.1 AVANT-PROPOS	- 121 -
4.1.2 ABSTRACT	- 122 -
4.1.3 INTRODUCTION	- 122 -
4.1.4 MATERIALS AND METHODS	- 124 -
4.1.4.1 Substrate	- 124 -
4.1.4.2 Operational conditions of the batch reactors	- 124 -
4.1.4.3 Analytical methods	- 125 -
4.1.4.4 Data analysis	- 126 -
4.1.5 RESULTS AND DISCUSSION	- 126 -
4.1.5.1 Effect of reactor configuration on the performance of solid-state anaerobic digestion	- 126 -
4.1.5.2 Spatial distribution of VFAs	- 129 -
4.1.6 CONCLUSION	- 133 -
4.1.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL	- 133 -
4.1.7.1 Profiles of the Bacteria and Archaea communities'	- 133 -
4.1.7.2 Cumulated CO <sub>2</sub> production	- 137 -
4.1.8 RESULTATS MAJEURS	- 138 -
<b>4.2 INFLUENCE DE L'HYDROGENE ET DU DIOXYDE DE CARBONE SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE DE LA PAILLE DE BLE</b>	<b>- 139 -</b>
4.2.1 INTRODUCTION	- 139 -
4.2.2 RESULTATS ET DISCUSSION	- 139 -
4.2.2.1 Effet de l'ajout d'N <sub>2</sub> et d'H <sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche	- 139 -
4.2.2.2 Effet de l'ajout du CO <sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche	- 143 -
4.2.3 CONCLUSION	- 145 -
<b>4.3 DISCUSSION DU CHAPITRE 4</b>	<b>- 146 -</b>
4.3.1 LES GAZ DISSOUS LORS DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE: DE L'ECHELLE MICROSCOPIQUE A L'ECHELLE MESOSCOPIQUE.	- 147 -
4.3.2 LE ROLE DU TRANSFERT DE MATIERE LORS DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE.	- 150 -
<b>4.3.3 EFFET DE L'AGITATION SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE</b>	<b>- 151 -</b>
<b>4.3.4 INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE L'INOCULUM SUR LA DIGESTION ANAEROBIE</b>	<b>- 152 -</b>
<b>4.4 CONCLUSION DU CHAPITRE 4</b>	<b>- 153 -</b>

---

<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>- 155 -</b>
------------------------------------	----------------

---

<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>- 159 -</b>
-------------------	----------------

---

---

## Table des figures

---

Figure 1-1 : Valorisation des déchets en Europe en 2012 en % .	- 4 -
Figure 1-2 : Part de l'énergie renouvelable provenant du biogaz en Europe de 2002 à 2013.	- 5 -
Figure 1-3 : Valorisation des déchets en France en 2008 en % .	- 6 -
Figure 1-4 : Pourcentage de production des déchets en Europe en 2008 par type de déchets.	- 7 -
Figure 1-5 : Filières de valorisations possibles des déchets ligno-cellulosiques.	- 9 -
Figure 1-6 : Comparaison de la composition de différents déchets ligno-cellulosiques avec en rouge l'emplacement des pailles dont la paille de blé.	- 10 -
Figure 1-7 : Molécule de cellulose avec la liaison glycosidique en $\beta$ -1,4 selon la représentation de Fisher.	- 11 -
Figure 1-8 : Principaux monomères constituant les hémicelluloses des parois végétales.	- 13 -
Figure 1-9 : Structures des hémicelluloses les plus courantes dans la paille de céréales.	- 14 -
Figure 1-10 : Structure des proto-lignines.	- 15 -
Figure 1-11 : Modèle de structure de la lignine.	- 16 -
Figure 1-12 : Complexe lignine/phénolique-carbohydrate (LCC), dans la paille de blé.	- 16 -
Figure 1-13 : Schéma simplifié de la digestion anaérobie.	- 22 -
Figure 1-14 : Evolution des énergies libres standards des réactions de la digestion anaérobie en fonction de la pression partielle en $H_2$	- 30 -
Figure 1-15 : Digesteur de type VALORGA	- 34 -
Figure 1-16: Digesteur de type DRANCO	- 35 -
Figure 1-17 : Digesteur de type KOMPOGAS	- 35 -
Figure 1-18 : Digesteur de type LARAN	- 36 -
Figure 1-19 : Digesteur de type BEKON	- 36 -
Figure 1-20 : Evolution de la digestion anaérobie par voie sèche et humide de 1991 à 2011 en Europe.	- 38 -
Figure 1-21 : Evolution du nombre de travaux de recherche sur la digestion anaérobie par voie sèche.	- 39 -
Figure 1-22 : Importance du $k_1a$ dans la production de $CH_4$ cumulée pour du carton broyé pour 30% de MS.	- 45 -
Figure 1-23 : Expérience de variation de surface spécifique d'échange.	- 46 -
Figure 1-24 : Modèle de biofilm.	- 48 -
Figure 1-25: Modèle de zone d'hydrolyse et de méthanisation.	- 48 -
Figure 2-1 : Schéma de fonctionnement d'un broyeur à couteaux.	- 55 -
Figure 2-2 : Conditions expérimentales des tests en couche mince.	- 57 -
Figure 2-3 : Dispositif expérimental de l'étude de la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique.	- 59 -
Figure 2-4 : Dispositif expérimental pour tester l'effet des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche ( $H_2$ et $CO_2$ ) à l'échelle mésoscopique	- 60 -
Figure 2-5 : Photo du micro-chromatographe en phase gazeuse multiplexé.	- 61 -
Figure 2-6 : Schéma de l'analyse des échantillons.	- 62 -
Figure 2-7 : Exemple de profil CE-SSCP.	- 66 -
Figure 3-1 : Schéma des mécanismes biologiques et de transfert de masse liés au gaz dissous au sein d'une matrice lors de la digestion anaérobie par voie sèche	- 70 -

- Figure 3-2: Anaerobic digestion performances on wheat straw at 25% of TS according to the initial  $H_2$  partial pressure in headspace (in mbars), expressed in terms of (1.A) cumulative  $CH_4$  production (in  $mL_{CH_4}/g_{TS}$ ), or (1.B) substrate degradation (in  $g_{COD}/g_{TS}$ ) - 79 -
- Figure 3-3 : Volatile Fatty Acids accumulation at the end of the experiment (in  $g_{COD}/g_{TS}$ ) according to initial partial pressure of  $H_2$ , at 25% TS, 35°C and pH 8. - 80 -
- Figure 3-4: Final partial pressure of  $CO_2$  ( $P_{CO_2}$ ) and  $H_2$  ( $P_{H_2}$ ) according to the initial partial pressure of  $H_2$  (in mbars), at 25% TS, 35°C and pH 8. Final  $P_{CO_2}$  and  $P_{H_2}$  in the headspace are represented with white circles and dark circles, respectively. - 81 -
- Figure 3-5 : Microbial community composition at Order level of the archaeal community, in the inoculum (Initial), in the control (0 mbars) and at 1 020 mbars of  $H_2$ , with 25% of totals solids, 35°C and pH 8. - 82 -
- Figure 3-6: Final product accumulation (gas and metabolites) (in mol per g of initial TS) according to the initial partial pressure of  $H_2$  (on the first line) and  $CO_2$  (on the second line) (in mbars) at 25% TS, 35°C and pH 8. - 83 -
- Figure 3-7 : Bacterial communities from CE-SSCP profiles. T0 is the profile before adding  $H_2$ . The  $P_{H_2}$  is expressed in mbars. - 87 -
- Figure 3-8: Archaeal communities from CE-SSCP profiles. T0 is the profile before adding  $H_2$ . The  $P_{H_2}$  is expressed in mbars. - 88 -
- Figure 3-9: Concentration of 16S rRNA genes copies of Archaea/ g of substrate, represented by white circles and 16S rRNA genes copies of Bacteria/ g of substrate represented by dark circles, according to the partial pressure of hydrogen initial in mbars - 89 -
- Figure 3-10: Cumulative  $CH_4$  production in  $ml/g_{TS}$  according to time in day for 0, 746 and 1 020 mbars of  $H_2$  at 25% of TS, 35°C and pH 8. - 90 -
- Figure 3-11: Cumulative methane production (in  $mL_{CH_4}\cdot g_{TS}^{-1}$ ), for reactors without adding gases (Control), with  $H_2$  initially added and mixed with  $CO_2$  at 11 and 18 days. - 96 -
- Figure 3-12 : Cumulative methane production (in  $mL_{CH_4}\cdot g_{TS}^{-1}$ ) according to the time after  $CO_2$  addition (in days), for the reactors with  $H_2$  mixed with  $CO_2$  after 11 and 18 days of operation. - 98 -
- Figure 3-13: Metabolites production (in  $mg_{COD}\cdot g_{TS}^{-1}$ ) according to the time of operation in the control (only  $N_2$  initially in headspace), and according to the time after  $CO_2$  addition after 11 and 18 days of operation of the reactors running at high  $P_{H_2}$ . - 100 -
- Figure 3-14 : Substrate degradation in  $mg_{COD}\cdot g_{TS}^{-1}$ , according to the time after adding  $CO_2$  ( $CO_2$  added at 11 and 18 days) and since the beginning (control) - 102 -
- Figure 3-15: Schéma de synthèse du Chapitre 3: Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique. - 110 -
- Figure 3-16 : Hypothèse de l'effet des gaz dissous lors de la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle macroscopique. - 115 -
- Figure 4-1: Experimental design (tubes) to analyze the composition of metabolites and microorganisms every 7 mm in the medium during anaerobic digestion at 25% of TS content, 35°C and pH 8. - 125 -
- Figure 4-2: Cumulated methane production in  $ml\cdot g_{TS}^{-1}$  in tubes (a 4.2 cm thick layer of medium) and flasks (a layer of medium < 1cm) during 33 days at 25% TS, 35°C and pH 8.5 - 128 -
- Figure 4-3: Total substrate degradation in  $g_{COD}\cdot kg_{TS}^{-1}$  in tubes ( a 4.2 cm thick layer of medium) and flasks (a layer of medium < 1cm) at 8, 20 and 33 days of anaerobic digestion at 25% of TS content, 35°C and pH 8. - 128 -
- Figure 4-4: Metabolites concentration in  $g_{COD}\cdot kg_{TS}^{-1}$  every 7 mm in the medium in the tubes with 0 corresponding to the surface near the headspace at 8, 20 and 33 days of anaerobic digestion at 25% of TS content, 35°C and pH 8. - 130 -
- Figure 4-5: Bacteria communities from CE-SSCP profiles at 20 days. The distance from the headspace is expressed in mm - 134 -

Figure 4-6: Bacteria communities from CE-SSCP profiles at 33 days. The distance from the headspace is expressed in mm.	- 135 -
Figure 4-7: Archaea communities from CE-SSCP profiles at 20 days. The distance from the headspace is expressed in mm	- 136 -
Figure 4-8: Archaea communities from CE-SSCP profiles at 33 days. The distance from the headspace is expressed in mm	- 137 -
Figure 4-9 : Cumulated $CO_2$ production in $ml.g_{TS}^{-1}$ in tubes (a 4.2cm thick layer of medium) and flasks (a layer of medium < 1cm) during 33 days at 25% TS, 35°C and pH 8.5	- 138 -
Figure 4-10 : Production cumulée de $CH_4$ au cours du temps selon les différents gaz ajoutés ( $H_2$ , $N_2$ et $CO_2$ ) en $ml_{CH_4}.g_{MS}^{-1}$	- 140 -
Figure 4-11 : Concentration des métabolites en $g_{DCO}.kg_{MS}^{-1}$ et le pH au cours du temps selon les différents gaz ajoutés ( $N_2$ , $H_2$ et $CO_2$ ) à 9, 18 et 28 jours.	- 141 -
Figure 4-12 : Dégradation totale du substrat en $g_{DCO}.kg_{MS}^{-1}$ selon les différents gaz ajoutés ( $N_2$ , $H_2$ et $CO_2$ ) à 9, 18 et 28 jours.	- 142 -
Figure 4-13 : Schéma de synthèse du chapitre 4 : Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique . Rapport des effets de l' $H_2$ et du $CO_2$ sur la digestion anaérobie à l'échelle mésoscopique.	- 146 -

## Table des tables

Table 1-1 : Différence de composition moléculaire et de BMP en fonction de l'organe de la paille de blé.	- 17 -
Table 1-2: Evolution du rendement de production du $CH_4$ en $ml_{CH_4}.g_{MV}^{-1}$ en fonction de la maturité du blé, pour deux types de blé.	- 18 -
Table 1-3: Caractéristiques moyennes des pailles de blé.	- 18 -
Table 1-4: Réactions principales d'acidogenèse et leurs enthalpies libres de réaction à 25°C à partir du glucose à pH 7.	- 23 -
Table 1-5: Réactions principales d'acétogenèse et d'homoacétogenèse et leurs enthalpies libres de réaction à 25°C et pH 7.	- 24 -
Table 1-6 : Avantages et inconvénients de la digestion anaérobie par voie sèche et voie humide.	- 33 -
Table 1-7 : Comparaison des différents réacteurs industriels les plus courants.	- 37 -
Table 2-1: Pressions partielles en hydrogène ( $P_{H_2}$ ) et/ou de dioxyde de carbone testés lors des expériences à l'échelle microscopique.	- 58 -
Table 2-2 : Procédure des analyses microbiologiques.	- 63 -
Table 2-3 : Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN.	- 65 -
Table 2-4 : Solutions d'amplifications utilisées pour les bactéries et les archées.	- 65 -
Table 2-5 : Conditions d'amplification par PCR pour les bactéries et les archées en utilisant un Mastercycler thermal cyler (Eppendorf).	- 65 -
Table 2-6 : Amorces pour la qPCR.	- 67 -
Table 3-1 : Gas partial pressure investigated in different runs	- 76 -
Table 3-2 : Final substrate degradation (in g COD per g of initial TS) according to the initial partial pressure of $H_2$ and $CO_2$ (in mbars).	- 84 -
Table 3-3: p-value of ANOVA, comparing the similarity between the substrate degradation depending on the variation of $P_{H_2}$ at 25% of TS, 35°C and pH 8.	- 90 -
Table 3-4: Mean and standard deviation of the cumulative $CH_4$ production, remaining $CO_2$ and $H_2$ in the headspace at the end of the experiment and substrate degradation depending on the variation of $P_{H_2}$ at 25% of TS, 35°C and pH 8.	- 91 -

<i>Table 3-5 : Cumulated CH<sub>4</sub> production, time and CH<sub>4</sub> production rate with standard deviations for the different phases, for the control (without gas added) and when the CO<sub>2</sub> was added at 11 and 18 days.</i>	- 97 -
<i>Table 3-6 : Production de CH<sub>4</sub> et AGVs (en ml<sub>CH4</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> and g<sub>DCO</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> respectivement), CO<sub>2</sub> restant (en mL<sub>CO2</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) et dégradation du substrat(en g<sub>DCO</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) à 13 jours selon la pression partielle initiale de CO<sub>2</sub> (en mbars).</i>	- 106 -
<i>Table 3-7 : Hypothèses de fonctionnement de l'hydrolyse pour la digestion anaérobie, d'après <sup>(1)</sup>Batstone et al.,(2002); <sup>(2)</sup>Gianfreda and Rao,(2004); <sup>(3)</sup>Malherbe and Cloete, (2002); <sup>(4)</sup>Subramaniyan and Prema, (2002); <sup>(5)</sup>Zhang and Lynd, (2004),</i>	- 111 -
<i>Table 3-8 : Enzymes dégradant les composés des résidus ligno-cellulosiques, d'après Brulé, (2014)</i>	- 112 -
<i>Table 3-9 : Equations de l'utilisation du bicarbonate par les microorganismes lors de la digestion anaérobie.</i>	- 114 -
<i>Table 3-10 : Synthèse des résultats du chapitre 3</i>	- 117 -
<i>Table 4-1: Free reaction enthalpies for the production of propionate from H<sub>2</sub> and the consumption of propionate and H<sub>2</sub> to produce acetate (De Bok et al., 2004; Thauer et al., 1977)</i>	- 131 -
<i>Table 4-2 : Similarités (p-value) par ANOVA pour la production cumulée de CH<sub>4</sub> et la dégradation de substrat à 9, 18 et 28 jours pour l'ajout de N<sub>2</sub>, de H<sub>2</sub></i>	- 140 -
<i>Table 4-3 : Similarités (p-value) par ANOVA pour la dégradation de substrat et la concentration en métabolites à 9, 18 et 28 jours pour les deux groupes de CO<sub>2</sub> (Différent pour une p-value&lt; 0,05 et similaire pour une p-value&gt;0,05)</i>	- 143 -
<i>Table 4-4 : Hypothèses de fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche selon les concentrations locales d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>.</i>	- 148 -
<i>Table 4-5 : Synthèse des résultats du chapitre 4</i>	- 154 -
<i>Table 1 : Principales formes d'inhibitions rencontrées pour la modélisation de la digestion anaérobie dans ADM1.</i>	- 156 -

## TABLE DES ABREVIATIONS

Abréviations dans les parties en français		Unités de dimension	Abréviations dans les parties en anglais	
%H <sub>2</sub>	Pourcentage total en hydrogène			
%H <sub>2i</sub>	Pourcentage en hydrogène après ajout de l'hydrogène la 1 <sup>ère</sup> fois			
%N <sub>2i</sub>	Pourcentage en azote après ajout de l'hydrogène la 1 <sup>ère</sup> fois			
μCPG	Micro-chromatographe en phase gazeuse multiplexé		μGC	Micro- Gas chromatography
μTCD	Micro-catharomètre détecteur à conductivité thermique			
6FAM	6-Carboxyfluoresceine (Marqueur fluorescent de l'ADN)		6FAM	6-Carboxyfluorescein
a	Surface spécifique d'échange	[L] <sup>2</sup> . [L] <sup>-3</sup>		
ACP	Analyse en Composantes Principales		PCA	Principal component analysis
			A <sub>CH<sub>4</sub>,f</sub>	Final amount of CH <sub>4</sub> accumulated in headspace
			A <sub>GC</sub>	Total amount of gas (H <sub>2</sub> and CH <sub>4</sub> ) sampled for analyses
AGVs	Acides Gras Volatils		VFAs	Volatils Fatty Acids
		[M]. [M] <sup>-1</sup>	A <sub>H<sub>2</sub>,f</sub>	Final amount of H <sub>2</sub> remaining in headspace
		[M]. [M] <sup>-1</sup>	A <sub>H<sub>2</sub>,i</sub>	Amount of H <sub>2</sub> initially added
		[M]. [M] <sup>-1</sup>	A <sub>met,i</sub>	Initial amount of metabolites in the medium
		[M]. [M] <sup>-1</sup>	A <sub>met,f</sub>	Final amount of metabolites
ANOVA	Analyse de la variance		ANOVA	Analysis of variance
B	Molécule de diffusion			
BMP	Potentiel Biochimique de Méthane.	[L] <sup>3</sup> . [M] <sup>-1</sup>	BMP	Biochemical methane potential
C <sub>B</sub>	Concentration du composé B	[M].[L] <sup>-3</sup>		
CE-SSCP			CE-SSCP	Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism
CPG	Chromatographie en phase gazeuse		GC	Gaz chromatography
CSTR			CSTR	Continuous stirred-tank reactor
D	Coefficient de diffusion	[L] <sup>2</sup> . [T] <sup>-1</sup>		
DA	Digestion anaérobie		AD	Anaerobic digestion
Da	Dalton			
DCO	Demande chimique en oxygène		COD	Chemical oxygen demand



Abréviations dans les parties en français		Unités de dimension	Abréviations dans les parties en anglais	
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide			
Fd	FerreDoxine			
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance		HPLC	High Performance liquid chromatograph
j	Flux massique	$[M]. [L]^{-2}. [T]^{-1}$		
Ka	Constante d'acidité			
k <sub>L</sub>	Coefficient de transfert de matière local			
k <sub>La</sub>	Coefficient de transfert de masse volumique	$[T]^{-1}$		
LCC	Complexe lignine/phénolique-carbohydrate			
MS	Matières Sèches %		TS	Total solids
MV	Matières Volatiles %		VS	Volatil solids
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide			
NTK	Azote total Kjeldahl	$[M]. [L]^{-3}$		
o	Ortho-position			
p	Para-position			
P°	Pression atmosphérique	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
P <sub>CO2</sub>	Pression partielle en dioxyde de carbone	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
PCR			PCR	Polymerase Chain Reaction
P <sub>H2</sub>	Pression partielle en hydrogène	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
P <sub>H2i</sub>	Pression partielle en hydrogène après le 1 <sup>er</sup> ajout en hydrogène	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
P <sub>N2i</sub>	Pression partielle en azote après le 1 <sup>er</sup> ajout de l'hydrogène	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
P' <sub>N2i</sub>	Pression partielle en azote après le flushage	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
P' <sub>o</sub>	Pression après flushage de la fiole (avant le 2 <sup>ième</sup> ajout d'hydrogène)	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
P <sub>i</sub>	Pression totale après le 1 <sup>er</sup> ajout de l'hydrogène	$[M]. [L]^{-1}. [T]^{-2}$		
qPCR			qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R	Constante des gaz parfaits			
S	Concentration du substrat	$[M]. [L]^{-3}$		
S <sub>1</sub> ou S <sub>2</sub>	Surface d'échange	$[L]^2$		
ss-AD	Digestion anaérobie par voie sèche		ss-AD	Solid-State Anaerobic Digestion
TAMRA	6-carboxytetramethylrhodamine (marqueur fluorescent de l'ADN)			
UASB			UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UASS			UASS	Upflow Anaerobic Solid State

Abréviations dans les parties en français		Unités de dimension	Abréviations dans les parties en anglais
V	Volume de substrat	$[L]^3$	
X	Concentration en microorganismes	$[M].[L]^{-3}$	
z	Coordonnée spatiale perpendiculaire au support	[L]	
$\Delta G^0$	Energie de Gibbs ou enthalpie libre	$[M].[L]^2.[T]^{-2}$	
$\Delta H^0$	Enthalpie standard	$[M].[L]^2.[T]^{-2}$	

---

## Publications scientifiques

---

**Cazier, E. A.**, Trably, E., Steyer, J. P., & Escudie, R. (2015). Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 190, 106–113. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.055

**Cazier, E.A**, Trably, E., Steyer, J.P., Escudié, R., Reversibility of the hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion by adding carbon dioxide, (*en cours*)

**Cazier, E.A**, Trably, E., Steyer, J.P., Escudié, R., Graduation effect of products during solid-state anaerobic digestion of wheat straws (*en cours*)

---

## Communications internationales

---

**Cazier, E.A**, Trably, E., Steyer, J.P., Escudié, R., Hydrogen inhibition of dry anaerobic digestion of wheat straw. *BiogasScience 2014*, Vienna, 26-30 October 2014

**Cazier, E.A**, Trably, E., Steyer, J.P., Escudié, R., Role of gas accumulation in dry anaerobic digestion of wheat straws, *AD14*, Vina del Mar Chile, 15-18 November 2015

---

# INTRODUCTION

---

De nombreux déchets sont produits par les activités humaines. Afin de limiter l'impact de cette production, leur tri et leur valorisation sont nécessaires. Les possibilités de traitement de ces déchets dépendent de leur nature et composition. Elles correspondent au stockage en Centre de Stockage de Déchets Non Dangereux (CSDND), à l'utilisation de la matière organique pour créer par exemple du papier (pour les déchets ligno-cellulosiques), à leur transformation en amendement organique par compostage ou encore en énergie par digestion anaérobie (méthane) ou par incinération. La digestion anaérobie permet la transformation, à l'aide de microorganismes, de la matière organique en énergie sous forme de biogaz, composé de  $\text{CH}_4$  et de  $\text{CO}_2$  et en matière sous forme d'un digestat qui peut être utilisé comme amendement organique en agriculture. Le biogaz produit peut être utilisé soit pour produire de l'électricité et de la chaleur par cogénération, soit en tant que biocarburant (en étant comprimé à 200 bars pour alimenter un véhicule), soit en étant injecté directement dans les canalisations de gaz naturel après purification.

Les résidus de cultures agricoles et d'élevages sont des déchets potentiellement utilisables en digestion anaérobie. Cependant, les résidus agricoles correspondent souvent à des déchets ligno-cellulosiques secs. Deux problématiques peuvent alors se poser : (1) les déchets ligno-cellulosiques sont composés de lignines, celluloses et hémicelluloses, qui forment une matrice difficile à hydrolyser par voie microbienne notamment par digestion anaérobie ; (2) vu leur teneur élevée en matières sèches, la digestion anaérobie par voie sèche semble être la technologie la mieux adaptée pour la valorisation de ces déchets puisque l'ajout d'eau est moins important qu'en voie humide. Cependant, les performances de la digestion anaérobie par voie sèche restent moins élevées. La digestion anaérobie par voie sèche est généralement définie par une teneur de matières sèches (MS) supérieure à 15%, et elle présente de nombreux avantages mais aussi certaines limitations opérationnelles par rapport à la digestion anaérobie par voie humide. Au niveau industriel, la digestion anaérobie par voie sèche s'est développée de manière relativement empirique avec un certain manque de connaissances sur son fonctionnement et ses limites.

En digestion anaérobie par voie sèche, la diminution de la quantité d'eau disponible dans le milieu amène à la diminution du transport diffusif des molécules dissoutes qui est généralement le mécanisme de transport prépondérant dans ces systèmes. Des observations à la fois expérimentales et numériques ont préalablement amené à des hypothèses de fonctionnement spécifique de la digestion anaérobie par voie sèche. Ainsi, des gradients de concentration des molécules produites lors de l'hydrolyse, comme par exemple des gaz dissous et/ou des AGVs, pourraient résulter de la limitation de leur transport. Ceci pourrait conduire à des conditions hétérogènes comportant différentes zones de réactions et de microorganismes selon les conditions opératoires. Ainsi, des niches de méthanisation, avec un pH neutre et une concentration faible en AGVs pourraient être entourées de niches où l'hydrolyse et l'acidification sont localement plus importantes avec une concentration en AGVs beaucoup plus élevée et un pH plus faible (Martin, 2001; Staley et al., 2011). Dans ces modèles, le transfert de matière joue un rôle important, puisqu'il correspond à la force motrice liée aux gradients de concentration de composés dissous. De plus, les transferts gaz-liquide

peuvent devenir limitant au-delà de 30% de MS, ce qui va augmenter la concentration en gaz dissous du milieu.

Cette thèse a pour ambition d'étudier le rôle des gaz dissous sur les différentes étapes de la digestion anaérobie par voie sèche. Cette étude relie les effets des gaz dissous à l'échelle microscopique (correspondant à l'effet local des gaz dissous sur les performances de la digestion anaérobie, sans l'effet des transferts de matières) jusqu'à leurs effets à l'échelle macroscopique (correspondant à l'effet global des gaz dissous sur les performances de la digestion anaérobie, en prenant en compte l'effet des transferts de matières). Jusqu'à présent, les limites d'inhibition par les sous-produits microbiens, notamment les gaz dissous, ont été le plus souvent déterminées lors d'études sur la digestion anaérobie en voie humide. Identifier le rôle des gaz dissous ( $H_2$  et  $CO_2$ ) sur la digestion anaérobie en voie sèche était donc nécessaire.

La structure de la présente thèse est centrée sur l'échelle des observations. Ainsi, le premier chapitre des résultats de ce doctorat porte sur une étude de l'impact des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique, en étudiant plus précisément les effets inhibiteurs au niveau local de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie et en réduisant le transport diffusif (expérimentation avec une épaisseur de milieu inférieure au cm). Le deuxième chapitre de résultats porte sur une étude de la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique. Le rôle des gaz dissous dans une situation plus réelle (avec en plus les effets de la diffusion et du transfert gaz-liquide) durant la digestion anaérobie par voie sèche a alors été étudié. Ainsi, une première expérience a été réalisée afin de tester si une graduation des AGVs et des microorganismes se mettaient en place lors de la digestion anaérobie en présence d'un transport diffusif limitant, puis si une surconcentration en gaz dissous avait un effet sur les performances à l'échelle mésoscopique.

Ce manuscrit comporte une introduction, une synthèse bibliographique permettant de positionner les objectifs de la thèse dans leur contexte scientifique, une présentation du matériel et méthodes, deux chapitres de résultats et de discussions aux différentes échelles, puis une conclusion générale.

Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'articles scientifiques. Chaque chapitre est donc composé d'un ou deux articles en anglais dont le texte et les figures respectent le format de leur soumission, ainsi qu'un sous-chapitre en français pour des résultats en attente de soumission. Pour faciliter la lecture, chaque chapitre est introduit d'un avant-propos, puis approfondi par une discussion en français. De plus, chaque article en anglais est introduit par un avant-propos puis suivi par un résumé en français des résultats majeurs de l'article.

Ces recherches ont été réalisées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne. La thèse s'intègre principalement au sein de l'objet thématique MaXIP (Matières complexes et Ingénierie des bioProcédés), avec toutefois des échanges importants avec l'objet thématique DIEM (Diversité et Ingénierie des Ecosystèmes Microbiens). Son financement a été assuré conjointement par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) et le département Environnement et Agronomie (EA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

# CHAPITRE 1:

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La digestion anaérobie correspond à la transformation de la matière organique en biogaz à l'aide d'un écosystème microbien complexe. Appliquée au niveau industriel, la digestion anaérobie constitue une technologie centrale dans les filières de valorisation des déchets organiques en France et en Europe. Son développement industriel a augmenté de façon importante ces dernières années suite à une politique européenne actuelle portée sur l'accroissement des énergies renouvelables.

Deux types de technologies existent, définis par la teneur en matières sèches (MS) présente dans le milieu réactionnel : la digestion anaérobie par voie humide (<15% de MS) et par voie sèche (>15% de MS). La digestion anaérobie par voie humide est plutôt adaptée à la valorisation des déchets de type lisier, ou boues de stations d'épuration alors que la digestion anaérobie par voie sèche est plutôt adaptée à la valorisation des déchets ménagers ou des déchets ligno-cellulosiques comme les résidus de cultures ou les fumiers. Ces deux types de digestion anaérobie présentent des avantages et des inconvénients. Grâce à une dilution plus faible du substrat en entrée de procédé, l'utilisation de la digestion anaérobie par voie sèche permet une diminution des besoins en eau et en énergie ainsi qu'en taille des installations par rapport à la voie humide. Grâce à ces avantages, la digestion anaérobie par voie sèche s'est largement développée industriellement au cours de ces 10 dernières années, mais plutôt de manière empirique. Cependant, la diminution de la teneur en eau amène à une diminution de la vitesse de diffusion des molécules solubles dans le milieu réactionnel, ce qui peut amener à une plus grande complexité du milieu et à une diminution des performances.

Ce chapitre vise à résumer les connaissances acquises sur la digestion anaérobie : de la place de la digestion anaérobie au sein des filières de valorisation des déchets en Europe, puis des principes généraux de la digestion anaérobie jusqu'aux spécificités de la digestion anaérobie par voie sèche.

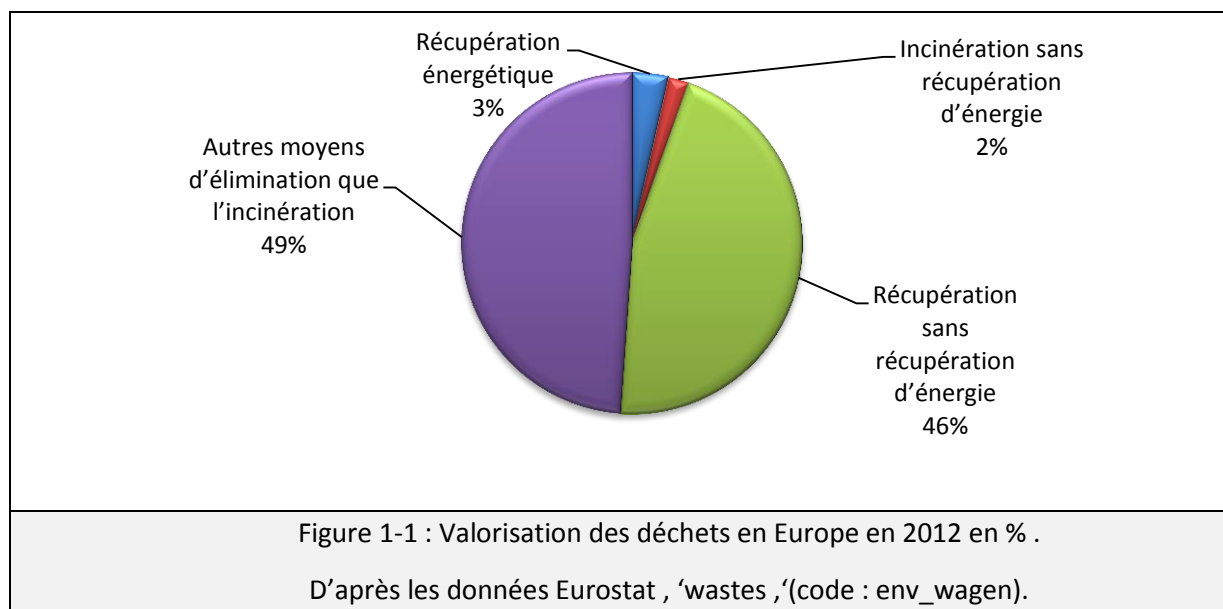
## 1.1 FILIERES DE VALORISATION DES DECHETS EN EUROPE

### 1.1.1 Filières de valorisation des déchets et spécificités de la valorisation des déchets ligno-cellulosiques en Europe

#### 1.1.1.1 Filières de valorisation des déchets en Europe

La politique de l'Union Européenne a pour objectif en 2020 de réduire les émissions de gaz à effet de serre de 20% par rapport à leur niveau en 1990, d'augmenter la part des énergies renouvelables à 20% de la consommation finale en énergie et de réduire de 20% la consommation totale en énergie (Brender et al., 2013).

En 2008, 49% des déchets traités en Europe ont été mis en décharge, 46% recyclés et 5% incinérés (Schrör, 2011). Plus précisément au niveau européen, 3% des déchets traités en 2008 ont été recyclés pour produire de l'énergie par digestion anaérobie, par combustion ou par récupération des gaz produits en décharge, 2% incinérés, 46% recyclés autrement que pour produire de l'énergie et 49% valorisés autrement que par incinération (comme par exemple les décharges sans récupération de gaz) (Figure 1-1). Même si la conversion des déchets en énergie a augmenté au cours du temps en Europe, (20% entre 2004 et 2008) (Schrör, 2011), de nombreux déchets ne sont pas encore valorisés, avec une valorisation de seulement 46% des déchets traités en 2008 en Europe (Schrör, 2011).



Grâce à la volonté européenne d'augmenter la production d'énergies renouvelables, la digestion anaérobie a connu une forte croissance lors de ces dix dernières années. Ainsi, la part d'énergie renouvelable provenant du biogaz en Europe a augmenté de 3,5% en 2002 jusqu'à atteindre 7% en 2013 (Figure 1-2). Le nombre de parcs de méthanisation a augmenté de 15 à 184 en

dix ans en Europe (Baere et al., 2010) : dans cette étude, les auteurs ont pris en compte des parcs de méthanisation ayant au moins 10% de leurs déchets composés de déchets ménagers organiques, avec une capacité minimale de 3 000 tonnes.an<sup>-1</sup>, les parcs en cours de construction en Europe et ceux qui ont cessé leur activité jusqu'en 2010.

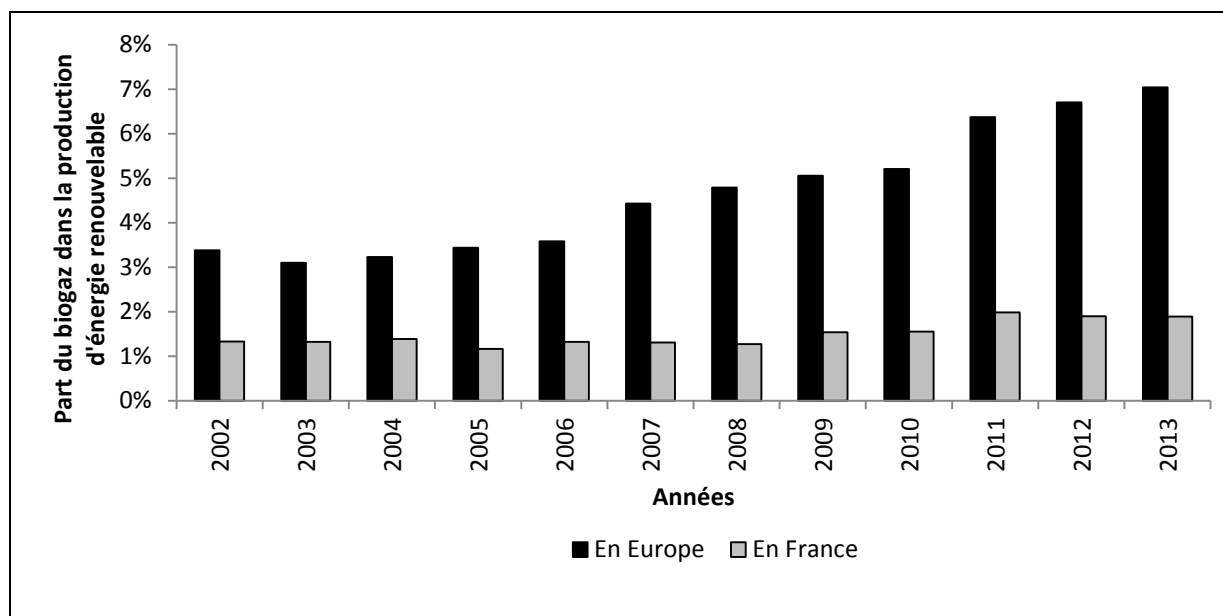


Figure 1-2 : Part de l'énergie renouvelable provenant du biogaz en Europe de 2002 à 2013.

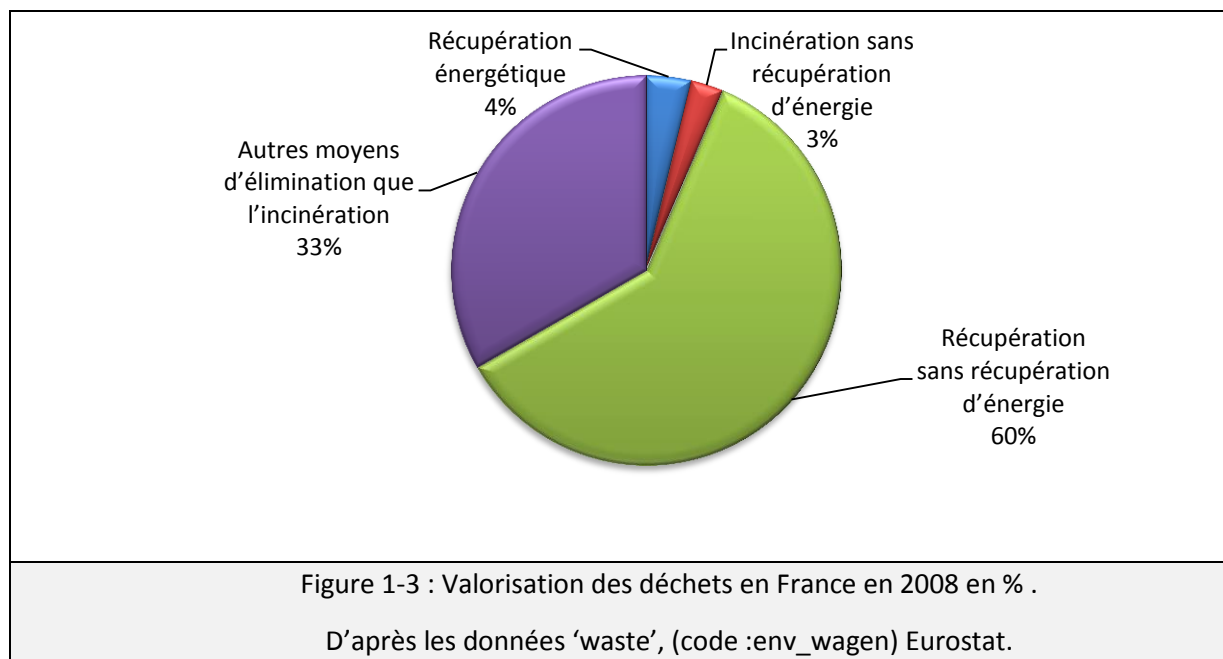
A partir des données 'Energie renouvelable par type '(code : ten00081) d'Eurostat, en tonnes équivalent pétrole.

En accord avec l'Europe, la France s'est fixée comme objectif d'aboutir à 23% de la consommation d'énergie provenant de sources renouvelables et de multiplier par quatre la production d'électricité et de chaleur à partir de biogaz en 2020. Cette production d'électricité passerait de 1 à 4 térawatts heures, soit l'équivalent de l'alimentation en électricité (sans chauffage) de 200 000 à 800 000 foyers, tandis que la production de chaleur augmenterait de 129 000 à 550 000 tonnes équivalent pétrole (Ministère de l'écologie et du développement durable et du logement et des transports, 2011). Pour cela, de nouvelles obligations ont été mises en place par l'article 204 de la loi du 12 juillet 2010 pour les « gros producteurs » de déchets : à partir de 2015, les producteurs de plus de 20 tonnes de déchets biodégradables.an<sup>-1</sup> doivent obligatoirement les valoriser. Cette valeur limite de valorisation des déchets biodégradables sera réduite à 10 tonnes.an<sup>-1</sup> en 2016 (Thauvin and Vernier, 2013). Ces objectifs offrent donc un potentiel de développement très important pour la digestion anaérobie à court terme. De plus, une volonté politique d'obtenir une énergie de plus en plus renouvelable (100% renouvelable en 2050) est présente (Fournié et al., 2014), ce qui offre un potentiel de développement important pour la digestion anaérobie à long terme.

Potentiellement, la production de biogaz à partir des déchets peut être estimée entre 7 000 à 16 000 kilotonnes équivalent pétrole.an<sup>-1</sup> en France (ADEME et al., 2008). Le potentiel le plus



important en biogaz est celui des déchets ou résidus agricoles avec une capacité de près de 10 700 kilotonnes équivalent pétrole de biogaz.



Plus généralement, en 2008 en France, 4% des déchets traités ont été recyclés pour faire de l'énergie, 3% incinérés, 60% recyclés autrement que pour l'énergie et 33% disposés autrement que par incinération (Figure 1-3), et la filière biogaz représente seulement que 2% de l'énergie renouvelable produite en 2013 (Figure 1-2). La production thermique et énergétique en France en 2014 était surtout due à l'incinération de 14,2 millions de tonnes de déchets, représentant 73% de la production d'électricité et 87% de la production thermique à partir de déchets en 2014. La méthanisation ne représente que 9% de la production d'électricité et 13% de la production thermique, avec une récupération du méthane issu dans les décharges permettant de produire en plus 17% de la production énergétique et 3% de la production thermique à partir de déchets en 2014 (Haeusler et al., 2015).

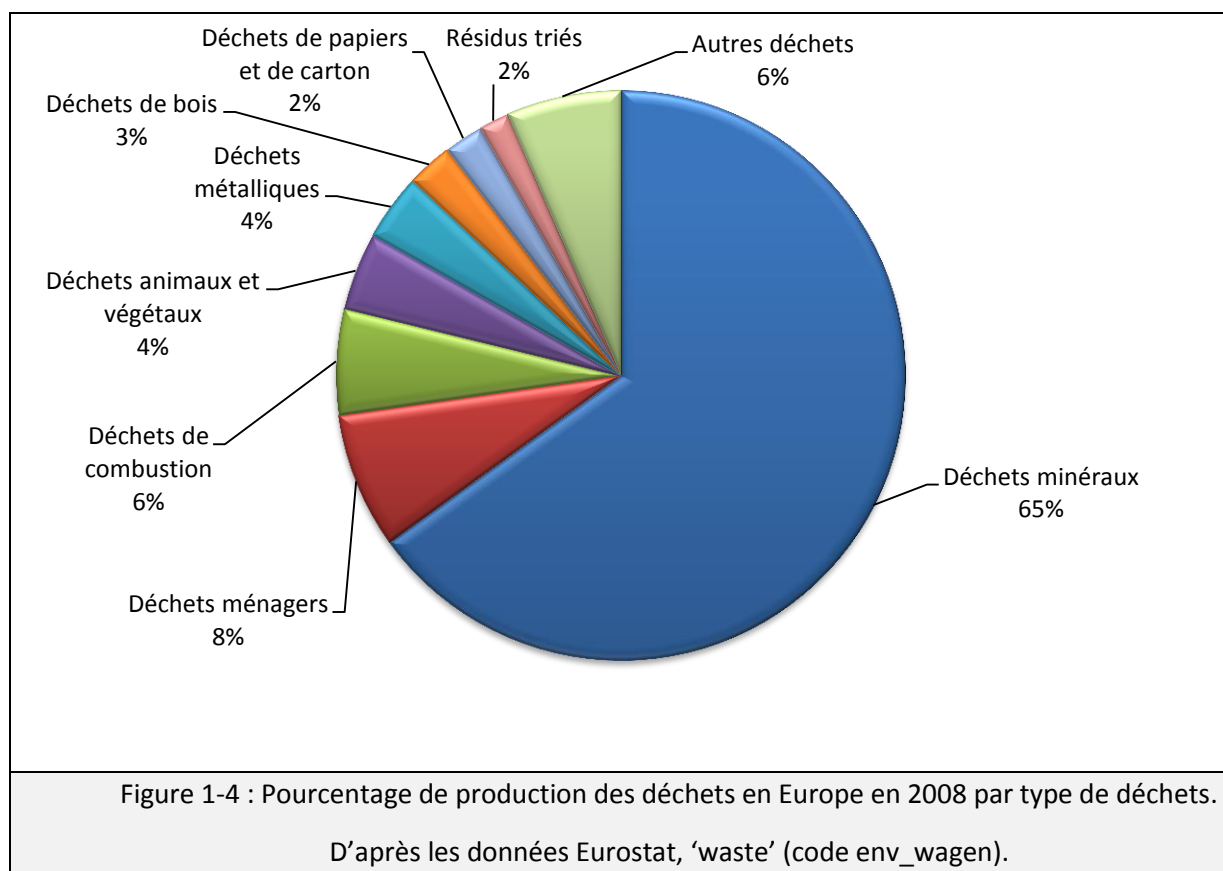
En janvier 2014, 447 unités de méthanisations étaient installés en France, avec des unités à la ferme ou centralisées (36%), des installations de stockage non dangereux (25%), des méthaniseurs en industries (18%), dans les stations d'épuration urbaines (19%), ou dans les centres de déchets ménagers (2%) (Haeusler et al., 2015). Actuellement, la France est le troisième pays en Europe pour la capacité installée de parcs de méthanisation avec 1 200 kilotonnes.an<sup>-1</sup> après l'Allemagne (2 000 kilotonnes.an<sup>-1</sup>) et l'Espagne (1 500 kilotonnes.an<sup>-1</sup>). Cependant, lorsque l'on ramène ces valeurs par rapport au nombre d'habitants, la France n'est plus que 8<sup>ième</sup>, avec 20 kilotonnes.an<sup>-1</sup> de capacité installée par million d'habitants, ce qui correspond à 5% du potentiel de capacité installée par million d'habitants (Baere et al., 2010). Ainsi, de nos jours, la capacité de production de biogaz évaluée pour les années 2015-2020 en France est de seulement 2 300 kilotonnes équivalent pétrole.an<sup>-1</sup>, en prenant en compte à la fois les parcs de méthanisation et les décharges (ADEME et al., 2008). Il reste donc un potentiel énorme de développement de la digestion anaérobie en France, et

les déchets ligno-cellulosiques agricoles constituent donc une source encore peu exploitée pour la production de biogaz.

### 1.1.1.2 Part des résidus ligno-cellulosiques parmi les déchets organiques en Europe

Les déchets ou résidus ligno-cellulosiques sont des déchets issus principalement des secteurs agricoles et forestiers. Dans ces secteurs, 45 050 kilotonnes de déchets ont été produits en Europe en 2008 (Schrör, 2011), ce qui correspond à 1,7 % des déchets totaux produits. Pour la France en 2008, cette fraction correspond à 1 195 kilotonnes de déchets soit 0,4% des déchets totaux produits.

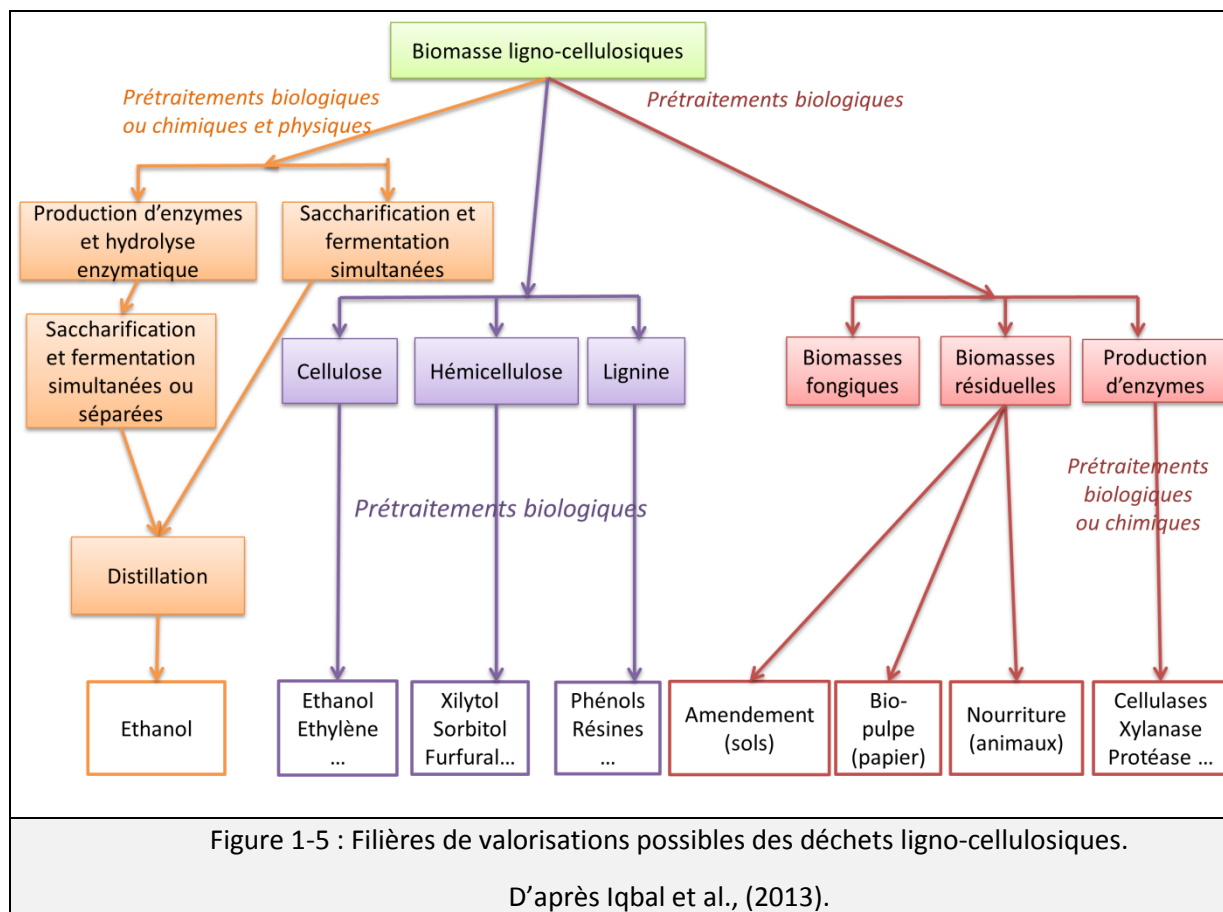
Les déchets ligno-cellulosiques sont des déchets contenant de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses. Parmi les déchets produits en Europe en 2008, les déchets de papier, de carton, de bois, ménagers et végétaux sont considérés comme des déchets ligno-cellulosiques. Ainsi 16,9 % de déchets produits peuvent être classés en déchets ligno-cellulosiques et sont potentiellement utilisables pour la méthanisation (Figure 1-4), ce qui correspond à 49% des déchets en ne tenant pas compte des déchets du bâtiment. Cette catégorie de déchets est une des plus importantes derrière les déchets minéraux.



### 1.1.1.3 **Filières de valorisation des déchets ligno-cellulosiques**

La part de déchets ligno-cellulosiques valorisés est difficile à estimer car peu de données existent sur le sujet. Les filières de valorisations de ces déchets sont en effet nombreuses et variées (Iqbal et al., 2013)(Figure 1-5), dont :

- **La production de biocarburants** et plus particulièrement le bioéthanol. Les carbohydrates contenus dans les déchets ligno-cellulosiques doivent tout d'abord être convertis en sucres simples comme le glucose qui est ensuite fermenté en éthanol (Lin and Tanaka, 2006). Des prétraitements physico-chimiques spécifiques sont utilisés pour améliorer le rendement de la production d'éthanol en libérant les sucres présents dans la biomasse ligno-cellulosiques (Chandra et al., 2007).
- **La production de biogaz**, par digestion anaérobie, qui sera détaillée dans la partie 1.2 Principes de la digestion anaérobie.
- **La production d'amendement organique** par compostage, qui correspond à une fermentation aérobie des déchets organiques et ligno-cellulosiques.
- **La production d'enzymes**, en utilisant les déchets ligno-cellulosiques comme support pour les microorganismes (plus particulièrement des champignons) afin de synthétiser des enzymes d'intérêt (Reddy et al., 2003). En effet, les déchets ligno-cellulosiques contiennent des carbohydrates solubles (substrats pour les microorganismes) et des précurseurs de la synthèse enzymatique. Les enzymes produites sont surtout des enzymes cellulolytiques (endo-glucanase, exo-glucanases,  $\beta$ -glucosidases...) (Brijwani et al., 2010) ou lignolytiques (peroxydases, laccases ...) (Reddy et al., 2003)
- **La fabrication de papier**, à partir du bois ou de la paille, mais aussi en utilisant des résidus industriels, comme par exemple les copeaux de bois ou les fibres de papiers recyclés. La pulpe, qui est la matière première de la fabrication du papier, peut aussi être obtenue à partir de déchets ligno-cellulosiques (Figure 1-5). Ainsi, le « bio-pulping » utilise des champignons de type pourriture blanche afin de séparer la lignine du bois et d'obtenir des fibres utilisables pour la pulpe (Singh et al., 2010).
- **La production de nourriture pour animaux** en utilisant la cellulose de certains déchets ligno-cellulosiques, qui peut alors être la source principale d'énergie et de carbone pour les ruminants. Les déchets ligno-cellulosiques peuvent être donnés directement aux animaux ou après prétraitement afin d'augmenter leur digestibilité. Ainsi, en délignifiant la biomasse ligno-cellulosique de ces déchets avec des champignons de types pourriture blanche, la digestibilité par les animaux de cette biomasse augmente (Cohen et al., 2002).
- **La production de produits chimiques** qui n'est pas encore réalisé au niveau industriel, mais qui a un potentiel de développement important (Chandel and Singh, 2011; Iqbal et al., 2013). Les produits chimiques synthétisables à partir des déchets ligno-cellulosiques sont par exemple le xylitol, les phénols, la vanilline, la syringaldéhyde, les benzènes ou les cyclohexanes (Iqbal et al., 2013).



### 1.1.2 Paille de blé : substrat modèle des déchets ligno-cellulosiques

Parmi les déchets ligno-cellulosiques, les déchets agricoles produits ont été estimés à près de 4 000 000 kilotonnes.an<sup>-1</sup> pour tout type de récoltes et à 3 000 000 kilotonnes.an<sup>-1</sup> pour les déchets ligno-cellulosiques de céréales dans le monde en 2008 (LaI, 2008). En appliquant un ratio résidus/récoltes de 1,3 (Kim and Dale, 2004), la quantité de paille de blé produite dans le monde peut être estimée autour de 850 000 kilotonnes.an<sup>-1</sup> (Talebnia et al., 2010).

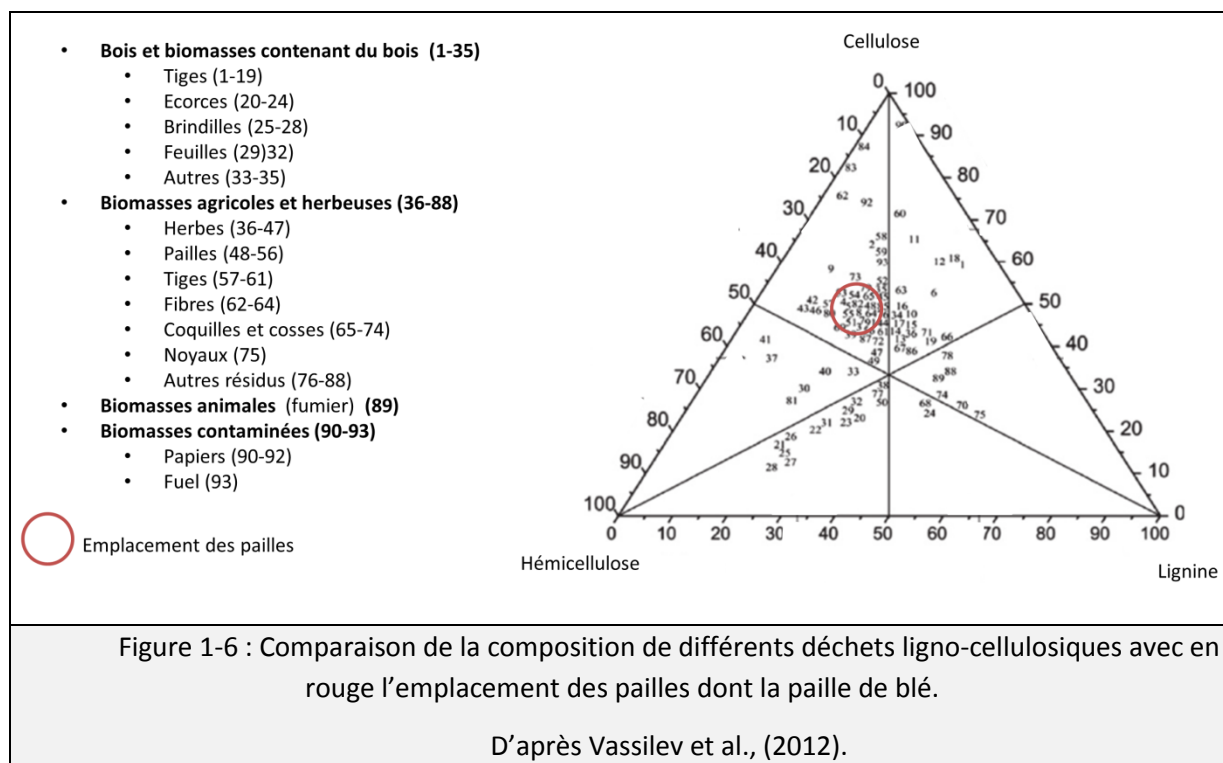
La paille peut être utilisée comme:

- **Nourriture pour animaux** dans l'élevage mais cet usage est limité car la paille est peu digestible et contient peu de sucres assimilables et de protéines (Iqbal et al., 2013).
- **Litière** qui est l'utilisation principale de la paille en France (70% de la récolte annuelle), (Zeitoun, 2011)).
- **Amendements** pour les sols dans l'agriculture.
- **Agent structurant** dans l'industrie papetière pour produire du papier.
- **Substrat énergétique** pour produire du biogaz, du biocarburant ou de la chaleur.

Afin de limiter l'érosion des sols, 60% des sols utilisés pour produire du blé doivent être recouverts par de la paille, ce qui correspond à une utilisation prévue de 1,7 tonnes de résidu de blé par hectare (Kim and Dale, 2004) pour le recouvrement des sols. En prenant en compte cette

utilisation, 354 000 kilotonnes de paille en 2004 et 430 000 kilotonnes en 2008 étaient disponibles pour produire de l'énergie au niveau mondial (Kim and Dale, 2004; Talebnia et al., 2010).

La paille de blé (*Triticum aestivum L.*), qui est le substrat ligno-cellulosique choisi dans cette thèse, est une monocotylédone de la famille des Graminées. La paille de blé correspond à un déchet-type dans le sens où sa composition en cellulose, hémicellulose et lignine est centrale par rapport à l'ensemble des déchets ligno-cellulosiques (Figure 1-6). La paille de blé peut donc être considérée comme un substrat modèle des déchets ligno-cellulosiques.



De plus, la paille de blé présente un bon rendement de production de  $CH_4$  parmi les déchets ligno-cellulosiques. En effet, lorsque le rendement de production de  $CH_4$  de quatre déchets ligno-cellulosiques (paille de blé, feuilles d'érable, déchets d'herbe, cannes de maïs) sont comparés, le rendement total de  $CH_4$  de la paille de blé est le deuxième avec  $70 L_{CH_4}.kg_{MV}^{-1}$  derrière la canne de maïs (à  $80 L_{CH_4}.kg_{MV}^{-1}$ ) pour un ratio substrat/inoculum de 2 à 4, en batch, à  $37^\circ C$  et pour une teneur en MS de 22% (Liew et al., 2012). Cependant, la paille de blé peut aussi présenter des hétérogénéités au niveau de sa structure macroscopique et moléculaire, ce qui peut impacter l'utilisation de ce substrat en digestion anaérobie.

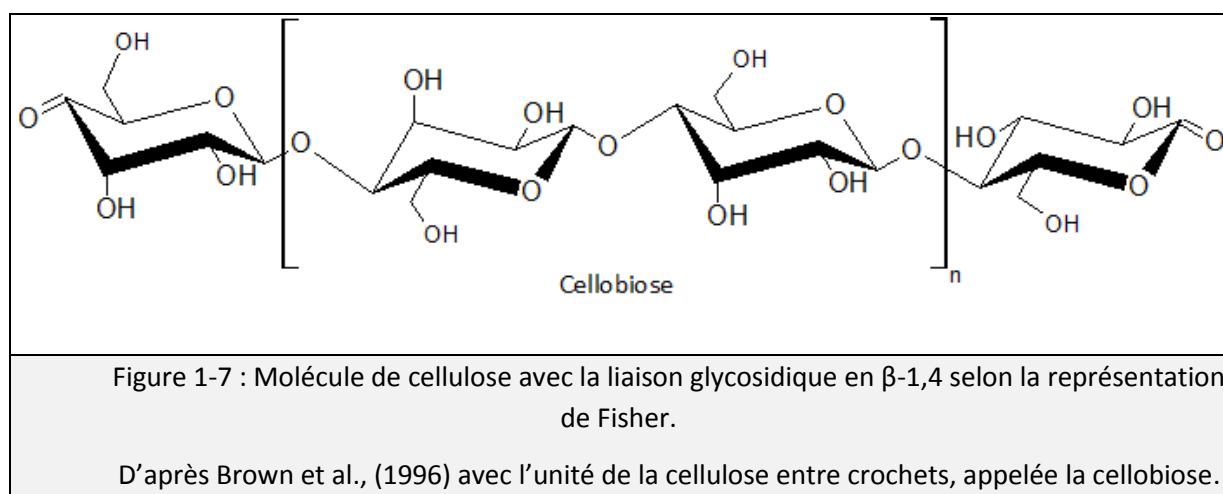
#### 1.1.2.1 Structure moléculaire de la paille de blé

La composition de la structure moléculaire des déchets ligno-cellulosiques peut avoir un effet sur le rendement de production de  $CH_4$  lors de la digestion anaérobie. En effet, la structure

moléculaire des déchets ligno-cellulosiques et plus particulièrement de la paille de blé est composée de 3 types de molécules qui sont différenciées selon leur structure : la cellulose, les hémicelluloses et les lignines.

### 1.1.2.1.1 Cellulose

La cellulose est un homopolymères constitués de longues chaînes linéaires d'unités de D-glucose liées entre elles par une liaison glycosidique  $\beta$ -1,4 (Bledzki and Gassan, 1999). C'est le composé le plus abondant dans les déchets ligno-cellulosiques. La cellulose représente environ 35 à 45% de la matière sèche dans les pailles (Sun, 2010). L'unité qui se répète dans les fibrilles de cellulose est la cellobiose, qui est un dimère de cellulose (Figure 1-7).



Les molécules de cellulose forment une hélice à deux résidus par tour, stabilisées par des liaisons hydrogène (Zhbankov, 1992). Ensuite, ces polymères forment des rubans parallèles à l'aide de liaisons inter et intramoléculaires correspondant à des micelles cristallins très rigides. Ensuite, ces micelles vont s'organiser en micro-fibrilles de cellulose qui font environ 25 à 30 nm de diamètre (Sun, 2010). Les micro-fibrilles de cellulose vont ensuite s'organiser en macro-fibrilles de 15 à 20 nm de diamètre (Zeitoun, 2011).

Les micro-fibrilles présentent deux formes (Monlau et al., 2013) :

- **La cellulose cristalline**, qui est plus organisée et plus rigide.
- **La cellulose amorphe**, qui est moins organisée.

Les fibres de cellulose sont le squelette des parois primaire et secondaire des cellules végétales. La longueur de la chaîne de cellulose et donc le degré de polymérisation varient selon les végétaux. Le degré de polymérisation de la cellulose, c'est-à-dire le nombre d'unité de glucose par molécule, est différent selon le végétal étudié et peut aller jusqu'à 16 000 unités (Sun, 2010). Au niveau moléculaire, la partie cristalline des micro-fibrilles de cellulose dans la paroi des cellules végétales est très résistante à l'hydrolyse chimique et biologique grâce à sa structure (Laureano-

Perez et al., 2005; Nishiyama et al., 2002) et va être de 3 à 30 fois plus lente que l'hydrolyse de la cellulose amorphe (Zhang and Lynd, 2004; Zhao et al., 2012). Ainsi, le taux de cristallisation de la cellulose (forme cristalline/forme amorphe) est un indicateur de la biodégradabilité de la cellulose. De plus, une quantité d'eau plus importante dans une biomasse va diminuer le taux de cristallisation de la cellulose (Jeoh et al., 2007).

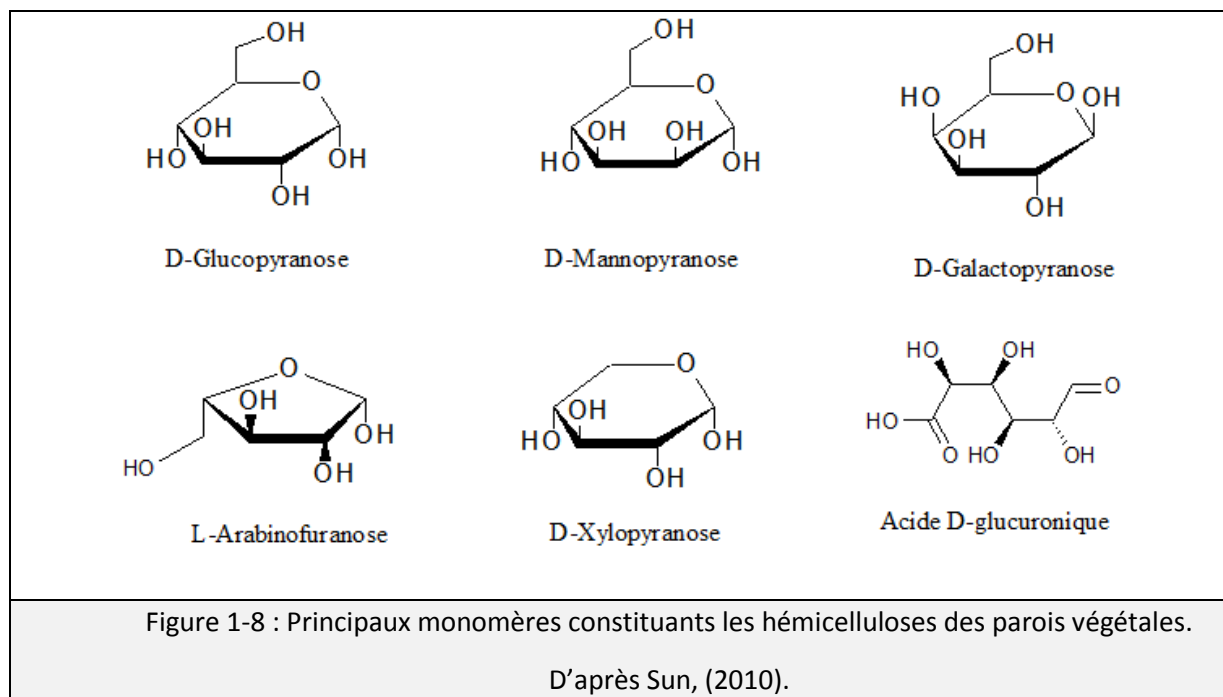
#### 1.1.2.1.2 Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides non-cristallins, formés par l'enchaînement de monomères de types variés reliés par des liaisons glycosidiques, et qui peuvent être ramifiés. Les hémicelluloses sont les composés les plus abondants, après la cellulose, dans la paille des céréales. Ces polysaccharides restent associés à la cellulose lorsque les lignines sont enlevées, et ils constituent une matrice autour des fibrilles de cellulose et sont donc une barrière physique entre la cellulose et le milieu extérieur (Bledzki and Gassan, 1999). Les molécules d'hémicellulose se lient par des liaisons hydrogène avec les celluloses, et des liaisons covalentes avec les lignines ou entre hémicelluloses avec une dimérisation des acides hydroxycinnamiques (Sun, 2010).

Les hémicelluloses seraient responsables du comportement plastique et de l'élasticité des parois cellulaires, et donc du comportement en flexion des plantes, dû à leur capacité à absorber de grandes quantités d'eau (Zeitoun, 2011). Les polymères d'hémicelluloses sont les composants des parois pariétales les moins résistants des déchets ligno-cellulosiques à la biodégradation. En effet, ce sont eux qui vont se dégrader le plus rapidement à de basses températures (Ghizzi Damasceno Da Silva, 2011).

Les principaux sucres constituant les hémicelluloses sont les hexoses comme le glucose, le mannose ou le galactose, les pentoses comme l'arabinose et le xylose, les dérivés méthyles comme le rhamnose ou le fucose et les acides uroniques comme l'acide glucuronique (Figure 1-8). Les hémicelluloses sont classées en quatre groupes généraux selon les différents types de polysaccharides les constituant (Ebringerová et al., 2005) :

- Les **xylanes** (ou xyloglycanes), qui sont principalement composés de xylose. Ce sont les composants principaux des parois secondaires des végétaux, constituant 20 à 30% de la biomasse des plantes dicotylédones et jusqu'à 50% pour les monocotylédones (dont le blé) (Sun, 2010). Elles forment une matrice autour des fibrilles de cellulose.
- Les **mannoglycanes** ou mannanes qui sont principalement composés de mannose.
- Les **xyloglycanes** qui sont présents dans les parois primaires des végétaux et sont composés de glucose, de xylose, de fucose et de galactose.
- Les **β-glucanes** qui sont principalement composés de glucose.

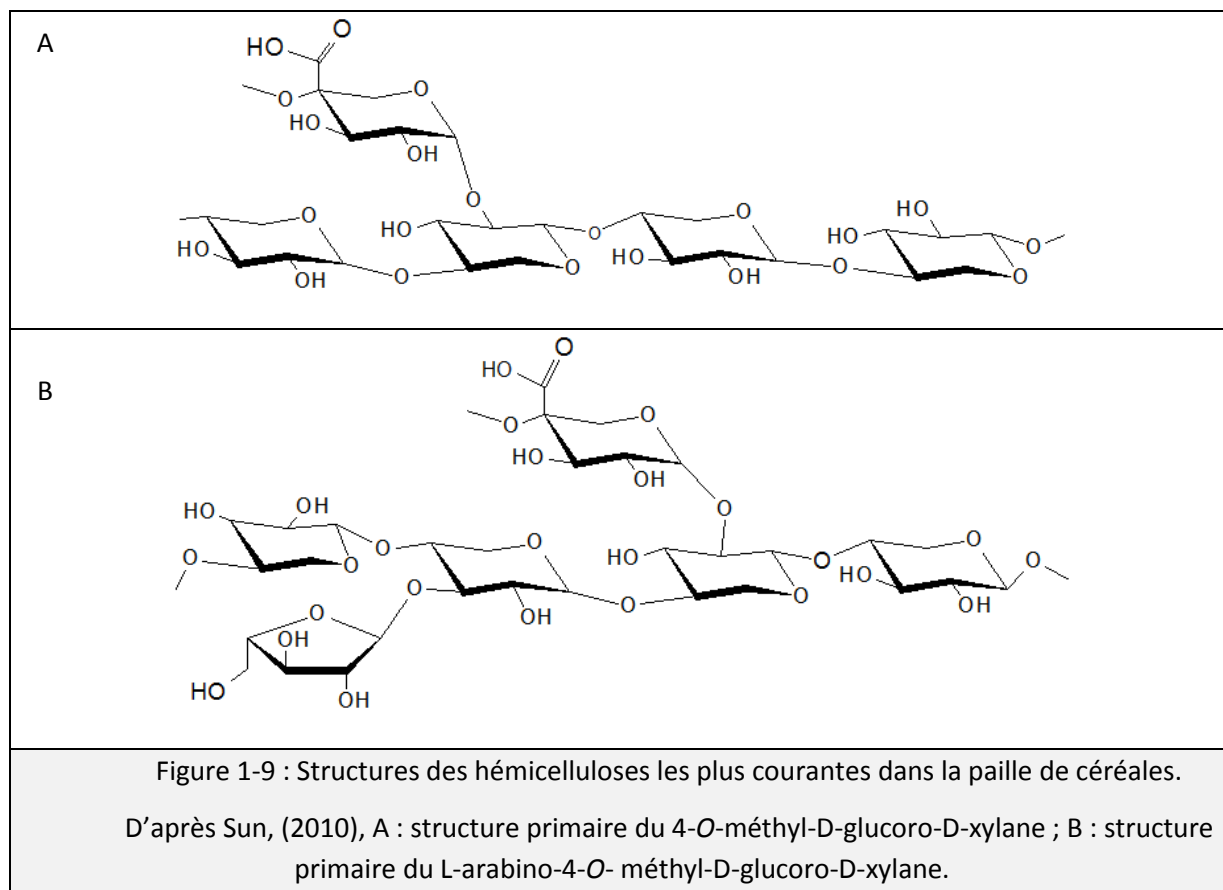


Il existe trois différences principales entre cellulose et hémicelluloses (Bledzki and Gassan, 1999):

- **Les unités de sucres sont différentes** et les hémicelluloses en contiennent plusieurs types alors que la cellulose n'est constituée que d'un seul type d'unité.
- Les **hémicelluloses** possèdent **des ramifications** alors que la cellulose est linéaire
- Le **degré de polymérisation de la cellulose est dix à cent fois plus élevé** que celui des hémicelluloses.

La composition des unités de l'hémicellulose dépend du végétal étudié. Ainsi, les hémicelluloses des plantes annuelles, dont la paille de blé, ont une chaîne principale constituée de 1,4- $\beta$ -D-xylopyranose avec comme chaînes secondaires (ou embranchements) des xylopyranoses, arabinofuranoses, des galactopyranoses en mono-, di- ou tri- saccharides (Sun, 2010). Ces hémicelluloses peuvent être acides ou neutres selon les sucres qui composent leurs chaînes. Les hémicelluloses acides les plus courantes sont en général des 4-O-méthyl-D-glucuronopyranosyle ou des D-glucuronopyranosyle (Figure 1-9). Chez les Graminées et en particulier chez le blé, les hémicelluloses correspondent majoritairement à des xylanes liés en  $\beta$ -1,4 et substitués par des arabinoses en C2 ou C3 et sont appelées 'arabinoxylanes', avec un ratio arabinose/xylose de 0,5 pour les tiges de blé et de 0,5-1 pour les enveloppes du grain de blé (Ghizzi Damasceno Da Silva, 2011). Les hémicelluloses de paille présentent une structure peu ramifiée d'une longueur moyenne de 200 unités de xylose sur la chaîne principale, pour une masse molaire de 30 000 Da (Fang et al., 1999; Sun et al., 2000).

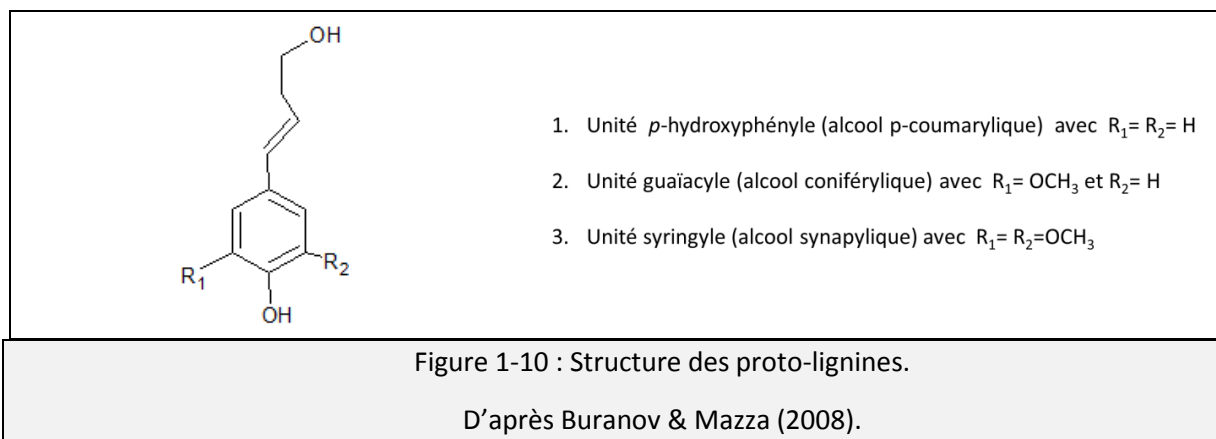




Lors de la maturation du végétal et de son vieillissement, le pourcentage de chaînes secondaires de xylane diminue de façon importante. Ainsi, les xylanes de la paille de blé ont une quantité d'arabinose plus faible que les xylanes contenus dans les grains (Morrison, 1974; Sun, 2010).

### 1.1.2.1.3 Lignines

Les lignines sont des polymères hydrocarbonés tridimensionnels amorphes qui peuvent contenir des cycles aromatiques et des composés aliphatiques (non cycliques) (Bledzki and Gassan, 1999). Les lignines n'ont pas de structure-type car elles regroupent des mélanges de matériaux hétérogènes chimiquement et physiquement et ne correspondent pas à une structure définie de molécule. Les lignines n'ont pas de structures et d'unités répétables, avec des variations significatives de la composition en monomères et des fréquences des liaisons inter-monomères. La composition et la structure des lignines dépendent de leur origine. Toutefois, les lignines sont toujours formées par polycondensation et déshydrogénation enzymatique de trois alcools phénylpropanes, dit proto-lignines : l'alcool p-coumarylique, sinapylique et coniférylique (Figure 1-10), avec des liaisons caractéristiques comme des liaisons arylglycérol- $\beta$ -éther ( $\beta$ -O-4), phénylcoumarane ( $\beta$ -5), pinorésidon ( $\beta$ - $\beta$ ), diarylpropane ( $\beta$ -1), biphenyl (5-5) (Buranov and Mazza, 2008; Ralph et al., 2004; Zeitoun, 2011).



Les proportions des différentes unités dépendent du type de végétal. Les lignines des plantes de type Angiospermes monocotylédones, dont fait partie le blé, contiennent des unités guaïacyle et syringyle dans des proportions égales ainsi que des unités composées des trois (des unités guaïacyle et syringyle avec des unités *p*-hydroxyphényles)(Baucher et al., 1998), pour finir dans des configurations telles que celles de la Figure 1-11.

Les lignines sont les composants principaux de la paille en dehors des polysaccharides (Sun, 2010) et apportent de la rigidité aux parois cellulaires des végétaux. Les lignines ne se dégradent pas facilement à cause de leur nature hydrophobe et du peu de liaisons hydrolysables qu'elles contiennent. De plus, les lignines peuvent avoir des liaisons avec d'autres éléments des parois végétales (Ralph et al., 2004), et notamment des associations avec des carbohydrates comme les hémicelluloses, par des liaisons covalentes de type éther et ester, dans les espaces entre les fibrilles de celluloses dans les parois primaires et secondaires des végétaux (Figure 1-12) (Buranov and Mazza, 2008; Theander, 1985; Zeitoun, 2011). Les liaisons covalentes lignines-cellulose-xylanes exercent une influence importante sur la digestibilité des déchets ligno-cellulosiques, car la cellulose est protégée des attaques enzymatiques par les hémicelluloses et les lignines. Ainsi, la quantité de lignine est le facteur principal pour prédire le potentiel  $CH_4$  d'un substrat ligno-cellulosique dû à leur non-dégradation sur le court terme (Laureano-Perez et al., 2005; Monlau et al., 2013), même si une déstructuration des lignines peut survenir sur le long terme, avec 44% de dégradation par exemple pour une digestion anaérobie par voie sèche de 244 jours (Motte, 2013).

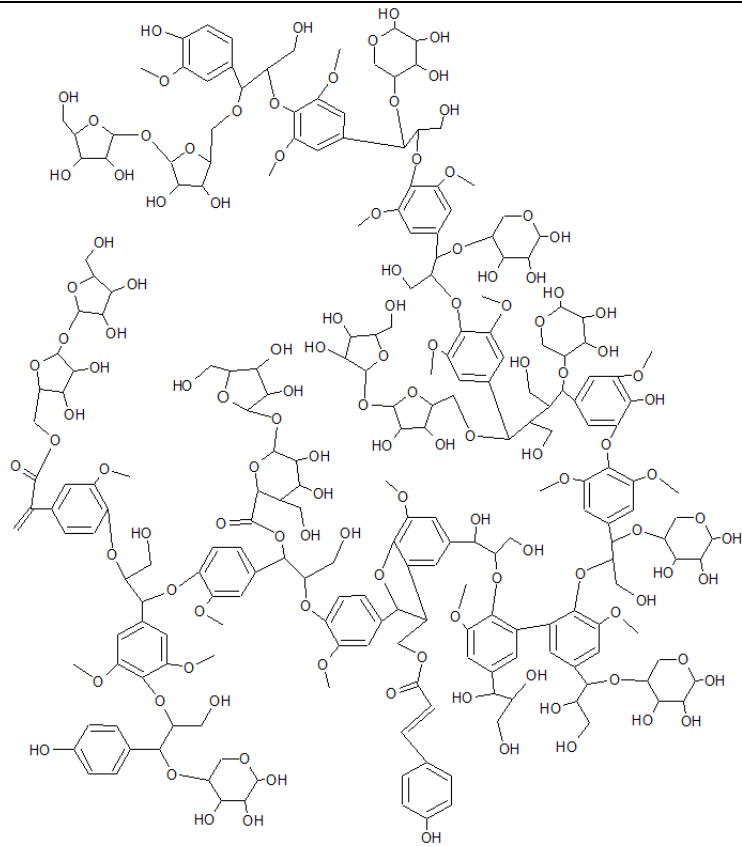


Figure 1-11 : Modèle de structure de la lignine.

D'après Sun, (2010).

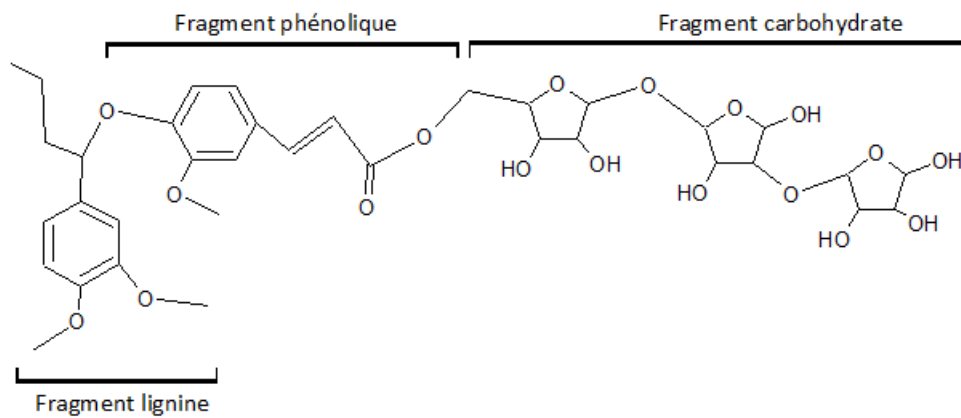


Figure 1-12 : Complexe lignine/phénolique-carbohydate (LCC), dans la paille de blé.

D'après Buranov and Mazza, (2008).

### 1.1.2.2 ***Hétérogénéité de la paille de blé***

La paille de blé peut présenter des variations dans sa structure macroscopique, c'est-à-dire sa composition en masse de ces différents organes (nœuds, entre-nœuds, feuilles, épis) mais aussi dans sa structure moléculaire (cellulose, hémicellulose, lignine), ce qui peut potentiellement avoir un effet sur les performances en digestion anaérobie.

#### 1.1.2.2.1 ***Influence de la structure macroscopique de la paille de blé***

Le blé est une plante annuelle de la famille des Graminées de genre *Triticum*. Le blé est constitué d'une tige avec un épi, qui correspond en masse à 9% de la paille de blé. Les feuilles constituent 15 à 30% en masse de la paille de blé. La tige est composée d'une succession de nœuds et d'entre-nœuds (l'espace entre deux nœuds) et est creuse en son centre. Il y a environ 5 à 6 nœuds chez une plante à maturité, ce qui correspond à 10% de la masse de la paille et les entre-nœuds correspondent à 50-60% de la masse de la paille (Mckean and Jacobs, 1997; Montané et al., 1998; Motte et al., 2014). Les compositions des différents organes de la paille de blé en celluloses, hémicelluloses et lignines sont différentes (Table 1-1). Ces différences de composition peuvent expliquer les variations de production de CH<sub>4</sub> lors de la digestion anaérobie, selon les organes présents dans le substrat, de 51% de potentiel CH<sub>4</sub> pour les entre-nœuds et 25% pour les feuilles à 6% pour les rachis (Motte et al., 2014), ainsi que des variations de rendement de production de CH<sub>4</sub> selon le degré de maturité du blé (Table 1-2).

Table 1-1 : Différence de composition moléculaire et de BMP en fonction de l'organe de la paille de blé.

D'après <sup>(1)</sup>Amon et al., (2007); <sup>(2)</sup>Bertrand et al., (2006); <sup>(3)</sup>Mckean and Jacobs, (1997); <sup>(4)</sup>Motte et al., (2014); <sup>(5)</sup>Sun, (2010).

	Entre-nœuds	Feuilles	Nœuds	Glumes <sup>(4)</sup>	Rachis <sup>(4)</sup>
<b>Hémicelluloses (%<sub>MS</sub>)</b>	35 <sup>(2,3,4,5)</sup> ± 7	28 <sup>(2,3,4,5)</sup> ± 4	33 <sup>(3,4,5)</sup> ± 5	43	39
<b>Celluloses (%<sub>MS</sub>)</b>	41 <sup>(2,3,4,5)</sup> ± 6	36 <sup>(2,3,4,5)</sup> ± 2	31 <sup>(3,4,5)</sup> ± 5	40	44
<b>Lignines (%<sub>MS</sub>)</b>	17 <sup>(2,3,4,5)</sup> ± 3	14 <sup>(2,3,4,5)</sup> ± 2	19 <sup>(3,4,5)</sup> ± 4	6	7
<b>Glucose (%<sub>MS</sub>)</b>	37 <sup>(2,4)</sup> ± 5	28 <sup>(2,4)</sup> ± 3	26 <sup>(4)</sup>	29	28
<b>Xylose (%<sub>MS</sub>)</b>	17 <sup>(4)</sup>	17 <sup>(4)</sup>	17 <sup>(4)</sup>	18	21
<b>Arabinose (%<sub>MS</sub>)</b>	1 <sup>(4)</sup>	2 <sup>(4)</sup>	3 <sup>(4)</sup>	3	2
<b>BMP (ml<sub>CH4</sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>)</b>	148 <sup>(4)</sup>	242 <sup>(4)</sup>	237 <sup>(1,4)</sup> ± 70	171	180
<b>BHP (ml<sub>H2</sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>)</b>	11 <sup>(4)</sup>	9 <sup>(4)</sup>	10 <sup>(4)</sup>	12	10

Table 1-2: Evolution du rendement de production du CH<sub>4</sub> en ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup> en fonction de la maturité du blé, pour deux types de blé.

D'après Amon et al., (2007).

Rendement spécifique de production du CH <sub>4</sub> (ml <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>MV</sub> <sup>-1</sup> )	Type Capo	Type Levendis
Stade nœud	343	229
Fleuraison de l'anthere	307	342
Stade laiteux du grain (50% d'humidité et stockage des protéines)	244	254
Stade pâteux du grain (perte d'humidité et constitution de l'amidon)	243	228
Maturité complète (20% d'humidité)	251	245

C'est pourquoi une homogénéisation du substrat, comme par exemple après broyage fin, est nécessaire pour les expériences en laboratoire, afin d'avoir un échantillonnage le plus représentatif possible.

#### 1.1.2.2 Influence de la structure moléculaire de la paille de blé

A travers une étude de la littérature, une caractérisation moyenne de la paille de blé peut être réalisée (Table 1-3). Les compositions en hémicelluloses, cellulose et lignines des pailles de blé dans la littérature varient beaucoup. En effet, la composition varie de 18 à 50 % d'hémicelluloses, de 29 à 52% de celluloses et de 6 à 23% de lignines (Table 1-3).

Table 1-3: Caractéristiques moyennes des pailles de blé.

D'après Abbasi and Abbasi, (2010); Ademe and Bastide, (2009); ADEME, (1998); Amon et al.,(2007); Barakat et al., (2013); Bauer et al., (2009); Brown et al., (2012); Buffière et al., (2009); Chandra et al., (2012); Cui et al., (2011); Demirbas, (2004); Erdei et al., (2010); Ferreira et al., (2014); Ghizzi Damasceno Da Silva, (2011); Kim and Dale, (2004); Krishania et al., (2013); Liew et al., (2012); Mckean and Jacobs, (1997); McKendry, (2002); Menardo et al., (2012); Naik et al., (2010); Nkemka and Murto,( 2013); Peiji et al., (1997); Pohl et al., (2012); Prasad et al.,(2007); Raveendran et al., (1995); Sambusiti et al., (2013); Sander, (1997); Sapci, (2013); Sarkar et al., (2012); Sharma et al., (1988); Sun, (2010); Tamaki and Mazza, (2010); Triolo et al., (2011); Zeitoun, (2011).

	Moyenne	Ecart-type	Min	Max	Nombre
MS (%)	92	3	84	98	39
MV (%)	85	7	64	96	40
Hémicelluloses (% <sub>MS</sub> )	29	6	18	50	33
Celluloses (% <sub>MS</sub> )	39	6	29	52	36
Lignines (% <sub>MS</sub> )	16	4	6	23	43
Glucose (% <sub>MS</sub> )	38	6	33	54	10
Xylose (% <sub>MS</sub> )	19	3	15	24	11

	Moyenne	Ecart-type	Min	Max	Nombre
Arabinose (% <sub>MS</sub> )	2	1	2	5	11
Carbone (%)	45	3	41	50	16
Hydrogène (%)	6	0	5	6	8
Oxygène (%)	41	6	36	52	6
Azote (%)	1	1	0	4	18
BMP (ml <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>MV</sub> <sup>-1</sup> )	275	41	200	384	30

Ainsi, la composition moléculaire du substrat utilisé peut avoir une influence sur la digestion anaérobie. En effet, la quantité des différents constituants va avoir une influence sur la production de CH<sub>4</sub>, d'H<sub>2</sub> et d'AGVs. Seules la cellulose et les hémicelluloses sont dégradées facilement lors de l'hydrolyse. Les lignines augmentent la rigidité et la résistance à la décomposition (c'est-à-dire l'hydrolyse) de ces déchets. De plus, le degré de cristallisation de la cellulose a une importance sur la digestion anaérobie, dû à la cellulose cristalline qui peut être rendue moins accessible par les enzymes (Barakat et al., 2013). En effet, les BMP sont négativement corrélés aux quantités de lignine du substrat ainsi qu'à la quantité de cellulose cristalline alors que la quantité de sucres solubles, de protéines et d'hémicelluloses corréleront positivement (Monlau et al., 2012). Ainsi, les variations de la composition moléculaire de la paille de blé amènent à des variations significatives des BMP allant de 200 à 384 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup> (Table 1-3). La quantité de cellulose et la quantité de lignine peuvent avoir des influences différentes selon le temps d'hydrolyse. En effet, pour une période d'hydrolyse courte, la quantité de lignine ne va pas influencer la digestion anaérobie lorsque la cristallisation de la cellulose est faible. Pour une période d'hydrolyse longue, la cristallisation de la cellulose ne va pas influencer la digestion anaérobie pour une quantité de lignine faible (Zhu et al., 2008).

### 1.1.3 Conclusion sur les déchets

Que ce soit au niveau européen ou français, une volonté d'augmenter la valorisation des déchets et la quantité d'énergie renouvelable d'ici 2020 a permis une augmentation du nombre de parcs de méthanisation. Ainsi, la France est le 3<sup>ème</sup> pays en Europe en prenant en compte la capacité des digesteurs anaérobies installés. Cependant, si la capacité installée est ramenée au nombre d'habitants, la France n'est plus qu'au 8<sup>ème</sup> rang.

Parmi les déchets produits en Europe, la part des déchets ligno-cellulosiques est une des plus importantes hors ceux du bâtiment, et ces déchets peuvent être utilisés pour la production de biogaz et de biocarburants, mais aussi de biomolécules (Chandra et al., 2012; Monlau et al., 2013; Prasad et al., 2007; Yang et al., 2015). Cependant, la composition biochimique des substrats ligno-cellulosiques peut avoir une influence importante sur leur potentiel de valorisation en méthanisation. La grande variabilité de composition en lignines, hémicelluloses et celluloses existent selon l'origine des déchets ligno-cellulosiques, ainsi que le moment de la récolte pour les résidus de culture. De plus, la composition moléculaire des déchets ligno-cellulosiques va également avoir un effet important sur la digestion anaérobie, avec un effet positif de la quantité d'hémicelluloses et de cellulose et un effet négatif des quantités de lignines et du degré de cristallisation de la cellulose.

La paille de blé constitue un substrat modèle, avec une composition moyenne en lignine, hémicelluloses et cellulose mais avec des variations selon le type de blé, d'organes ou de moment de la récolte. Un broyage de ce substrat est nécessaire pour une étude en laboratoire, afin d'homogénéiser la composition moléculaire ainsi que la composition macroscopique de la paille de blé puisque ces compositions peuvent avoir un effet sur la production de CH<sub>4</sub>, d'H<sub>2</sub> et d'AGVs.

---

## **1.2 PRINCIPES DE LA DIGESTION ANAEROBIE**

---

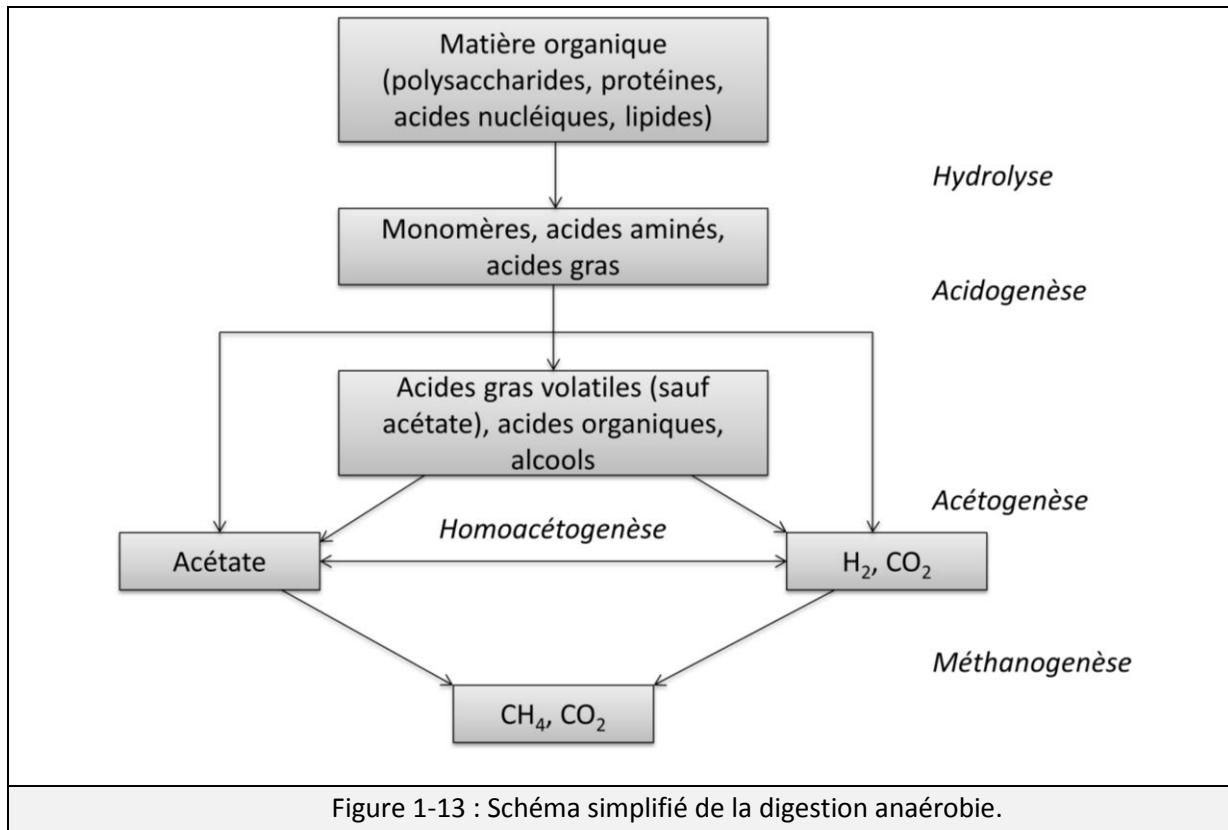
Parmi l'ensemble des filières de valorisation de la biomasse ligno-cellulosique, la digestion anaérobie par voie sèche est plus intéressante que la digestion anaérobie par voie humide car les déchets ligno-cellulosiques sont en général des déchets solides ne contenant que peu d'eau. L'utilisation de la digestion anaérobie par voie sèche permet ainsi de limiter la quantité d'eau nécessaire à apporter pour leur valorisation. Les réactions microbiologiques de la digestion anaérobie sont les mêmes pour les voies sèches et humides et de nombreux paramètres environnementaux peuvent influencer ces réactions, comme par exemple la température, le pH ou encore la concentration de certains produits réactionnels inhibiteurs.

La digestion anaérobie est ainsi une voie biologique de conversion de la matière organique en un biogaz (énergie renouvelable) composé de CH<sub>4</sub> (50 à 70%) et de CO<sub>2</sub> (30 à 50%), et en un digestat utilisable comme amendement organique pour l'agriculture. Le biogaz produit peut être valorisé en électricité et en chaleur par cogénération, en biocarburant ou peut être injecté directement dans les canalisations de gaz naturel, après avoir été purifié en enlevant le CO<sub>2</sub>, l'eau, et les autres composés pour obtenir 98% de CH<sub>4</sub> (ADEME et al., 2008; Théobald et al., 2014). Un m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub> est équivalent en énergie à 0,94 m<sup>3</sup> de gaz naturel, 9,7 kWh d'électricité, 1,15 L d'essence, 2,1 kg de bois, 1 L de mazout, 1,3 kg de charbon ou 1,7 L d'alcool (Moletta, 2009). La méthanisation présente donc des rendements intéressants dans le cadre d'une valorisation des déchets ménagers, agricoles ou encore industriels.

### **1.2.1 Réactions microbiologiques**

La digestion anaérobie est un processus complexe, faisant intervenir de nombreuses réactions biologiques réalisées par une communauté microbienne complexe. Ces réactions microbiologiques peuvent être simplifiées en 4 étapes principales (Figure 1-13). Les microorganismes présents dans cette communauté sont alors classés selon leurs activités au sein de ce réseau de réactions.





### 1.2.1.1 Hydrolyse

Lors de l'hydrolyse (1<sup>ère</sup> étape), la matière organique composée de protéines, lipides, polysaccharides et d'acides nucléiques, est hydrolysée en monomères et oligomères solubles, tels que les sucres, les acides aminés, les bases azotées ou les acides gras, grâce à des enzymes extracellulaires (cellulases, protéases, lipases...) excrétées par des microorganismes hydrolytiques (Montero et al., 2008). Les protéines sont alors transformées en acides aminés à l'aide d'enzymes provenant de microorganismes de types *Clostridium sp.*, *Peptococcus sp.*, les carbohydrates en sucres à l'aide microorganismes de types *Acetivibrio cellulolyticus*, *Staphylococcus sp.*, les lipides en AGVs, en alcool ou en acides aminés avec des microorganismes de types *Clostridium sp.*, *Micrococcus sp.* (Amani et al., 2010). L'activité des microorganismes hydrolytiques présents dans un digesteur dépendent de l'origine de l'inoculum et des conditions opératoires utilisées (température, type de déchets, pH...). L'hydrolyse est souvent l'étape limitante de la digestion anaérobie de déchets solides (Vavilin et al., 1996; Zhang et al., 2007) et des prétraitements peuvent être utilisés pour faciliter cette étape (Sambusiti et al., 2013).

### 1.2.1.2 Acidogenèse

Durant l'acidogenèse, les acides aminés, les sucres et les acides gras obtenus durant l'hydrolyse sont transformés en acides gras volatils (AGVs) comme l'acétate, le butyrate, le propionate ou le lactate, en acides organiques autres (lactate) et alcools à l'aide de microorganismes acidogènes, comme par exemple *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.* ou encore *Clostridium sp.* (Amani

et al., 2010). Cette étape est 30 à 40 fois plus rapide que l'hydrolyse (Moletta, 2011). Elle est aussi plus rapide que l'acétogénèse et la méthanogénèse. Des inhibitions de la méthanogénèse et de l'acétogénèse peuvent avoir lieu, à cause de l'accumulation des produits issus de l'acidogénèse comme les AGVs (Hori et al., 2006). La Table 1-4 présente quelques réactions de l'acidogénèse à partir de glucose, qui est le principal composant la cellulose.

Table 1-4: Réactions principales d'acidogénèse et leurs enthalpies libres de réaction à 25°C à partir du glucose à pH 7.

(Cord-Ruwisch et al., 1988; Ding et al., 2010; Moletta, 2011; Thauer et al., 1977), en italique : calculé à partir de données de Thauer et al., (1977) et de Haynie, (2001).

Equations	$\Delta G^{\circ}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
$C_6H_{12}O_6 \leftrightarrow 2 CH_3CH_2OH$ (éthanol) + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup>	-225
$C_6H_{12}O_6 \leftrightarrow 2 C_3H_5O_3^-$ (lactate) + 2 H <sup>+</sup>	-198
$C_6H_{12}O_6 + 6 H_2O \leftrightarrow 6 CHO_2^-$ (formate) + 6 H <sup>+</sup>	-6
$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \leftrightarrow C_4H_5O_4^{2-}$ (succinate) + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4 H <sup>+</sup> + 5 H <sub>2</sub>	-247
$C_6H_{12}O_6 \leftrightarrow 3 CH_3COO^-$ (acétate) + 3 H <sup>+</sup>	-311
$C_6H_{12}O_6 + 4 H_2O \leftrightarrow 2 CH_3COO^-$ (acétate) + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4 H <sup>+</sup> + 4 H <sub>2</sub>	-206
$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2 \leftrightarrow 2 C_2H_5COO^-$ (propionate) + 2 H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	-359
$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \leftrightarrow C_3H_7COO^-$ (butyrate) + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3 H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	-254
$C_6H_{12}O_6 + H_2 \leftrightarrow C_4H_9COO^-$ (valérate) + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	-139
$C_6H_{12}O_6 + 4 H_2 \leftrightarrow C_5H_{11}COO^-$ (caproate) + 4 H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	-407
$CH_3CH_2OH$ (éthanol) + $C_3H_7COO^-$ (butyrate) $\leftrightarrow C_5H_{11}COO^-$ (caproate) + H <sub>2</sub> O	-39
$C_6H_{12}O_6 + HCO_3^- \leftrightarrow C_4H_5O_4^{2-}$ (succinate) + $CH_3COO^-$ (acétate) + $CHO_2^-$ + 3 H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	-144
$C_3H_5O_3^-$ (lactate) + 2 H <sub>2</sub> O $\leftrightarrow C_3H_7COO^-$ (butyrate) + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	-56
3 $C_3H_5O_3^-$ (lactate) $\leftrightarrow CH_3COO^-$ (acétate) + 2 $C_2H_5COO^-$ (propionate) + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	-165
$CH_3CH_2OH$ (éthanol) + $CH_3COO^-$ (acétate) $\leftrightarrow C_3H_7COO^-$ (butyrate) + H <sub>2</sub> O	-39
$CH_3CH_2OH$ (éthanol) + $C_2H_5COO^-$ (propionate) $\leftrightarrow C_4H_9COO^-$ (valérate) + H <sub>2</sub> O	-39
2 $CH_3CH_2OH$ (éthanol) + $CH_3COO^-$ (acétate) $\leftrightarrow C_5H_{11}COO^-$ (caproate) + 2 H <sub>2</sub> O	-77

### 1.2.1.3 Acétogénèse

L'acétogénèse est l'étape où tous les métabolites microbiens (sauf l'acétate) sont transformés en acétate, en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub> à l'aide de deux groupes de microorganismes :

- **Les microorganismes acétogènes producteurs obligatoires d'H<sub>2</sub>** qui utilisent les AGVs, l'alcool et les acides gras pour produire de l'H<sub>2</sub>, du CO<sub>2</sub> et de l'acétate comme par exemple *Syntrophobacter wolinii* ou *Syntrophomonas wolfei* (Amani et al., 2010),

- **Les microorganismes homoacétogènes** qui utilisent l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> pour produire de l'acétate comme par exemple *Clostridium aceticum* (Amani et al., 2010). Ces microorganismes sont en compétition directe pour les substrats avec les méthanogènes hydrogénotrophes qui utilisent de l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> pour produire du CH<sub>4</sub>.

Les réactions de production d'H<sub>2</sub> sont thermodynamiquement défavorables ( $\Delta G^0 > 0$ ) pour des conditions standards ([réactif]=1M et P<sub>gaz</sub>=1atm) (Table 1-5) mais possibles pour des pressions partielles en H<sub>2</sub> très faibles ( $10^{-4} \text{atm} > P_{\text{H}_2} > 10^{-6} \text{atm}$ ) dans le milieu (Moletta, 2011) (voir la partie 1.2.3.2 Hydrogène). Il existe donc une nécessité d'éliminer l'hydrogène dès sa formation pour rendre ces réactions possibles et c'est ce qui se produit lors de l'étape de méthanogenèse.

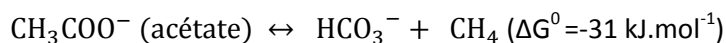
Table 1-5: Réactions principales d'acétogenèse et d'homoacétogenèse et leurs enthalpies libres de réaction à 25°C et pH 7.  
(Cord-Ruwisch et al., 1988; Moletta, 2011), en italique : calculé à partir de données de Thauer et al., (1977).

Equations	$\Delta G^0$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$ (lactate) + 2 H <sub>2</sub> O ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	-4
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH(éthanol) + H <sub>2</sub> O ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	10
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COO <sup>-</sup> (propionate) + 3 H <sub>2</sub> O ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 3 H <sub>2</sub>	76
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> COO <sup>-</sup> (butyrate) + 2 H <sub>2</sub> O ↔ 2 CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	48
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> COO <sup>-</sup> (valérate) + 5 H <sub>2</sub> O ↔ 2 CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup> + 5 H <sub>2</sub>	711
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> COO <sup>-</sup> (valérate) + 2 H <sub>2</sub> O ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COO <sup>-</sup> (propionate) + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	48
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> COO <sup>-</sup> (caproate) + 4 H <sub>2</sub> O ↔ 3 CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + 2 H <sup>+</sup> + 4 H <sub>2</sub>	96
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> COO <sup>-</sup> (caproate) + 2 H <sub>2</sub> O ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> COO <sup>-</sup> (butyrate) + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub>	48
C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (succinate) ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 3 H <sub>2</sub>	56
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH(éthanol) + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + 2 CHO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (formate) + H <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	7
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> ↔ CHO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (formate) + H <sub>2</sub> O	-1
Homoacétogenèse : 4 H <sub>2</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> ↔ CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> (acétate) + 3 H <sub>2</sub> O	-105

#### 1.2.1.4 Méthanogenèse

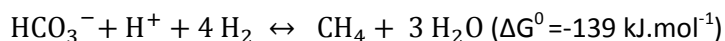
Lors de la méthanogenèse, l'acétate, l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> sont transformés en CH<sub>4</sub> et en CO<sub>2</sub>. Cette réaction est réalisée par des archées de plusieurs types :

- **Les archées méthanogènes acétoclastes** qui utilisent l'acétate comme substrat selon la réaction suivante:



Cette voie métabolique produit 70% du CH<sub>4</sub> total dans la digestion anaérobie (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991a) et implique différents microorganismes comme *Methanosaeta concilii* ou *Methanosarcina acetivorans* (Amani et al., 2010).

- **Les archées méthanogènes hydrogénotrophes** qui produisent du CH<sub>4</sub> à partir du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub> selon la réaction suivante :



Cette voie correspond à 30% du CH<sub>4</sub> total dans la digestion anaérobie même si cette réaction est plus efficace énergiquement (Hattori et al., 2000) et peut être réalisée par *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter arboriphilus* (Amani et al., 2010).

- **Les archées méthanogènes méthylotrophes** qui utilisent des composés méthylés comme le méthanol ou le sulfure diméthyle (Garcia et al., 2000).

## 1.2.2 Paramètres influençant la digestion anaérobie

Puisque la digestion anaérobie correspond à une suite et une interaction de réactions biologiques, certains paramètres environnementaux influencent les performances globales de la digestion anaérobie, qu'elle soit conduite en voie sèche ou humide. Ainsi, la température et le pH peuvent avoir une influence directe sur les microorganismes et leur activité, ce qui aura des conséquences sur la performance de la digestion anaérobie. De même, la composition de la communauté microbienne et le rapport de la quantité de substrat sur la quantité de microorganismes présents peuvent avoir un effet sur les performances.

### 1.2.2.1 Température

La température est un paramètre influant fortement la digestion anaérobie. En effet, la température va avoir une action sur l'activité des microorganismes, et par conséquent sur les vitesses des réactions biologiques et sur les voies métaboliques. L'optimum est à 35°C pour les microorganismes mésophiles et à 55°C pour les microorganismes thermophiles (Jha et al., 2011). La température de transition entre microorganismes mésophiles et thermophiles est de 42°C (Gerardi, 2003). La plupart des méthanogènes sont mésophiles et sont très sensibles aux variations soudaines de température (Chandra et al., 2012).

De plus, la température du procédé ne doit pas dépasser 60°C pour les microorganismes thermophiles et 40°C pour les mésophiles. En effet, ces températures correspondent aux optimums pour certains microorganismes présents dans la digestion anaérobie et un dépassement de ces températures limites provoque une baisse du rendement avec une diminution de la vitesse de dégradation des substrats (Ahring et al., 2001). A titre d'exemple, la production et la conversion du propionate sont stoppées lorsque la température passe de 55 à 65°C (Ahring et al., 2001). D'un point de vue plus général, **lorsque la température augmente :**

- **La cinétique de l'étape d'hydrolyse est plus rapide, ce qui peut réduire les temps de séjour au sein du digesteur** (Bouallagui et al., 2004). La cinétique d'hydrolyse est par exemple 2 fois plus importante en digestion anaérobie thermophile qu'en mésophile pour de la paille de blé en réacteur UASS, (Upflow Anaerobic Solid State) (Pohl et al., 2012). Elle est de même 5 à 6 fois plus importante pour la cellulose en conditions thermophiles (Bouallagui et al., 2004), grâce à l'augmentation des vitesses de dégradation selon la loi d'Arrhenius, à un meilleur abattement en matière organique (Bouallagui et al., 2004) et à une plus grande solubilité des composés hydrophobes (Angelidaki and Ellegaard, 2003). De plus, **la vitesse de croissance des microorganismes est 27 à 60% plus efficace** en digestion anaérobie thermophile (Fernández-Rodríguez et al., 2013).
- Cependant, **la stabilité du réacteur sur le long terme diminue** (Bernet and Buffière, 2008; Jha et al., 2011) car les microorganismes thermophiles sont plus sensibles aux variations des conditions environnementales (El-Mashad et al., 2004; Karthikeyan and Visvanathan, 2012). De plus, **le risque de toxicité de l'ammoniac augmente**, avec une augmentation de la concentration de la forme toxique indissocié (Angelidaki et al., 2003; Meena Krishania et al., 2013). La **mortalité des microorganismes augmente également** car ils ont besoin de plus d'énergie, ce qui va provoquer des problèmes de maintenance et la lyse des cellules (Ahring et al., 2001). Les microorganismes thermophiles sont également plus sensibles à l'accumulation d'acides gras à longues chaînes (Karthikeyan and Visvanathan, 2012).
- La concentration en AGVs augmente plus rapidement au début de la digestion anaérobie thermophile mais reste moins importante au total que pour une digestion anaérobie mésophile (Lu et al., 2007), surtout pour l'acétate (Shi et al., 2013). Cette différence est due au fait que les activités des microorganismes consommant l'acétate et le butyrate diminuent au cours du temps, avec une diminution de l'activité des méthanogènes acétoclastes (Ahring et al., 2001).

La digestion anaérobie peut aussi avoir lieu avec une température psychrophile (10-20°C) mais ce type de digestion est plutôt utilisée dans les digesteurs de type lagune ou en fosses, où le procédé n'est pas chauffé et la température dépend de la température extérieure (Chandra et al., 2012). La production de CH<sub>4</sub> a lieu lorsque la température est proche de 20°C mais ce type de digestion anaérobie produit une plus faible quantité de biogaz pour un temps donné, et est donc beaucoup moins rentable (Pain et al., 1988).

### 1.2.2.2 **pH**

Un pH proche de la neutralité induit un fonctionnement optimal de l'ensemble de la chaîne trophique de la digestion anaérobie. Des variations de pH trop importantes peuvent avoir un effet négatif sur les microorganismes, notamment hydrolytiques (Veeken et al., 2000), ou encore sur la structure des communautés bactériennes (Sung and Liu, 2003).

Le pH a une influence prépondérante sur la phase d'hydrolyse. En effet, l'hydrolyse des molécules carbonées dépend du pH (plus importante pour un pH autour de 7-8) et diminue avec

l'ajout d'acétate. Cependant, le pH n'influence pas l'hydrolyse des molécules azotées alors que l'ajout d'acétate diminue leur hydrolyse (Lü et al., 2006).

Pour l'étape d'acidogénèse, le pH optimum se situe autour de 5,5 et 6,5 (Ward et al., 2008). Les microorganismes fermentaires peuvent supporter un pH entre 4 et 8,5 (Hwang et al., 2004). Les méthanogènes sont très sensibles au pH, et possède une zone de fonctionnement pour un pH proche de la neutralité (entre 6 et 8) (Chandra et al., 2012; Meena Krishania et al., 2013) avec une baisse d'activité pour un pH inférieur à 6,6. Un pH inférieur à 6,2 est même considéré comme toxique pour les méthanogènes (Dague, 1968) .

Le pH varie en fonction de la composition en métabolites et en gaz dissous dans le milieu réactionnel. L'équilibre entre le CO<sub>2</sub> dissous et les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> correspond à l'alcalinité d'un milieu et apporte de la résistance au milieu contre des variations rapides du pH (Ward et al., 2008). Ainsi une accumulation de CO<sub>2</sub> dans le ciel gazeux, en lien avec l'équilibre calco-carbonique (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+H<sup>+</sup> ↔ CO<sub>2, dissous</sub> + H<sub>2</sub>O), résulte en une augmentation du CO<sub>2</sub> dissous sous la forme HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ward et al., 2008) et entraîne une baisse de pH. Le pH influence aussi le métabolisme (Ye et al., 2007) avec une variation des produits formés à pH 4 par rapport à pH 5-6. En effet, la production d'AGVs majoritaires par les microorganismes est le butyrate pour un pH acide et le propionate pour un pH basique. Outre l'effet direct du pH, la toxicité de différents composés présents dans le milieu réactionnel dépend aussi du pH. En effet, certains inhibiteurs de la méthanogénèse comme les AGVs, le sulfure d'hydrogène ou encore l'azote ammoniacal ne sont toxiques que sous leur forme non ionique, et la proportion de forme ionique/non-ionique évolue avec le pH (Lay et al., 1997) et l'alcalinité du milieu. Par exemple, la forme ammoniac, qui est la plus toxique, devient prédominante pour un pH basique alors que les formes toxiques des AGVs et du sulfure d'hydrogène deviennent prédominantes pour un pH acide (Mata-Alvarez, 2003).

### 1.2.2.3 **Inoculation**

La quantité des microorganismes et la structure de la communauté microbienne, apportées lors de l'inoculation, souvent exprimées par le rapport substrat/inoculum (S/X), ont une influence importante dans la digestion anaérobie en batch. En effet, avec un S/X élevé, c'est-à-dire une inoculation faible, l'activité hydrolytique est élevée par rapport aux étapes suivantes, ce qui peut être intéressant puisque l'hydrolyse est limitante pour la digestion anaérobie des solides (Fernández et al., 2008). Cependant, ces conditions peuvent amener à une acidification du milieu liée une accumulation transitoire d'AGVs et à une baisse du pH (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Staley et al., 2011), provoquées par un déséquilibre entre les produits issus de l'acidogénèse (phase rapide) et les réactifs utilisés pour l'acétogénèse et la méthanogénèse (phases lentes).

A l'inverse, une inoculation importante implique un S/X faible, évitant ainsi l'acidification. Avec un S/X faible, les quantités de bactéries acétogènes et de méthanogènes sont suffisamment importantes pour éviter ce déséquilibre. Ainsi, la digestion anaérobie est plus performante avec une quantité d'inoculum plus importante (pour 30% d'inoculum au lieu de 20% (Montero et al., 2009)), et pour un S/X faible (c'est-à-dire un S/X de 2 plutôt que pour un S/X de 5 en voie sèche (Liew et al., 2012)). Cependant, l'influence du S/X n'est dominante qu'en début de digestion anaérobie, ce qui correspondrait au temps d'adaptation des microorganismes aux conditions du milieu (Motte et al.,

2013a). La température peut aussi avoir un effet cumulé avec le S/X sur la digestion anaérobie et plus particulièrement sur la production finale de biogaz. En effet, pour une digestion anaérobie en batch de cannes de maïs à 37°C, plus le S/X est faible, plus la production finale de biogaz est importante, avec une inhibition forte pour un S/X entre 4,58 et 7,41. A 55°C, pour un S/X de 2,43 à 4,58, la production finale de biogaz augmente et l'inhibition n'est visible que pour un ratio de 7,41 (Li et al., 2011).

La composition en microorganismes est aussi importante mais elle peut dépendre de nombreux facteurs comme l'origine de l'inoculum initial, la température et le pH. A titre d'exemple, la digestion anaérobie démarre plus rapidement avec 23% de méthanogènes en plus initialement (Montero et al., 2009).

### 1.2.3 Inhibiteurs de la digestion anaérobie

La plupart des inhibiteurs de la digestion anaérobie sont connus pour la digestion anaérobie par voie humide. Certains inhibiteurs de la digestion anaérobie sont des intermédiaires réactionnels comme les acides gras volatils ou l'H<sub>2</sub>, qui vont avoir un effet direct sur les microorganismes les produisant mais aussi sur les autres microorganismes de la digestion anaérobie. L'effet inhibiteur de ces molécules dépend des conditions expérimentales comme la température et le pH.

#### 1.2.3.1 Acides gras volatils

Les acides gras volatils, produits lors de l'acidogénèse et l'acétogénèse, sont utilisés ensuite lors de l'acétogénèse et de la méthanogénèse pour former de l'H<sub>2</sub>, du CO<sub>2</sub> et du CH<sub>4</sub>. L'accumulation d'AGVs dans le milieu (Ahring et al., 1995) présente un effet inhibiteur sur l'ensemble des étapes de la digestion anaérobie (Jha et al., 2011). Une concentration importante en AGVs peut limiter l'hydrolyse de la biomasse (Siegert and Banks, 2005; Veeken et al., 2000) et inhiber les microorganismes en produisant des acides, ce qui va donc réduire la vitesse de l'acidogénèse (Meena Krishania et al., 2013). La concentration en AGVs possède aussi un effet sur la méthanogénèse, puisque ces AGVs vont être utilisés pour produire de l'acétate puis du CO<sub>2</sub> et du CH<sub>4</sub> par les méthanogènes acétotrophes (Angelidaki et al., 2003; Borzacconi et al., 1997; Hori et al., 2006; Nielsen et al., 2007). De plus, la concentration en propionate peut favoriser la prédominance des méthanogènes hydrogenotrophes sur les acétotrophes (Hori et al., 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, les concentrations inhibitrices des AGVs varient en fonction du pH. En effet, la toxicité des AGVs est liée à leur concentration de la forme indissociée (AH au lieu de A<sup>-</sup> et H<sup>+</sup>), qui entre librement dans les cellules où ils se dissocient : ils peuvent ainsi provoquer un dérèglement de l'homéostasie et une diminution du pH des cellules (Appels et al., 2008). Ainsi, les AGVs sous forme indissociées à pH faible sont plus toxiques pour les microorganismes surtout méthanogènes (Vedrenne, 2007) et hydrolytiques (Abbassi-Guendouz, 2012; Veeken et al., 2000).

La concentration inhibitrice des AGVs dépend aussi de la teneur en matières sèches du milieu. En effet, en voie humide, les concentrations inhibitrices en AGVs sont environ de l'ordre de 2 g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> à 35°C et pH 7 (Siegert and Banks, 2005). En voie sèche, les digesteurs ne sont pas inhibés pour une teneur en AGVs de 2,3 g.kg<sup>-1</sup> mais sont inhibés pour 17,7 g.kg<sup>-1</sup> d'AGVs à 22% de MS en utilisant du maïs comme substrat (Li et al., 2011). La toxicité dépend aussi du type d'AGVs présents. Ainsi, l'acide propionique est l'AGV le plus toxique et inhibe l'hydrolyse et l'acide acétique le moins toxique des AGVs (Amani et al., 2011).

### 1.2.3.2 Hydrogène

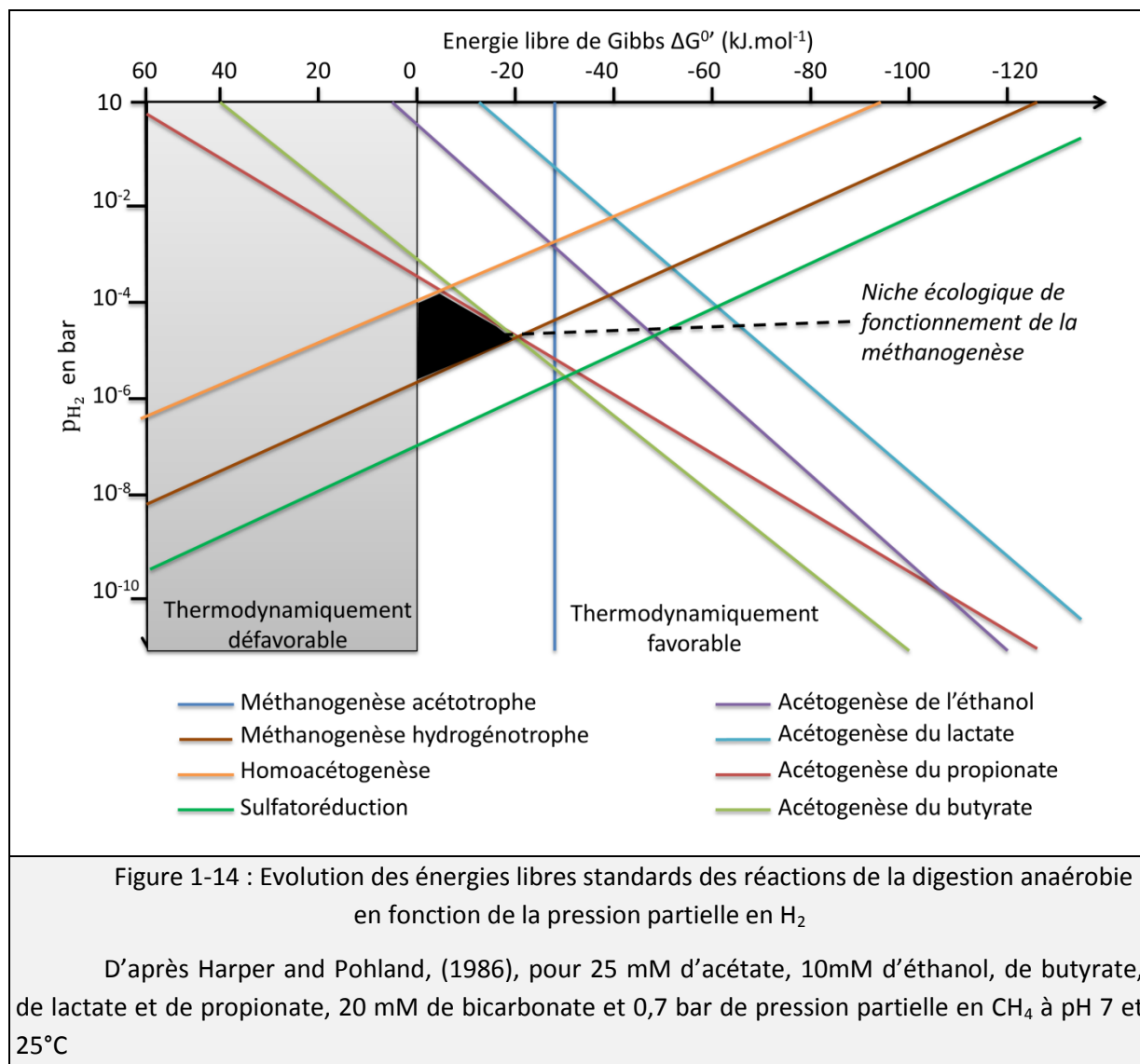
L'H<sub>2</sub> est à la fois nécessaire pour le bon déroulement de la digestion anaérobie, puisqu'il est utilisé pour produire du CH<sub>4</sub> lors de la méthanogenèse, mais il constitue aussi un composé inhibiteur de la digestion anaérobie comme beaucoup d'auteurs l'ont précédemment rapporté (Moletta, 2011; Ahring and Westermann, 1988; Amani et al., 2010). L'H<sub>2</sub> est produit lors de l'acidogenèse par les voies acétate et butyrate (Guo et al., 2010). Il est aussi produit au cours de la phase d'acétogenèse à partir des produits de l'acidogenèse comme les AGVs et l'éthanol, mais ces réactions sont endergoniques, c'est-à-dire défavorables avec une enthalpie libre positive. Les produits de ces réactions (acide acétique, H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) doivent donc être consommés par des méthanogènes (Amani et al., 2010; Montero et al., 2009) pour que les réactions puissent se réaliser. Cela se traduit par l'obligation d'avoir des pressions partielles faibles en hydrogène (P<sub>H<sub>2</sub></sub>), dont les valeurs données dans la littérature sont les suivantes pour la digestion anaérobie à faible taux de MS : 2 bars de P<sub>H<sub>2</sub></sub> dans le ciel gazeux pour une digestion anaérobie par voie humide (Arslan et al., 2012), 10<sup>-3</sup> bars de P<sub>H<sub>2</sub></sub> pour que la réaction de production de l'acétate et de l'H<sub>2</sub> à partir du glucose p (Hallenbeck, 2005). Au niveau thermodynamique, la P<sub>H<sub>2</sub></sub> a une influence importante sur la variation de l'énergie libre de Gibbs pour diverses réactions de la digestion anaérobie (Figure 1-14). En effet, la P<sub>H<sub>2</sub></sub> a besoin d'être entre 10<sup>-4</sup> bar et 10<sup>-6</sup> bar à 25°C et pH 7 pour que la réaction de consommation de l'H<sub>2</sub> pour produire du CO<sub>2</sub> et du CH<sub>4</sub> réalisée par les méthanogènes puisse se dérouler thermodynamiquement (Figure 1-14). Cette zone thermodynamique correspond à une zone où toutes les énergies de Gibbs des réactions impliquées dans la méthanisation sont négatives, c'est-à-dire favorables (Harper and Pohland, 1986; Moletta, 2011).

De plus, il a été observé que l'H<sub>2</sub> pouvait ralentir la dégradation de l'acétate, du propionate et du butyrate, pour une P<sub>H<sub>2</sub></sub> supérieure à 10<sup>-4</sup> bar (Amani et al., 2010; Massé and Droste, 2000), mais aussi la production des AGVs et plus particulièrement du butyrate (Ahring and Westermann, 1988) pour une P<sub>H<sub>2</sub></sub> de 0,02 bars dans le ciel gazeux.

L'H<sub>2</sub> possède aussi un effet indirect sur les microorganismes. Ainsi, la croissance des méthanogènes et des acidogènes est affectée par l'ajout d'H<sub>2</sub> en continu, due à une augmentation du pH au-dessus de 8 avec la consommation de CO<sub>2</sub> sous la forme HCO<sup>3-</sup> avec l'H<sub>2</sub> par les méthanogènes hydrogénotrophes pour produire du CH<sub>4</sub>. (Luo and Angelidaki, 2013; Luo et al., 2012). L'introduction de l'H<sub>2</sub> permet aussi d'augmenter l'activité spécifique des méthanogènes sur l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>. L'ajout d'H<sub>2</sub> contribuerait aussi à une augmentation de la quantité de microorganismes (Luo and Angelidaki, 2013).

A ce jour, de nombreuses études se sont focalisées sur l'inhibition de l'H<sub>2</sub> mais ces travaux concernent essentiellement la DA à faible teneur en MS (c'est-à-dire le traitement des effluents liquides).





### 1.2.3.3 Dioxyde de carbone

Le CO<sub>2</sub> est produit lors de l'acidogenèse, l'acétogenèse et la méthanogenèse. Peu d'études existent sur le rôle du CO<sub>2</sub> en DA. L'ajout de CO<sub>2</sub> peut faire chuter le pH, par l'équilibre calco-carbonique (voir 1.2.2.2 pH), si l'alcalinité du milieu est trop faible et être inhibiteur de la DA. L'effet détecté sera plutôt lié à une chute de pH et non l'effet direct du CO<sub>2</sub> sur les communautés microbiennes de la digestion anaérobie

Le CO<sub>2</sub> est également connu pour avoir un effet inhibiteur sur la production et la dégradation de certains AGVs. Ainsi, le CO<sub>2</sub> présente un effet direct inhibiteur sur la dégradation de l'acétate (1300 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> à 350 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), du propionate (200 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> à 60 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) ainsi que la dégradation du glucose lorsque la P<sub>CO2</sub> passe de 0 de 1 bar à pH maintenu à 7 (Hansson and Molin, 1981). De plus, la production des AGVs, et plus spécifiquement la production d'acétate et de propionate sont inhibées pour une P<sub>CO2</sub> de 1 à 2 bars à pH 4,5-5 et à pH 7 (Arslan et al., 2012; Hansson and Molin, 1981). Le CO<sub>2</sub> présente aussi un effet direct inhibiteur sur les microorganismes lactiques et acétogènes à pH 5,3 (Kim et al., 2006) et les méthanogènes acétoclastes à pH 7, avec une diminution

de 10 % du rendement de production de  $\text{CH}_4$  pour une  $P_{\text{CO}_2}$  augmentant de 0,2 bar à 1 bar (Hansson and Molin, 1981). De plus, le  $\text{CO}_2$  peut avoir un effet négatif sur la production de  $\text{H}_2$  à pH 5.5 pour un ajout de  $\text{CO}_2$  de 500 ml/min (Bru et al., 2012).

A l'inverse, le  $\text{CO}_2$  est connu pour avoir un effet positif sur l'acidogénèse et notamment la production d' $\text{H}_2$  et de butyrate à un pH acide. Ainsi, le  $\text{CO}_2$  aurait un effet direct positif sur la production d' $\text{H}_2$  quand le  $\text{CO}_2$  est ajouté dans le système à 300 ml.min<sup>-1</sup> et le pH maintenu à 5,3 (Kim et al., 2006) et à pH 5,5 pour un ajout de  $\text{CO}_2$  de 30 ml.min<sup>-1</sup> (Bru et al., 2012) et sur la production de butyrate pour 2 bars de  $\text{CO}_2$  (Arslan et al., 2012), avec un pH initial de 5 non maintenu pour un effluent riche en carbohydrates en voie humide.

Le mélange du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{H}_2$  dans le ciel gazeux peut aussi limiter l'effet inhibiteur de l' $\text{H}_2$  sur la production d'AGVs. Ainsi, en mélangeant 1 bar d' $\text{H}_2$  et de  $\text{CO}_2$ , l'effet inhibiteur de l' $\text{H}_2$  n'est plus visible sur la production d'acétate ainsi que la production d'éthanol et mais la production de propionate diminue pour un effluent riche en carbohydrates en voie humide avec un pH diminuant de 5 à 3,7 (Arslan et al., 2012).

#### 1.2.3.4 Autres inhibiteurs

**L'azote** est nécessaire pour la digestion anaérobie. Cependant, la concentration d'azote nécessaire pour les microorganismes lors de la digestion anaérobie devrait rester inférieure à 0,2 g.L<sup>-1</sup> (Sung and Liu, 2003). Son effet inhibiteur sur les microorganismes est surtout dû à la forme libre  $\text{NH}_3$  (ammoniac) (Sprott et al., 1984), et le pH du milieu réactionnel est donc un paramètre crucial, puisqu'il va jouer sur le rapport  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (pKa de 9,2). L'ammoniac est capable de dénaturer les protéines membranaires et de diffuser dans les cellules, ce qui provoque un déséquilibre de protons et un manque en potassium (Sung and Liu, 2003). Par conséquent, l'ammoniac est inhibiteur de la méthanisation et particulièrement des méthanogènes acétoclastes (Hansen et al., 1998; Kayhanian, 1994; Sprott et al., 1984). Il est cependant difficile de donner une concentration inhibitrice de l'ammoniac libre pour les différents microorganismes : en effet, de nombreuses concentrations ont été données dans la littérature (Chen et al., 2008) et leurs concentrations sont affectées par le pH et la température du système (Kayhanian, 1999). Les concentrations inhibitrices en voie sèche sont de l'ordre de 4,3 g<sub>N2</sub>.L<sup>-1</sup> à pH 8 et à 37°C (Wang et al., 2013) et 4 g<sub>N2</sub>.L<sup>-1</sup> pour un pH variant entre 7,5 et 8,5 à 55°C (Nakashimada et al., 2008).

**Les sulfates**, qui peuvent être présents dans le substrat, sont transformés en sulfure d'hydrogène par des groupes de microorganismes appelés sulfato-réducteurs. Le sulfure d'hydrogène est formé lors de dégradation de molécules ayant un composé soufré ou lors de la réduction d'ions sulfate (Chen et al., 2008). Deux types d'inhibitions existent lorsque des microorganismes sulfato-réducteurs sont présents :

- **Une inhibition compétitive pour le substrat**, ici l' $\text{H}_2$ , entre les microorganismes sulfato-réducteurs oxydant l' $\text{H}_2$  et les méthanogènes hydrogénotrophes (Stams et al., 2005; Zinder, 1993).
- **Une inhibition des microorganismes** et en particulier des méthanogènes due à la toxicité de l' $\text{H}_2\text{S}$ , qui peut diffuser dans les cellules et dénaturer les protéines en

formant des ponts sulfure et disulfures entre les chaînes de polypeptides (Chen et al., 2008). De plus, la toxicité de l' $H_2S$  varie avec le pH (McCartney and Oleszkiewicz, 1991).

#### **1.2.4 Conclusion sur la digestion anaérobie**

La digestion anaérobie est le résultat de plusieurs réactions métaboliques, réalisées par une communauté microbienne complexe et variée qui dégrade un substrat complexe en de nombreux produits en un biogaz composé de  $CH_4$  et  $CO_2$ . De nombreux composés intermédiaires peuvent avoir un effet inhibiteur sur les processus biologiques. Ainsi, l' $H_2$  et les AGVs doivent être dégradés rapidement afin que l'ensemble des étapes de la méthanisation puisse avoir lieu. Les conditions de la digestion anaérobie comme la température, le pH, le taux d'inoculation peuvent avoir un effet sur leur accumulation et donc sur les performances observées des procédés.

Cependant, la plupart des recherches sur la digestion anaérobie et ces inhibiteurs ont été réalisées dans des conditions en voie humide, pour de faibles teneurs en matières sèches. Même si les étapes principales et la plupart des inhibiteurs de la DA sont semblables, la diminution de l'eau présente dans le milieu peut avoir un effet sur les mécanismes de la digestion anaérobie par voie sèche (réactions, paramètres, inhibiteurs). Des études portant sur la spécificité de la voie sèche ont été réalisées au cours de ces 10 dernières années mais de nombreuses incertitudes existent pour comprendre les difficultés spécifiques de réalisation de ce type de procédé, ce qui est abordé dans le chapitre suivant.

### **1.3 SPECIFICITE DE LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE**

Deux technologies de digestion anaérobie des déchets solides ont été développées et diffèrent par la teneur en matières sèches du milieu réactionnel : la digestion anaérobie par voie humide est définie le plus souvent par une teneur en MS inférieure à 15% tandis que la digestion anaérobie par voie sèche est opérée à des teneurs en MS supérieures à 15% (Baere et al., 2010; Bolzonella et al., 2003). Cependant, cette teneur limite séparant la voie humide de la voie sèche ne fait pas consensus, avec plusieurs limites données dans la littérature :

- La voie humide peut être définie par une teneur en MS entre 5 et 10%, la voie semi-humide entre 10 et 15% et la voie sèche au-dessus de 15% de MS (Baere et al., 2010; Bolzonella et al., 2003; Yebo Li et al., 2011).
- La voie humide peut aussi être définie par une teneur en MS inférieure à 15%, la voie intermédiaire entre 15 et 25% et la voie sèche au-dessus de 25% de MS (Benbelkacem et al., 2015a; Motte et al., 2013a).
- La voie humide peut aussi être définie par une teneur en MS inférieure à 10%, la voie intermédiaire entre 10 et 20% et la voie sèche au-dessus de 20% de MS (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Forster-Carneiro et al., 2008).

Table 1-6 : Avantages et inconvénients de la digestion anaérobie par voie sèche et voie humide.

D'après Kalia and Singh, (1998); Kusch et al., (2011).

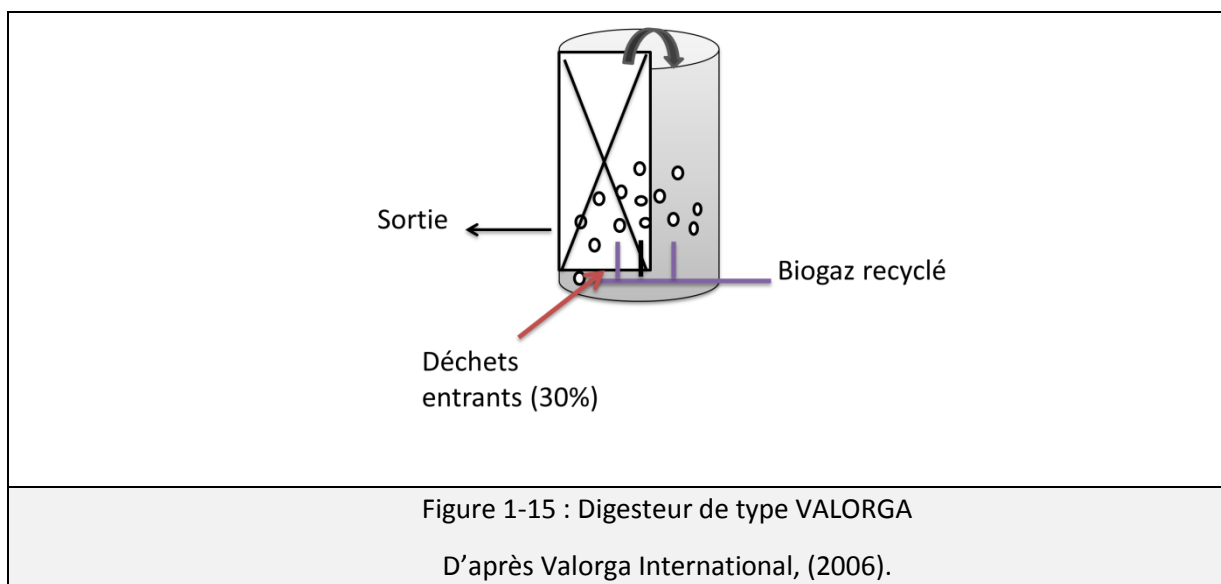
	<b>Voie sèche</b>	<b>Voie humide</b>
<b>Avantages</b>	Diminution de l'ajout en eau Diminution de la taille des réacteurs Séparation de phase simplifiée	Substrat plus homogène Facilité d'agitation
<b>Inconvénients</b>	Hétérogénéité du substrat Inhibition de la DA pour de fortes teneurs en MS (>30%) Problème de transfert de matière Viscosité plus importante donc besoin de pompes plus robustes pour transporter les déchets et le digestat	Consommation en eau importante Taille des fermenteurs plus importante Besoin de déshydrater le digestat Séparation de phase

### 1.3.1 Place de la digestion anaérobie par voie sèche dans l'industrie

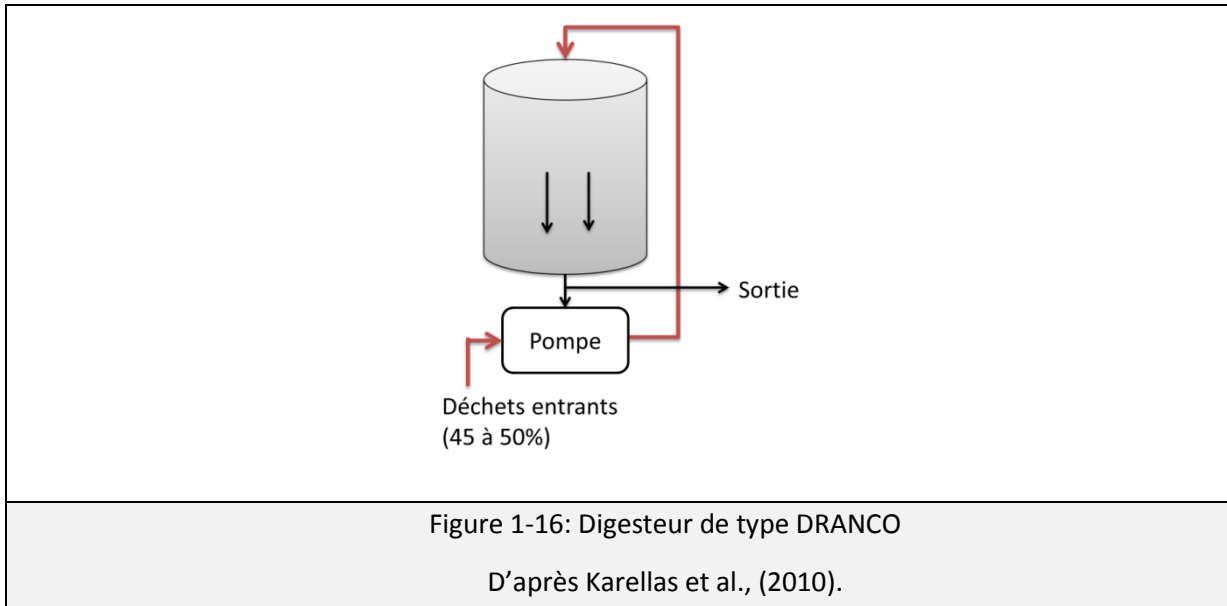
#### 1.3.1.1 Procédés industriels de digestion anaérobie par voie sèche

Deux types de procédés existent pour la digestion anaérobie par voie sèche: les procédés continus et discontinus (batch). Les procédés continus diffèrent surtout par le système d'agitation du digesteur. Après une période de digestion anaérobie de 3 semaines à 2 mois selon les différents sites industriels, les digestats issus des méthaniseurs entrent, dans la plupart des cas, dans une filière de maturation.

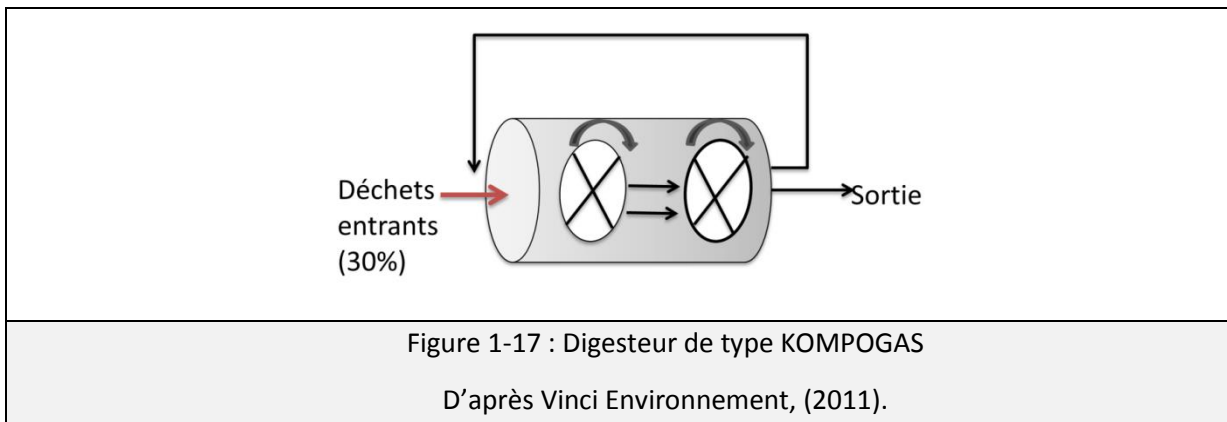
- **Le procédé VALORGA** réalise une agitation intermittente par recirculation du biogaz (sous pression). Cette technologie est principalement utilisée pour la valorisation de la fraction organique des déchets ménagers (Figure 1-15). Ce procédé peut être opéré en mode thermophile ou mésophile.



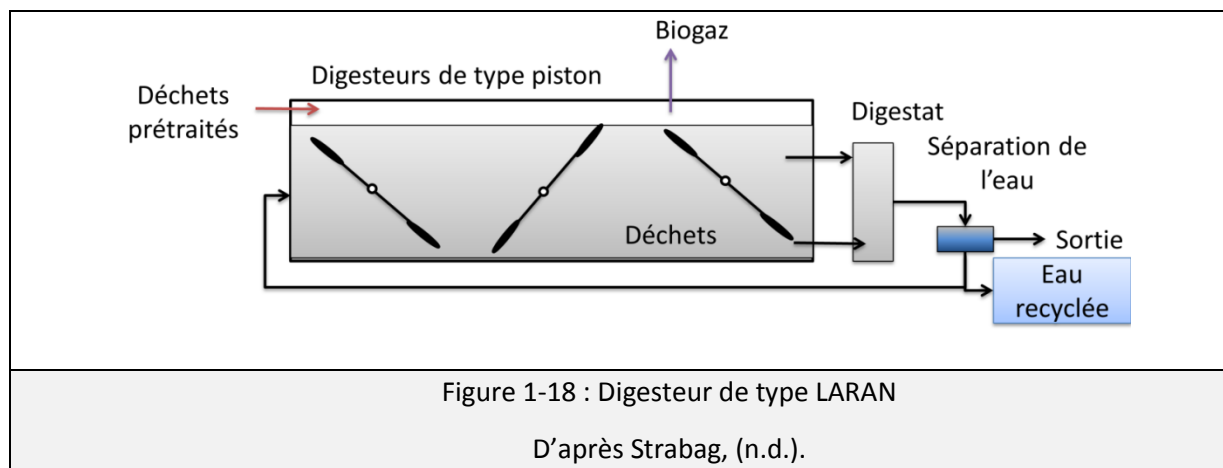
- **Le procédé DRANCO** fonctionne par gravité, avec recirculation du digestat avec le déchet entrant. Ce mode de fonctionnement permet une agitation du réacteur, facilite la libération du biogaz, et évite la présence d'une phase liquide (OWS, n.d.), (Figure 1-16).



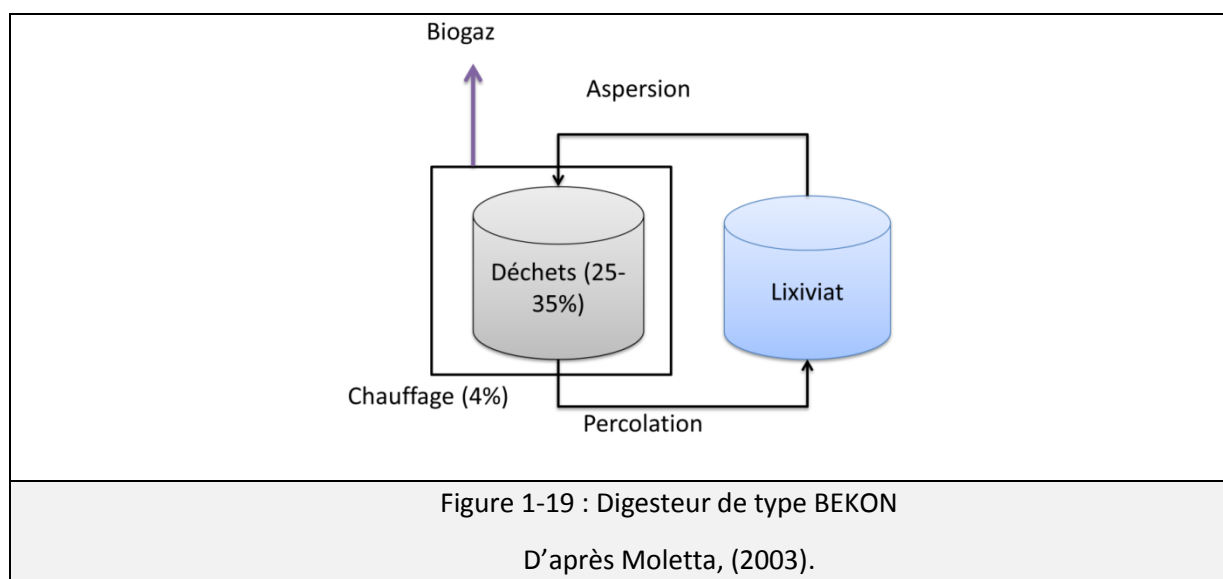
- **Le procédé KOMPOGAS** possède un fonctionnement continu de type piston (Figure 1-17). C'est un procédé par voie sèche avec une agitation mécanique, avec des pâles tournant autour d'un axe longitudinal central (Vinci Environnement, 2011).



- **Le procédé LARAN** est un procédé continu à mode de fonctionnement de type piston. Des mélanges locaux du digesteur sont réalisés par des agitateurs mécaniques (Figure 1-18).



- Pour les procédés discontinus, comme la **technologie de type Bekon**, les déchets et l'inoculum (déchets digérés) sont placés dans un digesteur hermétique pour une durée de fonctionnement proche de 2 mois. Une recirculation de lixiviat (percolat) est utilisée pour humidifier les déchets (Moletta, 2003) et homogénéiser la phase liquide (Figure 1-19). Une recirculation intermittente du lixiviat semble plus intéressante qu'une alimentation continue (Kusch et al., 2012; Vavilin et al., 2003, 2002) qui provoquerait l'acidification du milieu (Kusch et al., 2011).



Le tableau suivant résume les caractéristiques de ces différents procédés, ainsi que leurs fonctionnements.

Table 1-7 : Comparaison des différents réacteurs industriels les plus courants.

	<b>VALORGA</b>	<b>DRANCO</b>	<b>KOMPOGAS</b>	<b>LARAN</b>	<b>BEKON</b>
<b>Géométrie des réacteurs</b>	Cylindrique verticale	Cylindrique verticale	Horizontale	Horizontale	Cylindrique
<b>Température</b>	Mésophile et thermophile	Mésophile et thermophile	Thermophile	Mésophile et thermophile	Mésophile
<b>Temps de rétention (jours)</b>	18-24	15-30	15-20	20	28-35
<b>Fonctionnement</b>	Continu	Continu	Continu	Continu	Discontinu
<b>Mouvement des déchets</b>	Piston	Piston	Piston	Piston	Non
<b>Type d'agitation</b>	Injection de biogaz	Aucune	Mécanique	Mécanique	recirculation du lixiviat
<b>Type de déchets</b>	Fraction organique des déchets ménagers, Déchets verts	Déchets verts, Déchets organiques, Fraction organique des déchets ménagers Boues d'épuration déshydratées	Déchets verts, Déchets organiques Fraction organique des déchets ménagers	Déchets verts, Déchets organiques, Déchets agricoles, Fraction organique des déchets ménagers	Déchets verts, Déchets organiques, Déchets agricoles, Fraction organique des déchets ménagers
<b>Prétraitements</b>	Déchetage, Fermentation anaérobie, Tri manuel, Séparation des métaux, Tri granulométrique	Déchetage, Séparation des métaux, Tri granulométrique	Déchetage, Tri manuel, Séparation des métaux, Tri granulométrique	Déchetage, Fermentation anaérobie, Séparation des métaux, Tri granulométrique	Non
<b>Teneur en MS (%)</b>	30-35% pour les déchets entrant	45 à 50% pour les déchets entrants	30 %	15 à 45%	25 à 30%
<b>Rendement du CH<sub>4</sub> (m<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>3</sup>.tonnes de déchets entrants<sup>-1</sup>)</b>	80-160	100-200	110-130	100	100-180



### 1.3.1.2 Développement industriel de la digestion anaérobie par voie sèche

Au niveau industriel, la digestion des déchets ménagers solides par voie sèche s'est développée depuis les années 2000 jusqu'à être aussi utilisée que la digestion de ces déchets par voie humide, sauf de 2004 à 2007 où des installations de grands parcs de méthanisation thermophiles à voie humide ont eu lieu (Figure 1-20), en prenant en compte les parcs de méthanisation ayant au moins 10% de leurs déchets composés de déchets ménagers organiques, avec une capacité minimum de 3 000 tonnes.an<sup>-1</sup> (Baere et al., 2010; Bolzonella et al., 2003). La digestion anaérobie des résidus ligno-cellulosiques possédant une teneur élevée en MS est le plus souvent réalisée à la ferme, dans des procédés discontinus (ADEME, 2011). La méthanisation à la ferme est en pleine phase de développement avec plus de 40 unités de méthanisation en 2011 en France (ADEME et al., 2011). Elle permet, par exemple, de produire près de 5 200 kilowatts équivalent en utilisant comme substrats 75 % de fumiers et de lisiers, 15 % de déchets issus des industries agroalimentaires et 10% de cultures intermédiaires ou dédiés. Cette stratégie de développement se base sur des petites unités de méthanisation, produisant en moyenne 170 kilowatts d'électricité et avec environ 6 550 tonnes de déchets.an<sup>-1</sup>, ce qui permet d'alimenter environ 450 foyers en électricité, sans prendre en compte le chauffage et l'eau chaude. Elle permet aussi d'obtenir 19 % de volume à épandre en plus sur les terres avec une augmentation des teneurs en azote disponibles de 53% (ADEME et al., 2011).

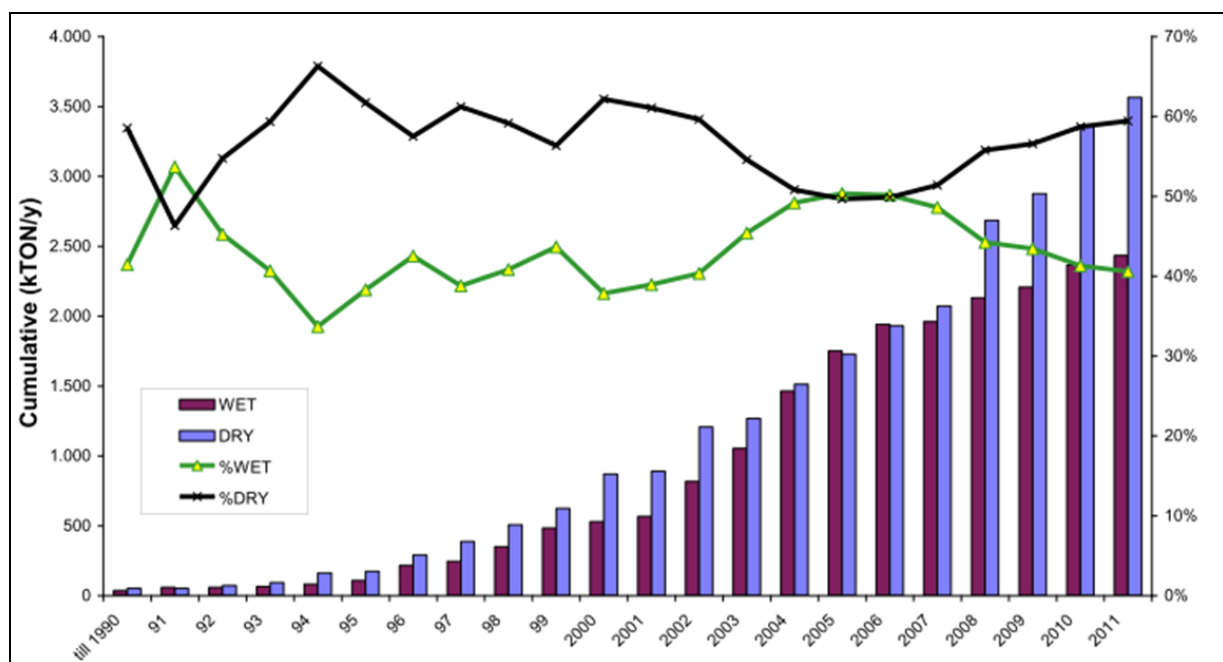


Figure 1-20 : Evolution de la digestion anaérobie par voie sèche et humide de 1991 à 2011 en Europe.

D'après (Baere et al., 2010), avec les parcs de méthanisation ayant au moins 10% de leurs déchets composés de déchets ménagers organiques, avec une capacité minimum de 3 000 tonnes/an, les parcs en construction en Europe et ceux qui ont cessé l'activité durant les années 1990 à 2010.

Pourtant, face au développement important de la digestion anaérobie par voie sèche au niveau industriel à partir des années 90, les activités de recherche académique sur ce sujet ont été beaucoup moins importantes au cours la même période (Figure 1-21), avec un développement plus important à partir de 2008. En effet, le nombre de publications portant sur la digestion anaérobie par voie sèche ne concerne que 9% des publications sur la digestion anaérobie depuis 1990 (827 contre 9575 publications) et 11% pour les 5 dernières années (479 contre 4532 publications en juillet 2015).

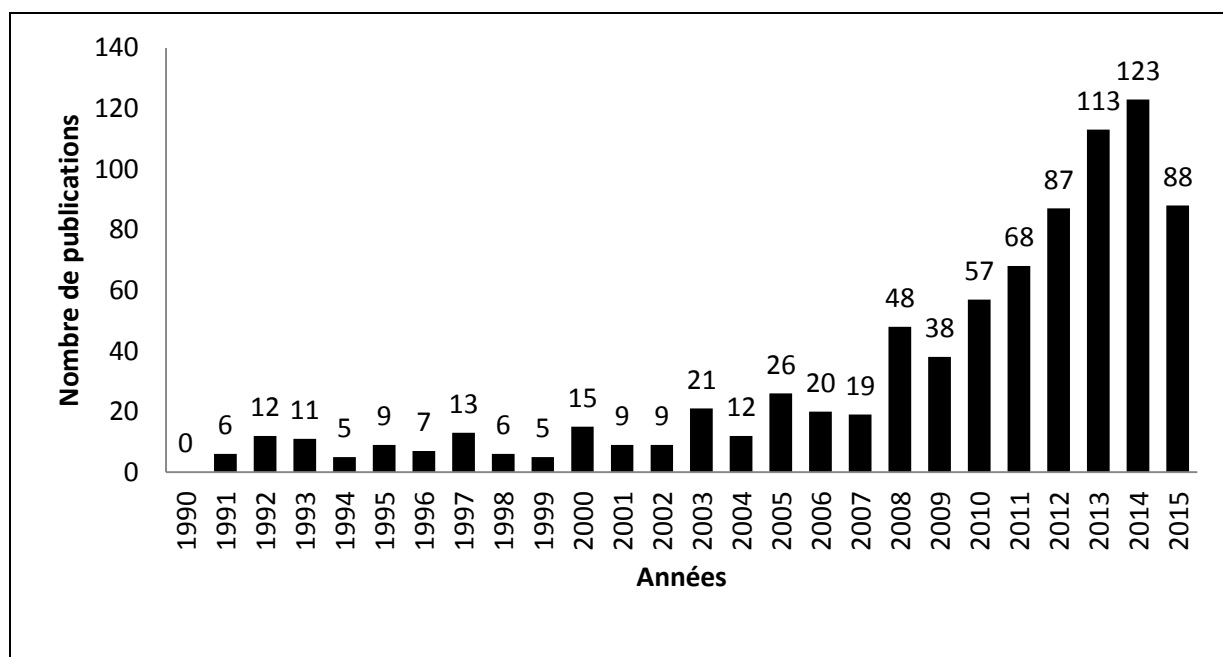


Figure 1-21 : Evolution du nombre de travaux de recherche sur la digestion anaérobie par voie sèche.

D'après une recherche sur Web of Knowledge, Juillet 2015 : sujet comprenant « anaerobic digestion » et « dry » ou « solid-state » ou « high solid\* ».

Suite au développement plus ou moins empirique des technologies de digestion anaérobie par voie sèche à partir des connaissances issues de la digestion humide (Jha et al., 2011), des études scientifiques sont nécessaires afin d'optimiser ce processus au niveau industriel. Pour cela, des études sur les processus de la digestion anaérobie par voie sèche sont nécessaires. Ce besoin de connaissances scientifiques sur la digestion anaérobie par voie sèche peut ainsi expliquer l'augmentation du nombre de publications sur le sujet depuis 2008.

### 1.3.2 Paramètres-clés opératoires de la digestion anaérobie par voie sèche

Les performances de la digestion anaérobie par voie sèche sont souvent inférieures à celles de la digestion anaérobie par voie humide (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Le Hyaric et al., 2011; Motte et al., 2013; Motte et al., 2013). De récentes études ont été réalisées sur les effets des paramètres opératoires sur la digestion anaérobie par voie sèche afin de mieux en comprendre son

fonctionnement. La performance de la digestion anaérobie par voie sèche dépend ainsi des paramètres opératoires du procédé utilisé (teneur en matière sèche, taille des particules, température (Motte et al., 2013; Shi et al., 2013), des caractéristiques du substrat (structure et composition moléculaire et morphologique (Monlau et al., 2012; Motte et al., 2014)), ainsi que de la biomasse microbienne (ratio S/X, composition en méthanogènes (Cui et al., 2011; McMahon et al., 2004)).

### 1.3.2.1 **Teneur en matière sèches**

La digestion anaérobie par voie sèche, généralement définie par une teneur en MS supérieure à 15%, (Baere et al., 2010) correspond à une teneur en eau inférieure à 85%. L'eau présente peut être distinguée en deux types :

- **L'eau liée**, qui est liée physiquement et chimiquement à des solides, à la matrice et à des molécules.
- **L'eau libre** qui peut diffuser dans le milieu (Pommier and Chenu, 2007).

De nombreuses recherches ont été menées pour mieux appréhender l'effet de la teneur en MS. Lorsque la teneur en MS de la digestion anaérobie augmente :

- **La quantité d'eau libre diminue** (Garcia-Bernet et al., 2011a). La présence d'eau est essentielle à la digestion anaérobie car elle dilue les nutriments, les substrats solubles et facilite la diffusion dans le milieu jusqu'aux microorganismes (Mora-Naranjo et al., 2004; Pommier and Chenu, 2007). Avec une diminution de la quantité d'eau libre du milieu, la quantité d'eau disponible diminue.
- **La dégradation du substrat diminue**. Par exemple, pour une DA mésophile de déchets ménagers en batch (Fernández et al., 2008), la dégradation du substrat décroît de 17% pour une teneur en MS augmentant de 20 à 30%. Cette diminution de la dégradation du substrat peut être liée au fait que l'efficacité de l'activité hydrolytique diminue avec l'augmentation de la quantité de solides du milieu (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Kristensen et al., 2009; Pommier and Chenu, 2007).
- **L'activité spécifique des archées méthanogènes diminue**. Par exemple, une diminution 3,5% de cette activité est observée lorsque l'on passe de 18 à 35 % de MS, avec une relation linéaire entre l'activité des méthanogènes et la teneur en eau (Le Hyaric et al., 2011). D'un point de vue global, **la production de CH<sub>4</sub> décroît avec l'augmentation de la teneur en MS** (Forster-Carneiro et al., 2008; Xu et al., 2014), confirmée par les travaux de Motte et al., (2013a). En effet, la teneur en MS (12 à 25% MS) est le facteur le plus important dès 40 jours de digestion anaérobie durant toute la digestion anaérobie pour la production de CH<sub>4</sub> (Motte et al., 2013). Cependant, **l'effet de la teneur en MS peut dans certains cas dépendre du substrat** (Brown et al., 2012; Li et al., 2013). En effet, le rendement de production de CH<sub>4</sub> pour la paille de blé est de 123,9 L.kg<sub>MV</sub><sup>-1</sup> en voie sèche et 139,1 L.kg<sub>MV</sub><sup>-1</sup> en voie humide mais celui de la canne de maïs est meilleur en voie sèche avec 131,8 L.kg<sub>MV</sub><sup>-1</sup> qu'en voie humide avec 124 L.kg<sub>MV</sub><sup>-1</sup> (Brown et al., 2012).

- **La production d'H<sub>2</sub> lors de l'acidogénèse diminue.** L'effet de l'augmentation de la teneur en MS sur la production d'H<sub>2</sub> peut être lié à un changement métabolique comme cela est le cas à partir de 28% de MS avec de la paille de blé comme substrat : au-delà de cette limite, Motte et al., (2013b) ont rapporté que la production de butyrate augmente et les productions d'acétate, de propionate et d'H<sub>2</sub> diminuent. Par conséquent, la production d'H<sub>2</sub> diminue aussi avec l'augmentation de la teneur en MS (de 20 à 35% de MS) pour une fermentation sombre thermophile de déchets ménagers (Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo, 2009) ou de paille ( de 10 à 34% MS) (Motte et al., 2014), ou de déchets agroalimentaires industriels en fermentation mésophile (au-delà de 18% MS) (Robledo-Narváez et al., 2013).
- **La production d'AGVs augmente pour la digestion anaérobie par voie sèche et diminue pour la fermentation sombre** (Benbelkacem et al., 2015a; Motte et al., 2013; Motte et al., 2013). Par exemple, pour un digesteur semi-continu de déchets ménagers, la production d'AGVs augmente avec la teneur en MS, de 1 g<sub>DCCO</sub>.L<sup>-1</sup> à 22% de MS à 25 g<sub>DCCO</sub>.L<sup>-1</sup> à 35% de MS (Benbelkacem et al., 2015a) et de 0 g<sub>AGVs</sub>.g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> pour 10% MS à 36 g<sub>AGVs</sub>.g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 35% MS pour une digestion anaérobie mésophile de carton en batch (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Lors de la fermentation sombre de paille de blé, la concentration totale en AGVs diminue de 900 à 600 mmol.kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> avec l'augmentation de 10 pour 33 % de MS ( Motte et al., 2013).

L'hétérogénéité du milieu augmente avec des variations de la teneur en eau et du pH selon par exemple leur emplacement spatial dans le milieu (Staley et al., 2011). Cette hétérogénéité pourrait influencer la digestion anaérobie en limitant les interactions des microorganismes avec le substrat, ce qui diminuerait la dégradation du substrat et donc la production de biogaz (Abbassi-Guendouz, 2012; Benbelkacem et al., 2015a).

### 1.3.2.2 **Taille des particules**

Pour certains substrats solides, qui sont plutôt utilisés dans la digestion anaérobie par voie sèche comme par exemple de la paille ou des déchets ménagers, il est nécessaire de réaliser des prétraitements comme par exemple une réduction de la taille de ces substrats. En effet, ces déchets contiennent de la lignine (voir 1.1.2 Paille de blé : substrat modèle des déchets ligno-cellulosiques), qui est difficile à dégrader et qui peut former des assemblages avec la cellulose et l'hémicellulose. Ainsi, plus la quantité de lignine du substrat est importante, plus sa biodégradabilité diminue (Monlau et al., 2013). En réalisant des prétraitements comme par exemple du broyage ou une hydrolyse acide, la biodisponibilité de la cellulose et des hémicelluloses augmente, ce qui améliore la biodégradabilité du substrat (Monlau et al., 2012; Sambusiti et al., 2013).

Lors d'expérimentations réalisées en laboratoire, l'objectif d'un prétraitement de type broyage est d'homogénéiser le substrat lorsque de faibles quantités de substrat sont utilisées. Un des prétraitements possibles pour les substrats ligno-cellulosiques à l'échelle laboratoire, pilote et industrielle est la diminution de la taille des particules de substrat par broyage, afin d'obtenir un substrat plus homogène (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Forster-Carneiro et al., 2008; Tabil et al., 2011; Taherzadeh and Karimi, 2008).

Toutefois, **la taille des particules de substrat peut avoir un impact sur le rendement de production du biogaz**. C'est le cas pour une réduction de la taille des particules à 5, 2 et 0,5 cm pour la paille d'orge, avec une augmentation de 19,5 à 54 % du rendement de CH<sub>4</sub> produit pour une digestion anaérobie par rapport aux non-traités (Menardo et al., 2012). Pour la paille de blé, cette augmentation est de 56 à 80 % pour des particules de 5 et de 0,2 cm (Menardo et al., 2012). Ce résultat pour la paille de blé est confirmé par une autre étude de Sharma et al. (1988) basée sur l'étude de particules de 0,088, 0,4, 1 et 6 mm. Dans ces travaux, et quels que soient les déchets ligno-cellulosiques (paille de blé, paille de riz, feuilles de Mirabilis, feuilles de chou-fleur ou encore des peaux de bananes), la production de biogaz augmentait faiblement avec la diminution de la taille des particules.

**La taille des particules de substrat peut avoir un impact spécifiquement sur l'hydrolyse**. En effet, plus la taille des particules est faible, plus la surface de contact du substrat augmente et par conséquent, la zone d'attaque des enzymes extracellulaires hydrolytiques augmente, ce qui peut avoir un effet positif sur l'efficacité de l'hydrolyse (Vidal et al., 2011). Pour Vidal et al. (2011), la diminution de la taille des particules de déchets ligno-cellulosiques permet d'augmenter le rendement de l'hydrolyse enzymatique et de conversion de la biomasse de près de 50%. Cependant, au-delà d'une certaine taille de particules, qui varie selon le type de biomasse, le rendement reste stable et peut même diminuer. Sur un substrat de type paille de blé, Ghizzi et al. (2012) ont montré que la vitesse initiale et le rendement de l'hydrolyse enzymatique variaient avec la taille des particules. Ainsi il a été observé une augmentation de la vitesse initiale de l'hydrolyse d'un facteur 5 et du rendement d'un facteur 7 pour une diminution de la taille des particules de 720 à 48 µm. Cependant, aucune amélioration n'a été reportée lorsque la taille des particules diminuait de 48 µm à 22 µm. Jusqu'à 100 µm, l'augmentation du rendement de l'hydrolyse enzymatique serait due à une augmentation de la surface spécifique (limite de la libération des sucres réducteurs et du glucose), en mettant en contact les enzymes réductrices et des polymères hydrolysables non accessibles avant le broyage. L'augmentation du rendement de l'hydrolyse enzymatique de 100 à 48 µm serait due à une déstructuration interne macromoléculaire, en réduisant la cristallinité de la cellulose avec le prétraitement au vibro-broyeur.

Cependant, **une taille limite des particules existe à partir de laquelle la réduction de taille peut engendrer une limitation de la digestion anaérobie par voie sèche**, avec acidification du milieu due à une hydrolyse enzymatique trop rapide (diminution du pH, augmentation des AGVs produits), et qui dépend du substrat considéré. Ainsi, la taille optimum des particules pour la digestion anaérobie par voie sèche, en batch pour un ratio S/X de 28 à 47 en MV, est de 1,4 mm pour de la paille de blé avec une acidification pour des particules de l'ordre de 0,1 mm (Motte et al., 2013a). Le digesteur s'acidifie avec des particules de taille fine (< 4 mm) d'ordures ménagères, en digestion sèche dans un réacteur semi-continu avec une charge organique de 6 kg<sub>MV</sub>.m<sup>-3</sup>.j<sup>-1</sup>) (Zhang and Banks, 2013). La taille limite des particules à partir de laquelle la réduction de taille peut générer des effets inhibiteurs via l'acidification de la digestion anaérobie par voie sèche semble donc être en général inférieure au mm.

### 1.3.2.3 ***Transferts de matières***

Au niveau industriel, les digesteurs en voie sèche sont souvent peu mélangés et/ou mélangés de manière intermittente. Ainsi, des problèmes de transferts de matières peuvent être présents dans ces digesteurs et limiter les performances de la digestion anaérobie par voie sèche. Les transferts de matières au sein des digesteurs sont régis par deux mécanismes : la convection et la diffusion.

#### 1.3.2.3.1 ***Convection***

La convection est un mode de transfert qui implique un déplacement de matière macroscopique dans un milieu (Kaparaju et al., 2008). Dans les réacteurs industriels, l'agitation mécanique ou par recirculation du biogaz est utilisée pour faciliter la convection.

Cependant, deux théories s'opposent à propos de l'effet de l'agitation sur la digestion anaérobie par voie sèche.

Une de ces théories considère que **l'agitation a un effet positif sur la digestion anaérobie par voie sèche** et qu'elle libère les gaz dissous dans le digestat, améliore la mise en contact de la biomasse active et des matières organiques et empêche la sédimentation (Abbassi-Guendouz, 2012; Jha et al., 2011). L'agitation permet aussi d'augmenter le transfert de chaleur au sein du digesteur, de diminuer la taille des particules au fur et à mesure de la digestion (Kaparaju et al., 2008). Selon Kaparaju et al. (2008), une agitation par intermittence ou minimale est plus favorable à la production de CH<sub>4</sub> qu'une agitation continue pour un réacteur configuration de type CSTR (Continuous stirred-tank reactor). Au niveau industriel, l'agitation permet d'augmenter l'efficacité des procédés de digestion anaérobie en évitant d'avoir des zones mortes hydrauliques, ce qui modifie le temps de rétention hydraulique (Elnekave et al., 2006).

L'autre théorie conclut à **un effet négatif de l'agitation sur la digestion anaérobie par voie sèche**. Des travaux ont reporté un effet défavorable d'une agitation continue pour des digesteurs contenant des déchets ménagers, avec une accumulation de propionate et une diminution des archées méthanogènes (McMahon et al., 2001; Tian et al., 2013). L'agitation faciliterait donc l'hydrolyse, l'acidogénèse et l'acétogénèse mais pas la méthanogénèse et augmenterait donc la concentration en acétate dans le milieu (McMahon et al., 2001; Stroot et al., 2001). Pour une quantité de substrat importante, une agitation rapide est ainsi responsable de l'acidification tandis qu'une faible agitation aboutit à une digestion anaérobie plus efficace (Ghanimeh et al., 2012; McMahon et al., 2001; Stroot et al., 2001). De plus, le démarrage des réacteurs en digestion anaérobie par voie sèche est favorisé par une absence d'agitation (Karim et al., 2005). Selon cette théorie, l'agitation excessive pourrait également détruire l'organisation dimensionnelle de la structure des communautés microbiennes et réduire la vitesse d'oxydation des acides gras volatils, ce qui peut amener à l'instabilité du réacteur (Kaparaju et al., 2008; McMahon et al., 2001; Stroot et al., 2001).

La mise en place d'une agitation efficace est aussi problématique pour la digestion anaérobie par voie sèche car la rhéologie du milieu est complexe. Ces milieux réactionnels sont caractérisés par des seuils de contraintes très élevés qui augmente, de manière exponentielle, avec la teneur en MS (Garcia-Bernet et al., 2011b). Dans le cas de la DA par voie sèche, le transport convectif n'est pas le

transfert de matière le plus important, en particulier lors d'agitation intermittente des digesteurs. Le transport diffusif peut ainsi devenir le mécanisme prépondérant.

### 1.3.2.3.2 Diffusion

La diffusion correspond à un mécanisme de transport de la matière au niveau microscopique sous l'effet d'un gradient de concentration, depuis des zones concentrées vers des zones moins concentrées. En ordre de grandeur, le coefficient de diffusion est autour de  $10^{-5}$ - $10^{-3}$   $m^2.s^{-1}$  pour les gaz,  $10^{-10}$ - $10^{-9}$   $m^2.s^{-1}$  pour les liquides et  $10^{-15}$ - $10^{-13}$   $m^2.s^{-1}$  pour les solides. La première loi de Fick est la plus souvent utilisée pour modéliser la diffusion :

$$j_i = -D_i \cdot \frac{dC_i}{dz}$$

Avec  $j_i$  la densité de flux de matière  $[M].[L]^{-2}.[T]^{-1}$  (masse ou nombre de mol qui traverse la surface en unité de temps et de surface),  $D_i$  le coefficient de diffusivité  $[L]^2.[T]^{-1}$ ,  $\frac{dC_i}{dz}$  le gradient de concentration avec  $c$  la concentration de l'espèce chimique  $[M].[L]^{-3}$  et  $z$  la surface  $[L]$ .

Lorsque **la teneur en MS augmente, le coefficient de diffusion des composés solubles diminue**. Ainsi, le coefficient de diffusion de l'ion I<sup>-</sup> dans un digestat à 25% de MS est 3 fois plus faible que dans un digestat à 8% de MS et 200 fois inférieur à celui de l'eau (Bollon et al., 2013).

### 1.3.2.3.3 Transfert gaz-liquide

Le transfert gaz-liquide correspond au transfert d'une molécule d'une phase, par exemple liquide, dans une autre phase, par exemple gazeuse. Lorsqu'un composé présent dans une phase gazeuse passe dans une phase liquide, cette absorption peut être physique, due à la solubilité de la molécule dans la phase liquide ou peut être favorisée par des réactions chimiques entre le gaz dissous et la phase liquide. Lorsqu'un composé dissous dans une phase liquide passe dans une phase gazeuse, cette désorption est due tout simplement à un transfert physique de la phase liquide à la phase gazeuse (Roustan, 2003).

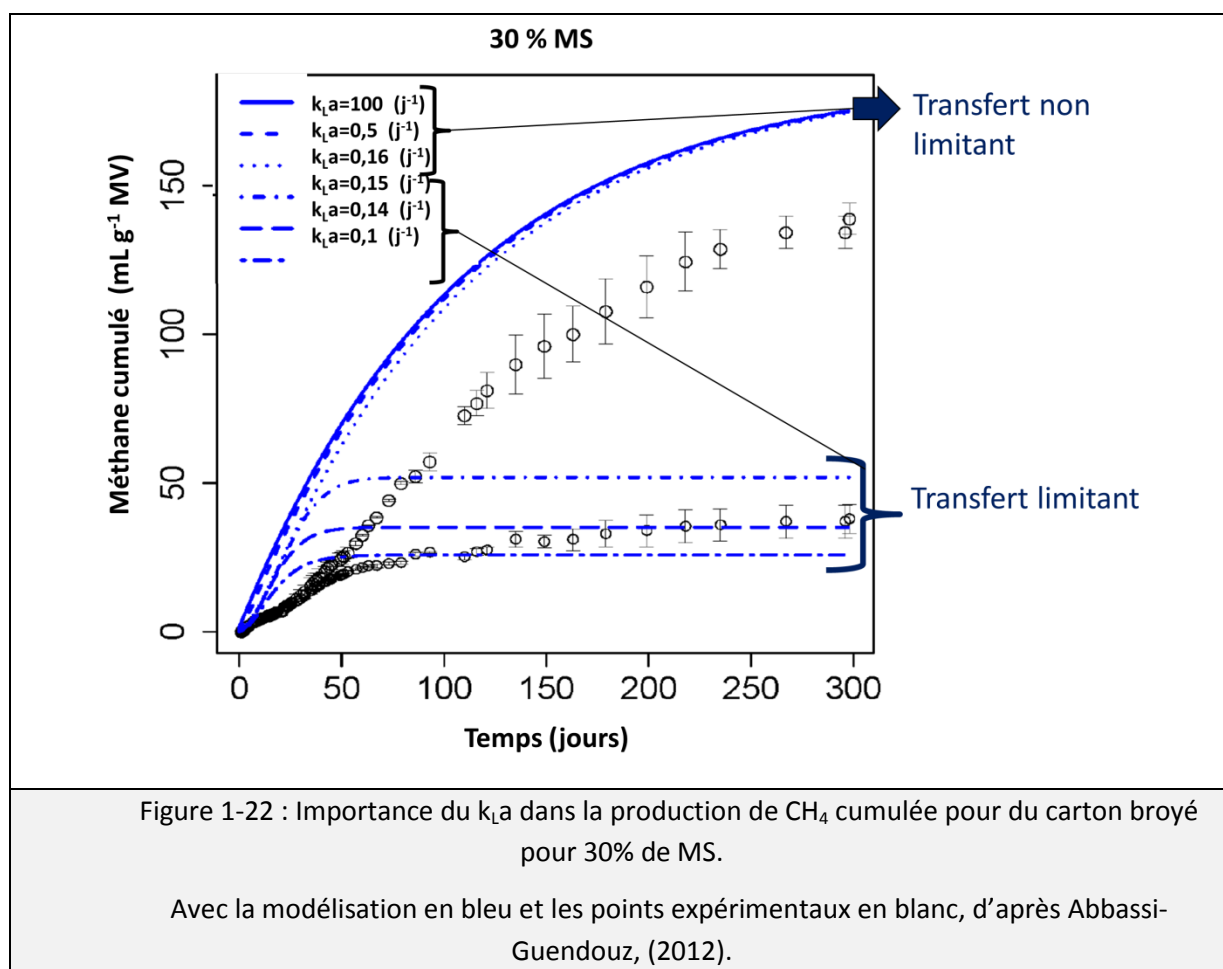
Le transfert gaz-liquide peut être exprimé dans les modèles par le coefficient de transfert de masse volumique  $k_L a$ . Ce coefficient de transfert de masse volumique est lié au coefficient de diffusion par l'équation suivante :

$$k_L a(\text{digestat}) = k_L a(\text{eau}) * \left( \frac{D_i(\text{digestat})}{D_i(\text{eau})} \right)^{0,5}$$

Avec  $D_i$  le coefficient de diffusion  $[L]^2.[T]^{-1}$ . La baisse du coefficient de diffusion avec l'augmentation de la teneur en MS va donc faire aussi diminuer les transferts gaz-liquide (Bollon et al., 2013).

Des études récentes ont été menées afin de mieux appréhender le rôle du transfert gaz-liquide dans les procédés de DA sèche mélangés par intermittence. Benbelkacem et al. (2015b) ont calé des expériences menées sur un réacteur continu de laboratoire en utilisant un modèle ADM1

modifié. Le coefficient de transfert  $k_{La}$  possède un rôle clef lorsque la teneur en MS augmente. Ainsi, le  $k_{La}$  va diminuer de 1,05 à 0,15  $j^{-1}$  lorsque la teneur en MS passe de 18 à 35% pour une digestion anaérobie de déchets ménagers (Benbelkacem et al., 2015b). Une approche couplant des observations expérimentales et des travaux de simulation de type ADM1 a également été entreprise afin d'évaluer l'impact de transfert gaz-liquide sur des réacteurs batch non-mélangés (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Dans ces conditions opératoires, il a été observé une teneur en MS limite, de l'ordre de 28-30% MS à partir de laquelle la production de  $CH_4$  et d' $H_2$  diminue et la production d'AGVs augmente (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015a; Motte et al., 2013a). Il a été possible de proposer une explication à l'inhibition de la production de  $CH_4$  à partir de 30% de MS en utilisant la modélisation. En effet, en faisant varier le  $k_{La}$ , il a été démontré que l'inhibition de la production de  $CH_4$  pouvait être simulée (Abbassi-Guendouz et al., 2012) (Figure 1-22). Ainsi, l'inhibition de la production de  $CH_4$  serait liée à l'existence d'un  $k_{La}$  critique ( $\leq 0.15 j^{-1}$ ), c'est-à-dire d'un transfert gaz-liquide des gaz dissous qui provoquerait une accumulation de ces gaz dissous en certains endroits du milieu. L'inhibition de la production de  $CH_4$  pour une teneur en MS élevée serait donc due à un faible transfert gaz-liquide générant l'accumulation de gaz dissous inhibiteurs. Cependant, le  $k_{La}$  critique défini est différent de celui de Benbelkacem et al., (2015b), avec un  $k_{La} > 5 j^{-1}$  à partir duquel le transfert gaz-liquide deviendrait limitant. Cette valeur de  $k_{La}$  critique semble donc dépendre de la teneur en MS, du substrat utilisé et du procédé.





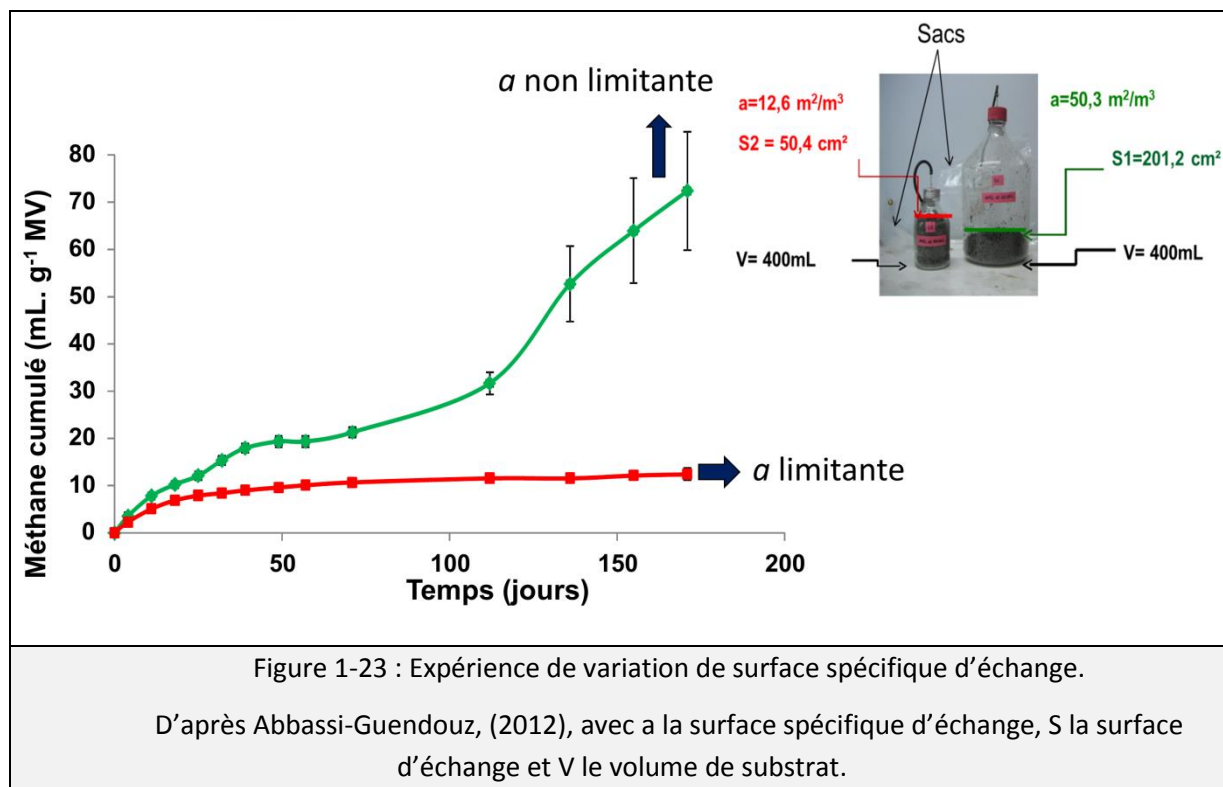
Afin de valider l'importance du  $k_L a$  dans l'inhibition de la production de  $CH_4$  pour de fortes teneurs en MS, une expérience complémentaire a été réalisée par Abbassi-Guendouz (2012), en modifiant la surface spécifique d'échange. En effet, Le  $k_L a$ , qui correspond au coefficient de transfert de masse volumique est composé de :

- $k_L$ , le coefficient de transfert de matière local
- $a$ , la surface spécifique d'échange, définie par :

$$a = \text{surface spécifique d'échange} = \frac{\text{Surface d'échange}}{\text{Volume de substrat}}$$

L'utilisation de deux fioles de diamètre différent permettait de faire varier la surface d'échange et ainsi de faire varier la surface spécifique d'échange pour un même volume de substrat et donc le  $k_L a$ .

Pour une surface d'échange spécifique la plus grande ( $a= 50,3 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ ), la production de  $CH_4$  était plus importante (Figure 1-23), tandis que pour une surface spécifique de  $12,6 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ , le comportement observé précédemment par Abbassi-Guendouz (2012) était reproduit et la production de  $CH_4$  était fortement limitée.



Ainsi, le transfert gaz-liquide lié à la diffusion de composés solubles ou dissous semble donc être responsable d'un mécanisme de limitation de la DA par voie sèche pour une teneur en MS élevée, impliquant une inhibition des microorganismes liée à une accumulation de composés inhibiteurs dans le milieu.

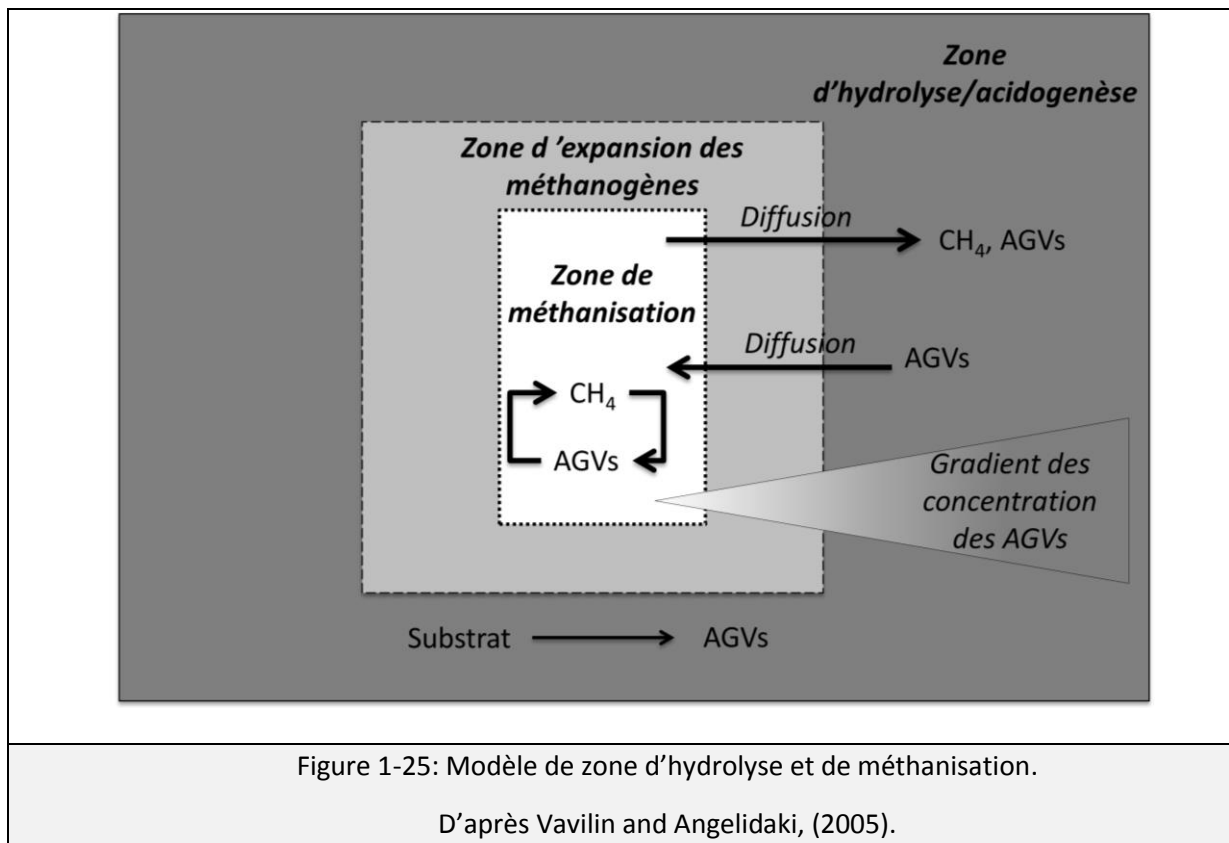
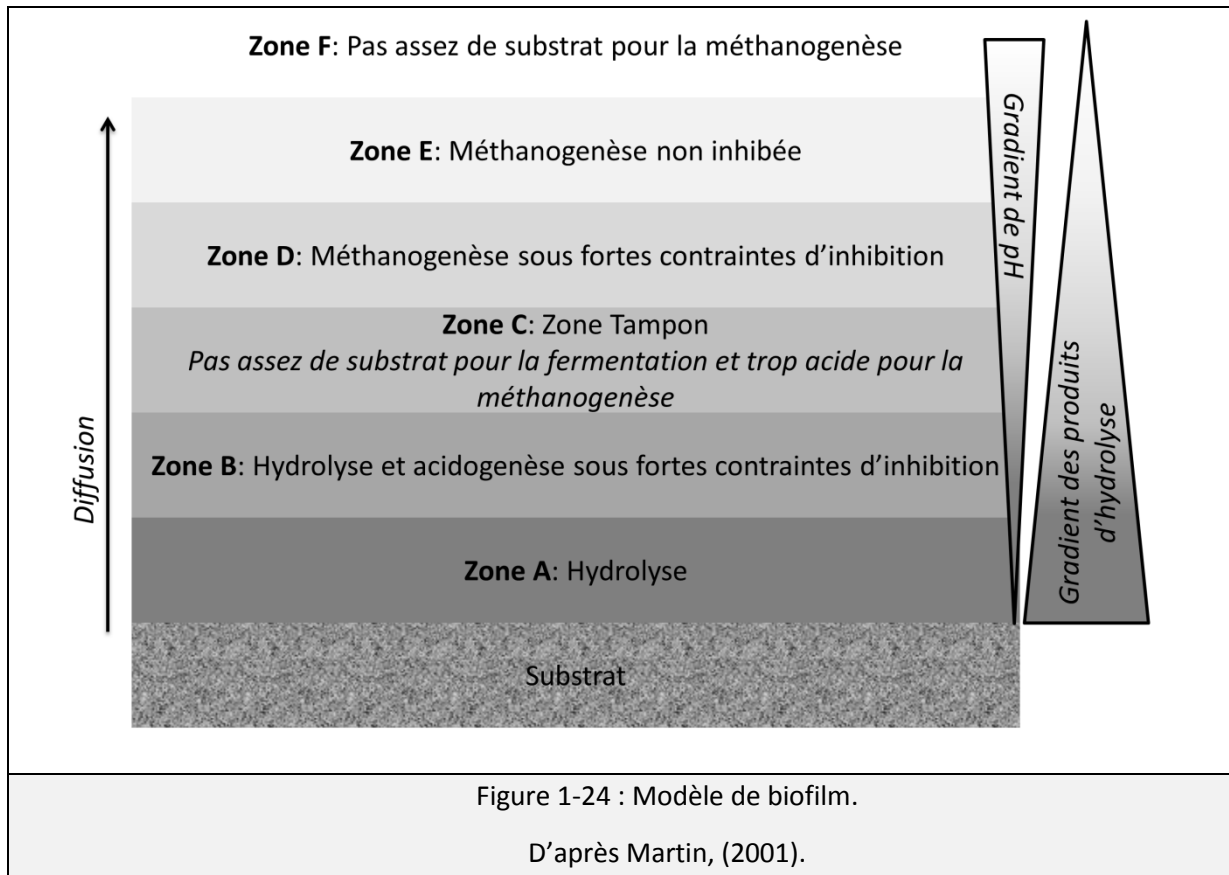
#### **1.3.2.3.4 Hypothèses de structuration spatiale de la digestion anaérobie par voie sèche**

Avec la diminution de la phase liquide en DA par voie sèche, les mécanismes de transfert de molécules dissoutes (diffusion, transfert gaz-liquide) entre les différentes phases diminuent également (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013; Garcia-Bernet et al., 2011a). Ainsi, une structuration du milieu réactionnel peut se former, avec une spatialisation dans le milieu des réactifs et des produits de réactions en fonction de la diffusion dans le milieu des molécules dissoutes (Staley et al., 2011). Certaines réactions et microorganismes sont inhibés par les produits de réactions, comme par exemple l'hydrolyse et les méthanogènes par un pH acide et par les AGVs produits durant l'acidogenèse et l'acétogenèse (Amani et al., 2010; Veeken et al., 2000). Par conséquent, une gradation des réactifs et des produits de réaction est susceptible de se former dans le milieu et pourrait résulter en une spatialisation de la structure des communautés microbiennes.

Plusieurs modèles de la structuration du milieu ont été évoqués pour la digestion anaérobie par voie sèche. Par exemple, un de ces modèles, dit de biofilm, utilise pour hypothèse que la méthanogenèse a besoin de sites spécifiques protégés contre les produits inhibiteurs de l'acidogenèse (Martin, 2001). Ce modèle comporte donc différentes zones (Figure 1-24), qui sont formées grâce à une résistance du milieu à la diffusion (Martin, 2003). Ainsi, les microorganismes sont structurés et séparés par des zones tampons, amenant à une séparation de la méthanogenèse et de l'hydrolyse. Le gradient de concentration des produits de l'hydrolyse serait le facteur influençant le plus le développement des différentes zones. Une étude (Staley et al., 2011) a tenté d'éprouver ce modèle en étudiant la composition du milieu en microorganismes et en métabolites tous les cm. Cependant, cette approche n'a pas permis de valider ou d'invalider le modèle. Cela peut être expliqué par un problème d'échelle, puisque le modèle de départ est plutôt basé sur des zones de l'ordre du mm et non du cm (Martin, 2003).

Un autre concept considère qu'il existe des zones d'initiation de la méthanisation au sein du milieu (Vavilin and Angelidaki, 2005). Dans un digesteur en voie sèche, des zones de méthanogenèse seraient présentes dans le réacteur afin de pouvoir résister à l'inhibition par les acides produits lors de l'acidogenèse. Les zones dépendraient de la quantité de méthanogènes dans l'inoculum et se trouveraient dans une zone où la concentration des AGVs diffusées est suffisamment faible pour être totalement transformées en CH<sub>4</sub> par les microorganismes (Vavilin and Angelidaki, 2005). Dans ce modèle, le gradient de concentration des AGVs serait le facteur influençant le plus fortement la formation des différentes zones.

Les mécanismes de diffusion des molécules dissoutes peuvent donc avoir un effet sur le procédé global. Ainsi, il est important de mieux les prendre en compte dans des modèles de digestion anaérobie par voie sèche.



### 1.3.3 Microorganismes de la digestion anaérobie par voie sèche

Les microorganismes présents lors de la digestion anaérobie par voie sèche peuvent varier en fonction de la teneur en MS. Ainsi, l'abondance relative des différentes archées évoluent, avec des pics majoritaires (plus de 10% d'abondance relative) différents pour 10-15%, 20-30% ainsi que 30-35% de MS pour de la digestion anaérobie mésophile utilisant du carton comme substrat (Abbassi-Guendouz et al., 2013). L'abondance relative des différentes bactéries dans le milieu varie selon la teneur en MS, avec une augmentation d'indicateurs microbiens du genre *Clostridium sp.* de 5 % d'abondance relative pour 10-30% de MS jusqu'à 24 % environs à 30-35% de MS (somme de 3 pics dominants) (Abbassi-Guendouz et al., 2013).

Ces résultats sont confirmés en fermentation acidogène thermophile de la paille de blé (Motte et al., 2014). Ainsi, 2 groupes se forment avec deux métabolismes différents : des microorganismes de classe *Clostridia* sont majoritairement présents pour des teneurs en MS de 10-14% MS et sont liés à une production d'H<sub>2</sub> importante, tandis que pour des teneurs en MS compris entre 19 à 34% MS, les microorganismes présents sont représentatifs des classes *Bacilli*, *Bacteroidetes* et *Clostridia* et liés avec à une production d'H<sub>2</sub> faible et une production de lactate plus importante (Motte et al., 2014).

Le métabolisme des microorganismes peut aussi varier avec la teneur en MS. Ainsi, 3 groupes différents reliés à des shifts métaboliques se distinguent lors de la fermentation acidogène mésophile de la paille de blé (Motte et al., 2013b):

- **De 10 à 14% de MS**, avec une production importante d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> par rapport au reste des métabolites (63% des métabolites totales) puis l'acétate (24-12% des métabolites totales), indiquant des voies de productions d'H<sub>2</sub> couplées à la production de butyrate et d'acétate (c.f. Table 1-4 et Table 1-5 dans 1.2.1 Réactions microbiologiques).
- **De 19 à 28% de MS** avec une diminution de la production d'H<sub>2</sub> et de la conversion de la paille de blé (de 25%) et une augmentation de la production de butyrate (ratio butyrate/acétate passe de 0,4-à 1) mais restant encore faible, indiquant une activité prépondérante d'homoacétogénèse.
- **De 28 à 35% de MS** avec une diminution de la production de l'H<sub>2</sub>, de la vitesse de fermentation (de 4 à 8 jours pour atteindre le maximum de production de l'H<sub>2</sub>), du taux de conversion de la paille de blé (de 40% par rapport au 1er groupe) et une augmentation de la production de butyrate (ratio butyrate/acétate atteignant 2,5), pouvant être dû à une voie butyrate sans production d'H<sub>2</sub>.

Ces résultats ont été obtenus sans modification importante de la communauté microbienne entre ces 3 groupes. Ainsi, la variation de la production d'H<sub>2</sub> et de la production de butyrate avec la variation de la teneur en MS pour une température mésophile serait due à une variation du métabolisme et non à une variation de la structure de la communauté microbienne (Motte et al., 2013b).

Toutefois, la structure de la communauté microbienne peut aussi varier au cours du temps lors d'une digestion anaérobie par voie sèche, plus particulièrement dans un digesteur en continu. Ainsi, dans un digesteur thermophile à 25-30% de MS, le ratio des méthanogènes hydrogenotrophes

par rapport aux méthanogènes acétoclastes évolue d'un rapport 11:1 en début de réaction à un rapport de 7:22 en régime permanent (Montero et al., 2008). De même, les quantités de microorganismes utilisant la cellulose et le xylose ou encore les méthanogènes acétoclastes évoluent au cours de la digestion anaérobie mésophile et thermophile de tige de maïs (Shi et al., 2013).

#### 1.3.4 Conclusion sur la spécificité de la digestion anaérobie par voie sèche

Le développement de la digestion anaérobie par voie sèche par rapport à la voie humide au niveau industriel est semblable en Europe, avec une légère augmentation de la digestion anaérobie par voie sèche durant ces dernières années. Cependant, ce développement s'est surtout déroulé au niveau industriel de façon empirique. Des actions de recherche sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes spécifiques liés à la digestion anaérobie par voie sèche.

La digestion en voie sèche amène à une hétérogénéité de la quantité d'eau libre, des microorganismes et des composés produits dans le digestat, liée à une diffusion plus lente des molécules. Le transfert de matière et plus particulièrement des molécules solubles et des gaz dissouts peut ainsi avoir un rôle positif et négatif dans la DA par voie sèche. En effet, la diffusion des molécules dissoutes dans le milieu de la DA est influencée par la quantité d'eau libre du milieu. Ainsi, lorsque la teneur de MS augmente, le coefficient de diffusion diminue (Bollon et al., 2013; Abbassi-Guendouz et al., 2012). Au-delà de 30% de MS, le transfert gaz-liquide des molécules peut devenir un facteur limitant entraînant une inhibition la DA par voie sèche, qui peut être expliqué par un coefficient de transfert volumique critique (Abbassi-Guendouz et al., 2012). De plus, la teneur en MS peut avoir un effet sur la structure des communautés microbiennes mais aussi sur les métabolismes de ces microorganismes.

L'existence de composés inhibiteurs et les concentrations présentes au sein du milieu en voie sèche ont amené à formuler des hypothèses de graduations du pH, des AGVs et des gaz dissous dans le milieu lors de la DA par voie sèche. Ces hypothèses ont été posées afin d'expliquer les inhibitions de la DA par voie sèche au-delà de 30% de MS, ainsi que les conditions possibles de réalisation de la DA par voie sèche. Ainsi des gradients de pH et des produits d'hydrolyse seraient présents dans le milieu, permettant l'existence de niches de méthanogènes. Cependant, ces modèles n'ont pas été prouvés à l'ordre du cm. Une hypothèse pour expliquer les problèmes de la digestion en voie sèche pour des teneurs de MS élevés serait que ces problèmes seraient dus à la limitation du transfert gaz-liquide des molécules solubles dans le milieu et plus particulièrement des gaz dissous. Ainsi, les transferts de matière joueraient un rôle important dans la digestion anaérobie par voie sèche et sur la concentration des gaz dissous dans le milieu.

---

## 1.4 CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La digestion anaérobie par voie sèche s'est développée ces dernières années au niveau industriel mais les connaissances sur son fonctionnement et ces limitations sont encore limitées.

La digestion anaérobie par voie sèche a un effet sur les mécanismes de transfert de matière des molécules dissoutes produites et consommées dans le milieu. En effet, la diffusion des molécules est ralentie lorsque la teneur en MS augmente, ce qui peut induire des pertes de performances globales et les transferts gaz-liquide diminuent, ce qui peut induire des accumulations de gaz dissous dans le milieu. De nombreux modèles ont été proposés pour expliquer le fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche, en se basant sur la diffusion des molécules dissoutes. Une diminution de la vitesse de diffusion pourrait résulter en :

- **Une accumulation locale des AGVs**, provoquant une inhibition des méthanogènes dû à une augmentation du pH (Martin, 2001)
- **Une accumulation locale des gaz dissous**, pouvant amener à une inhibition locale de la digestion anaérobie dû à une  $P_{H_2}$  inhibitrice (Abbassi-Guendouz et al., 2012)
- **La création de niches de méthanogènes**, protégées des effets inhibiteurs des produits de l'hydrolyse par une diffusion suffisamment lente (Staley et al., 2011)

Cependant, ces hypothèses n'ont pas été démontrées pour la digestion anaérobie par voie sèche (Staley et al., 2011), même si la diminution du coefficient de diffusion avec l'augmentation de la teneur en MS est maintenant avérée (Bollon et al., 2013). Il est possible que cette structuration du milieu se réalise à l'échelle du mm et non du cm.

De plus, de nombreux paramètres peuvent avoir des effets différents en voie sèche et en voie humide, même si les principales étapes de la digestion anaérobie par voie humide et sèche restent les mêmes. Ainsi, les limites d'inhibition des AGVs en voie sèche et en voie humide sont très différentes. Les comparaisons entre les inhibiteurs en voie humide et voie sèche sont donc difficiles. Le fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche peut être dirigé par des gradients de concentrations en AGVs ou en gaz dissous, qui peuvent avoir un effet inhibiteur local sur le procédé et amenant à l'inhibition globale du procédé pour une teneur en MS élevée. Les effets des gaz dissous, et plus spécifiquement l' $H_2$  et le  $CO_2$ , sur la digestion anaérobie par voie sèche ont été testés dans cette thèse. Ainsi, une première étude a porté sur l'impact des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique. Puisque la vitesse de diffusion des molécules dissoutes et les transferts gaz-liquide dans le milieu diminuent avec l'augmentation de la teneur en MS (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013), une accumulation de gaz dissous ( $H_2$  et  $CO_2$ ) est possible dans le milieu. L'objectif de cette première partie était de tester l'impact direct de l'accumulation de l' $H_2$  et/ou de  $CO_2$  sur les microorganismes et sur la DA par voie sèche. Une deuxième étude a porté sur l'impact des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique. Puisque les transferts gaz-liquide sont limitants pour une teneur en MS élevée, avec une baisse des coefficients de diffusion, un gradient de concentration des gaz dissous pourrait se mettre en place dans le milieu, avec des effets différents sur les microorganismes présents dans le milieu selon la concentration locale en  $H_2$  et/ou en  $CO_2$  (effets locaux démontrés auparavant à l'échelle microscopique).



---

# **CHAPITRE 2:**

## **MATERIEL ET METHODES**

---



---

## ***2.1 CARACTERISATION DU SUBSTRAT ET DE L'INOCULUM***

---

### **2.1.1 Mesure du pourcentage de MS et de MV**

Des creusets en porcelaine préalablement nettoyés et séchés ont été tarés ( $m_1$ ) avec une balance de précision. Puis, l'échantillon a été ajouté et sa masse a été mesurée ( $m_p$ ). Le creuset a été ensuite placé dans un four à 105°C pendant 24h. Il a ensuite été refroidi pendant ¼ h au dessiccateur avant d'être de nouveau pesé ( $m_2$ ). Le creuset a enfin été mis au four à 550°C pendant 3h puis refroidi au four à 105°C pendant ½ h et dans le dessiccateur pendant ¼ h avant d'être pesé ( $m_3$ ).

La teneur en matières sèches (MS) de l'échantillon correspondait au poids de cet échantillon après séchage à 105°C pendant 24h :

$$\text{MS (en \%)} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_p} \right) * 100$$

La teneur en matières volatiles (MV) correspondait à la différence entre le poids de l'échantillon sec ( $m_2$ ) et celui de l'échantillon après son passage au four à 550°C ( $m_3$ ) :

$$\text{MV (en \%)} = \left( \frac{m_2 - m_3}{m_p} \right) * 100$$

### **2.1.2 Préparation de l'inoculum**

L'inoculum utilisé pour l'ensemble des expériences avait pour origine un digesteur de type UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) traitant des effluents de sucrerie à Marseille. Afin de pouvoir réaliser des expériences à 25% de MS, la boue anaérobie a tout d'abord été mise sous agitation pendant 24h à 35°C afin de casser les granules et de libérer les microorganismes.

La boue anaérobie a ensuite été centrifugée à 7 841 g pendant 20 minutes à 4°C avec une centrifugeuse de type Avanti JE.26 XP. Ainsi, deux phases ont été obtenues : une phase solide contenant la plupart des microorganismes et une phase liquide contenant essentiellement de l'eau. Une mesure des teneurs en MS et MV de cette boue centrifugée a été réalisée afin de calculer la quantité de boue centrifugée nécessaire pour obtenir un milieu à 25% de MS et un rapport substrat/inoculum de 3.

### **2.1.3 Mesure de l'azote (NTK)**

La mesure de l'azote total présent dans la boue a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, la minéralisation des échantillons a permis de transformer l'azote organique en sulfate d'ammonium, en utilisant de l'acide sulfurique à 96% et un catalyseur (catalyseur de Kjeldahl) pendant 3h. Ensuite, l'azote total contenu dans les échantillons a été dosé en utilisant la méthode de Kjeldahl. Cette méthode consiste à alcaliniser l'ion ammonium en ammoniac à l'aide de soude (32%) puis à le

retransformer en ammonium en présence d'acide borique. Un mélange ion ammonium/ion borate a donc été obtenu. Ensuite la quantité d'ammoniac qui n'avait pas réagi avec l'acide borique ainsi que la quantité d'ion borate produite ont été titrées avec de l'acide chlorhydrique à 0,02 N afin de connaître la quantité d'ammoniac présente initialement. Comme les pKa des deux réactions sont très proches, l'ammoniac et l'ion borate ont été dosés en même temps. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un distillateur/titrateur BUCHI 370-K.

#### 2.1.4 Prétraitement de la paille de blé

La paille de blé utilisée était de type blé tendre, semée en octobre et récoltée en juillet 2012. Son potentiel de méthane était de  $237,29 \pm 1,15$  ml de  $\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{MV}}^{-1}$  (mesuré par BMP flash©, ONDALYS). Avant d'être utilisée, la paille a été broyée à l'aide d'un broyeur à couteaux (RETSCH® SM100) (Figure 2-1). Ce broyage de la paille était nécessaire pour réaliser des études en laboratoire afin d'homogénéiser le substrat, puisque les expériences réalisées utilisaient de faibles quantités de paille. Le principe d'un broyeur à couteau est d'entrechoquer les particules introduites dans le broyeur entre des chicanes et des couteaux se trouvant sur le rotor tournant entre 2000 et 4000 rpm. Puis les particules passent sur un tamis lorsqu'elles ont atteint une taille suffisante. Le diamètre des mailles était de 1 mm pour les expériences. Ensuite, la paille broyée a été tamisée entre deux tamis en métaux avec des mailles de 1 mm et de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les particules d'une taille supérieure à 1 mm ont été remises dans le broyeur afin d'obtenir une granulométrie comprise entre 1 mm et 400  $\mu\text{m}$  (les particules d'une taille inférieure à 400  $\mu\text{m}$  ont été rejetées). Le broyage de la paille a été choisi entre 1 mm et 400  $\mu\text{m}$  car un broyage entre 0,5 et 2 mm permet d'améliorer l'hydrolyse et la digestibilité du digestat mais un broyage plus fin peut inhiber la digestion anaérobie (Barakat et al., 2013; Motte et al., 2013a).

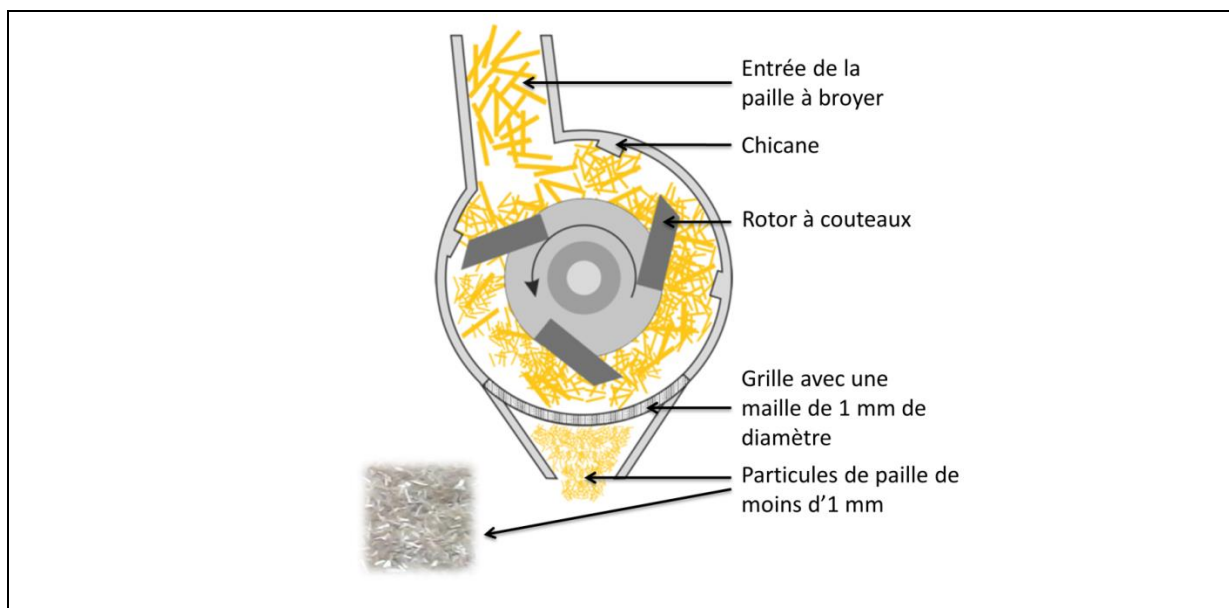


Figure 2-1 : Schéma de fonctionnement d'un broyeur à couteaux.

D'après Motte, (2013).

---

## 2.2 DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

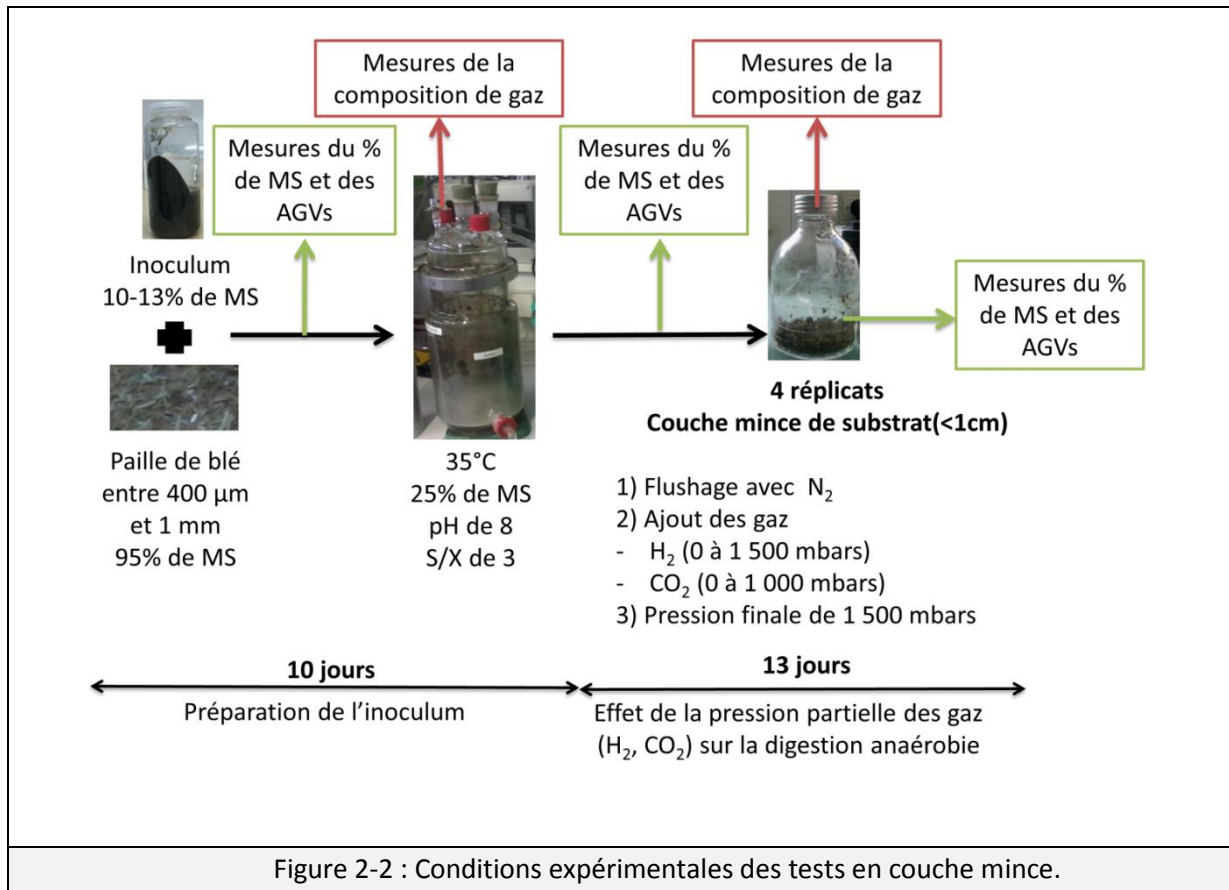
---

### 2.2.1 Echelle microscopique: tests en couche mince

#### 2.2.1.1 Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales pour les tests d'étude de l'échelle microscopique de la digestion anaérobie par voie sèche sont résumées dans la Figure 2-2. De la paille broyée a été inoculée avec de la boue anaérobie dont la teneur en MS était comprise entre 10 et 13% après centrifugation. Tout d'abord, le mélange a été mis dans un réacteur de 3 L à double parois thermostaté à 35°C pendant 10 jours environ. L'objectif de cette pré-culture était d'homogénéiser le milieu réactionnel et d'atteindre la phase exponentielle de production de méthane. Ce réacteur a été flushé à l'azote afin d'éliminer l'oxygène présent. Une solution d'éléments trace ( $\text{FeCl}_2$  2 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{CoCl}_2$  0,5 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{MnCl}_2$  0,1 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{NiCl}_2$  0,1 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{ZnCl}_2$  0,05 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,05 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  0,05 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{CuCl}_2$  0,04 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,01 g.L<sup>-1</sup>) a été ajouté pour un volume de 0,2 ml par fiole. Le rapport substrat/inoculum (en MV) a été fixé à 3 pour permettre une production importante de biogaz, tout en étant suffisamment rapide pour réaliser des expériences sur 24 jours (Li et al., 2011). Le pH a été tamponné à 8 en utilisant 0,0026 g de  $\text{NaHCO}_3$  par g de substrat (soit 0,0031 mmol de  $\text{NaHCO}_3$  par g de substrat).

Les tests à l'échelle microscopique ont été réalisés en tests dits « couche mince », c'est-à-dire avec un milieu de moins de 1 cm d'épaisseur afin de s'affranchir des problèmes liés à la diffusion des molécules dissoutes et solubles dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel était donc supposé homogène, et les gaz dissous en équilibre avec la phase gazeuse. Lors des tests « couche mince », 20 g du mélange échantillonné dans le réacteur de pré-culture ont été ajoutés sous forme de couche de moins de 1cm d'épaisseur dans des fioles de 600 ml. Tout d'abord, ces fioles ont été flushées avec de l'azote. Puis de l'hydrogène et/ou du dioxyde de carbone ont été ajoutés afin d'obtenir des atmosphères différentes, avec une pression totale constante de 1,5 bars au début des expériences (voir 2.2.1.2 Ajout de l'hydrogène et du dioxyde de carbone en couche mince en début d'expérience). Les pressions partielles testées étaient comprises entre 0 et 1,5 bars pour l' $\text{H}_2$  et entre 0 et 1 bar pour le  $\text{CO}_2$ . Les fioles ont ensuite été incubées à 35°C. L'évolution de la composition des ciels gazeux a été suivie pendant 13 jours.



### 2.2.1.2 Ajout de l'hydrogène et du dioxyde de carbone en couche mince en début d'expérience

Pour atteindre les pressions partielles voulues en H<sub>2</sub> et/ou en CO<sub>2</sub> en début d'expérience (c'est-à-dire après flushage au N<sub>2</sub>), des ajouts de ces gaz par mesures de pressions ont été réalisés. Les pressions partielles voulues en H<sub>2</sub> et/ou le CO<sub>2</sub> étant élevées (Table 2-1), les gaz ont été ajoutés en deux ou trois fois selon les pressions partielles voulues.

La pression finale choisie était de 1 500 mbars, ce qui permettait des mesures automatiques à la µCPG tout en évitant des contaminations croisées entre échantillons. Lorsque la pression de la fiole était inférieure à la pression atmosphérique, les analyses de la composition du ciel gazeux ont été réalisées à la CPG.

L'ajout du dioxyde de carbone en début d'expérience a été fait de la même manière que l'ajout de l'hydrogène. Lorsque l'ajout de dioxyde de carbone se faisait pendant l'expérience, la pression totale a été mesurée avant et la pression partielle voulue de dioxyde de carbone a été rajoutée.

Table 2-1: Pressions partielles en hydrogène ( $P_{H_2}$ ) et/ou de dioxyde de carbone testés lors des expériences à l'échelle microscopique.

Essais	Pression partielle en H <sub>2</sub> (mbars)	Pression partielle en CO <sub>2</sub> (mbars)
1	0	0
	55	
	105	
	485	
	895	
2	0	0
	650	
	750	
	932 1 020	
3	0	0
	778	
	1 418	
4	0	0
	828	
	1 545	
5	0	0
		737
		1 120
6	0	0
	780	427
	1 060	327
7	0	0
	994	351, 451 (ajouté à 11 et 18 jours)

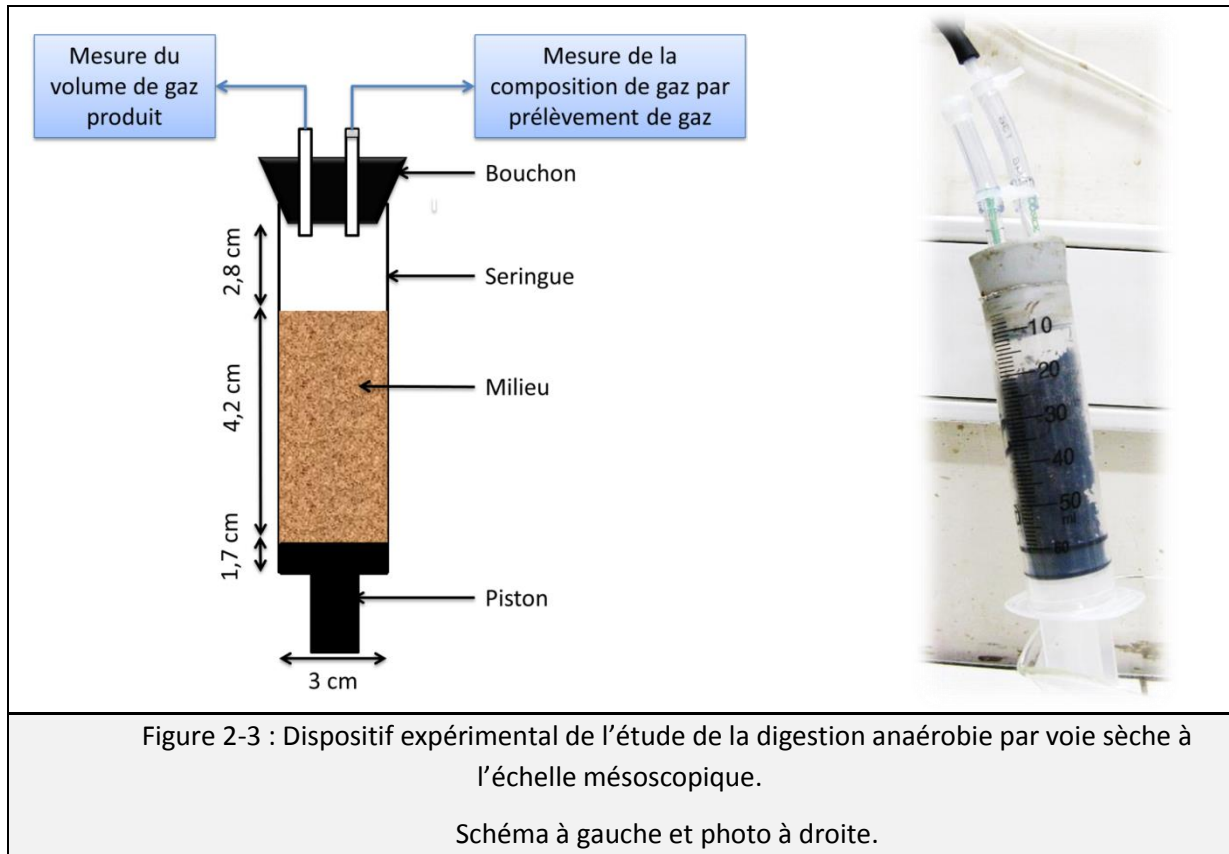
## 2.2.2 Echelle mésoscopique : tests en couche épaisse

### 2.2.2.1 Conditions expérimentales de l'étude de la digestion anaérobie en voie sèche à échelle mésoscopique

L'objectif était de tester l'effet de l'épaisseur du milieu réactionnel sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche. Pour cela, de la paille broyée a été mélangée avec de la boue anaérobie (10-13% de MS après centrifugation), en utilisant les mêmes concentrations d'éléments traces et le même rapport substrat/inoculum que pour les expériences à l'échelle microscopique (voir 2.2.1.1 Conditions expérimentales). Le pH a été tamponné à 8 en utilisant 0,907 mg de  $HK_2PO_4$  par g de substrat (0,0052 mmol de  $HK_2PO_4$  par g de substrat) et 0,343 mg de  $KPO_4^{2-}$  par g de substrat (0,00025 mmol de  $KPO_4^{2-}$  par g de substrat). Ce mélange a ensuite été introduit dans des tubes cylindriques de 8,7 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre sur une hauteur tassée de 4,2 cm (Figure 2-3). Le ciel gazeux a été ensuite flushé à l'azote avant l'expérience. La production de biogaz a été suivie par une mesure volumétrique du biogaz par éprouvette renversée et par des prélèvements

de gaz au cours du temps analysés manuellement par GC. Cette expérience a duré 33 jours et des analyses du milieu réactionnel ont été réalisées à 8, 20 et 33 jours en sacrifiant des réacteurs. Le pH, les AGVs et les communautés microbiennes ont été analysés tous les 0,7 cm de hauteur.

Par comparaison, des fioles en couche mince ont été lancées en parallèle dans les mêmes conditions que pour les tests à l'échelle microscopique (sans l'homogénéisation dans le réacteur de 3L), avec la même masse de milieu que pour les tubes, correspondant à 15 g de milieu.

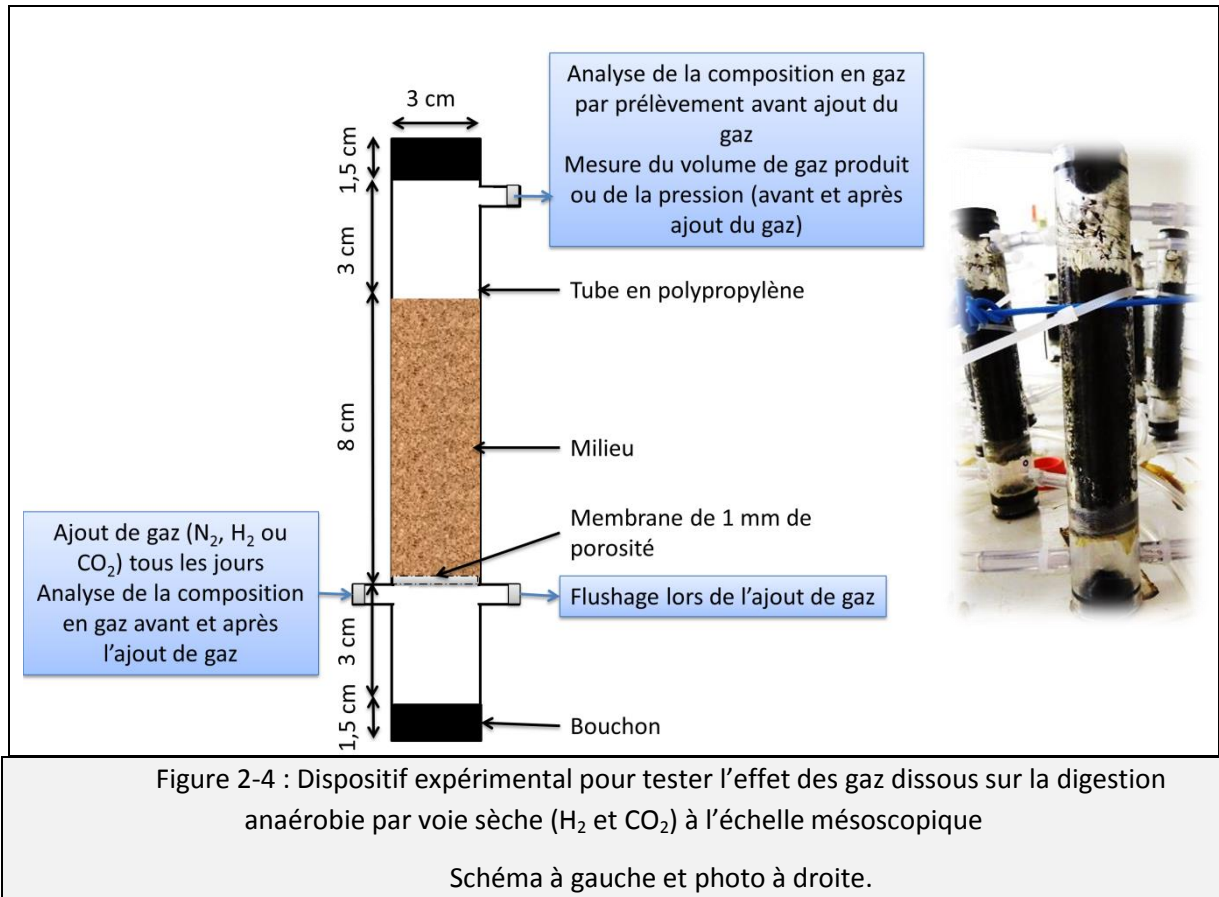


### 2.2.2.2 Conditions expérimentales de l'effet des gaz à l'échelle mésoscopique en digestion anaérobie par voie sèche

Le milieu a été préparé de la même manière que l'expérience précédente. Le mélange (paille, boue, tampon, élément trace) a ensuite été ajouté sur une hauteur tassée de 8 cm dans des tubes cylindriques de 20 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre. Un espace de tête était présent en haut mais aussi en bas des tubes cylindriques (Figure 2-4). Les ciels gazeux ont été flushés à l'azote avant expérience. Au cours de l'expérience, 60 ml de gaz ( $N_2$ ,  $H_2$  ou  $CO_2$ ) ont été ajoutés tous les jours par flushage en bas des tubes cylindriques. Pour les tubes cylindriques dans lequel du  $N_2$  a été ajouté, la mesure de la production de gaz a été réalisée tous les jours avant l'ajout de gaz par mesure volumétrique par éprouvette renversée. Pour les tubes cylindriques dans lesquels de l' $H_2$  ou du  $CO_2$  ont été ajoutés, la production de gaz a été mesurée par l'évolution de la pression avec une mesure avant l'analyse des gaz et une mesure après avoir ajouté le gaz en bas du tube cylindrique. Les

analyses de gaz ont été réalisées par GC en haut du cylindre puis en bas du cylindre avant d'ajouter les 60 ml de gaz en bas du tube. Une nouvelle analyse a été réalisée après l'ajout des gaz.

Cette expérience a duré 28 jours et des analyses du milieu ont été réalisées à 9, 18 et 28 jours pour les 3 conditions. Le pH, les AGVs et les communautés microbiennes ont été analysés tous les cm.



---

## 2.3 MESURES DES PARAMETRES GLOBAUX

---

### 2.3.1 Mesures des gaz par $\mu$ CPG

La composition et la pression du ciel gazeux ont été mesurées en continu par micro-chromatographie en phase gazeuse multiplexée ( $\mu$ CPG R3000, SRA instrument), qui permet le suivi simultané de 12 à 20 fioles (Figure 2-5). Le  $\mu$ CPG est composé d'un injecteur chauffé à 90°C et de deux colonnes capillaires à 80°C. La première colonne est une MolSieve 5Å (avec une longueur de 10 m et un diamètre de 0,32 mm) permettant de séparer le dioxyde de carbone du reste du gaz et qui utilise l'argon comme gaz vecteur (pression de 30 psi). La deuxième colonne est une PLOT Q (avec une longueur de 8m et un diamètre de 0,32 mm) séparant l'oxygène, l'hydrogène, l'azote et le méthane avec l'hélium comme gaz vecteur (pression de 20 psi). La détection des gaz est assurée par un micro-catharomètre ( $\mu$ TCD) détecteur à conductivité thermique.

Tout d'abord, l'appareil mesurait la pression dans la fiole. Si celle-ci était supérieure à 1 550 bars, le  $\mu$ CPG dégazait la fiole avant de réaliser l'analyse de la composition du ciel gazeux. Puis après l'analyse, la pression était de nouveau mesurée. Si la pression dans la fiole était inférieure à 0,95 bars, la composition du ciel gazeux n'était pas analysée afin d'éviter des contaminations entre fioles. A ce moment-là, la composition du ciel gazeux était mesurée manuellement en utilisant un chromatographe en phase gazeuse non automatique (CPG) (c.f. 2.3.2 Mesures des gaz par CPG).



Figure 2-5 : Photo du micro-chromatographe en phase gazeuse multiplexé.

### 2.3.2 Mesures des gaz par CPG

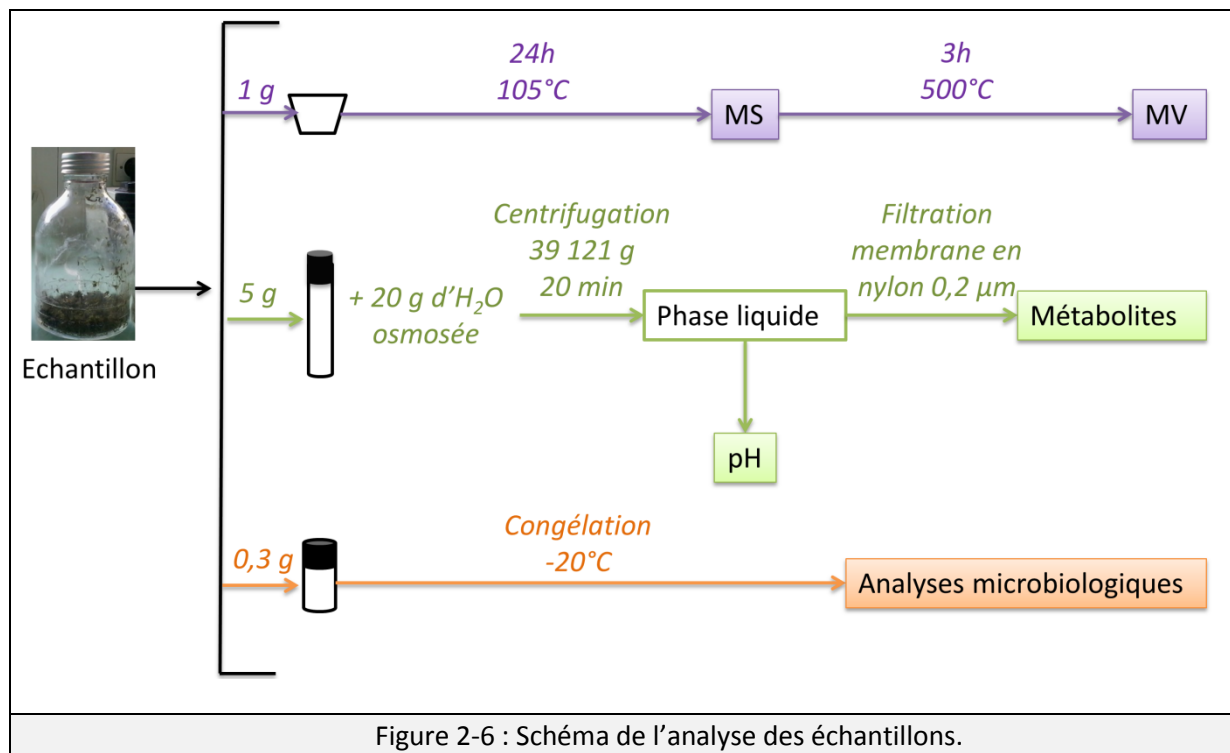
Le chromatographe en phase gazeuse Clarus 580 contient un injecteur à 250°C et deux colonnes capillaires à 60°C. La première colonne est une RtUBond, qui permet de séparer le dioxyde de carbone du reste du gaz. La deuxième colonne est une RtMolsieve qui sépare l'oxygène, l'hydrogène, l'azote et le méthane, en utilisant l'argon comme gaz vecteur pour les deux colonnes, à



un débit de  $31,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  et une pression de 350 kPa. Le chromatographe CPG Clarus 580 est équipé d'un détecteur à conductibilité thermique (TCD) à  $150^\circ\text{C}$ . Ce détecteur réagit aux différences de conductibilité thermique entre le gaz vecteur et les composés de l'échantillon.

### 2.3.3 Analyse des échantillons de milieu

Les échantillons de milieu prélevés pendant les expériences correspondaient à des échantillons solides et ont été analysés afin de mesurer la matière sèche, le pH, les métabolites ou encore les communautés microbiennes selon le protocole résumé dans la Figure 2-6.



#### 2.3.3.1 Mesure des métabolites, des sucres solubles et du pH

Comme le digestat était à 25% de MS, il n'y avait pas d'eau disponible suffisante pour mesurer le pH ou analyser les métabolites. Une quantité de milieu connu a donc été mélangé avec une quantité d'eau connue (avec un facteur de dilution d'ordre de 3 à 10 selon les expériences), puis placé à température ambiante pendant 30 min. Le mélange a ensuite été centrifugé à  $4^\circ\text{C}$  à 39 121 g pendant 20 min avec une centrifugeuse Avanti JE. La partie liquide du mélange a été récupérée. Le pH était mesuré sur cette phase à l'aide d'un pH-mètre (Eutech Instruments pH510). Enfin, une filtration avec des filtres nylon de porosité  $0,2 \mu\text{m}$  a été réalisée afin de pouvoir mesurer les métabolites sur le filtrat obtenu.

Deux appareils ont été utilisés pour mesurer les métabolites. Le lactate ou l'éthanol par exemple ont été dosés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Ce chromatographe a été composé d'un passeur automatique d'échantillons (Water 717 plus), d'une pré-colonne (Micro

guard cation H refill cartridges, Bio-rad) pour filtrer les résidus éventuels, ainsi que d'une colonne Aminex HPX-87H (300 mm sur 7,8 mm, Bio-rad), chauffée à 35°C et d'un détecteur réfractométrie. L'éluant utilisé correspondait à une solution d'acide sulfurique à 0,005 M à un débit de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>. Cet instrument était calibré pour le dosage du glucose, du fructose, de l'éthanol ainsi que du lactate, de l'acétate, du propionate, du butyrate, du valérate, du caproate, du formate et du succinate. Les sucres solubles ont aussi été mesurés en utilisant cet appareil.

Pour mesurer les AGVs (acétate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovalérate, valérate, isocaproate, caproate), une chromatographie en phase gazeuse a été utilisée. Ce chromatographe Perkin Clarus 580 est constitué d'un injecteur chauffé à 250°C, d'une colonne capillaire Elite-FFAP crossbond®carbowax® (15 m) chauffée à 200°C et utilisant de l'azote à 6 mL.min<sup>-1</sup> en gaz vecteur, ainsi qu'un détecteur FID chauffé à 280°C. Les échantillons ont été préparés en mélangeant 300 µL de la solution filtrée précédemment avec 300 µL d'une solution aqueuse à 1 g.L<sup>-1</sup> d'étalon interne (acide éthyle-2-butyrique). L'étalonnage externe du CPG a été réalisé par une solution à 1 g.L<sup>-1</sup> de chaque AGVs.

### 2.3.3.2 Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques réalisées sur les échantillons de milieu réactionnel sont résumées dans le Table 2-2.

Table 2-2 : Procédure des analyses microbiologiques.	
<b>Prélèvement</b>	0,3 g de digestat mis directement dans la glace
<b>Stockage</b>	-20°C
<b>Extraction d'ADN</b>	Lyse cellulaire (tampon contenant du N-LS)
	Vibrobroyage
	Récupération de l'ADN par lavage au PVPP
	Précipitation de l'ADN à l'isopropanol
	Déstructuration de l'ARN
<b>Purification de l'ARN</b>	PROMEGA Wizard® Genomic DNA
<b>Mesure de la qualité et de la concentration en ADN</b>	Spectrométrie (Infinite NanoQuant M200, Tecan)
<b>Amplification par PCR</b>	Amorces: Bactéries et Archées et utilisation d'un Mastercycler thermal cycler (Eppendorf)
<b>Profils de communautés microbiennes</b>	Dénaturation de l'ADN

	CE-SSCP (capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism)
	Traitement des profils de communautés par Statfingerprints et R
<b>Amplification et mesure de la concentration des microorganismes par QPCR</b>	Amorces: Bactéries et Archées
<b>Séquençage de l'ADN</b>	Illumina MiSeq System au centre de séquençage GenoToul ( <a href="http://www.genotoul.fr">www.genotoul.fr</a> ) utilisant le logiciel Mothur version 1.33.2

### 2.3.3.2.1 Echantillonnage

0,3 g de milieu ont été prélevé afin d'extraire l'ADN, puis mis dans de la glace afin d'obtenir une congélation plus rapide de l'échantillon. Enfin, ces échantillons ont été conservés à -20°C afin d'en extraire l'ADN.

L'extraction de l'ADN consistait tout d'abord en une lyse enzymatique des microorganismes en utilisant 500µL de tampon phosphate à pH 8 contenant 5% de N-LS (N-Lauroyl sarcosine), ajouté à l'échantillon de milieu congelé. Après une incubation de 1h à 70°C, 500 µL de billes de zirconium ont été ajoutées à l'échantillon et l'échantillon a été agité pendant 10 minutes grâce à un vibrobroyeur. Ensuite, 15 mg de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) ont été ajoutés (fixation des inhibiteurs de la PCR comme par exemple l'acide humique). Enfin, l'échantillon a été centrifugé afin de récupérer le surnageant, qui contenait l'ADN. Afin d'éliminer les billes de zirconium, trois cycles de lavages suivi de centrifugations en utilisant 500 µL de TENP (Tris-Cl, 50 mM ; EDTA, 20 mM ; NaCl, 100 mM ; PVPP, 1%) ont été réalisées. Une dernière centrifugation des surnageants a permis d'éliminer les suspensions où étaient les impuretés. L'ADN a ensuite été précipité en ajoutant de l'isopropanol puis a été récupéré par centrifugation. Afin de ne récupérer au final que de l'ADN, 20 µL d'une solution à 1 mg.mL<sup>-1</sup> de RNase a été ajoutée suivi de 10 minutes d'incubation à 37°C afin de déstructurer l'ARN présent dans l'échantillon (Godon and Zumstein, 1997).

Enfin, l'ADN a été purifié en utilisant le kit PROMEGA Wizard® Genomic DNA. La concentration d'ADN et sa pureté ont été mesurées par spectrométrie (Infinite NanoQuant M200, Tecan), en mesurant les absorbance à 260 nm et 280 nm.

### 2.3.3.2.2 Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Après avoir extrait et purifié l'ADN, une PCR a été réalisée, ce qui permet de dupliquer en grand nombre des zones spécifiques de l'ADN ou de l'ARN. Pour cela, des amorces, permettant de spécifier le(s) gène(s) à amplifier ont été choisies. Les amorces choisies pour nos amplifications se trouvent dans la Table 2-3.

Table 2-3 : Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN.  
Avec en italique les marqueurs fluorescents : *6FAM* : 6-carboxyfluorescein

Cibles	Amorces	Séquences (5'-3')	Positions	Références
Bactéries	W49F	ACG GTC CAG ACT CCT ACG GG	E.Coli -330	(Wéry et al., 2008)
	W104R	<i>6FAM</i> -TTA CCG CGG CTG CTG CPGA C	E.Coli -533	(Wéry et al., 2008)
Archées	W274F	CCC TAC GGG CPGG CAG CAG	E.Coli -340	(Braun et al., 2011)
	W275R	<i>6FAM</i> -TTA CCG CGG CGG CTG	E.Coli -519	(Braun et al., 2011)

Les solutions d'amplifications utilisées pour réaliser la PCR sont décrites dans la Table 2-4.

Table 2-4 : Solutions d'amplifications utilisées pour les bactéries et les archées.

Solution d'amplification (µL)	Bactéries	Archées
Eau	18,25	17,25
10x Tampon ADN Pfu Turbo	2,5	2,5
200 nM de DNTP	2	2
Amorces 400 nM de W49 ou W274)	1	1
Amorces 400 nM de W104 ou W275)	1	1
2.5 U/µl d'ADN Pfu Turbo polymérase (Stratagène	0,25	0,25
ADN génomique	1	1

L'amplification a été réalisée par des cycles de dénaturation, d'élongation et d'hybridation. Les conditions de ces cycles sont décrites dans la Table 2-5.

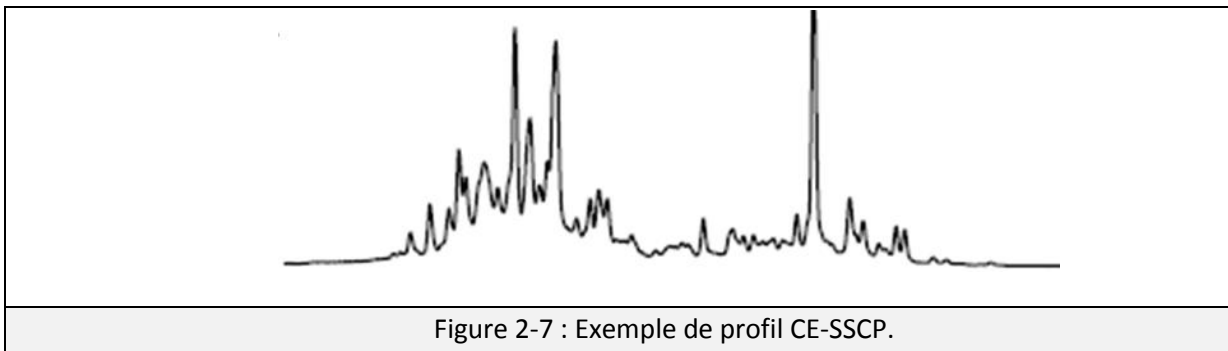
Table 2-5 : Conditions d'amplification par PCR pour les bactéries et les archées en utilisant un Mastercycler thermal cycler (Eppendorf).

Conditions d'amplifications	Bactéries	Archées
Etape de dénaturation	94 °C pendant 2 min	94 °C pendant 2 min
Nombre de cycles	25	30
Etapes du cycle	94 °C pendant 30 s	94 °C pendant 30 s
	61 °C pendant 30 s	61 °C pendant 30 s
	72 °C pendant 30 s	72 °C pendant 30 s
Elongation finale	72 °C pendant 10 min	72 °C pendant 10 min
Refroidissement	4°C dans la glace	4°C dans la glace

### 2.3.3.2.3 Profils des communautés microbiennes

Les profils des communautés microbiennes ont été obtenus par CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism), qui permettait de séparer les fragments d'ADN de même taille mais de composition différente obtenu par PCR.

Le mélange pour la SSCP était composé de 1  $\mu$ L des produits de PCR dilué, de 18,925  $\mu$ L de formamide et 0,075  $\mu$ L d'un étalon de taille interne ROX GS 400 (Applied Biosystem) dilué 10 fois. Puis le mélange a été dénaturé à 95°C pendant 5 minutes et placé directement dans la glace pendant 10 minutes pour structurer l'ADN en structure secondaire. La SSCP a été réalisée avec un analyseur ABI 3130 (Applied Biosystems) avec des tubes capillaires de 50 cm avec 5,6% d'un polymère de conformation, d'un tampon et 10% de glycérol (Applied Biosystem). Le tampon contient du EDTA, du glycérol et de l'eau osmosé. L'électrophorèse a été ensuite réalisée à 12kV et 32°C pendant 30min par échantillon (Wéry et al., 2008). Un profil de communautés de microorganismes a alors été obtenu (Figure 2-7) par échantillon. Chaque pic du profil correspond à un type de microorganismes, c'est-à-dire ayant une composition ADN proche. Ces profils permettent de comparer l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon.



Pour l'analyse statistique des profils SSCP, les profils ont été tout d'abord alignés en utilisant l'étalon interne ROX (Applied Biosystem) pour la variabilité inter-échantillon au niveau de l'électrophorèse. Puis les profils ont été normalisés en utilisant R version 2.11.1 et la librairie StatFingerprints (Fromin et al., 2002). Les distances génétiques entre les communautés de bactéries et des archées ont été analysées par analyses en composantes principales (ACP). Des corrélations linéaires entre le classement des communautés par ACP et les paramètres de l'expériences ont été établis en utilisant la fonction envfit de la librairie (Oksanen et al., 2013).

### 2.3.3.2.4 PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative est une PCR avec un marqueur fluorescent fixé sur les amorces, ce qui permet de suivre l'amplification de l'ADN en temps réel. Ainsi, les marqueurs vont être fluorescent lorsqu'ils vont de fixer sur une séquence d'ADN précise. La fluorescence est détectée à partir d'un seuil précis et c'est le nombre de cycles d'amplification de la PCR au moment de la détection de ce seuil qui va permettre de calculer la concentration de départ de l'ADN présent.

Le mélange PCR pour l'amplification contenait 5 µL d'ADN à amplifier, 12,5 µL de L'Express qPCR Supermix pré-mélangé à du ROX (Invitrogen). A ce mélange s'ajoutaient 10 nM des amorces du gène de l'ARNr 16S, 8 nM de la sonde TaqMan puis de l'eau a été ajouté afin d'arriver à un volume finale de 25 µL. Le mélange a été distribué ensuite sur des plaques PCR à temps réelles à 96 puits (Eppendorf). Les amorces utilisées pour les bactéries et les archées ont été détaillées dans la Table 2-6. Les conditions d'amplifications de la qPCR étaient une incubation initiale de 20s à 95°C puis 40 cycles de dénaturation (95°C pendant 15 s suivi de 60°C pendant 1 min). Une courbe standard a été réalisée en utilisant une dilution au 1/10 dans de l'eau stérilisée avec des clones provenant de l'intestin d'animaux (Snell-Castro et al., 2005). Les clones utilisés comme standards étaient DF10 pour les Archées et LC103 pour les Bactéries.

Table 2-6 : Amorces pour la qPCR.

En italique les marqueurs fluorescents : *6FAM* : 6-carboxyfluorescein, *TAMRA*, 6-carboxytetramethylrhodamine et *Jaune d'Yakima*.

Cibles	Amorces	Séquences (5'-3')	
Bactéries	BAC338F	ACTCC TACGG GAGCPG AG	(Yu et al., 2005)
	BAC805R	GACTA CCAGG GTATC TAATC C	
	BAC16F	<i>Jaune d'Yakima</i> -TCPGCA CPGACPG CCPGGG TAATA C- <i>TAMRA</i>	
Archées	ARC787F	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC	
	ARC1059R	CPGCAT CPGACC WCCTC T	
	ARC915F	<i>6FAM</i> -AGGAA TTGCPG GGGGG ACPGAC- <i>TAMRA</i>	

### 2.3.3.2.5 Séquençage

Les compositions des communautés microbiennes (archées et bactéries) ont aussi été identifiées par séquençage après purification des produits de la PCR. Pour cela, le système Illumina MiSeq a été utilisé par le centre de séquençage GenoToul ([www.genotoul.fr](http://www.genotoul.fr)). Ensuite, le résultat des séquences a été assemblé et nettoyé en utilisant Mothur version 1.33.2 (Schloss et al., 2009). SILVA release 102 a finalement été utilisé pour l'alignement et la taxonomie.

---

## **2.4 ANALYSES STATISTIQUES**

---

### **2.4.1 Analyses de variances (ANOVA)**

Les analyses de variances (ANOVA) ont été réalisées en utilisant le logiciel R (version 2.15.2) et Rcmdr (version 1.8.4). Les seuils de similarité ont été fixés à 5% et les différences ont été significatives pour une p-value <0.05.

### **2.4.2 Analyses en composantes principales (ACP)**

L'analyse en composantes principales a été utilisée pour corrélérer les résultats microbiologiques avec les paramètres environnementaux. Cette méthode d'analyse permet de corrélérer un grand nombre de données et de variables entre elles et de représenter sous forme de nuages de points distribués sur 2 axes principaux. Le logiciel R (version 2.15.2) a été utilisé pour réaliser l'ACP des CE-SSCP, avec vegan (1.17-9), ce qui a permis de comparer les profils de communautés microbiennes avec les conditions environnementales.

# **CHAPITRE 3:**

## **INFLUENCE DES GAZ DISSOUS SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE A L'ECHELLE MICROSCOPIQUE**

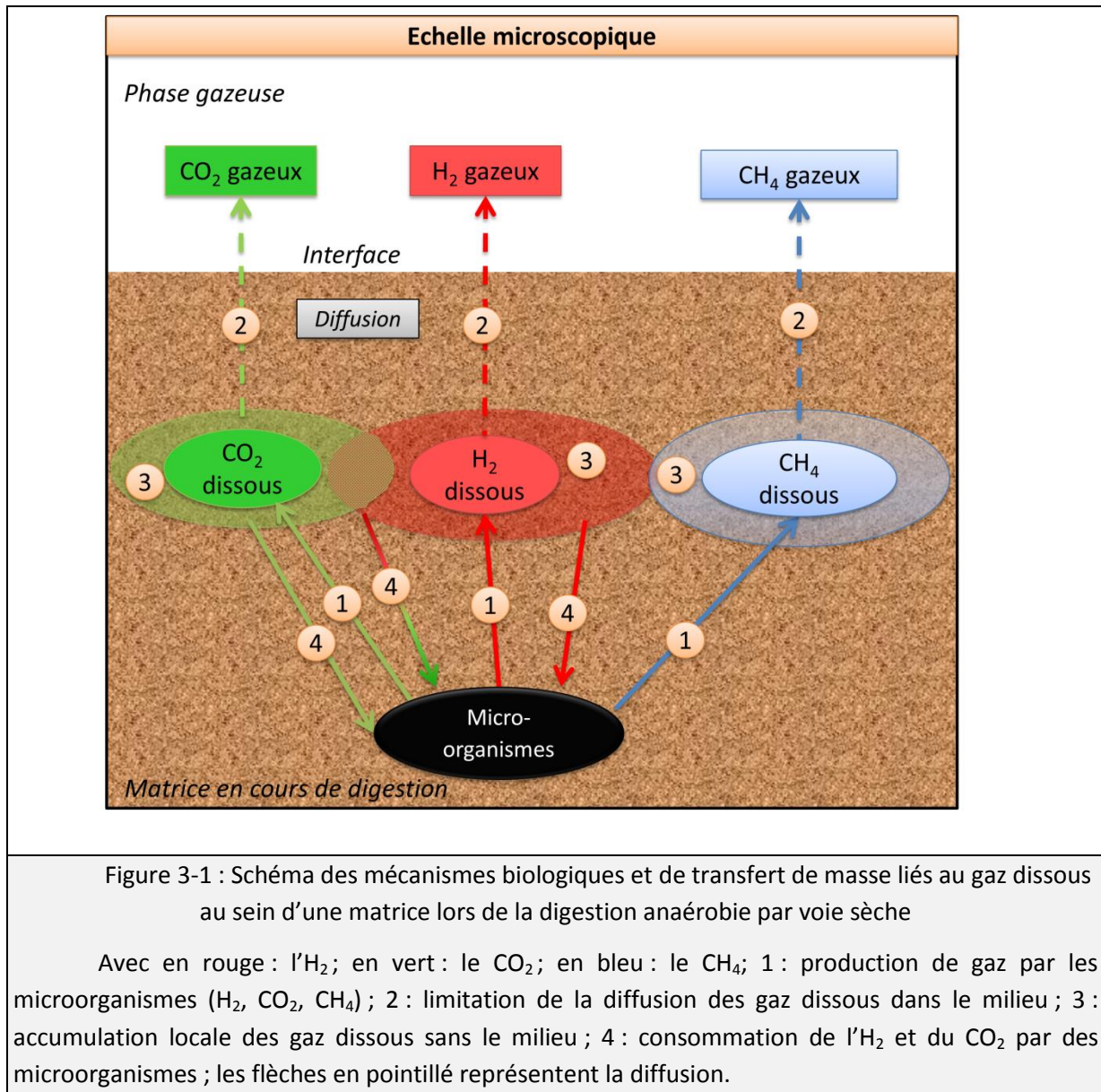
---

La diminution de la concentration et de l'accessibilité en eau au sein d'un substrat organique peuvent avoir un effet important sur le processus de digestion anaérobie. En effet, il a été largement démontré que la digestion anaérobie pouvait être inhibée pour des teneurs importantes en MS (28-30% de MS) (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2014; Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo, 2009). La dégradation du substrat ainsi que la production de CH<sub>4</sub> et d'H<sub>2</sub> peuvent donc diminuer avec une augmentation du taux de matières sèches, ce qui peut conduire à une accumulation des AGVs produits dans le milieu (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015a; Fernández et al., 2008; Motte et al., 2013a; Robledo-Narváez et al., 2013).

Cette inhibition de la digestion anaérobie pour une teneur en MS importante pourrait être reliée à une diminution des cinétiques de transfert de matière des molécules solubles au sein du substrat avec l'augmentation de la teneur en MS (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013). En effet, un milieu à haute teneur en MS peut amener à des accumulations locales de sous-produits comme par exemple les AGVs ou les gaz dissous (H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) qui peuvent être inhibiteurs de la digestion anaérobie (Figure 3-1). Ces sous-produits de réaction sont connus pour être inhibiteurs pour la digestion anaérobie en voie humide (Amani et al., 2010; Chen et al., 2008) sans que leurs effets sur la digestion anaérobie par voie sèche soient encore bien décrits.

Ce chapitre rapporte une première étude ayant eu pour objectif de déterminer les effets des gaz dissous (de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>) sur la digestion anaérobie par voie sèche au niveau local, c'est-à-dire en minimisant l'effet de la diffusion. Pour cela, les expériences suivantes ont été réalisées avec un milieu de faible épaisseur, dans des conditions de digestion anaérobie par voie sèche, afin de tester l'effet direct de la pression partielle en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. La paille de blé a été utilisée comme substrat modèle des résidus ligno-cellulosiques.





Une première série d'expériences a porté sur l'influence d'une large gamme de pressions partielles en H<sub>2</sub> afin d'évaluer son effet sur la digestion anaérobie par voie sèche (25 % de MS) et plus particulièrement son effet inhibiteur. Or, la diffusion diminue avec l'augmentation de la teneur en MS (Bollon et al., 2013) et peut devenir limitant. Afin de limiter les effets possibles de la diffusion, les expériences ont été réalisées avec un milieu d'épaisseur minimale (moins de 1 cm). L'effet de la P<sub>H<sub>2</sub></sub> a été testé de 0 à 1 557 mbars d'H<sub>2</sub>, ce qui correspond à un ciel gazeux allant de 0 à 100% d'H<sub>2</sub>. Cependant, le CO<sub>2</sub> est un gaz produit en même temps que l'H<sub>2</sub> lors de la phase d'acidogénèse et peut être consommé avec l'H<sub>2</sub> pour produire de l'acétate ou de CH<sub>4</sub>. Ainsi, les effets d'un mélange H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> ont été étudiés, avec une P<sub>H<sub>2</sub></sub> variant de 0 à 1 120 mbars et une P<sub>CO<sub>2</sub></sub> variant de 0 à 427 mbars. Ces pressions partielles ont été choisies afin d'obtenir une P<sub>CO<sub>2</sub></sub> correspondant à 2 ou 4 fois la P<sub>H<sub>2</sub></sub>. En effet, au niveau stœchiométrique, 1 mol de CO<sub>2</sub> et 4 mol de H<sub>2</sub> sont nécessaires pour produire 1 mol de CH<sub>4</sub> (méthanogénèse) et 2 mol de CO<sub>2</sub> et 4 mol de H<sub>2</sub> sont nécessaires pour produire 1 mol d'acétate (homoacétogénèse) (Thauer et al., 1977). Les résultats sont présentés sous la forme d'un

article publié dans « *Bioresource Technology* » en 2015 (Cazier et al., 2015). Il a été montré qu'une pression partielle importante en hydrogène pouvait inhiber l'hydrolyse de la paille lors de la digestion anaérobie par voie sèche, avec une accumulation apparente très faible en CO<sub>2</sub>, suggérant qu'il pouvait être limitant. Cependant, l'hydrolyse n'a pas été inhibée lorsque l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> ont été ajoutés en même temps. Ainsi, il est possible de penser que l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> pourrait être évitée par ajout de CO<sub>2</sub>.

Afin de tester cette hypothèse, une deuxième série d'études a porté sur la réversibilité de l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> au cours du temps par ajout de CO<sub>2</sub>. Cette réversibilité a été testée en ajoutant de l'H<sub>2</sub> en début de réaction (inhibition de l'hydrolyse), puis en ajoutant du CO<sub>2</sub> au bout de 11 et 18 jours d'inhibition. Cette étude est présentée sous la forme d'un second article (à soumettre). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> était réversible suite à l'ajout de CO<sub>2</sub> avec toutefois la persistance d'un effet sur les vitesses de méthanisation. Cet effet serait potentiellement dû à un effet rémanent de l'inhibition H<sub>2</sub> sur les voies méthanogènes passant par la dégradation de l'acétate (par les méthanogènes acétotrophes ou par l'oxydation de l'acétate par les bactéries).

Suite à ces expériences mélangeant à la fois H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>; l'étude de l'effet du CO<sub>2</sub> seul sur la digestion anaérobie par voie sèche, avec une P<sub>CO<sub>2</sub></sub> allant de 0 à 1 092 mbars, a enfin été réalisée afin d'estimer le rôle du CO<sub>2</sub> seul à l'échelle microscopique. Cette étude est présentée sous la forme d'un chapitre en français. Le CO<sub>2</sub> ne semble pas avoir eu d'effet sur la dégradation totale du substrat (et donc l'hydrolyse) mais un effet positif de l'ajout du CO<sub>2</sub> était présent sur la production de CH<sub>4</sub>. Ainsi, l'ajout de CO<sub>2</sub> permettrait d'accélérer la production de CH<sub>4</sub> à partir des AGVs ou permettrait la conversion d'H<sub>2</sub> potentiellement dissous dans le milieu.

---

### **3.1 BIOMASS HYDROLYSIS INHIBITION AT HIGH HYDROGEN PARTIAL PRESSURE IN SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION**

---

Cazier, E. A., Trably, E., Steyer, J. P., & Escudie, R. (2015). Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 190, 106–113. [doi:10.1016/j.biortech.2015.04.055](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.055)

#### **3.1.1 Avant-propos**

La digestion anaérobie par voie sèche est un des deux types de technologies existantes (voies sèche et humide). Ce type de digestion anaérobie est utile pour la valorisation de déchets secs comme par exemple les déchets ligno-cellulosiques et possède des avantages comme un besoin en eau et en énergie moins importants. Cependant, les performances de la digestion anaérobie par voie sèche sont souvent inférieures aux performances de la digestion anaérobie par voie humide, car ce système est sujet à des inhibitions importantes en présence de teneurs en MS élevées (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a). La diminution de la performance de la digestion anaérobie avec l'augmentation de la teneur en MS peut être expliquée par une diminution de la vitesse de diffusion des molécules dissoutes au sein du milieu (Bollon et al., 2013), ce qui implique notamment une diminution des cinétiques de transfert gaz-liquide au sein du milieu (Abbassi-Guendouz et al., 2012). En effet, pour des teneurs en MS importantes (> 28-30%), les cinétiques de transfert gaz-liquide des molécules dissoutes au sein du milieu peuvent devenir limitantes et provoquer l'accumulation de ces molécules au sein du milieu réactionnel (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b). Or ces molécules dissoutes peuvent être inhibitrices, comme par exemple les AGVs, et provoquer des inhibitions locales de la digestion anaérobie. Lorsque ces inhibitions locales sont très importantes, la digestion anaérobie peut être inhibée dans sa globalité. Les molécules dissoutes inhibitrices peuvent aussi être des gaz dissous, comme par exemple l'H<sub>2</sub> ou le CO<sub>2</sub>, comme supposé par Abbassi-Guendouz et al.,(2012).

L'objectif de cette étude était donc d'étudier l'effet de la pression partielle en hydrogène sur la digestion anaérobie par voie sèche. Puisque les mécanismes de transferts de matière peuvent être limitants en digestion anaérobie par voie sèche, les expériences suivantes ont été réalisées avec une épaisseur de substrat de moins d'un cm (c'est-à-dire en couche « mince »), afin de limiter les effets de la diffusion et de tester directement les effets de la présence de pressions partielles élevées en H<sub>2</sub>.

Une deuxième série d'expériences a testé les effets de l'ajout de H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> en début de réaction dans les mêmes conditions. En effet, le CO<sub>2</sub> est produit de façon concomitante avec l'H<sub>2</sub> lors de l'acidogenèse. L'ajout de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub> se rapproche donc de ce qui peut être obtenu lors du processus de digestion anaérobie par voie sèche.

### 3.1.2 Abstract

In solid-state anaerobic digestion, so-called ss-AD, biogas production is inhibited at high total solids contents. Such inhibition is likely caused by a slow diffusion of dissolved reaction intermediates that locally accumulate. In this study, we investigated the effect of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on ss-AD. Partial pressure of H<sub>2</sub> and/or CO<sub>2</sub> was artificially fixed, from 0 to 1 557 mbars for H<sub>2</sub> and from 0 to 427 mbars for CO<sub>2</sub>. High partial pressure of H<sub>2</sub> showed a significant effect on methanogenesis, while CO<sub>2</sub> had no impact. At high P<sub>H<sub>2</sub></sub>, the overall substrate degradation decreased with no accumulation of metabolites from acidogenic bacteria, indicating that the hydrolytic activity was specifically impacted. Interestingly, such inhibition did not occur when CO<sub>2</sub> was added with H<sub>2</sub>. This result suggests that CO<sub>2</sub> gas transfer is probably a key factor in ss-AD from biomass.

#### **Keywords**

Dry anaerobic digestion; gas transfer; hydrogen; hydrolysis; lignocellulosic residues.

#### **Highlights**

- Biogas production is inhibited for high total solids contents (over 28-30%).
- The effect of H<sub>2</sub> alone or mixed with CO<sub>2</sub> on dry mesophilic anaerobic digestion was tested.
- H<sub>2</sub> inhibits the hydrolysis in mesophilic ss-AD.
- CO<sub>2</sub> is the limiting factor for CH<sub>4</sub> production in mesophilic ss-AD through indirect H<sub>2</sub> accumulation

### 3.1.3 Introduction

Over the past decade, solid-state anaerobic digestion (ss-AD) also called dry anaerobic digestion or high-solids AD has gained a wide interest in Europe. Agricultural waste and organic fraction of municipal waste had been particularly used as substrates (Baere et al., 2010). In ss-AD, organic matter contained in the waste is biologically converted by anaerobic bacteria into a biogas composed of CH<sub>4</sub> (50-70%) and CO<sub>2</sub> (30-50%). Remaining organic matter called digestate can be further reused on land as fertilizer with several sanitary and environmental restrictions. The biogas produced by AD can be converted into electricity and heat by cogeneration or, after purification, can be used as biofuel (95% of CH<sub>4</sub>) or directly injected in natural gas pipelines (Weiland, 2010).

Anaerobic digestion is composed of four microbial steps: first, organic matter (proteins, lipids and polysaccharides) is hydrolyzed into soluble molecules by extracellular enzymes excreted by hydrolytic microorganisms (Montero et al., 2008). Hydrolysis is mostly the limiting step of AD when solid organic matter is used as substrate (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991a). The second step corresponds to acidogenesis: amino-acids, saccharides and fatty acids are transformed into volatile fatty acids (VFAs) such acetate, butyrate, propionate, or into others organics acids, such as lactate, or in alcohols, i.e. ethanol, butanol, in presence of fermentative microorganisms such as *Clostridium* sp. (Fritsch et al., 2008). The third step is called acetogenesis where all types of VFAs are transformed into acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> by two types of microorganisms: (1) syntrophic acetogens, e.g.

*Syntrophobacter wolinii* or *Syntrophomonas wolfei*, also called Obligate Hydrogen Producing Bacteria (OHPB), are converting VFAs, alcohols and fatty acids to H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and acetate (Amani et al., 2010). These microorganisms are syntrophs of methanogens since all acetogenic reactions are thermodynamically not favorable and end-products accumulation can inhibit their own production, in particular hydrogen (2) non syntrophic homoacetogens, e.g. *Clostridium aceticum*, are using H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> to produce acetate (Amani et al., 2010). In this case, the reaction is thermodynamically favorable and does not require the presence of methanogenic *Archaea*. Acidogenesis is also impacted by H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in wet AD and more specifically the production of propionate, butyrate and caproate (Arslan et al., 2012). Acetate and butyrate are concomitantly produced with H<sub>2</sub> and the consumption of these VFAs may be inhibited by high P<sub>H<sub>2</sub></sub> (Ahring and Westermann, 1988; Ding et al., 2010; Hallenbeck, 2005). The last step corresponds to methanogenesis. Acetate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are transformed into CH<sub>4</sub> by two types of microorganisms: (1) acetotrophic methanogens using acetate as substrate and producing 70% of CH<sub>4</sub> in AD (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991) such as *Methanosaeta concilii* or *Methanosarcina acetivorans* (Amani et al., 2010), (2) hydrogenotrophic methanogens using CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as substrates, such as *Methanobacterium bryantii* or *Methanobrevibacter arboriphilus* (Amani et al., 2010).

Two main types of technologies have been developed to convert the solid organic matter in anaerobic digestion : wet AD and solid-state AD (ss-AD), with a Total Solids (TS) content below or higher than 15%, respectively (Baere et al., 2010). ss-AD presents several advantages such as reducing the water demand and lowering the costs related to water management, with a subsequent reduction of reactor size and less energy requirements for heating. These advantages contributed to a recent and large industrial development of ss-AD, with a rapid emergence of full-scale plants (Baere et al., 2010). Industrial digesters usually use agricultural, green or solid organic waste, under a TS content ranging from 15 to 30%. Since many industrial installations have been empirically developed, recent research has been devoted to optimize ss-AD processes through a better understanding of their limitations (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013b).

The key parameter driving the microbial processes in ss-AD is low water content since microbial end-products can locally accumulate and inhibit methanogenesis (Abbassi-Guendouz et al., 2012). In such systems, water availability presents two distinct forms: (1) "free water" that can act as a solvent for salts and soluble compounds (Pommier and Chenu, 2007), (2) "bound water" that has more structural bonding (chemical and physical interactions) than liquid or free water and thus, is unable to act as a solvent. The form of water depends mainly on the structure and composition of the organic matter structure. Moreover, when the TS content increases, the quantity of free water decreases (Garcia-Bernet et al., 2011a) and the transport of soluble content within the substrate can become a limiting factor (Bollon et al., 2013). Microbial activity can be impacted by water availability and methane yields vary significantly between wet and ss-AD, according to the nature of the substrate. Brown et al. (2012) reported that CH<sub>4</sub> yields of paper decreased from 19.2 L/kg TS to 8.7 L/kg TS in wet and ss-AD, respectively. In contrast, no CH<sub>4</sub> yields variation was observed with wheat straw, i.e. 11.6 L/kg TS (wet AD) and 12 L/kg TS (ss-AD). Overall, by increasing the TS content, substrate degradation and consequently the biogas production are reduced (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Garcia-Bernet et al., 2011a; Motte et al., 2013b). As an illustration, a decrease of organic waste degradation by 17% was observed when changing the TS content from 20 to 30% (Fernández et al., 2008).

When the water content decreases, the rheological behavior of the substrate is also modified (Garcia-Bernet et al., 2011a). Therefore, the diffusion of metabolic compounds within the substrate at a macroscopic level is lowered (Bollon et al., 2013). The limitation of ss-AD might be explained by the slow diffusion of dissolved inhibitory products inside the organic matrix generating local accumulation at microbial scale (Martin, 2001; Staley et al., 2011). In a recent study, Abbassi-Guendouz et al. (2012) suggested that methanogenesis inhibition at high solids content was mainly caused by gas transfer limitation and more particularly by a local accumulation of gases ( $H_2$  and  $CO_2$ ) leading to VFAs accumulation.  $H_2$  has a well-described inhibitory effect on wet AD but the exact effect of  $H_2$  on ss-AD remains unknown.

The objective of this study was to investigate the effect of dissolved gases on ss-AD. The accumulation of  $H_2$  and  $CO_2$ , as by-products of acidogenesis, was investigated in particular since local accumulation of these gases may impact the overall ss-AD process. Experiments were designed and carried out to evaluate the effect of the partial pressure of  $H_2$  alone or mixed with  $CO_2$  on the overall reaction of ss-AD.

### 3.1.4 Materials and methods

#### 3.1.4.1 Substrate preparation

Wheat straw (*Triticum aestivum*) was used as model substrate representing lignocellulosic agricultural waste for its well-known composition in hemicelluloses, cellulose and lignin (Vassilev et al., 2012). Particles were fractionated in a cutting miller through a 1 mm grid, and further sieved between grids of 1 mm and 400  $\mu m$ . Wheat straw particles had a TS content of 95%.

#### 3.1.4.2 Operating conditions of the batch tests

Granular sludge originated from an industrial UASB reactor treating sugar factory effluents was used to inoculate the batch reactors. The sludge was mixed during 24 h at 35°C to break the granules, and then centrifuged at 7 841 g (20 min, 4°C) to obtain a microbial anaerobic inoculum with a TS content ranging between 10 to 13 %. Final pH of the inoculum was 7.8.

A substrate/inoculum biomass (S/X) ratio of 3 (in volatile solids basis) was used as suggested elsewhere (Liew et al., 2012). The initial TS content of the flask was fixed at 25 % where no inhibition of AD was reported (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013b). Wheat straw and inoculum were added in a S/X ratio of 3 and TS content was adjusted with the buffer solution after addition of trace elements. At this TS content, A solution of trace elements ( $FeCl_2$  2g/L,  $CoCl_2$  0.5g/L,  $MnCl_2$  0.1 g/L,  $NiCl_2$  0.1 g/L,  $ZnCl_2$  0.05 g/L,  $H_3BO_3$  0.05g/L,  $Na_2SeO_3$  0.05g/L,  $CuCl_2$  0.04 g/L,  $Na_2MoO_4$  0.01g/L) was added with a volume of 0.2 mL by flask. A buffer solution of sodium bicarbonate (0.0026 g  $NaHCO_3$ /g substrate) was added at the beginning to keep the pH around 7-8.

First, the medium (wheat straw, trace elements, buffer and inoculum) was introduced into a 3 L reactor operated during 10 days at 35°C. This reactor was flushed with  $N_2$  to avoid the presence of  $O_2$ . This pre-culture was performed to reach an active phase of methanogenesis and homogenize

the substrate. Then, 20 g of the pre-culture was distributed in a thin layer (<1 cm) at the bottom of a 600 mL flask. Such thin layer was used to minimize the influence of the gas diffusion within the medium. The flasks were flushed with N<sub>2</sub> before the addition of other gases (H<sub>2</sub> alone or mixed with CO<sub>2</sub>). Whatever the gas added, the initial pressure was around 1.5 bars. The flasks were then incubated during 13 days at 35°C to evaluate the effect of the partial pressure of H<sub>2</sub> and/or CO<sub>2</sub> on the initial degradation of wheat straw in ss-AD.

Experiments were conducted in five separate runs, with three to four replicates for each condition. An experimental design plan was performed in order to investigate the partial pressure of H<sub>2</sub> (P<sub>H<sub>2</sub></sub>) alone or mixed with CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) (Table 1). When H<sub>2</sub> was added alone, initial P<sub>H<sub>2</sub></sub> ranged from 0 to 1 557 mbars. CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> were also added simultaneously in a mixture corresponding to partial pressures of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> ranging from 0 to 1 060 mbars and 0 to 427 mbars, respectively (Table 3-1). For each run, a control (only N<sub>2</sub> in headspace) was carried out.

Table 3-1 : Gas partial pressure investigated in different runs

Runs	Partial pressure of H <sub>2</sub> (mbars)	Partial pressure of CO <sub>2</sub> (mbars)
1	0, 55, 105, 485 and 895	0
2	0, 650, 750, 932 and 1 020	0
3	0, 778 and 1 418	0
4	0, 828 and 1 545	0
5	0, 780 and 1 060	0, 327 and 427

### 3.1.4.3 ***Analytical methods***

Gas pressure and composition were measured periodically with an automated multiplexed micro-gas chromatograph (µGC R3000, SRA instrument) using 12 to 20 flasks at once. It was composed of an injector and two capillary columns heated at 90°C and 80°C, respectively. One column corresponded to a MolSieve 5Å (with a length of 10 m and a diameter of 0.32 mm) for analyzing CO<sub>2</sub> with argon as carrier gas, at a pressure of 30 psi. The second column corresponded to a PLOT Q with a length of 8 m and a diameter of 0.32 mm, and was used for analysis of the O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> with helium as carrier gas at a pressure of 20 psi. The detection was ensured by a thermal conductivity detector.

At the end of the experiment, 5 g of the medium were diluted in 20 g of deionized water, mixed during 30 minutes, and centrifuged at 39 121 g during 20 min at 4°C. The supernatant was then filtrated at 0.2 µm with a nylon membrane, and was then used to measure VFAs, others microbial metabolites (formate, succinate, lactate, ethanol) and residual soluble sugars.

Volatile fatty acids (VFAs) were measured at start and at the end of each experiment. VFA concentrations were determined with a gas chromatograph Perkin Clarus 580 with an Elite-FFAP crossbond®carbowax® 15 m column connected to a flame ionization detector at 280°C and N<sub>2</sub> at 6 mL.min<sup>-1</sup> as carrier gas, as described elsewhere (Motte et al., 2013b).

Others metabolites and soluble sugars were measured at start and at the end of each experiment. These compounds were quantified using high performance liquid chromatograph. This chromatograph was composed of an automatic sampler (Water 717), a pre-column to filter residues (Micro guard cation H refill cartridge, Bio-rad) and a Aminex HPX-87H column (300 mm on 7,8 mm, Bio-rad). The carrier liquid was sulfuric acid at 0.005 M at 0.4 ml.min<sup>-1</sup>, as described elsewhere (Motte et al., 2013).

The quantity of microorganisms (*Bacteria* and *Archaea*) was quantified using quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction ) according to the protocol of Braun et al. (2011) and Bru et al. (2012). The community structures of *Bacteria* and *Archaea* were obtained using Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) using the protocol described by Wéry et al., (2008). The microbial community composition (Archaea and Bacteria) was evaluated by sequencing after purification of the PCR products, using the Illumina MiSeq System with 2x300 bp paired-end chemistry at the GenoToul sequencing center (www.genotoul.fr). An average of 81 707 high quality sequences per sample for Archaea and 453 382 high quality sequences per sample for Bacteria were retained after assembly, demultiplexing and cleaning steps in Mothur version 1.33.2 (Schloss et al., 2009). SILVA release 102 was used for alignment and as taxonomic outline.

#### 3.1.4.4 **Data analysis**

Statistical analyses of the data obtained were performed using R software (version 2.15.2) with the package Rcmdr (version 1.8-4). Non-significant p-values were fixed >0.05 and significant p-values were estimated when <0.05; <0.01 and <0.001.

Total substrate degradation was assessed with Chemical Oxygen Demand (COD) mass balance between the start and the end of the experiment. To avoid a high experimental error when determining the COD value from solids, wheat straw COD was not considered and all calculations were expressed according to the initial TS content. Total substrate degradation was estimated theoretically according to the end-products accumulation in the gas and liquid phases, as follows (Equation 1):

$$\text{Total Substrate Degradation (Final State-Initial State)} = \frac{A_{H_2,f} + A_{CH_4,f} + A_{met,f} + A_{GC}}{g\ TS} - \frac{A_{H_2,i} + A_{met,i}}{g\ TS}$$

where,  $A_{H_2,f}$  is the final amount of H<sub>2</sub> remaining in headspace,  $A_{CH_4,f}$  the final amount of CH<sub>4</sub> accumulated in headspace,  $A_{met,f}$  the final amount of metabolites,  $A_{GC}$  the total amount of gas (H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) sampled for analyses,  $A_{H_2,i}$  the amount of H<sub>2</sub> initially added and  $A_{met,i}$  the initial amount of metabolites in the medium.



### 3.1.5 Results and discussion

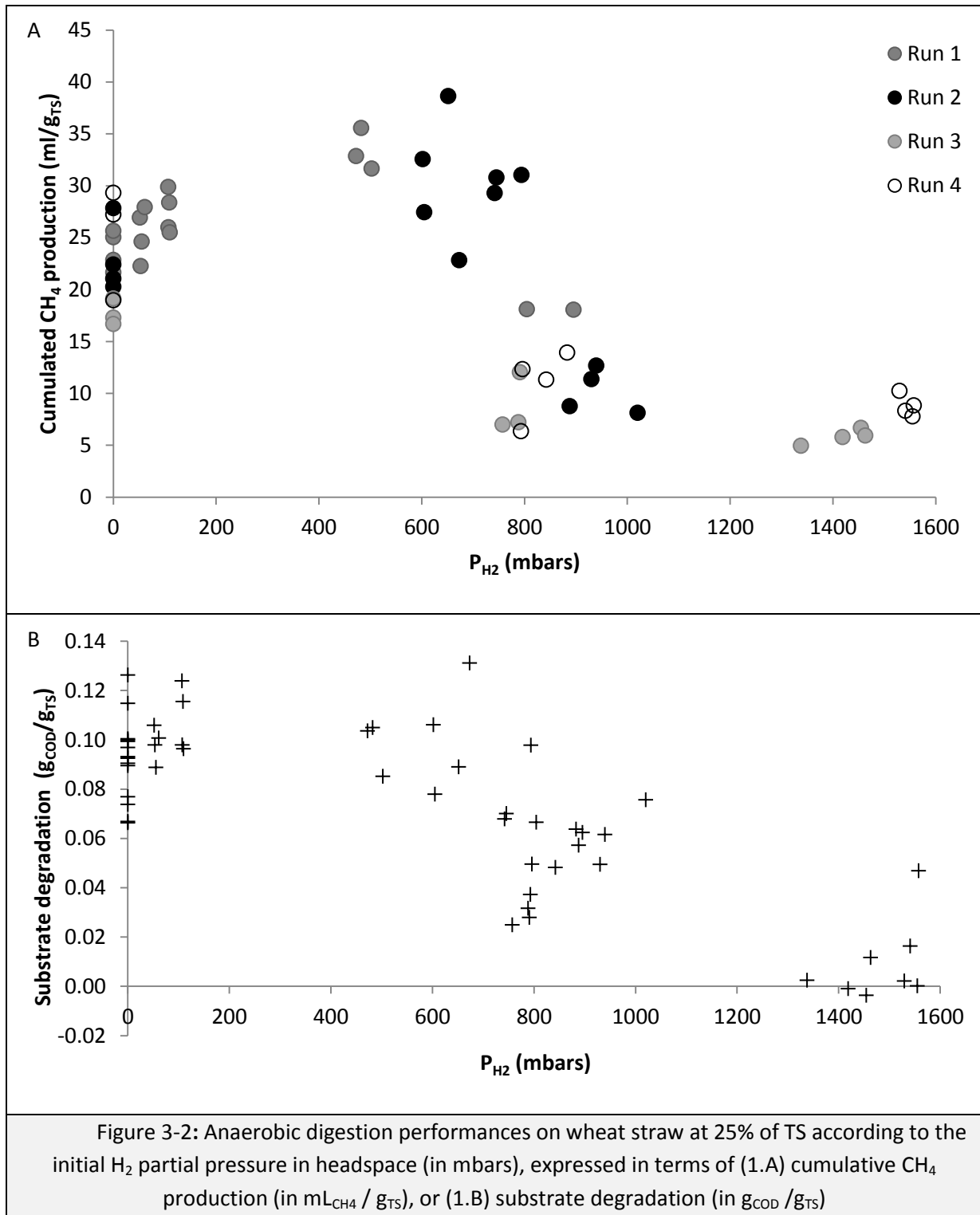
#### 3.1.5.1 **Impact of high $P_{H_2}$ on methanogenesis**

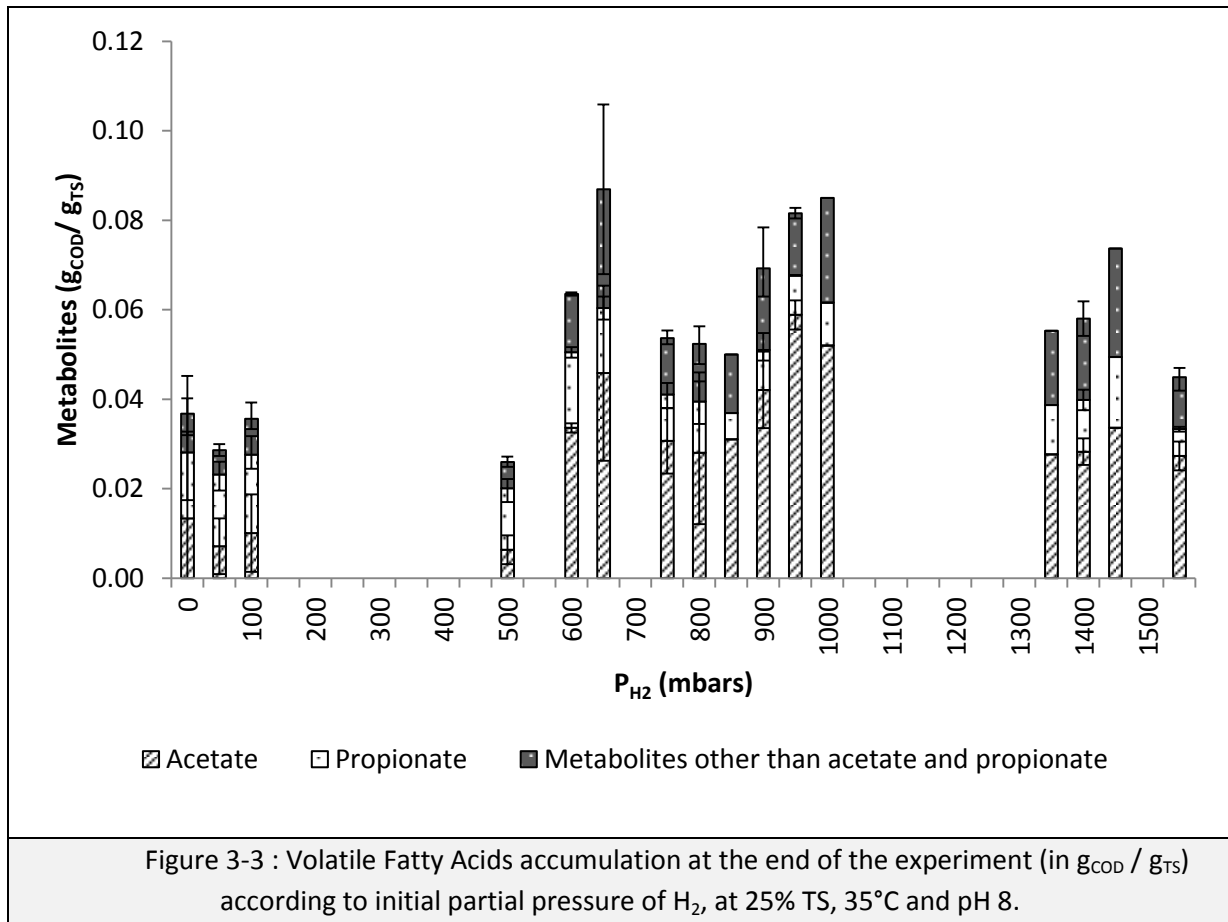
Figure 3-2-A shows the cumulative  $CH_4$  production at the end of the experiment (i.e. 13 days) according to the initial  $H_2$  partial pressure. In this figure, results from four different runs (Runs 1-4) inoculated with distinct pre-cultures are presented. Since the pre-cultures were not exactly from the same origin, cumulated  $CH_4$  production in the control samples ( $P_{H_2} = 0$ ) showed a high variability. This was likely due to a slightly longer lag phase for  $CH_4$  production that was observed in the controls, although the pre-culture was active in all runs (see Supplementary material). A difference of few days in the initial lag phase could have resulted in variability of cumulated  $CH_4$  after 13 days of experiment. Adding  $H_2$  in headspace at start of the experiment accelerated the initial  $CH_4$  production and the results between the assays showed a lower variability. When initial  $P_{H_2}$  ranged from 0 to 600 mbars, a slight increase of  $CH_4$  production was observed from  $23 \pm 4 \text{ mL}_{CH_4}/\text{g}_{TS}$  to  $28 \pm 6.1 \text{ mL}_{CH_4}/\text{g}_{TS}$ , respectively. This increase was due to a partial consumption of the  $H_2$  initially added. At higher initial  $P_{H_2}$ , cumulative production of  $CH_4$  decreased from  $28 \pm 6.1 \text{ mL}_{CH_4}/\text{g}_{TS}$  down to  $9 \pm 1.1 \text{ mL}_{CH_4}/\text{g}_{TS}$  at  $P_{H_2} = 1\ 555$  mbars. Interestingly, at  $P_{H_2}$  higher than 800-900 mbars, a strong decrease of methanogenesis was observed.

Figure 3-2-B shows the overall substrate degradation expressed in g COD per g of initial TS, after 13 days of experiment. The substrate degradation corresponded to the total amount of COD produced by AD degradation of wheat straw. Interestingly, substrate degradation decreased with the increase of initial  $P_{H_2}$ , from  $0.09 \pm 0.01 \text{ g}_{COD}/\text{g}_{TS}$  in the control samples to  $0.02 \pm 0.01 \text{ g}_{COD}/\text{g}_{TS}$  at a  $P_{H_2} = 1\ 555$  mbars. Since total amount of metabolic end products such as methane and acidogenic VFAs decreased with the increasing of  $P_{H_2}$ , this result suggests that a strong inhibition of the initial steps of hydrolysis and/or acidogenesis occurred at initial  $P_{H_2}$  higher than 742 mbars. An analysis of variance (ANOVA) showed that when  $H_2$  was introduced alone (1) the substrate degradation was not significantly different from controls at  $P_{H_2}$  lower than 781 mbars, and (2) the substrate degradation was significantly different at 1 050 mbars of  $H_2$  with a p-value < 0.0001 (see more information in Supplementary material).

In addition, a low pH resulting from VFA accumulation could have a strong impact on methanogens. Here, since the medium was buffered, the pH remained the same between 8 and 9 all along the experiments.

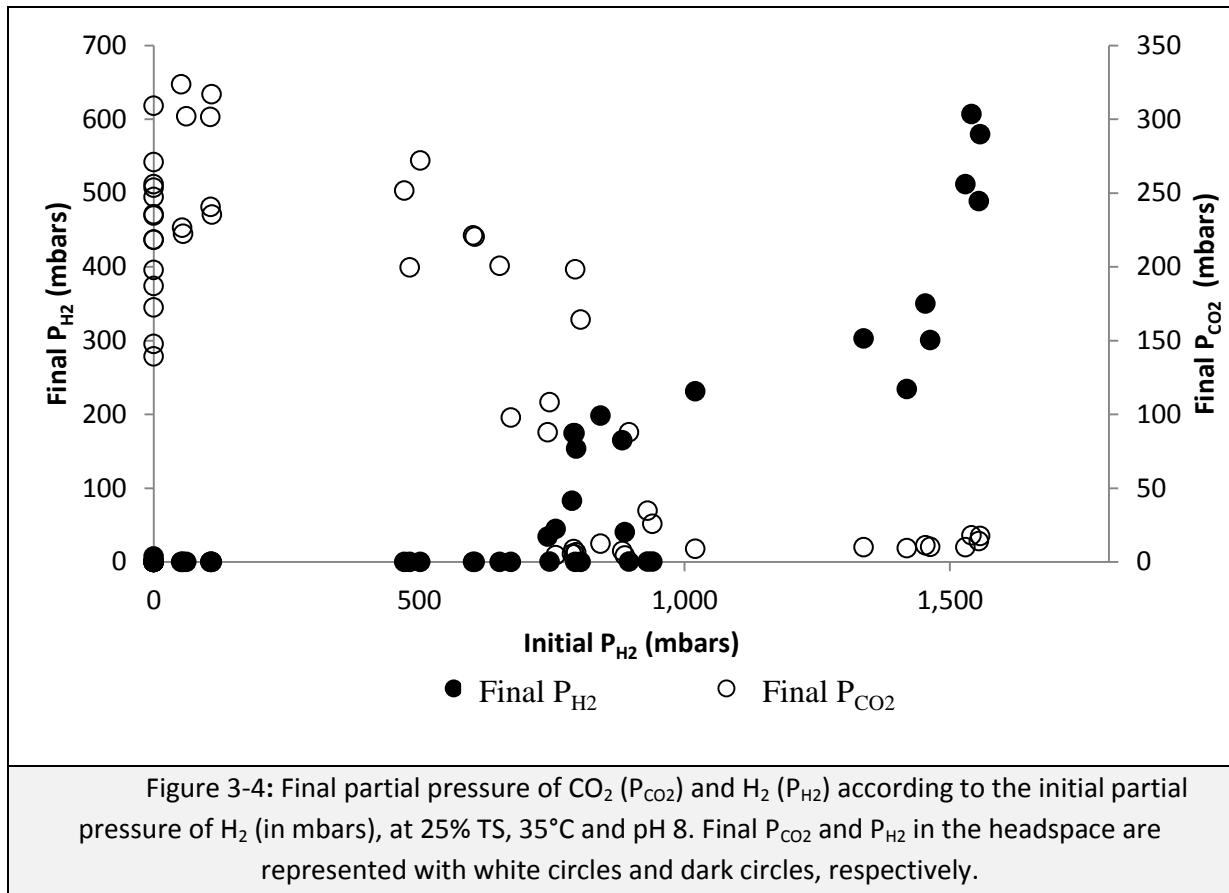
Figure 3-3 shows the cumulated amount of VFAs expressed in  $\text{g}_{COD}/\text{g}_{TS}$  at the end of the experiment according to initial  $P_{H_2}$ . VFAs accumulation increased from  $26 \pm 8$  to  $85 \pm 2 \text{ mg}_{COD}/\text{g}_{TS}$  between  $P_{H_2}$  of 500 mbars and 1 000 mbars, respectively, and decreased at higher  $P_{H_2}$ . Acetate was the unique VFAs changing with initial  $P_{H_2}$ . The amount of acetate increased from  $13 \pm 11 \text{ mg}_{COD}/\text{g}_{TS}$  in the control to  $33 \pm 1 \text{ mg}_{COD}/\text{g}_{TS}$  at 600 mbars. The slight increase of acetate production at  $P_{H_2}$  higher than 603 mbars was likely due to the consumption of  $H_2$  and  $CO_2$  by homoacetogens (Montero et al., 2009). A maximum amount of  $59 \pm 3 \text{ mg}_{COD}/\text{g}_{TS}$  was observed at 950 mbars, and the amount of acetate decreased at  $P_{H_2}$  of 1 350 mbars with  $27 \pm 2 \text{ mg}_{COD}/\text{g}_{TS}$ .





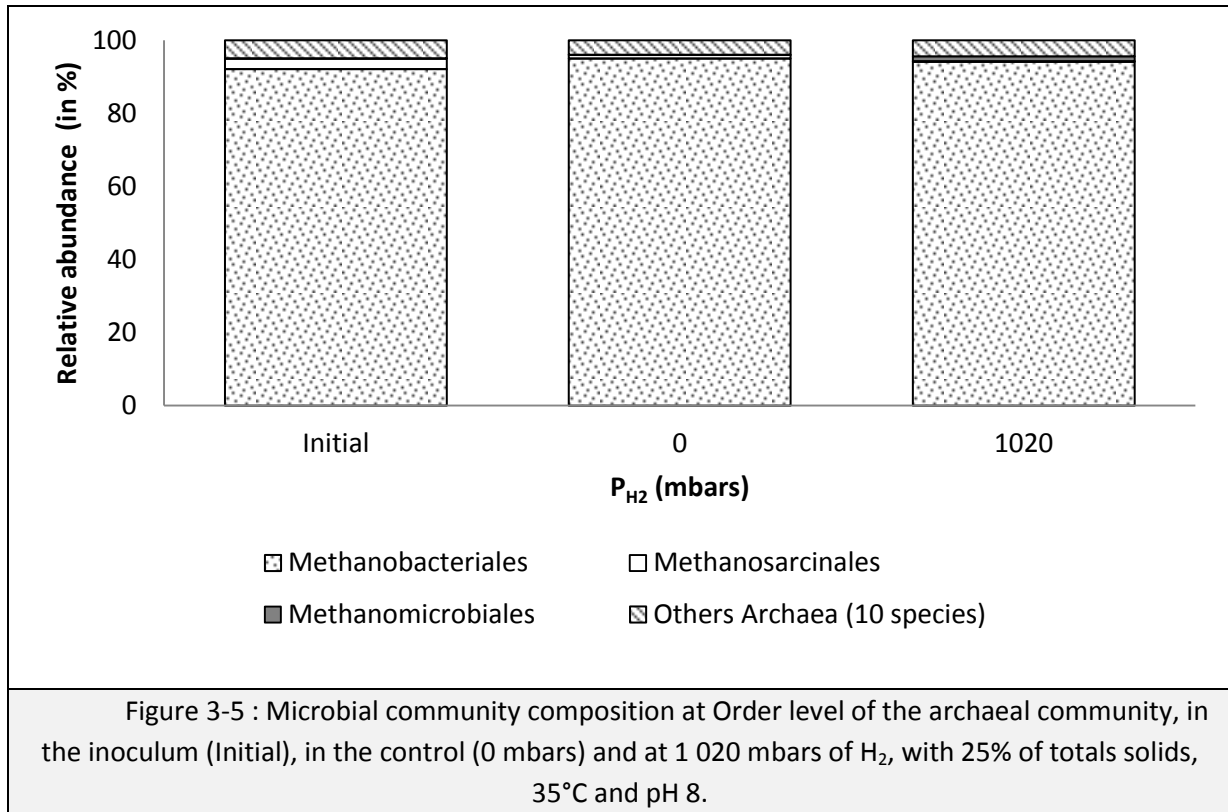
In this study, no substantial VFAs accumulation that could explain methanogenesis inhibition was observed. Inhibition of methanogenesis by H<sub>2</sub> partial pressure is well-known process in wet AD, since acetogenesis is thermodynamically unfavorable when the P<sub>H2</sub> is too high ( $1.01 \times 10^{-3}$  mbars) resulting in VFA accumulation and changes in VFA distribution (Deublein and Steinhauser, 2008). According to the Henry's law, the dissolved H<sub>2</sub> concentration at 35°C ranged from  $1.14 \times 10^{-3}$  mg/L to  $3.64 \times 10^{-2}$  mg/L at 52 mbars of H<sub>2</sub> and 1 545 mbars of H<sub>2</sub>, respectively. In AD, H<sub>2</sub> is continuously produced by fermentation from sugars and acetogenic bacteria from VFAs and ethanol. Since the latter reactions are endergonic, complete AD requires an immediate and rapid H<sub>2</sub> consumption by methanogens to produce CH<sub>4</sub> (Amani et al., 2010). In wet AD, methanogenic conversion of fermentative end-products generated by acidogenic and acetogenic bacteria can decrease when H<sub>2</sub> accumulates with subsequent increase of VFAs. The P<sub>H2</sub> value at which VFAs accumulate and methanogenesis is inhibited in wet AD is very low when compared to the present results. As an illustration, butyrate consumption by acetogens was reported as inhibited at a P<sub>H2</sub> of 20.3 mbars, at 25°C and pH 7, using glucose as substrate (Ahring and Westermann, 1988). However, acetogenesis and inhibition leads to a change in VFA distribution that was not observed in this study (Figure 2). When considering the amount of water contained in the medium, the maximal VFAs concentration was always lower than  $19 \pm 0.5$  g VFAs/L that was even below the inhibitory limit of methanogenesis 20 g/L. This inhibitory limit of methanogenesis, but not acidogenesis was reported in wet AD by Siegert and Banks (2005) using glucose and cellulose as substrates. Arslan et al. (2012) reported that H<sub>2</sub> up to 2 bars has no effect on fermentative acetate production from carbohydrates, proteins and lipids rich waste. Additionally, Abbassi-Guendouz et al (2012) reported that VFAs could accumulate

under similar conditions at concentrations higher than 40 g/L at high TS value. It was therefore concluded that high  $P_{H_2}$  had a strong inhibitory impact on hydrolysis rather than acidogenesis.



In addition, the final partial pressure of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> remaining in headspace at the end of the experiment and according to initial  $P_{H_2}$  are shown in Figure 3-4. The remaining  $P_{H_2}$  was always lower than the amount of H<sub>2</sub> introduced at start-up of the experiment, showing that added H<sub>2</sub> was partially or totally consumed and no H<sub>2</sub> was overproduced. At low initial  $P_{H_2}$ , H<sub>2</sub> was fully consumed during the time of the experiments. H<sub>2</sub> was likely used to produce acetate and CH<sub>4</sub> at  $P_{H_2}$  lower than 745 mbars. At a  $P_{H_2}$  ranging between 745 and 1 000 mbars, H<sub>2</sub> was partially consumed to produce acetate by homoacetogenesis (Montero et al., 2009). Interestingly, H<sub>2</sub> consumption was lower at high  $P_{H_2}$  since H<sub>2</sub> remained in the headspace at the end of the experiment with  $26 \pm 23.1$  to  $547 \pm 55.6$  mbars of H<sub>2</sub>/g TS for initial  $P_{H_2}$  of 745 mbars and 1 550 mbars, respectively. More precisely, H<sub>2</sub> consumption was rapid during the first days of experiments and then slowed down rapidly according to the initial  $P_{H_2}$ . As an illustration, at 1 418 mbars, H<sub>2</sub> was rapidly consumed during the first 3 days, with a consumption rate of  $206 \pm 112$  mbars of H<sub>2</sub> per g TS and per day. H<sub>2</sub> consumption rate was much slower the following days with only  $21.3 \pm 16.2$  mbars H<sub>2</sub> per g TS and per day. Meanwhile, the remaining CO<sub>2</sub> in headspace was also monitored (Figure 3-4). The apparent remaining CO<sub>2</sub> corresponds to a balance between CO<sub>2</sub> production due to microbial degradation of wheat straw, and CO<sub>2</sub> consumption to produce either CH<sub>4</sub> by methanogens or acetate by homoacetogens, both in combination with H<sub>2</sub>. From 0 to 745 mbars, CO<sub>2</sub> was overproduced due to microbial activity on

substrate. The remaining  $P_{CO_2}$  decreased  $221 \pm 47.8$  to  $67 \pm 55$  mbar of  $CO_2$  /g TS in the control and at a  $P_{H_2}$  of 745 mbars, respectively. At higher  $P_{H_2}$ , no remaining  $CO_2$  was found in headspace. Since the increase of the remaining amount of  $H_2$  in headspace was correlated to the decrease of remaining  $CO_2$ , it was concluded that  $CO_2$  production was the limiting factor for  $H_2$  consumption and, by consequence,  $H_2$  inhibition on the hydrolytic activity (Florin and Harris, 2008). Since both  $CO_2$  and  $H_2$  are required to produce acetate or methane, the decrease of acetate/methane production at higher  $P_{H_2}$  may be explained by a lack of remaining  $CO_2$  in headspace.



This assumption was supported by microbial community analysis. The archaeal community of methanogens was composed of  $94.6 \pm 0.6$  % of *Methanobacteriales* and only  $0.5 \pm 0.6$  % of *Methanosarcinae* at 0 and 1 020 mbars, as shown in Figure 3-5. *Methanobacteriales* are strict hydrogenotrophes, while members of the *Methanosarcinae* order are rather acetotrophes with some members exhibiting both activities. In absence of acetotrophes, acetate oxidation could occur in AD, and has even been reported as main methanogenic pathway by Karakashev et al. (2006). However, acetate oxidation is thermodynamically unfavorable at high  $P_{H_2}$  and could only occur in presence of active hydrogenotrophes. Since  $CO_2$  was a limiting factor, leading to subsequent  $P_{H_2}$  accumulation by limiting the hydrogenotrophic activity, acetate was not oxidized and accumulated in the medium and lower production of methane. The concentration of 16S rRNA genes copies of *Archaea* or *Bacteria* per g of digestate measured by quantitative PCR did not change according to the initial  $P_{H_2}$ , likely because of the limited time period of 13 days. Therefore, archaeal and bacterial community structures, evaluated by CE-SSCP, showed no significant differences between the assays and it was concluded that the initial  $P_{H_2}$  had no effect on either communities or growth of the anaerobic

consortium, but rather had an impact at a cellular or physiological level (data shown in supplementary material section).

### 3.1.5.2 ***Effect of adding CO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub> on solid state AD***

A second set of experiments was carried out to evaluate the effect of CO<sub>2</sub> that is concomitantly produced with H<sub>2</sub> during acidogenesis. Abbassi-Guendouz et al. (2012) showed methanogenesis inhibition at high solids content (>30%) and suggested that such inhibition was due to local accumulation of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> leading subsequently to VFAs accumulation. To determine the exact effect of both H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> on AD, a mixture of both gases were initially introduced in headspace.

As control, CO<sub>2</sub> was added alone at different initial P<sub>CO<sub>2</sub></sub>, but no significant effect on substrate degradation was observed (see supplementary material).

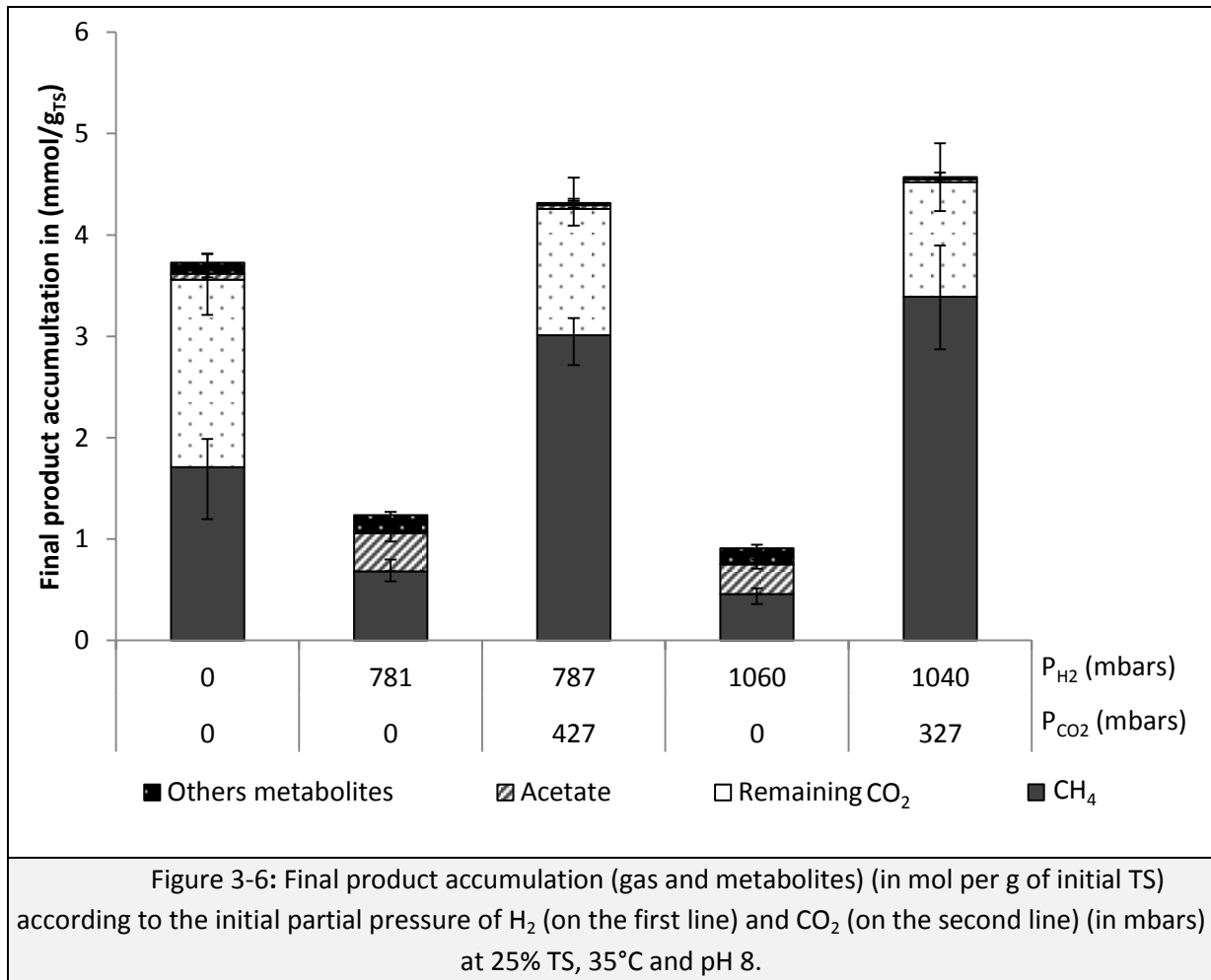


Figure 3-6 shows the cumulative production of CH<sub>4</sub> and VFAs as well as the remaining CO<sub>2</sub> at the end of the experiment, according to the initial P<sub>CO<sub>2</sub></sub> and P<sub>H<sub>2</sub></sub>. First, CH<sub>4</sub> production increased when

CO<sub>2</sub> was initially added with H<sub>2</sub> from 0.46 ± 0.06 mmol CH<sub>4</sub>/g TS to 3.4 ± 0.51 mmol CH<sub>4</sub>/g TS in the control with no CO<sub>2</sub> and with CO<sub>2</sub> at 1 040-1 060 mbars of H<sub>2</sub>, respectively. The remaining CO<sub>2</sub> increased when CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> were added together, from 0 with only H<sub>2</sub> added to 1.25 ± 0.3 mmol CO<sub>2</sub>/g TS and 1.13 ± 0.4 mmol CO<sub>2</sub>/g TS at 787 mbars and 1 040-1 060 mbars of H<sub>2</sub>, respectively. Such values of CO<sub>2</sub> indicated an overproduction of CO<sub>2</sub> during the time of experiment. Interestingly, H<sub>2</sub> was entirely consumed at the end of the experiment, when mixed with CO<sub>2</sub> (after 2-4 days). In contrast, remaining H<sub>2</sub> was present when H<sub>2</sub> was added alone, from 0.4 ± 0.4 to 1 ± 0.2 mmol H<sub>2</sub>/g TS at the end of the experiment for 781 and 1 060 mbars of H<sub>2</sub> respectively. In conclusion, microorganisms likely used both CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> to produce CH<sub>4</sub> by methanogenesis and/or acetate by homoacetogenesis rapidly transformed to methane. Hydrolysis inhibition did not occur since the P<sub>H<sub>2</sub></sub> decreased rapidly in the headspace when CO<sub>2</sub> was added initially.

Furthermore, the total amount of VFAs was higher when H<sub>2</sub> was added alone (0.03 ± 0.006 g VFAs/ g TS for both P<sub>H<sub>2</sub></sub>) than for the mixture (0.003 ± 0.002 g VFAs/ g TS for both P<sub>H<sub>2</sub></sub>/ P<sub>CO<sub>2</sub></sub>). This result suggests that methanogenesis occurred preferentially than homoacetogenesis when both CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> were added, which is different than in conventional wet AD (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991a). This observation was confirmed by acetate concentration which was higher when only H<sub>2</sub> was present in headspace, with 3.48 x 10<sup>-4</sup> mol acetate/g TS (for 781 mbars of H<sub>2</sub> alone) than for a mixture of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, with 5.27 x 10<sup>-5</sup> mol acetate/g TS (with 787 mbars of H<sub>2</sub>/427 mbars of CO<sub>2</sub>). Moreover, the overall substrate degradation increased from 7.28 x 10<sup>-3</sup> g COD/g TS at 1 060 mbars of H<sub>2</sub> with no CO<sub>2</sub>, to 0.14 g COD/g TS at similar 1 040 mbars of H<sub>2</sub> with 324 mbars of CO<sub>2</sub> (Table 3-2). The overall substrate degradation was 5 to 19 times higher when CO<sub>2</sub> was added than with only H<sub>2</sub>. Statistically, substrate degradation was similar in control and when CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> were added initially in headspace. In this case, hydrolysis inhibition did not occur, since H<sub>2</sub> was consumed rapidly with CO<sub>2</sub> by the methanogens to produce CH<sub>4</sub>, and P<sub>H<sub>2</sub></sub> decreased rapidly under inhibitory P<sub>H<sub>2</sub></sub>. By adding CO<sub>2</sub> in headspace, it was confirmed that CO<sub>2</sub> was a limiting factor for CH<sub>4</sub> production when P<sub>H<sub>2</sub></sub> was high. Hydrolysis inhibition by H<sub>2</sub> could therefore not occur when CO<sub>2</sub> was present in headspace, since they were both consumed to produce acetate or CH<sub>4</sub>.

Table 3-2 : Final substrate degradation (in g COD per g of initial TS) according to the initial partial pressure of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (in mbars).

Similarity was determined by ANOVA (analysis of variance) test between the control (0 mbars of CO<sub>2</sub> and 0 mbars of H<sub>2</sub>) and when H<sub>2</sub> and/or CO<sub>2</sub> were added. Non-significant p-value are >0.05 (Similar) and significant p-values are <0.05; <0.01 and <0.001 (Different).

Initial partial pressure of H <sub>2</sub> (mbars)	Initial partial pressure of CO <sub>2</sub> (mbars)	Substrate degradation (g <sub>COD</sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup> )
0	0	0.11±0.018
781	0	0.03 ± 0.01 ( <i>Different</i> )
787	427	0.13 ± 0.01 ( <i>Similar</i> )
1 060	0	0.01 ± 0.01 ( <i>Different</i> )
1 040	327	0.14 ± 0.03 ( <i>Similar</i> )

All these experiments were performed with a thin layer of substrate to reduce gas transfer limitations and investigate local impact of gas partial pressure. To extend these observations to ss-AD reactor, gas transfer must also be considered. In high solids reactors, anaerobic digestion is inhibited at high TS contents (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013b). Diffusion coefficients of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are also lower in ss-AD (Bollon et al., 2013). With high solids, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> may accumulate in the matrix and local P<sub>H<sub>2</sub></sub> likely increases with subsequent inhibition of hydrolysis. Diffusion of CO<sub>2</sub> may also be slowed, and the overall inhibition observed at high solids content may result from a low amount of CO<sub>2</sub> available to reduce hydrolysis inhibition by H<sub>2</sub>.

Moreover, hydrolysis is already known to be a limiting factor in ss-AD (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991a) and the composition of the substrate (morphological and chemical) has a strong effect on this step (Motte et al., 2014; Triolo et al., 2011). The actual mechanisms of hydrolysis are not well understood, but many models are including low hydrolysis rates (Vavilin et al., 2008). In ADM1 model, two mechanisms for the extracellular enzymes are proposed: (1) the microorganisms secrete enzymes into the liquid phase of the digestate and the enzymes have an effect directly on the substrate or (2) the microorganisms attach themselves on the substrate and produce enzymes (Batstone et al., 2002). As shown for the first time in our study, H<sub>2</sub> produced during fast hydrolysis of readily accessible carbohydrates, could act as a strong inhibitor of the hydrolytic activity of microorganisms, either on production or secretion of extracellular enzymes, or on attachment and physiological cellular activity.

In previous study, modeling of ss-AD showed that a structuration of the microorganisms could occur, dependent of VFAs concentration and pH (Martin, 2001). Since H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are produced by acidogenic and acetogenic bacteria, dissolved gases may accumulate transiently in high solids reactors, with low availability to methanogens growing at a higher pH of 7-8. Thus, at high solids content, local accumulation of gases may result in inhibition of the overall process of methanogenesis as suggested in Abbassi-Guendouz et al. (2012). The authors reported a strong inhibition of CH<sub>4</sub> production at TS content higher than 30%, with an increase of VFAs concentration up to 40 g/L and a decrease of pH from 7 to 6. By modeling the process, it was shown that gas transfer was probably a limiting factor for the production of CH<sub>4</sub> since H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> may be used locally to produce acetate by homoacetogenic bacteria and since acidogens and acetogens are able to grow in same conditions rather unfavorable to methanogens, i.e. at low pH (Diekert and Wohlfarth, 1994).

### **3.1.6 Conclusion**

This study provides new insight about an inhibitory effect of H<sub>2</sub> on organic matter hydrolysis in ss-AD, using wheat straw as substrate. By adding CO<sub>2</sub>, hydrolysis inhibition was suppressed, indicating that CO<sub>2</sub> was the limiting factor to avoid H<sub>2</sub> inhibition in ss-AD. These results were obtained with a thin layer of substrate to avoid the effect of the gas transfer. Even though the strong inhibitory effect of H<sub>2</sub> was only observed at a local scale, inhibition of AD at high solids content may result from similar mechanisms when low gas diffusion rates create high local H<sub>2</sub> accumulation.



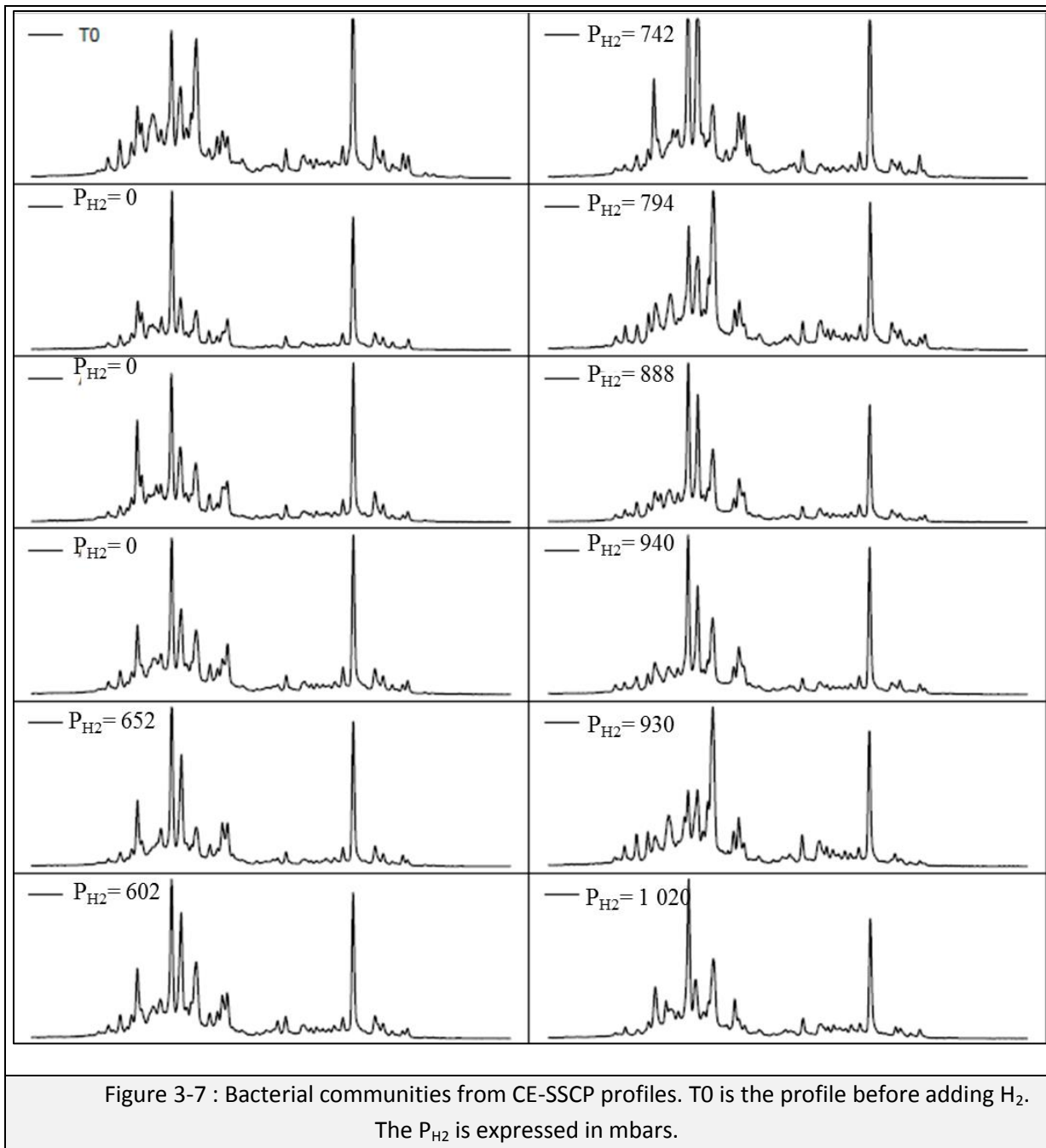
### **Acknowledgements**

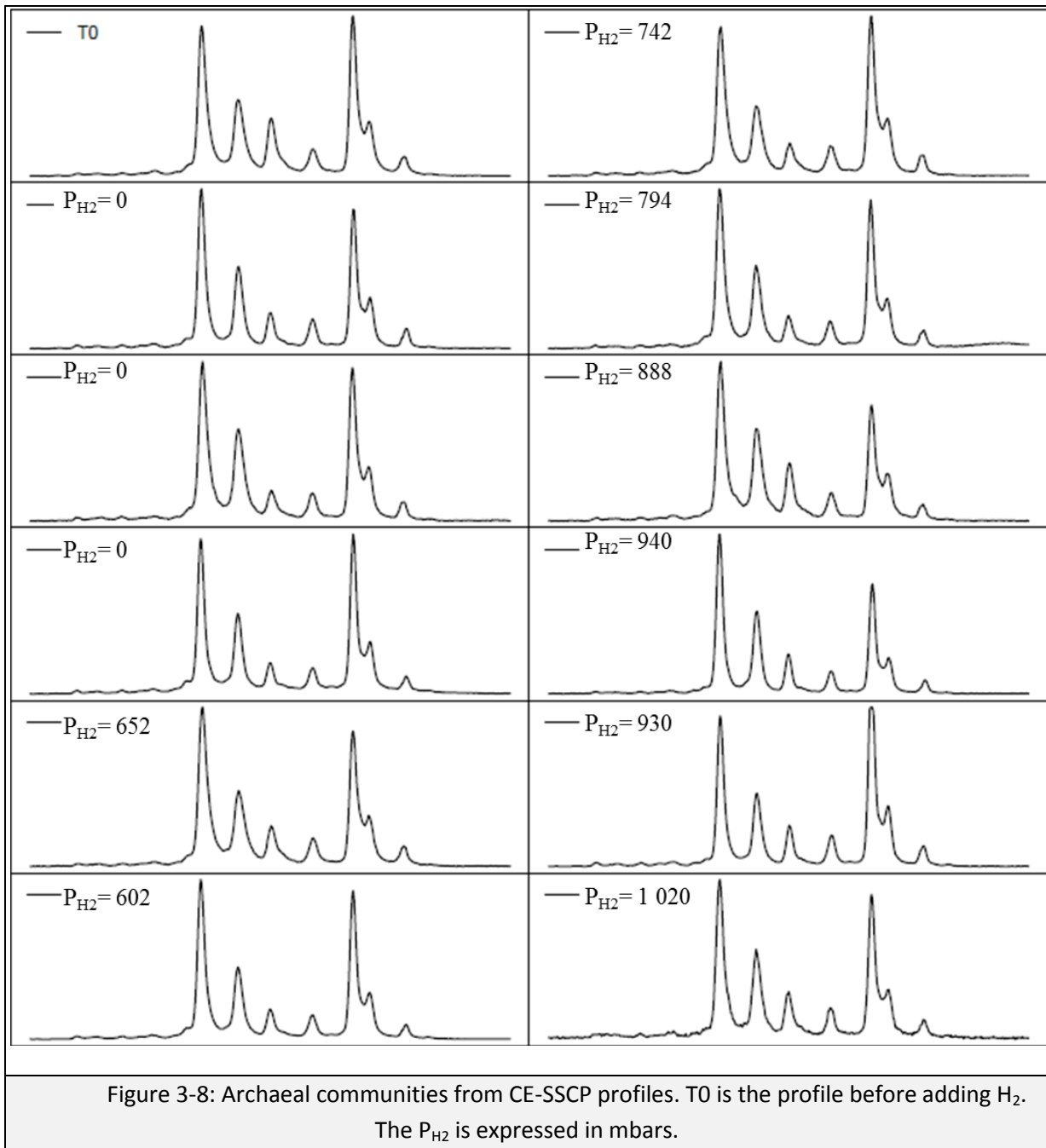
This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and the French Institute for Agricultural and Food Research (INRA).

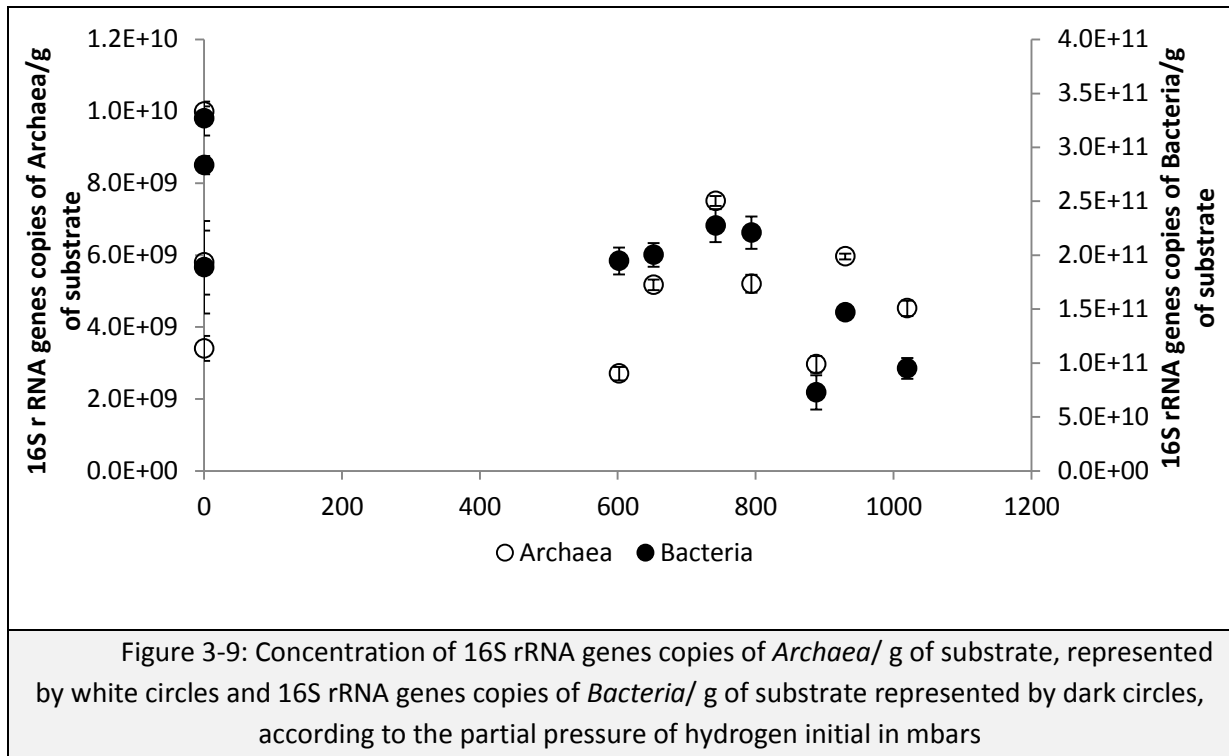
## **3.1.7 Supplementary material**

### **3.1.7.1 Effect of $P_{H_2}$ on Bacteria and Archaea communities**

The Figure 3-7 shows the bacterial communities profiles according to the  $P_{H_2}$ , using CE-SSCP. The  $P_{H_2}$  did not have any effect on the bacterial communities. In addition, the Figure 3-8 shows the archaeal communities profiles according to the  $P_{H_2}$ , using CE-SSCP. The  $P_{H_2}$  did not have any effect on the archaeal communities. Moreover, the  $P_{H_2}$  did not have any effect on the concentration of Archaea and *Bacteria* per g of substrate (Figure 3-9).







**3.1.7.2 Effect of  $P_{H_2}$  on the cumulated  $CH_4$  production, substrate degradation and remaining  $H_2$  and  $CO_2$  (Standard deviation and ANOVA)**

The Figure 3-10 shows the difference between the cumulated  $CH_4$  profiles, according to the  $P_{H_2}$ . When  $H_2$  was added, the production of  $CH_4$  started faster (4 days before) than without  $H_2$ . When  $P_{H_2}$  was too high, the  $CH_4$  production stopped after only 2 days (for 1 020 mbars of  $H_2$ ). The Table 3-3 shows the similarity and the difference between the substrate degradation according to  $P_{H_2}$ , and showed a significant difference in substrate degradation between 52-673, 742-883 and 888-1 557 mbars of  $H_2$ . The Table 3-4 represents the mean and standard deviation every 50 mbars of  $H_2$ .

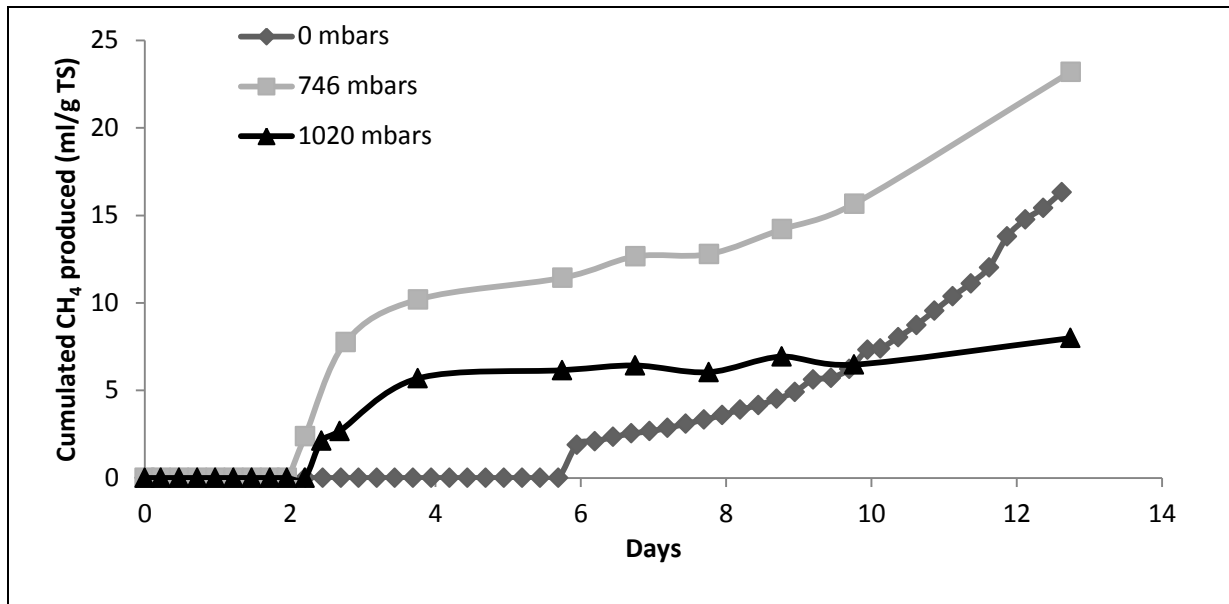


Figure 3-10: Cumulative CH<sub>4</sub> production in ml/g<sub>TS</sub> according to time in day for 0, 746 and 1 020 mbars of H<sub>2</sub> at 25% of TS, 35°C and pH 8.

Table 3-3: p-value of ANOVA, comparing the similarity between the substrate degradation depending on the variation of P<sub>H<sub>2</sub></sub> at 25% of TS, 35°C and pH 8.

Similarity was determined by ANOVA (analysis of variance) test between the control (0 mbars of CO<sub>2</sub> and 0 mbars of H<sub>2</sub>) and when H<sub>2</sub> and/or CO<sub>2</sub> were added. Non-significant p-value are >0.05 (Similar) and significant p-values are <0.05; <0.01 and <0.001 (Different).

Groups (mbars of H <sub>2</sub> )	Compared to	Similarity for the substrate degradation
52-673	0	0.464 (Similar)
742-883	0	<0.001 (Different)
888-1557	0	<0.001 (Different)
52-673	742-883	<0.001 (Different)
52-673	888-1557	<0.001 (Different)
742-883	888-1557	<0.001 (Different)

Table 3-4: Mean and standard deviation of the cumulative CH<sub>4</sub> production, remaining CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the headspace at the end of the experiment and substrate degradation depending on the variation of P<sub>H<sub>2</sub></sub> at 25% of TS, 35°C and pH 8.

Partial pressure of H <sub>2</sub>	Cumulated CH <sub>4</sub> production	Remaining CO <sub>2</sub>	Remaining H <sub>2</sub>	Substrate degradation
Mbars	ml <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup>	ml <sub>CO<sub>2</sub></sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup>	ml <sub>H<sub>2</sub></sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup>	g <sub>COD</sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup>
0	23 ± 4.0	35 ± 10.5	0 ± 0.2	0.083 ± 0.007
50	25 ± 2.5	33 ± 9.7	0 ± 0.0	0.090 ± 0.002
100	27 ± 2.1	32 ± 9.8	0 ± 0.0	0.095 ± 0.003
500	33 ± 2.0	31 ± 2.6	0 ± 0.0	0.094 ± 0.002
600	28 ± 6.1	34 ± 9.6	0 ± 0.0	0.086 ± 0.000
650	27 ± 9.8	23 ± 18.1	0 ± 0.0	0.099 ± 0.015
750	20 ± 11.2	10 ± 8.4	2 ± 2.2	0.053 ± 0.002
800	15 ± 9.1	6 ± 7.6	9 ± 8.1	0.054 ± 0.012
850	11 ± 0.0	1 ± 0.0	21 ± 0.0	0.046 ± 0.000
900	14 ± 4.7	3 ± 5.3	7 ± 8.5	0.043 ± 0.009
950	12 ± 0.9	2 ± 0.2	0 ± 0.0	0.029 ± 0.001
1 000	8 ± 0.0	0 ± 0.0	22 ± 0.0	0.047 ± 0.000
1 350	5 ± 0.0	1 ± 0.0	22 ± 0.0	0.016 ± 0.000
1 400	7 ± 0.6	1 ± 0.5	21 ± 6.1	0.017 ± 0.001
1 450	6 ± 0.0	1 ± 0.0	21 ± 0.0	0.012 ± 0.000
1 550	9 ± 1.1	1 ± 0.8	57 ± 4.5	0.032 ± 0.012

### 3.1.8 Résultats majeurs

Au cours de cette étude, il a été observé qu'à l'échelle locale, la digestion anaérobie par voie sèche pouvait être inhibée pour une pression partielle initiale en H<sub>2</sub> supérieure à 780 mbars. Plus spécifiquement, il a été montré que l'hydrolyse de la paille de blé était l'étape inhibée en présence d'H<sub>2</sub>. De plus, le CO<sub>2</sub> paraît être le facteur limitant de la production de CH<sub>4</sub> lorsque l'H<sub>2</sub> s'est accumulé. Si du CO<sub>2</sub> est ajouté initialement en même temps que l'H<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub> est consommé avec ce CO<sub>2</sub> et l'hydrolyse n'est alors plus inhibée.

---

## **3.2 REVERSIBILITY OF HYDROLYSIS INHIBITION BY HYDROGEN PARTIAL PRESSURE IN SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION**

---

E.A. CAZIER<sup>a</sup>, E. TRABLY<sup>a\*</sup>, J.P. STEYER<sup>a</sup>, R. ESCUDIE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>INRA, UR0050 Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

\*corresponding author : eric.trably@supagro.inra.fr; Phone: (+33)(0) 468 425 172; Fax: (+33)(0) 468 425 160

### **3.2.1 Avant-propos**

Dans le chapitre précédent, il a été montré qu'une pression partielle initiale en hydrogène supérieure à environs 780 mbars pouvait avoir un effet inhibiteur sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé et plus particulièrement sur l'étape d'hydrolyse (Cazier et al., 2015). L'ajout initial de CO<sub>2</sub> en même temps que d'H<sub>2</sub> permet de limiter cette inhibition par consommation de H<sub>2</sub> présent avec le CO<sub>2</sub> pour former du CH<sub>4</sub>. Aucun effet inhibiteur sur la digestion anaérobie par voie sèche n'est alors observé. Peu documenté, une meilleure compréhension du fonctionnement de cette inhibition de l'hydrolyse semble nécessaire. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'étudier l'inhibition locale de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> en testant si cette inhibition est réversible en ajoutant du CO<sub>2</sub> au cours du temps (et non initialement) et en étudiant les effets du temps passé sous inhibition sur la performance de la digestion anaérobie par voie sèche. Afin de limiter les effets de la diffusion, cette étude a été réalisée avec une épaisseur de substrat de moins d'un cm.

### **3.2.2 Abstract**

Well documented, solid-state anaerobic digestion (ss-AD) shows lower performances when solid content increases through methanogenesis inhibition. Such inhibition may be due to a decrease of the gas-liquid transfer kinetics leading to local accumulation of inhibitory by-products. Hydrogen has been described as an inhibitor of not only acetogenesis but also of hydrolysis in ss-AD. However, the exact role of CO<sub>2</sub> remains unknown. In this study, the reversibility of hydrogen inhibition on anaerobic hydrolysis in ss-AD was investigated by adding CO<sub>2</sub>. Anaerobic batch tests were performed with a thin layer of substrate to avoid diffusion effect in the medium. A high P<sub>H<sub>2</sub></sub> was initially used in the headspace to block hydrolysis. After 11 and 18 days of inhibition, 375 mbars of CO<sub>2</sub> was introduced. As a result, and as soon as CO<sub>2</sub> was added, methanogenesis recovered rapidly, likely through the hydrogenotrophic pathway. The duration of inhibition impacted only the acetate degradation.

#### **Keywords**

Acidogenesis, Carbon dioxide, Dry Anaerobic Digestion, Gas transfer, Hydrogen

## **Highlights**

- Methanogenesis inhibition by H<sub>2</sub> is reversible by adding CO<sub>2</sub>.
- The duration of H<sub>2</sub> inhibition had a transitory effect on anaerobic digestion.
- H<sub>2</sub> accumulation had a residual inhibitory effect on acetate degradation.

### **3.2.3 Introduction**

Anaerobic digestion has been widely developed in Europe since 1997 (Baere et al., 2010). In anaerobic digestion, organic wastes are degraded by microorganisms into a biogas composed of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> and also a residual digestate that may be further used as fertilizer if sanitary and environmental safeties are met. Three types of anaerobic digestion processes are distinguished according to their operational conditions: wet anaerobic digestion with a total solid content (TS) below 10%, semi-dry anaerobic digestion with a TS content between 10 and 20 % of TS and dry anaerobic digestion or solid-state AD (ss-AD) with a TS content over 20% (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Since less water is required in ss-AD, the digester size as well as the energy demand are both minimized (Yebo Li et al., 2011). Mostly, ss-AD is implemented for treating agricultural and ligno-cellulosic residues.

In counterpart, ss-AD technologies present some disadvantages due to the high TS content, with a decrease of the performance of anaerobic digestion and a higher heterogeneity and viscosity of the substrate (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a; Staley et al., 2011). For example, when the TS content exceeds 30 % , the anaerobic digestion process can be blocked rapidly and even strongly inhibited (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Such inhibition phenomenon is characterized by a concomitant decrease of the production of biogas and pH and an increase of the VFAs concentration (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a). A decrease of the free available water when TS content is increasing (Garcia-Bernet et al., 2011a) will likely cause a reduction of mass transfer kinetics of soluble molecules such as VFAs, or dissolved gases (Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013). Since VFA, dissolved gas diffusion and gas-liquid transfer may become limiting, a local accumulation of inhibitory by-products can occur rapidly in the bulk phase where microorganisms are active (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b).

In particular, it is well established that dissolved hydrogen accumulation can inhibit anaerobic digestion by making the reaction of acetogenesis thermodynamically unfeasible, which can further cause VFAs accumulation and methanogenesis inhibition (Deublein and Steinhauser, 2008; Guo et al., 2010). In anaerobic digestion, H<sub>2</sub> is produced by acidogenic bacteria and then consumed with CO<sub>2</sub> by homoacetogenic bacteria to produce acetate (Amani et al., 2010). H<sub>2</sub> is also directly consumed with CO<sub>2</sub> to produce CH<sub>4</sub> by the hydrogenotrophic methanogens. This pathway represents about 30% of the CH<sub>4</sub> produced in anaerobic digestion (Amani et al., 2010). All these reactions are reversible in anaerobic digestion process where acetate oxidation can also play a key role (Karakashev et al., 2006). Dissolved H<sub>2</sub> needs to accumulate partly to be further used by methanogens to produce CH<sub>4</sub>, but has to remain low enough to avoid inhibition of acetogens. When H<sub>2</sub> partial pressure (P<sub>H<sub>2</sub></sub>) is high, VFAs production increases and the pH decreases (Guo et al., 2010). This variation of the pH impacts the methanogenesis, hydrolysis and acetogenesis step (Siegert and



Banks, 2005; Veeken et al., 2000) and the growths of the methanogens and acidogenic bacteria (Luo and Angelidaki, 2013).

Recently, Cazier et al. (2015) reported that high partial pressure of H<sub>2</sub> in headspace can be strongly inhibitory of wheat straw hydrolysis step in ss-AD. It was shown that CO<sub>2</sub> can be limiting in ss-AD since H<sub>2</sub> inhibition occurred when CO<sub>2</sub> was exhausted. At the same time, hydrolysis inhibition did not occur when CO<sub>2</sub> was initially present with H<sub>2</sub> in reactor headspace (Cazier et al., 2015). When anaerobic digestion is efficiently working, CO<sub>2</sub> is biologically produced during acidogenesis and acetogenesis and then immediately consumed during homoacetogenesis and methanogenesis. CO<sub>2</sub> is also produced by hydrogenotrophic methanogens using acetate as substrate (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991b) and CO<sub>2</sub> represents 30 to 50% of the biogas in AD. CO<sub>2</sub> is known to be inhibitory on the production and degradation of VFAs and mostly on acetate, propionate for 1 bar of CO<sub>2</sub> at pH 7 and pH 4.5 (Arslan et al., 2012; Hansson and Molin, 1981). Moreover, CO<sub>2</sub> may have an inhibitory effect on lactic and acetogenic bacteria at pH 5.3 (Kim et al., 2006) and on acetoclastic methanogens at pH 7 (Hansson and Molin, 1981). Additionally, H<sub>2</sub> production yield may be improved by sparging CO<sub>2</sub> during fermentation (at 30 to 300 ml<sub>CO<sub>2</sub></sub>.min<sup>-1</sup>) (Bru et al., 2012; Kim et al., 2006). However, CO<sub>2</sub> may also have an inhibitory effect when sparged at high rate (500 ml<sub>CO<sub>2</sub></sub>.min<sup>-1</sup>) (Bru et al., 2012). The exact role of CO<sub>2</sub> is still unclear since removing CO<sub>2</sub> can also improve fermentative H<sub>2</sub> production (Park et al., 2005).

The aim of this study was to evaluate whether methanogenesis inhibition by H<sub>2</sub> in mesophilic ss-AD could be reversed by adding CO<sub>2</sub>. Different times of inhibition under H<sub>2</sub> atmosphere prior to CO<sub>2</sub> injection in the reactor headspace were investigated to evaluate the time dependency of the reversibility of the inhibition.

### 3.2.4 Materials and methods

#### 3.2.4.1 Substrate

Wheat straw (*Triticum aestivum*) was used as substrate. After harvest and collection, wheat straw was fractionated using a cutting miller through a 1 mm grid, and then sieved to collect particles with a size between 400 µm and 1 mm. The TS content of the wheat straw particles was 95%.

#### 3.2.4.2 Operating conditions of the batch tests

Industrial UASB anaerobic granules were used to inoculate the batch reactors. The granules were mixed during 24 h at 35°C and then centrifuged (7 841 g, 20 min, and 4°C) to obtain a homogeneous anaerobic inoculum. The TS content of the inoculum ranged between 10 to 15 %. The substrate/inoculum ratio was fixed at three (on basis of volatile solids) (Liew et al., 2012). A solution of sodium bicarbonate (0.0026 g of NaHCO<sub>3</sub>/g of substrate) was used to buffer the pH at 8 and a solution of trace elements (FeCl<sub>2</sub> 2 g.L<sup>-1</sup>, CoCl<sub>2</sub> 0.5 g.L<sup>-1</sup>, MnCl<sub>2</sub> 0.1 g.L<sup>-1</sup>, NiCl<sub>2</sub> 0.1 g.L<sup>-1</sup>, ZnCl<sub>2</sub> 0.05 g.L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.05 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.05 g.L<sup>-1</sup>, CuCl<sub>2</sub> 0.04 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.01 g.L<sup>-1</sup>) was added (0.2 mL by flask) at start of the experiment, using the same protocol than Cazier et al., (2015). Initial TS content of the

mixture (inoculum, wheat straw, sodium bicarbonate solution and trace elements) was fixed at 25% corresponding to a threshold value in ss-AD where no inhibitory effect is yet observed (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a).

First, the mixture was introduced into a reactor with a working volume of 3 L operated during 10 days à 35°C under N<sub>2</sub> atmosphere to reach an active phase of methanogenesis and homogenize the substrate/inoculum medium. Then, 20 g of this pre-culture was put in the bottom of flasks of 600 ml as a thin layer of less than 1 cm to limit the influence of gas diffusion in the medium. The batch tests in flasks were initially flushed with N<sub>2</sub> gas. Hydrogen gas was then added to reach an initial H<sub>2</sub> partial pressure of 996 ± 27 mbars, under a total pressure of 1 500 mbars. A control, with only N<sub>2</sub> in headspace, was also carried out. All the flasks were then incubated at 35°C during 32 days. In some flasks, 396 ± 44 mbars of CO<sub>2</sub> were added at 11 and 18 days after the start of the batch tests. Batch tests were carried out in triplicates for each condition. Flasks were analyzed at 0, 11, 18, 25 and 32 days for further analysis of metabolites concentration.

#### 3.2.4.3 ***Analytical methods***

Biogas production was analyzed by monitoring total pressure and the biogas composition. The gas composition was measured using a gas chromatograph Perkin Clarus 580. It was composed of an injector heated at 250°C and two capillary columns heated at 60°C. The first column corresponded to an RtUbond for the CO<sub>2</sub> and the second column an RtMolsieve used for the detection of the O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>. The carrier gas was argon at pressure of 350 kPa and a flowrate of 31.8 ml.min<sup>-1</sup>. The detection was ensured by a thermal conductivity detector kept at 150°C.

Metabolites were quantified by diluting 5 g of digestate sample in 20 g of deionized water during 30 minutes. The mixture was then centrifuged during 20 min at 39 121 g and 4°C and filtrated at 0.2 µm with a nylon membrane using the same protocol than Cazier et al. (2015). VFAs were measured with a gas chromatograph Perkin Clarus 580 equipped with an Elite-FFAP crossbond® carbowax® 15 m column connected to a flame ionization detector at 280°C. Nitrogen was used as carrier gas under a flow rate of 6 mL.min<sup>-1</sup> (Motte et al., 2013a). Others metabolites than VFAs were quantify using high performance liquid chromatograph, e.g. lactic acid and ethanol. The chromatograph was composed of an automatic sampler (Water 717), a pre-column to filter residues (Micro guard cation H refill cartbridges, Bio-rad) and a Aminex HPX-87H column (300 mm on 7.8 mm, Bio-rad). The carrier eluent was a sulfuric acid solution at 0.005 M under a fixed flowrate of 0.4 ml.min<sup>-1</sup>.

#### 3.2.4.4 ***Data analysis***

R software (version 2.15.2) coupled with the package Rcmdr (version 1.8-4) was used for statistical analysis of the experimental data, using variance analysis (ANOVA). Non-significant p-values were fixed > 0.05 and significant p-values were fixed when < 0.05.

Total substrate degradation (TSD) was estimated theoretically from Chemical Oxygen Demand (COD) mass balance between the start-up and the end of each experiment, as described

elsewhere (Cazier et al., 2015). All calculation was expressed according to initial TS content of wheat straw, as follows:

$$\text{TSD} = \text{Final State} - \text{Initial State} = \frac{A_{\text{H}_2,f} + A_{\text{CH}_4,f} + A_{\text{met},f} + A_{\text{GC}}}{\text{g TS}} - \frac{A_{\text{H}_2,i} + A_{\text{met},i}}{\text{g TS}} \quad (\text{Equation 1})$$

where,  $A_{\text{H}_2,f}$  is the amount of  $\text{H}_2$  remaining at the end in the headspace,  $A_{\text{CH}_4,f}$  the final amount of  $\text{CH}_4$  accumulated in headspace,  $A_{\text{met},f}$  the final amount of metabolites accumulated,  $A_{\text{GC}}$  the total amount of gas ( $\text{H}_2$  and  $\text{CH}_4$ ) sampled for analyses,  $A_{\text{H}_2,i}$  the initial amount of  $\text{H}_2$  added and  $A_{\text{met},i}$  the initial amount of metabolites in the medium.

### 3.2.5 Results and discussion

#### 3.2.5.1 Impact on methanogenesis

Figure 3-11 represents the cumulated  $\text{CH}_4$  production according to the time of reactor operation in the reactors carried out at high  $P_{\text{H}_2}$  where  $\text{CO}_2$  was added after 11 and 18 days of operation, and in the control (i.e., without  $\text{H}_2$ ).

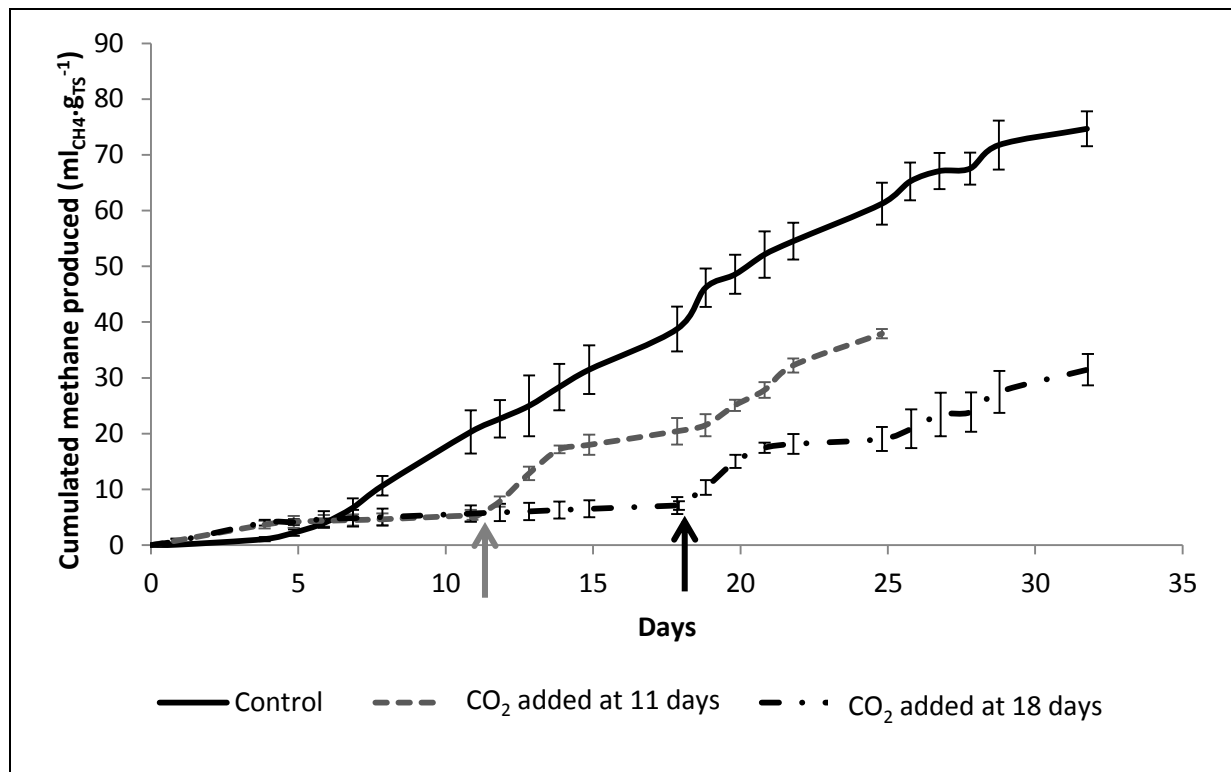


Figure 3-11: Cumulative methane production (in  $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$ ), for reactors without adding gases (Control), with  $\text{H}_2$  initially added and mixed with  $\text{CO}_2$  at 11 and 18 days.

Tests were operated at pH 8, 25% TS and at  $35^\circ\text{C}$ . The grey and black arrows show the time when  $\text{CO}_2$  was added at 11 and 18 days, respectively.

First, and before adding CO<sub>2</sub> (Table 3-5), a small production of CH<sub>4</sub> was visible just after adding H<sub>2</sub>, during 1 day, with a production rate of 0.96 ± 0.52 and 0.83 ± 0.42 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> before the CO<sub>2</sub> was added at 11 and 18 days respectively. Then, CH<sub>4</sub> production was inhibited when H<sub>2</sub> was added in reactor headspace with a production rate of 0.2 ± 0.1 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> (5 ± 1 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 11 days and 7 ± 2 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 18 days), compared to the control (only N<sub>2</sub>) with a production rate of 2.7 ± 0.32 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> (20 ± 4 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 11 days and 39 ± 4 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 18 days). The concentration of initial dissolved H<sub>2</sub> in the medium at 35°C, calculated by Henry's law was 0.58 ± 5 × 10<sup>-2</sup> mg<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>, which corresponds to an inhibitory H<sub>2</sub> concentration of the hydrolysis, as previously suggested by Cazier et al. (2015), and explain why the CH<sub>4</sub> production was inhibited under H<sub>2</sub>.

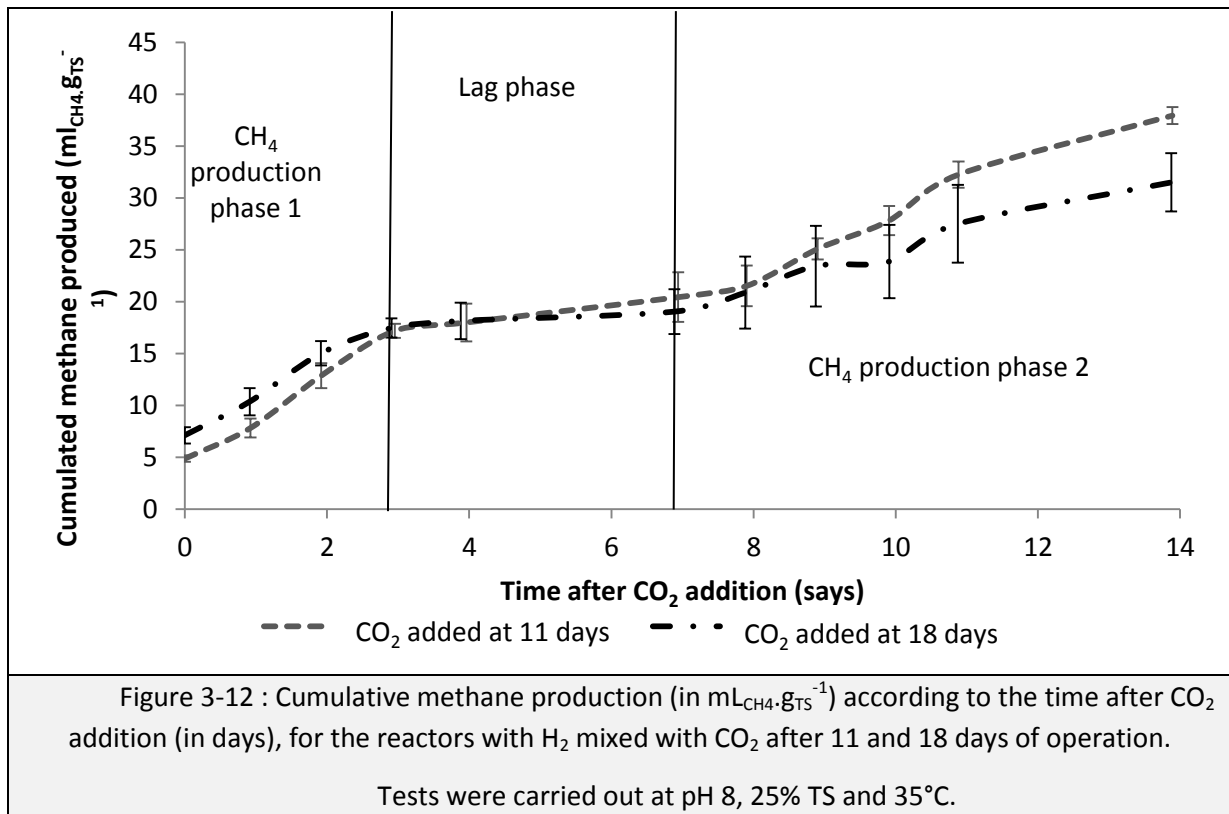
Table 3-5 : Cumulated CH<sub>4</sub> production, time and CH<sub>4</sub> production rate with standard deviations for the different phases, for the control (without gas added) and when the CO<sub>2</sub> was added at 11 and 18 days.

			Time (days)	Cumulated CH <sub>4</sub> (ml <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup> )	Average CH <sub>4</sub> production rate (ml <sub>CH<sub>4</sub></sub> ·g <sub>TS</sub> <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> )
<b>Control</b>			From 0 to 5	2 ± 0.6	0.45 ± 0.13
			From 6 to 32	72 ± 3	2.7 ± 0.32
<b>CO<sub>2</sub> added at 11 days</b>	<b>Before CO<sub>2</sub> addition</b>		From 0 to 1	0.8 ± 0.4	0.96 ± 0.52
			From 1 to 11	4 ± 0.3	0.23 ± 0.14
	<b>After CO<sub>2</sub> addition</b>	<i>CH<sub>4</sub> production phase 1</i>	From 11 to 14	12 ± 1	4.64 ± 0.75
		<i>Lag phase</i>	From 15 to 18	4 ± 2.4	0.82 ± 0.27
		<i>CH<sub>4</sub> production phase 2</i>	From 19 to 25	16 ± 1	2.74 ± 0.45
<b>CO<sub>2</sub> added at 18 days</b>	<b>Before CO<sub>2</sub> addition</b>		From 0 to 1	0.7 ± 3	0.83 ± 0.42
			From 1 to 18	6 ± 1	0.22 ± 0.09
	<b>After CO<sub>2</sub> addition</b>	<i>CH<sub>4</sub> production phase 1</i>	From 19 to 21	10 ± 2	3.55 ± 0.87
		<i>Lag phase</i>	From 22 to 26	3 ± 2.1	0.41 ± 0.27
		<i>CH<sub>4</sub> production phase 2</i>	From 27 to 32	11 ± 3	1.61 ± 0.23

When CO<sub>2</sub> was added in the headspace at 11 and 18 days, methane production increased rapidly to reach an average of 12 ± 1 and 10 ± 2 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> in 3 days (CO<sub>2</sub> added at 11 and 18 days, respectively). This first CH<sub>4</sub> production phase was named phase 1 (Figure 3-12). During phase 1, the

H<sub>2</sub> and the CO<sub>2</sub> present in the headspace were both consumed until total exhaustion of H<sub>2</sub>. Since no acetate accumulation was observed, it was concluded that H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were likely consumed by hydrogenotrophic methanogens to produce CH<sub>4</sub>. Interestingly, the rate of CH<sub>4</sub> production during this phase, i.e.  $4.64 \pm 0.75 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  and  $3.55 \pm 0.87 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  (Table 3-5) was higher than during the exponential phase of the control, estimated at  $2.7 \pm 0.3 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ .

The CH<sub>4</sub> production rate of the control was at the maximum  $5 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ , corresponding to  $4.5 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ , which is smaller than the maximum CH<sub>4</sub> production rate of wheat straw at 19% of TS and S/X of 3 ( $12 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) (Brown et al., 2012) and at 22% of TS and S/X of 2 ( $12 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) (Liew et al., 2012). This result may be due to the fact that the TS content was higher in the present experiment (25% of TS), which decreases the CH<sub>4</sub> production rate and CH<sub>4</sub> yields (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a). Moreover, the maximum rate of CH<sub>4</sub> production during the exponential phase of the control was higher than the maximum CH<sub>4</sub> yield rate for cardboard at 25% of TS content, 35°C, a substrate/inoculum ratio of 20 (on w/w basis) ( $1.8 \text{ ml}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ), which may be due to the fact that the effect of the diffusion was avoid in the present experiment (thin layer) (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Another explanation may be the substrate inoculum ratio which may have a inhibitory effect over 4 for lignocellulosic residues (Liew et al., 2012). Since, the methanogenic activity recovered immediately after adding CO<sub>2</sub>, this result suggests that hydrogenotrophic methanogens were not inhibited at high P<sub>H<sub>2</sub></sub>. Consistently, the production of CH<sub>4</sub> by hydrogenotrophic methanogens was previously shown to be favored at high P<sub>H<sub>2</sub></sub> (> 5 mbars) in anaerobic digestion (Demirel and Scherer, 2008; Schink, 1997).



After CH<sub>4</sub> production in phase 1, a lag phase of 3 days was observed with a very small production of CH<sub>4</sub> (Table 3-5). The CH<sub>4</sub> production rate during the lag phase was about  $0.82 \pm 0.26$  and  $0.41 \pm 0.27$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> when the CO<sub>2</sub> was added at 11 and 18 days respectively, which corresponded to the CH<sub>4</sub> production rate when the inhibition by H<sub>2</sub> occurred ( $0.2 \pm 0.1$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>).

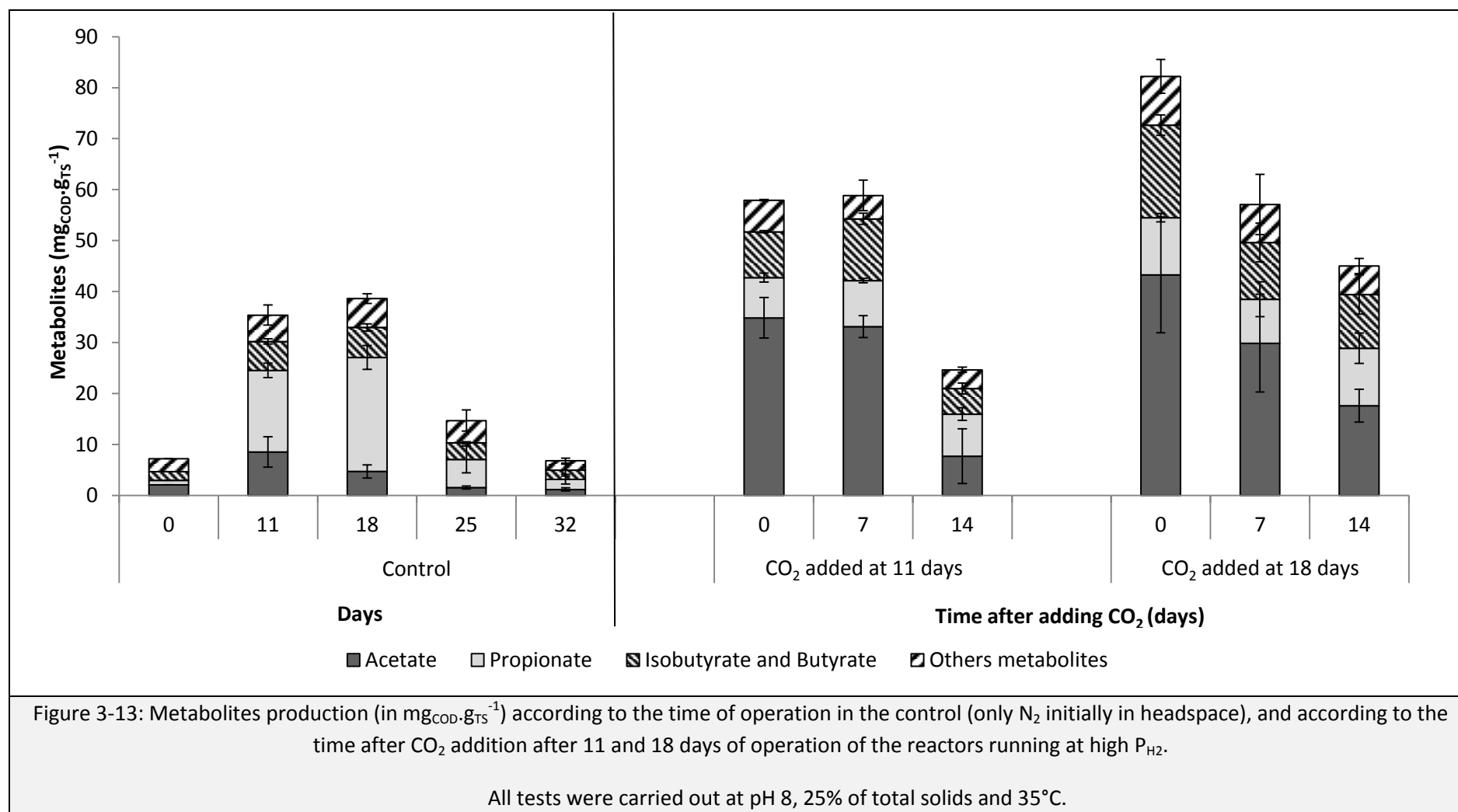
Afterwards, the methane production increased up to obtain a cumulated methane production of  $16 \pm 1$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> and  $11 \pm 3$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> in 6 days, when CO<sub>2</sub> was added at 11 days and at 18 days, respectively. This second production phase was denominated phase 2 (Figure 3-12). In phase 2, methane production rate decreased by half when compared to CH<sub>4</sub> production rate in phase 1 (Table 3-5), with  $2.74 \pm 0.45$  and  $1.61 \pm 0.23$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> when the CO<sub>2</sub> was added at 11 and 18 days respectively during phase 2. Since the rate of CH<sub>4</sub> production was higher in phase 2 than before CO<sub>2</sub> addition (Table 3-5), the CH<sub>4</sub> production was not inhibited, thus confirming the role of H<sub>2</sub> accumulation in methanogenesis inhibition. Since the CH<sub>4</sub> production rate were substantially different during for the first and second phase of production and that a lag phase was present between both, all these observations suggest that the CH<sub>4</sub> production was likely due to two different metabolic pathways. Therefore, the CH<sub>4</sub> production phase 1 seems to be mostly due to hydrogenotrophic methanogens and the CH<sub>4</sub> production phase 2 may be due to the degradation of acetate by acetoclastic methanogens or through an oxidative pathway of acetate (Demirel and Scherer, 2008).

Interestingly, the CH<sub>4</sub> production in phase 2 was faster when the CO<sub>2</sub> was added after 11 days ( $2.74 \pm 0.45$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) than 18 days ( $1.61 \pm 0.23$  ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>). This difference may be the result of a remaining inhibitory effect of H<sub>2</sub> on the microorganisms producing CH<sub>4</sub> during phase 2.

### 3.2.5.2 ***Impact of P<sub>H<sub>2</sub></sub> on metabolites production***

Figure 3-13 presents the accumulation of metabolic by-products, excluding methane, in the control and in the reactors carried out at high P<sub>H<sub>2</sub></sub> where CO<sub>2</sub> was added after 11 and 18 days of operation. In the control, the metabolites accumulated transitorily between 11 and 18 days of operation ( $43 \pm 6$  mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>) and then decreased to  $9 \pm 3$  mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 32 days confirming the high methanogenic activity in the reactor.

The amount of metabolites was higher in the reactors when H<sub>2</sub> was initially added compared to the control. The concentrations of metabolites reached  $30 \pm 8$  mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 11 day (i.e., between day 0 when CO<sub>2</sub> is added at 11 days in Figure 3-13) and  $56 \pm 13$  mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> (i.e., between day 0 when CO<sub>2</sub> is added at 18 days in Figure 3-13). A high concentration of metabolites may be the cause of the methanogenesis inhibition. Indeed, the concentration of total metabolites under H<sub>2</sub> was  $20 \pm 2$  g·L<sup>-1</sup> before adding CO<sub>2</sub> on day 11, and  $28 \pm 6$  g·L<sup>-1</sup> before adding CO<sub>2</sub> on day 18, which is over the limit of 20 g·L<sup>-1</sup> reported in anaerobic digestion by Siegert and Banks (2005), using glucose as a substrate. The high concentration of metabolites might have contributed partially but not totally to the strong inhibition of the methanogenesis under high P<sub>H<sub>2</sub></sub>, prior CO<sub>2</sub> addition.



The increase of the total amount of metabolites under high  $P_{H_2}$  was mostly due to an increase of the acetate content, and at a lower extent butyrate and isobutyrate. Indeed, the concentration of acetate increased from  $2 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  at the start of the experiment to  $35 \pm 4 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  at day 11 and  $43 \pm 11 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  at day 18, just before adding  $\text{CO}_2$ . The concentration of butyrate and isobutyrate increased from  $2 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  at the start of the experiment to  $9 \pm 0.2 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  at day 11 and  $18 \pm 4 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  at day 18, just before adding  $\text{CO}_2$ . Such increase of acetate and butyrate concentrations under an atmosphere of  $\text{H}_2$  was previously observed during the conversion of carbohydrates-rich waste with an increase by 51% of butyrate and 31% of acetate production when operated under a  $P_{H_2}$  of 2 bars than with only  $\text{N}_2$  (Arslan et al., 2012).

During the  $\text{CH}_4$  production phase 2, the decrease of the total metabolites concentration was mostly due to a decrease of the acetate concentration, which is consistent with a recovery of the methanogenic activity. The acetate decreased from  $33 \pm 2.4 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  and  $30 \pm 10 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  after 7 days to  $8 \pm 6 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  and  $18 \pm 4 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$  after 14 days since  $\text{CO}_2$  was added at day 11 and day 18, respectively. The decrease of acetate concentration may be due to conversion of acetate into  $\text{CH}_4$  by acetoclastic methanogens (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991a) or to the oxidation of acetate into  $\text{H}_2$  by acetate-oxidizing bacteria and then converting  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$  into  $\text{CH}_4$  by hydrogenotrophic methanogens (Karakashev et al., 2006). In addition, the difference between the acetate concentration at 0 and 14 days, when the  $\text{CO}_2$  was added at 11 and 18 days was statistically significant (ANOVA, p-value <0.05), confirming the role of the acetate degradation in  $\text{CH}_4$  production.

Interestingly, the degradation of acetate during phase 2 (day 7 to 14) was slower when the  $\text{CO}_2$  was added at day 18 than at day 11. This result may be due to a remaining inhibitory effect of  $\text{H}_2$  on the microorganisms degrading acetate. Indeed,  $\text{H}_2$  is known to have an inhibitory effect on the growth of *Methanosarcina* at 200 mbars of  $\text{H}_2$  and on acetate metabolism at 2.5 mbars of  $\text{H}_2$  (Ahring et al., 1991). Moreover, this result would explain why mostly hydrogenotrophic methanogens may be active for the  $\text{CH}_4$  production in phase 1 with a lower acetoclastic methanogenic activity in phase 2 for longer exposition on  $\text{H}_2$ .

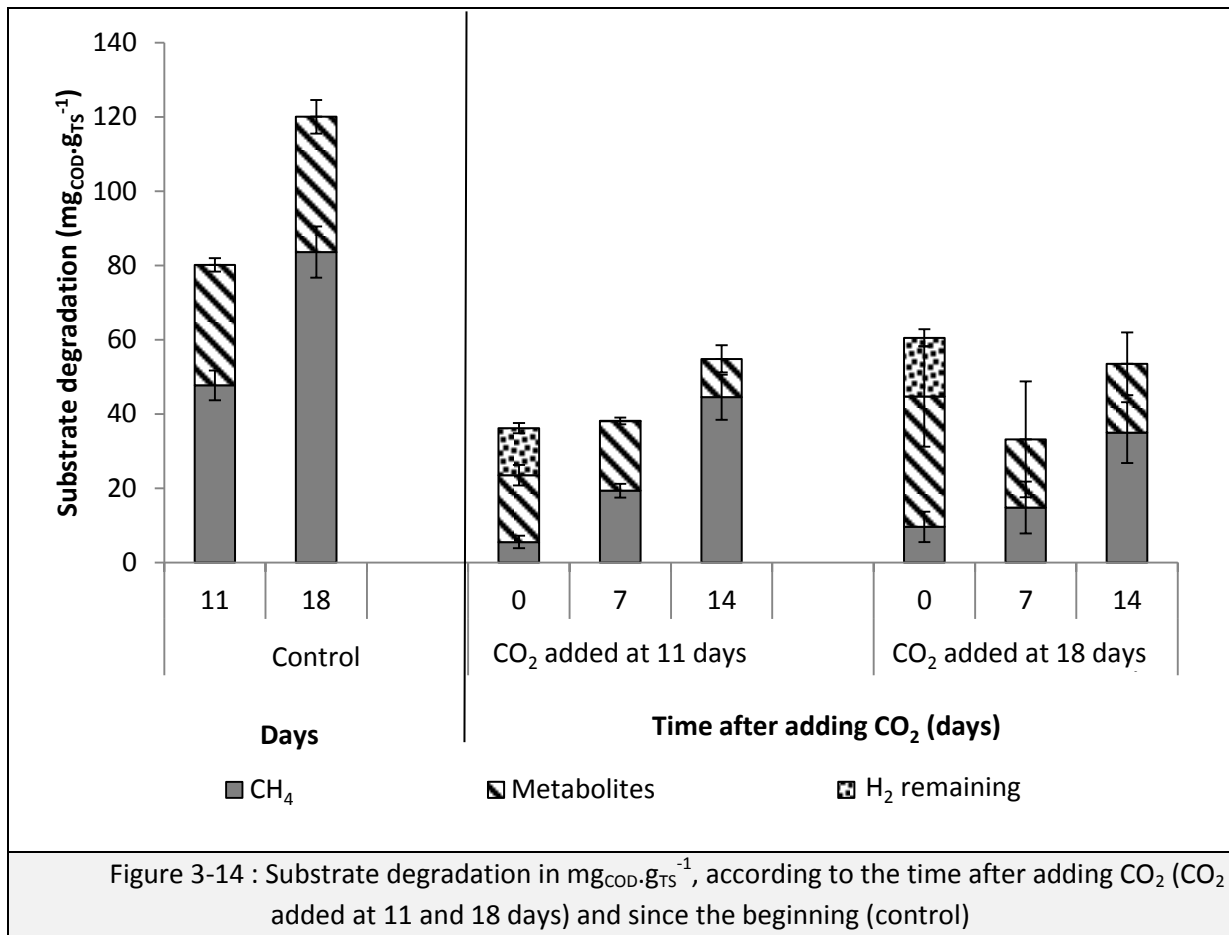
Another explanation of the differences in acetate degradation between day 7 and 14, for the different time where  $\text{CO}_2$  was added, may be a remaining inhibitory effect of  $\text{H}_2$  on acetate-oxidizing bacteria. No many information are known about acetate-oxidizing bacteria, except for *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm et al., 2010) or *Clostridium ultunense* (Schnurer et al., 1996), which seems to be mostly active when acetoclastic methanogens are inhibited or absent (Rivera-Salvador et al., 2014; Westerholm et al., 2011). Syntrophic acetate oxidation does not occur when the  $P_{H_2}$  is too high (over 0.72 mbars) (Hao et al., 2011; Rivera-Salvador et al., 2014), since the reaction is thermodynamically unfavorable ( $\Delta G^{\circ} = +104,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) (De Vrieze et al., 2012). That may explain why acetate oxidation may have been inhibited under a  $P_{H_2}$  of 996 mbars. Therefore, a longer exposition on high  $P_{H_2}$  might have an effect on the presence of this kind of bacteria too, explaining the slower methanogenic activity after 18 days of inhibition by  $\text{H}_2$ .

### 3.2.5.3 **Impact on the overall substrate degradation**

The total substrate degradation (expressed in  $\text{mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$ ) corresponds to the overall conversion yield of the substrate in methane and metabolites, taking into consideration the amount



of H<sub>2</sub> initially added. The total substrate degradation is shown in Figure 3-14 for the three different operating conditions. First, 14 days after CO<sub>2</sub> addition, the substrate degradation was the same when CO<sub>2</sub> was added at day 11 (55 ± 9 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>) and 18 (54 ± 17 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup>). This result suggests that the remaining inhibitory effect visible on acetate degradation and methane production when comparing both CO<sub>2</sub> adding time was not due to a remaining inhibitory effect on the hydrolytic activity. Nevertheless, the final total substrate degradation was lower when CO<sub>2</sub> was added at day 11 and 18 than the substrate degradation of the control for the same duration of reaction (80 ± 5 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at day 11). This was likely due to a remaining inhibitory effect of H<sub>2</sub>.



However, the dynamics of substrate degradation were different when CO<sub>2</sub> was added at day 11 or day 18. Indeed, when the CO<sub>2</sub> was added at day 11, the substrate degradation did not change between 0 and 7 days (36 ± 4 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 0 days and 38 ± 1 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 7 days), which corresponded to the CH<sub>4</sub> production phase 1 and the lag phase. However, the substrate degradation increased to 55 ± 9 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 14 days, which showed the reversibility of hydrolysis inhibition

When the CO<sub>2</sub> was added at day 18, the substrate degradation decreased from 0 to 7 days after adding CO<sub>2</sub> (from 61 ± 19 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 0 day to 33 ± 23 mg<sub>COD</sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 7 days after adding CO<sub>2</sub>). However, this difference in the substrate degradation at 0 to 7 days was not significant, with a p-value of 0.7903 by ANOVA (p-value > 0.05). Therefore, this high difference of the substrate degradation may be due to the fact that sacrificed flasks were used to calculate the substrate degradation. The substrate degradation increased from 7 to 14 days when the CO<sub>2</sub> was added at 18

days (increase of  $20 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$ ), which seems to be due to the increase of the production of  $\text{CH}_4$  during the  $\text{CH}_4$  production phase 2. Therefore, the  $\text{CH}_4$  produced during phase 2 was higher than the degraded VFAs, especially visible at 11 days and the increase of the substrate degradation between 7 and 14 days seems to be due to the new start of the hydrolysis after the inhibition.

In conclusion, the reversibility of  $\text{H}_2$  inhibition was clearly shown both when  $\text{CO}_2$  was added at day 11 and 18. Nevertheless, a remaining inhibitory effect was also observed when compared to the control. Another remaining inhibitory effect was also visible when comparing when  $\text{CO}_2$  was added at day 11 and 18, since the increase of the substrate degradation between 0 and 14 days was higher when  $\text{CO}_2$  was added at day 11 than when  $\text{CO}_2$  was added at day 18.

The mechanisms of hydrolysis is not well-know, however two of them are proposed in the most admitted AD model (ADM1): (1) the enzymes are secreted directly into the liquid phase of the digestate by hydrolytic microorganisms and have a direct effect on the substrate or (2) the microorganisms attach themselves on the substrate and produce enzymes (Batstone et al., 2002). Cazier et al. (2015) supposed that  $\text{H}_2$  may be a strong inhibitor of the hydrolytic activity of microorganisms by acting either on production or secretion of extracellular enzymes, or on attachment and physiological cellular activity. Since  $\text{H}_2$  was still available to be consumed directly with  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  could act as strong inhibitor of the hydrolytic activity of microorganisms without entering inside the cell, either on the secretion of extracellular enzyme or on attachment of the microorganisms on the substrate.

These experiments were carried out in thin layer to reduce gas transfer limitation and investigate local effect of gas partial pressure. In an ss-AD reactor, the effect of gas transfer must be considered. Since diffusion coefficients decrease when TS contents increase (Bollon et al., 2013), dissolved gas diffusion and gas-liquid transfer may become a limiting factor (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b), with an possible local accumulation of  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$  in the medium. With a substrate rich in carbohydrate and a high TS content, the hydrolysis and acidogenesis will be fast, with a high production of VFAs,  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$ , leading to a local accumulation of  $\text{H}_2$  since  $\text{CO}_2$  could be dissolved in carbonates at high pH. If the  $P_{\text{H}_2}$  is high enough, hydrolysis may therefore be inhibited, especially if the local  $P_{\text{CO}_2}$  is low. Therefore, the addition of  $\text{CO}_2$  in ss-AD digester may improve the performance by decreasing the local  $P_{\text{H}_2}$  and by mixing the medium to avoid local accumulation of dissolved molecules. In addition,  $\text{CO}_2$  can be removed to improve the quantity of  $\text{CH}_4$  in the biogas, by absorption of  $\text{CO}_2$  into a liquid or by membrane separation (Deublein and Steinhauser, 2008; Makaruk et al., 2010). Therefore,  $\text{CO}_2$  is available for further use in ss-AD. In counterpart, adding  $\text{CO}_2$  may have an inhibitory effect on the performances of ss-AD if the medium is not buffered enough since  $\text{CO}_2$  could decrease the pH (Brouckaert et al., 2011; Ward et al., 2008). Indeed, a pH lower than 6 has a strong inhibitory effect on methanogens (Chandra et al., 2012; Dague, 1968; Meena Krishania et al., 2013).

### **3.2.6 Conclusion**

Hydrolysis inhibition by  $\text{H}_2$  was reversible after  $\text{CO}_2$  addition whatever the time of exposition to  $\text{H}_2$ . However, the performance of anaerobic digestion after reversibility depends on the time spent under inhibition, due to a residual effect on acetate degradation into  $\text{CH}_4$ . The injection of  $\text{CO}_2$  may

therefore represent a solution to improve the performances of solid-state anaerobic digestion, especially in case of high TS content where local accumulation of H<sub>2</sub> could occur.

### **Acknowledgements**

We thank Gaëlle Gevaudan for the technical assistance with the microbial analysis of the experiments.

This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and the French Institute for Agricultural and Food Research (INRA), by funding EA Cazier's PhD.

### **3.2.7 Résultats majeurs**

Dans ce chapitre, il a été confirmé que l'activité d'hydrolyse lors de la digestion anaérobie par voie sèche était inhibée pour une pression partielle en H<sub>2</sub> de 996 mbars. Il a été montré que cette inhibition était réversible par l'ajout de CO<sub>2</sub>. Néanmoins, un effet rémanent de la période d'inhibition a été observé sur la production de CH<sub>4</sub> et la dégradation de l'acétate après la levée de l'inhibition. En effet, après ajout de CO<sub>2</sub>, deux phases de production de CH<sub>4</sub> ont été observées, présentant des vitesses différentes avec une phase de latence entre les deux. La première phase de production de CH<sub>4</sub> après l'ajout de CO<sub>2</sub> correspond à la consommation directe d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> par des méthanogènes hydrogénotrophes, avec des vitesses de production similaire à la phase exponentielle du témoin (sans H<sub>2</sub>). Par comparaison, la deuxième phase de production de CH<sub>4</sub> est plus lente et serait probablement due à la consommation de l'acétate par des méthanogènes acétoclastes pour produire du CH<sub>4</sub>, ou par des bactéries oxydant l'acétate pour produire de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> puis consommation de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> par les méthanogènes hydrogénotrophes pour produire du CH<sub>4</sub>. De plus, la deuxième phase de production de CH<sub>4</sub> a été plus lente lorsque le CO<sub>2</sub> a été ajouté à 18 jours qu'à 11 jours, ce qui indiquerait un effet inhibiteur rémanent de l'H<sub>2</sub> sur la dégradation de l'acétate en CH<sub>4</sub>. Ainsi, l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> est réversible suite à l'ajout de CO<sub>2</sub>, mais pas totalement, avec des effets inhibiteurs rémanents significatifs sur les performances de la digestion anaérobie (hydrolyse et méthanisation).

---

### **3.3 L'EFFET DU DIOXYDE DE CARBONE SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE A L'ECHELLE MICROSCOPIQUE**

---

#### **3.3.1 Avant-propos**

Au cours des chapitres précédents, il a été montré que l'accumulation d'H<sub>2</sub> pouvait inhiber fortement l'hydrolyse (Cazier et al., 2015). Il a également été montré que cette inhibition était réversible suite à l'ajout de CO<sub>2</sub>, même si des effets inhibiteurs rémanents restaient observables sur les performances de la digestion anaérobie (vitesse de méthanisation, hydrolyse). Si l'accumulation locale de H<sub>2</sub> est responsable de l'inhibition globale de la digestion anaérobie par voie sèche pour une teneur en MS élevée (Abbassi-Guendouz et al., 2012), cela implique une faible disponibilité locale du CO<sub>2</sub>. Toutefois, il ne peut être exclu que l'accumulation de CO<sub>2</sub> seul peut posséder également un effet sur la digestion anaérobie par voie sèche, pour une teneur en MS élevée.

L'objectif de cette étude est ainsi d'étudier l'effet d'une surconcentration en dioxyde de carbone seul sur la digestion anaérobie par voie sèche. Puisque les transferts de matière peuvent être limitants lors de la digestion anaérobie par voie sèche, les expériences suivantes ont été réalisées avec une épaisseur de substrat de moins d'un cm, afin de limiter les effets de la diffusion. Le milieu a été tamponné à pH 8 afin d'éviter la diminution du pH avec l'ajout de CO<sub>2</sub> et tester directement les effets du CO<sub>2</sub> (Brouckaert et al., 2011; Ward et al., 2008).

#### **3.3.2 Introduction**

Lors de la digestion anaérobie, le CO<sub>2</sub> est produit principalement durant l'étape d'acétogénèse par des bactéries acétogènes qui utilisent des AGVs, de l'alcool et des acides gras pour produire de l'H<sub>2</sub>, du CO<sub>2</sub> et de l'acétate (Amani et al., 2010). Le CO<sub>2</sub> est aussi consommé durant l'homoacétogénèse, par des bactéries qui utilisent l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> pour produire de l'acétate et par les méthanogènes hydrogénotrophes qui utilisent le CO<sub>2</sub> et le H<sub>2</sub> pour produire du CH<sub>4</sub> (Amani et al., 2010).

Le CO<sub>2</sub> peut avoir un effet sur le pH du milieu quand il est ajouté lors la digestion anaérobie. En effet, en ajoutant du CO<sub>2</sub>, le pH peut diminuer selon l'équilibre calco-carbonique, puisque le CO<sub>2</sub> est dissous dans l'eau en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et H<sup>+</sup> (pKa (CO<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>O/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) =6,37 à 25°C) (Brouckaert et al., 2011). De plus, le CO<sub>2</sub> peut avoir un effet inhibiteur sur la production d'acétate et de propionate pour 1 à 2 bar de CO<sub>2</sub> à pH 4,5 et 7 (Arslan et al., 2012; Hansson and Molin, 1981) et sur la dégradation de l'acétate et du propionate à pH 7 pour 1 bar de CO<sub>2</sub> (Hansson and Molin, 1981). Il a également été montré que le CO<sub>2</sub> pouvait avoir un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques et acétogènes à pH 5 pour 300 ml<sub>CO2</sub>.min<sup>-1</sup> en continu (Kim et al., 2006), sur la production d'H<sub>2</sub> à pH 5,3 en ajoutant 500 ml<sub>CO2</sub>.min<sup>-1</sup> en continu à pH 5,3 (Bru et al., 2012) et sur les méthanogènes acétoclastes à pH 7 pour 1 bar de CO<sub>2</sub> (Hansson and Molin, 1981). L'effet du CO<sub>2</sub> est toutefois mal déterminé car il est aussi connu pour avoir un effet positif sur la production d'H<sub>2</sub> par fermentation en ajoutant 30 ml<sub>CO2</sub>.min<sup>-1</sup> à pH 5,5 (Bru et al., 2012) et en ajoutant 300 ml<sub>CO2</sub>.min<sup>-1</sup> à pH 5,3 (Kim et al., 2006). Il semblerait que l'ajout de CO<sub>2</sub>

puisse donc avoir des effets positifs sur la digestion anaérobie lorsqu'il est ajouté en petite quantité et négatif lorsqu'il est ajouté en des quantités importantes.

L'objectif de cette étude était de tester les effets directs du CO<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche. Pour cela, des expériences utilisant le même protocole que pour l'étude de l'effet inhibiteur de l'hydrogène ont été réalisées (Cazier et al., 2015), en ajoutant initialement du CO<sub>2</sub> dans le ciel gazeux au lieu de l'H<sub>2</sub>. L'impact direct de l'ajout de CO<sub>2</sub> a été testé en faisant varier la P<sub>CO2</sub> partielle initiale de 0 ; 737 ± 45 et 1 120 ± 71 mbars pour une pression totale de 1 500 mbars. Les conditions expérimentales sont identiques à celles détaillées précédemment dans 2.2.1 *Echelle microscopique: tests en couche mince*. Pour éviter l'acidification du milieu et pour évaluer les effets directs de l'ajout de CO<sub>2</sub>, le pH du milieu a été tamponné à 8 en utilisant du bicarbonate de sodium. Pour rappel, la teneur en MS du mélange (paille, inoculum, tampon, oligoéléments) était de 25 % avec un ratio substrat/inoculum de 3. Une première fermentation en réacteur de 3 L a été réalisée à 35°C pendant 10 jours environ afin d'homogénéiser le milieu réactionnel. Une faible épaisseur (moins de 1 cm) a ensuite été disposée dans des fioles pendant 13 jours à 35°C, avec suivi de la production de gaz. En fin de réaction, une analyse des métabolites a été réalisée.

### 3.3.3 Résultats et discussions

La Table 3-6 représente la production cumulée de CH<sub>4</sub> après 13 jours d'expérimentation, le CO<sub>2</sub> restant dans le ciel gazeux et la production finale en AGVs en fonction de la P<sub>CO2</sub> initiale.

Table 3-6 : Production de CH<sub>4</sub> et AGVs (en ml<sub>CH4</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> and g<sub>DCO</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> respectivement), CO<sub>2</sub> restant (en ml<sub>CO2</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) et dégradation du substrat(en g<sub>DCO</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) à 13 jours selon la pression partielle initiale de CO<sub>2</sub> (en mbars).  
Les tests ont été réalisés à 25% de MS, 35°C et pH 8.

P <sub>CO2</sub> (mbars)	Production finale cumulée de CH <sub>4</sub> (ml <sub>CH4</sub> ·g <sub>MS</sub> <sup>-1</sup> )	Concentration finale en AGVs (g <sub>DCO</sub> ·g <sub>MS</sub> <sup>-1</sup> )	Dégradation du substrat (g <sub>DCO</sub> ·g <sub>MS</sub> <sup>-1</sup> )
0	36 ± 18	0,35 ± 0,18	0,22 ± 0,18
737	59 ± 10	0,25 ± 0,25	0,20 ± 0,13
1 120	63 ± 17	0,21 ± 0,16	0,15 ± 0,13

La production de CH<sub>4</sub> au bout de 13 jours a été significativement plus importante pour un ajout de 737 mbars de CO<sub>2</sub> (59 ± 10 ml<sub>CH4</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) et de 1 120 mbars de CO<sub>2</sub> (63 ± 17 ml<sub>CH4</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) que dans le témoin (avec N<sub>2</sub>) (36 ± 18 ml<sub>CH4</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>). Cette différence dans la production de CH<sub>4</sub> avec 737 mbars et 1 120 mbars de CO<sub>2</sub> ajoutés a été validée statistiquement avec une ANOVA avec des p-values < 0,05 (p-value de 0,0487 et 0,0462 respectivement). De la même manière, aucune augmentation significative de la production de CH<sub>4</sub> n'a été observée entre 737 et 1 120 mbars de CO<sub>2</sub>, confirmé statistiquement par ANOVA (p-value de 0,9993 > 0,05). En conclusion, une amélioration de la production de CH<sub>4</sub> a été observée suite à l'ajout de CO<sub>2</sub>, mais seulement par rapport au témoin.

Par ailleurs, aucun effet de la  $P_{CO_2}$  sur la production d'AGVs n'a été observé puisque la concentration totale en AGVs à 13 jours était à la même à 737 et 1 120 mbars de  $CO_2$  et dans le témoin (i.e.,  $0,27 \pm 0,25 \text{ g}_{DCO} \cdot \text{g}_{MS}^{-1}$ ). Un test ANOVA a confirmé la similarité entre les trois conditions ( $p$ -value > 0,05).

D'une manière globale, la dégradation totale du substrat n'a pas varié avec l'augmentation de la  $P_{CO_2}$  (de  $0,22 \pm 0,18 \text{ g}_{DCO} \cdot \text{g}_{MS}^{-1}$  sans  $CO_2$  à  $0,15 \pm 0,13 \text{ g}_{DCO} \cdot \text{g}_{MS}^{-1}$  pour 1 120 mbars de  $CO_2$ ), malgré l'augmentation de la production de  $CH_4$ . La  $P_{CO_2}$  n'aurait donc pas eu d'effet direct sur l'étape d'hydrolyse, ce qui est différent des travaux d'Hansson and Molin, (1981) qui ont montré que le pourcentage de dégradation du glucose en acides, en  $CO_2$  et en  $H_2$  (en 20 h) était 30% plus grand pour une  $P_{CO_2}$  faible que pour 1 bar de  $CO_2$  en digestion anaérobie par voie humide à pH 7. Toutefois, la dégradation de la paille est plus complexe car elle correspond non seulement à la dégradation de la cellulose, mais aussi des hémicelluloses qui présentent des structures complexes et une cinétique plus lente de dégradation (Monlau et al., 2012).

Le fait que la dégradation du substrat n'augmente pas avec l'ajout de  $CO_2$  alors qu'une amélioration de la production de  $CH_4$  est visible pourrait être expliqué par une accélération de la production d'acétate consommée ensuite pour produire du  $CH_4$ . Ainsi, les réactions d'acétogénèse produisent de l'acétate et de l' $H_2$  à partir d'autres AGVs et sont souvent thermodynamiquement défavorables (cf. 1.2.1.3 Acétogénèse). Or, la consommation de l' $H_2$  produit lors de ces réactions avec du  $CO_2$  ajouté pour produire du  $CH_4$  par les méthanogènes hydrogénotrophes (Weiland, 2010), permettrait d'améliorer l'acétogénèse et de l'accélérer. De plus, l'acétate produit serait consommé par les méthanogènes acétotrophes pour produire de  $CH_4$ , ce qui expliquerait la diminution de la quantité d'AGVs produits lors de l'ajout de  $CO_2$ . Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi l'augmentation de la production de  $CH_4$  est la même quelle que soit la quantité de  $CO_2$  ajouté dans le milieu, puisque l'amélioration de la production ne dépend que de la quantité d' $H_2$  dissous. Ainsi, le  $CO_2$  pourrait donc être un facteur limitant de la méthanogénèse durant la digestion anaérobie par voie sèche, avec une répercussion sur l'acétogénèse. Cependant, la quantité de  $CH_4$  produit lors de l'ajout de  $CO_2$  est plus importante que la quantité d'AGVs manquante par rapport au témoin. Cette différence pourrait être expliquée par la présence d' $H_2$  résiduel dissous dans le milieu, consommé avec le  $CO_2$  ajouté pour produire du  $CH_4$ .

Nos résultats semblent indiquer que l'hydrolyse n'est pas limitée dans ces conditions expérimentales. En effet, cette non-limitation de l'hydrolyse est due au fait que la teneur en MS utilisée pour nos expériences (25%) est plus faible que les teneurs inhibitrices pour la digestion anaérobie par voie sèche (28-30%) (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a, 2013b). Ainsi, même si la diffusion et le transfert gaz-liquide sont faibles (accumulation locale faible d' $H_2$  dans le milieu), les cinétiques seraient suffisamment importantes pour éviter une accumulation locale d' $H_2$  suffisante pour inhiber l'hydrolyse.

Puisque le pH a été tamponné à 8 lors de nos expériences, l'effet de l'ajout de  $CO_2$  a été testé en priorité (pas de baisse du pH par  $HCO_3^-$ ), ce qui est différent des données de la littérature. En effet, il a été largement démontré qu'une  $P_{CO_2}$  importante pouvait avoir un effet sur la digestion anaérobie en diminuant le pH par un équilibre calco-carbonique avec le  $CO_2$  dissous en  $HCO_3^-$  et  $H^+$  (Brouckaert et al., 2011). Une  $P_{CO_2}$  élevée a un effet différent en digestion anaérobie humide puisque un effet inhibiteur a été observé sur les méthanogènes acétoclastes pour 1 bar de  $CO_2$  à pH 7 (Hansson and

Molin, 1981). La différence avec nos résultats pourrait être expliquée par le milieu tamponné qui limite la concentration en ions carbonates et la baisse du pH.

### 3.3.4 Conclusion

Pour conclure, l'ajout de CO<sub>2</sub> dans le ciel gazeux a un effet positif sur la production de CH<sub>4</sub> mais pas sur la production d'AGVs ou la dégradation de substrat. Cet effet semble plutôt dû à une accélération de la méthanisation par consommation d'un H<sub>2</sub> dissous préalablement présent dans le milieu (issu de la pré-culture) plutôt que d'une amélioration de l'hydrolyse. Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur rapporté dans la littérature de l'ajout de CO<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie serait le plus souvent dû à une diminution du pH par l'équilibre calco-carbonique et non un direct effet du CO<sub>2</sub> (Chen et al., 2008; Veeken et al., 2000). L'amélioration de la production de CH<sub>4</sub> par l'ajout de CO<sub>2</sub> semble confirmer que le CO<sub>2</sub> soit l'élément limitant par rapport à la production d'H<sub>2</sub> en digestion anaérobie par voie sèche.

---

### **3.4 DISCUSSION DU CHAPITRE 3**

---

En digestion anaérobie par voie sèche, le transfert gaz-liquide des gaz dissous peut être un processus limitant (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b), ce qui peut provoquer des accumulations locales de gaz ( $H_2$  et  $CO_2$ ) au sein du milieu réactionnel. Ainsi, l'objectif principal des expériences décrites dans ce chapitre était d'étudier l'effet d'une suraccumulation de gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé, à l'échelle microscopique. Pour cela, les expériences ont été réalisées avec une épaisseur de milieu de moins d'un cm afin de limiter les effets de la diffusion.

Tout d'abord, une première série d'expériences a testé les effets directs de l' $H_2$  sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé, à 35°C, 25% de MS et pH 8. Ces expériences ont démontré que pour une  $P_{H_2}$  supérieure à 780 mbars, la production de  $CH_4$  et de  $CO_2$  diminuaient significativement, sans accumulation de métabolites dans le milieu. Il a ainsi été montré qu'une  $P_{H_2}$  importante pouvait avoir un effet inhibiteur sur l'étape d'hydrolyse. Cette inhibition de l'hydrolyse n'a pas eu lieu lorsque le  $CO_2$  a été ajouté en même temps que l' $H_2$  dans le ciel gazeux. Ainsi, une deuxième série d'expériences a testé la combinaison des effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  et surtout la réversibilité de l'inhibition de l'hydrolyse par l'ajout du  $CO_2$ . Ainsi, il a été montré que l'ajout de  $CO_2$  dans un réacteur inhibé par l' $H_2$  levait l'inhibition de l'hydrolyse mais un effet était toujours visible sur les performances de la digestion anaérobie après la levée de cette inhibition (hydrolyse et dégradation de l'acétate). Enfin, l'effet direct du  $CO_2$  sur la digestion anaérobie par voie sèche a été testé, avec une amélioration de la production de  $CH_4$  par l'ajout de  $CO_2$ , sans amélioration de la dégradation du substrat. Cette amélioration de la méthanisation est sans doute due à la présence d' $H_2$  dissous dans le milieu et à une accélération de la dégradation de l' $H_2$ . L'ensemble de ces résultats est résumé dans la Figure 3-15.



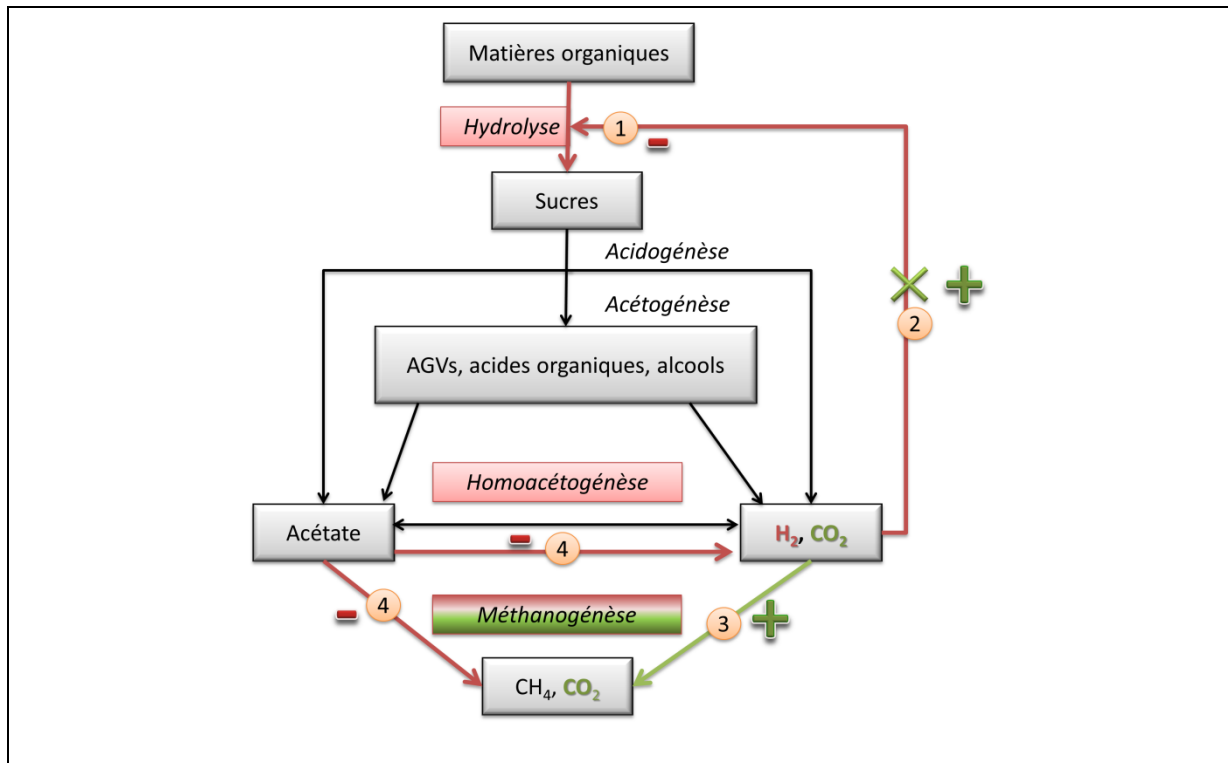


Figure 3-15: Schéma de synthèse du Chapitre 3: Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique.

Avec 1 : inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub>; 2 : réversibilité de l'inhibition de l'hydrolyse par ajout de CO<sub>2</sub>; 3 : amélioration de la production de CH<sub>4</sub> par ajout de CO<sub>2</sub>; 4 : effet inhibiteur rémanent sur la dégradation de l'acétate. En rouge : les effets de l'hydrogène, en vert : les effets du dioxyde de carbone.

### 3.4.1 Hydrolyse enzymatique de la paille de blé

Au regard des informations trouvées dans la littérature, il est difficile de déterminer exactement comment une P<sub>H<sub>2</sub></sub> importante peut inhiber l'hydrolyse. En effet, les mécanismes d'hydrolyse sont incertains en milieu complexe et l'inhibition de l'hydrolyse par H<sub>2</sub> n'avait pas été montrée jusqu'à présent. Le plus souvent, il est suggéré que les mécanismes d'hydrolyse utiliseraient des enzymes extracellulaires. Deux sortes d'enzymes extracellulaires existent :

- **Les enzymes libres** dans le milieu.
- **Les enzymes liées aux microorganismes** dénommées systèmes enzymatiques complexes (Banerjee et al., 2010). Ces systèmes enzymatiques complexes correspondent à des complexes enzymatiques qui peuvent s'associer avec la surface des microorganismes et régulent l'attachement des microorganismes avec les substrats insolubles, ainsi que la dégradation en substrat soluble et son absorption dans les microorganismes.

Les mécanismes possibles de l'hydrolyse sont détaillés dans la Table 3-7. En ce qui concerne **l'hydrolyse**, elle peut être **simple**, c'est-à-dire avec un effet direct sur le substrat **ou double**, avec deux hydrolyses différentes.

Table 3-7 : Hypothèses de fonctionnement de l'hydrolyse pour la digestion anaérobie, d'après <sup>(1)</sup>Batstone et al.,(2002); <sup>(2)</sup>Gianfreda and Rao,(2004); <sup>(3)</sup>Malherbe and Cloete, (2002); <sup>(4)</sup>Subramaniyan and Prema, (2002); <sup>(5)</sup>Zhang and Lynd, (2004),

	Enzymes libres	Enzymes liées aux microorganismes
Hydrolyse simple	Sécrétion des enzymes dans la phase liquide. Effet direct sur le substrat <sup>(1)</sup> .	Attachement des microorganismes au substrat. Effet direct sur le substrat <sup>(1)(3)</sup> .
Double hydrolyse	Sécrétion des enzymes dans la phase liquide.  Hydrolyse primaire des polymères en monomères intermédiaires solubles.  Absorption par les microorganismes des monomères intermédiaires.  Hydrolyse secondaire par des enzymes intracellulaires <sup>(2)(4)</sup> .	Attachement des microorganismes au substrat par sécrétion de glycocalyx.  Hydrolyse primaire lente dans le milieu.  Largage des intermédiaires solubles dans le milieu.  Hydrolyse secondaire rapide dans la phase liquide des intermédiaires solubles dans le milieu <sup>(5)</sup> .

Ainsi, dans le cas où **les enzymes sont libres**, une première hydrolyse a lieu dans la phase liquide, en hydrolysant les polymères en monomères par les enzymes présentes dans la phase liquide puis les monomères sont absorbés par les microorganismes, avant de subir une 2<sup>ème</sup> hydrolyse par des enzymes intracellulaires. Ce mécanisme a donc besoin de deux types d'enzymes, extra et intracellulaires pour fonctionner (Gianfreda and Rao, 2004; Subramaniyan and Prema, 2002).

Dans le cas des **enzymes liées aux microorganismes**, une première hydrolyse plus lente a lieu au niveau de la liaison substrat-microorganismes, avec un relargage dans la phase liquide des produits d'hydrolyse. Ensuite, une seconde hydrolyse, plus rapide, a lieu dans la phase liquide de ces produits (Zhang and Lynd, 2004).

Dans les systèmes anaérobies, les enzymes extracellulaires dans le milieu existent en majorité sous forme de systèmes enzymatiques complexes, qui sont nécessaires pour dégrader des substrats non solubles, et peu sous forme d'enzymes libres (Banerjee et al., 2010; Malherbe and Cloete, 2002). En effet, les enzymes extracellulaires utilisées pour l'hydrolyse des résidus ligno-cellulosiques sont souvent constituées en systèmes complexes de plusieurs enzymes qui agissent en synergie et qui sont détaillées dans la Table 3-8.

Dans le cadre des résultats observés, l'hydrogène pourrait avoir un effet inhibiteur sur le **système de sécrétion des enzymes dans le milieu** (si les enzymes sont libres) ou sur les **systèmes de fixation des microorganismes sur le substrat** (si les enzymes sont liés). Si l'hydrolyse est double, l'hydrogène **doit avoir un effet sur la première hydrolyse**, puisque il n'y avait pas d'accumulation dans le milieu de sucres solubles pendant nos expériences. Il reste cependant difficile d'avancer des hypothèses d'inhibition lorsque les mécanismes de fonctionnement et les effets inhibiteurs possibles de l'H<sub>2</sub> sur les enzymes ne sont pas entièrement déterminés.

Table 3-8 : Enzymes dégradant les composés des résidus ligno-cellulosiques, d'après Brulé, (2014)

Composé à dégrader	Polymères	Enzymes dégradant la chaîne principale	Enzyme dégradant les chaînes secondaires
<b>Cellulose</b>		Exo-glucanase Endo-glucanase $\beta$ -glucosidase	Extensine Swollénine
<b>Hémicellulose</b>	Hétéroxylane	Exo-xylanase Endo-xylanase $\beta$ -xylosidase	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase $\alpha$ -glucuronidase Acétyl xylane estérase Feruloyl estérase p-coumaric acid estérase
	Xyloglucane	Endo-xyloglucanase $\alpha$ -xylosidase $\beta$ -glucosidase	$\alpha$ -fucosidase $\alpha$ -glucuronidase $\beta$ -galactosidase
	MLG (Mixed linked glucan)	$\beta$ -glucanase ML glucanase Lichenase	
	Hétéromannane	Endo-mannase $\beta$ -mannosidase $\beta$ -glucosidase	$\alpha$ -galactosidase Acétyl mannane estérase
<b>Lignine</b>		Laccase Manganèse peroxydase Lignine peroxydase	

### 3.4.2 Effets différents de la $P_{H_2}$ sur les microorganismes dans un écosystème complexe

L'inhibition de l'hydrolyse par l' $H_2$  est réversible par ajout de  $CO_2$ . En effet, après la consommation de l' $H_2$  présent avec le  $CO_2$  ajouté par les **méthanogènes hydrogénéotrophes**, l'inhibition de l'hydrolyse par l' $H_2$  est levée, avec une deuxième production de  $CH_4$  par les méthanogènes acétotrophes ou par la voie d'oxydation de l'acétate par les bactéries. Une pression partielle en  $H_2$  supérieure à 780 mbars n'a donc pas d'effet inhibiteur sur les méthanogènes hydrogénéotrophes, ce qui est confirmé par le fait que la production de  $CH_4$  par les méthanogènes hydrogénéotrophes est favorisée pour une  $P_{H_2}$  forte ( $> 5$  mbars) (Demirel and Scherer, 2008; Schink, 1997). Cependant, la diminution de la  $P_{H_2}$  aurait dû favoriser l'acétogénèse, puisque ces réactions sont endergoniques (Amani et al., 2010; Montero et al., 2008) et que l'inhibition de l'hydrolyse est réversible. Ainsi, la production d'AGVs aurait dû augmenter de façon significative après la consommation de l' $H_2$  présent dans le ciel gazeux. Or, cela n'a pas été le cas, indiquant soit une inhibition rémanente par l' $H_2$  de la production des AGVs par les bactéries acétogènes ou une consommation rapide des AGVs produits jusqu'à la consommation de l'acétate par les méthanogènes acétotrophes ou par les bactéries oxydant l'acétate. Comme la production de  $CH_4$  présente un temps de latence, les méthanogènes acétotrophes et les bactéries oxydant l'acétate ne peuvent être responsables de la concentration faible en AGVs. L'hypothèse d'une inhibition rémanente par l' $H_2$  de

la production des AGVs semble être la plus probable, avec un effet possible sur les bactéries acidogènes. Ainsi, l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> semble être l'effet inhibiteur principal mais d'autres effets inhibiteurs de l'H<sub>2</sub> existent et ne sont pas forcément visibles, dû au fait que l'hydrolyse est la première étape de la digestion anaérobie.

### 3.4.3 De l'échelle microscopique à l'échelle macroscopique

Les résultats précédents ont été obtenus pour un milieu de moins de 1 cm d'épaisseur, afin de limiter les effets de la diffusion et du transfert gaz-liquide. Cette faible épaisseur a permis d'étudier les effets directs de l'accumulation de gaz dissous sur la digestion anaérobie (à l'échelle microscopique), sans prendre en compte les effets de la diffusion. Cependant, à l'échelle d'un digesteur en voie sèche, des cinétiques lentes de diffusion présentent des effets importants sur la digestion anaérobie.

Tout d'abord, puisque la diffusion diminue avec l'augmentation de la teneur en MS, la diffusion des molécules dissoutes, comme par exemple les gaz dissous, va être limitée. Ainsi, le milieu peut être hétérogène, avec des accumulations locales de molécules inhibitrices. Selon les concentrations locales de ces molécules, ainsi que des variations de pH, les communautés microbiennes peuvent varier dans le milieu (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Martin, 2001; Martin, 2003; Staley et al., 2011; Vavilin and Angelidaki, 2005).

Dans le cas des gaz dissous H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>, les vitesses de diffusion de ces deux gaz sous forme dissoute sont différentes dans l'eau. Ainsi, le coefficient de diffusion de l'H<sub>2</sub> dans l'eau est de  $4,21 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et le coefficient de diffusion du CO<sub>2</sub> est de  $1,73 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à 20°C (Roustan, 2003). Puisque la vitesse de diffusion et les transferts gaz-liquide dépendent des coefficients de diffusions, la vitesse de diffusion de l'H<sub>2</sub> dissous sera plus rapide que celle du CO<sub>2</sub> dans le milieu pendant la digestion anaérobie. Ces variations de la vitesse de diffusion vont amener à des déséquilibres entre les concentrations locales d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> dans le milieu.

De plus, le CO<sub>2</sub> dissous peut se transformer en bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), qui est ensuite utilisé par les microorganismes lors de la fermentation ou de la respiration (De Bok et al., 2004; Stams, 1994). Ainsi, l'HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> va être transformé en formate selon les différents accepteurs d'électrons présents, comme par exemple la nicotinamide adénine dinucléotide, la ferredoxine ou la flavine adénine dinucléotide (Table 3-9).

La forme prioritaire dans l'eau entre le CO<sub>2</sub> dissous et l'HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est calculée de la façon suivante : le pKa du couple (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) à 25°C est de 6,37 (Brouckaert et al., 2011). A 35°C, le pKa peut être calculé selon la relation suivante (Batstone et al., 2002):

$$K_{35^\circ \text{ C}} = K_{25^\circ \text{ C}} * e^{\frac{\Delta H^0 * (35 - 25)}{R * (273 + 25)^2}}$$

avec K la constante d'acidité à 35 et 25°C,  $\Delta H^0$  l'enthalpie standard de réaction et R la constante des gaz parfaits. Ainsi, le pKa du couple (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) est de 6,25 à 35°C. Dans les conditions expérimentales (pH de 8,7), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est la forme majoritaire présente dans l'eau. La différence de concentration pour ce pH peut être estimée en utilisant l'équation suivante :

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}\right)$$

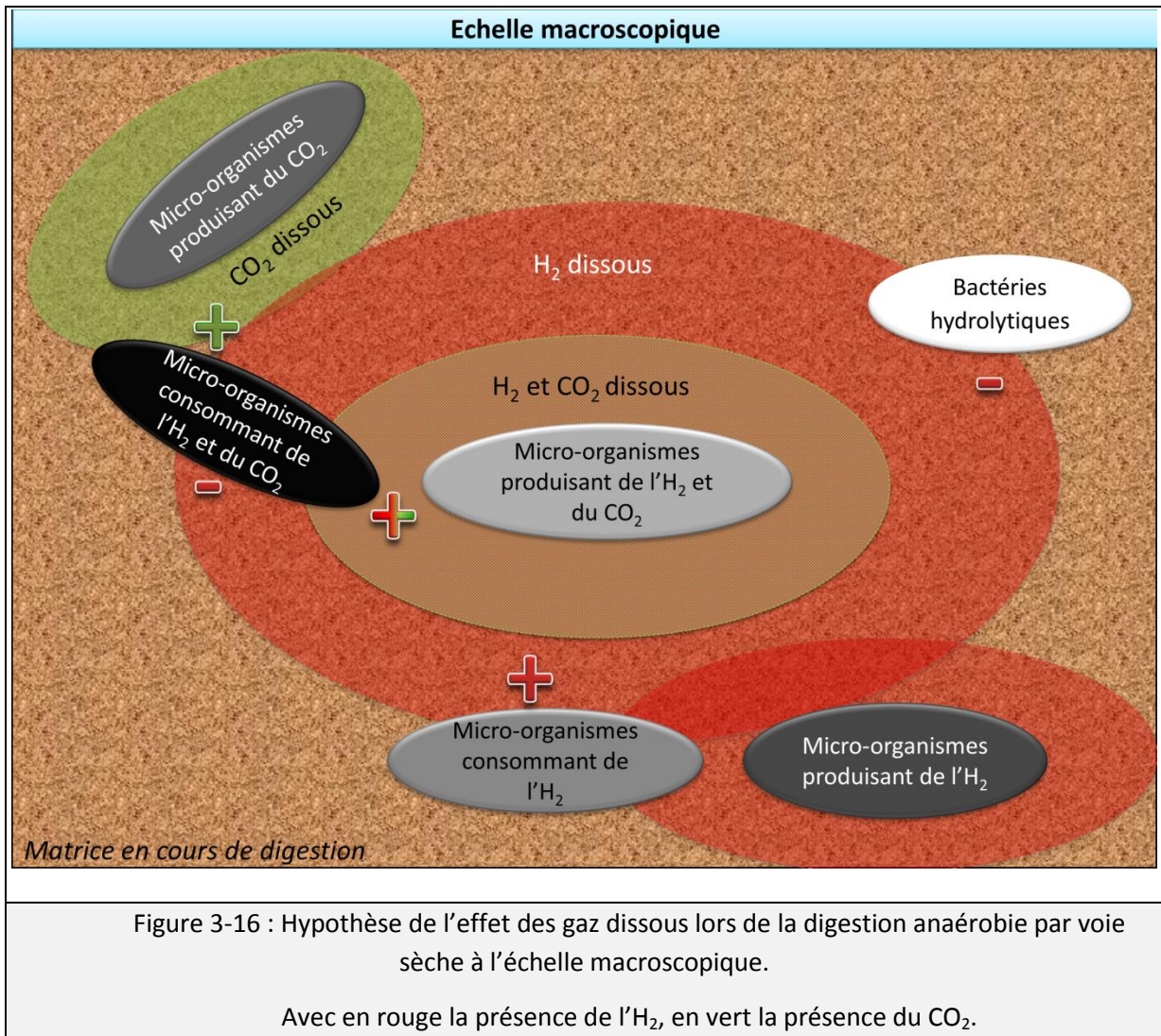
avec le  $pK_a = -\log(K_a)$ ,  $[HCO_3^-]$  la concentration en bicarbonate dans l'eau et  $[CO_2]$  la concentration en dioxyde de carbone dissous.

Table 3-9 : Equations de l'utilisation du bicarbonate par les microorganismes lors de la digestion anaérobie.  
Avec  $\Delta G^0$  l'énergie libre de Gibbs à 298 K, pH 7, 1 mol de soluble et  $10^5$  Pa (Stams, 1994), Fd : ferredoxine, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide et FAD : flavine adénine dinucléotide.

Equations	$\Delta G^0$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Contexte
$2 Fd_{(red)} + HCO_3^- \leftrightarrow 2 Fd_{(ox)} + CHO_2^-$ (formate) + $H^+$	1,7	Décarboxylation oxydative lors de la respiration des microorganismes.
$NADH + HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow NAD^+ + CHO_2^-$ (formate) + $H_2O$	16,8	Dégradation anaérobie des sucres, des acides aminés et des acides organiques.
$FADH_2 + HCO_3^- \leftrightarrow FAD + CHO_2^-$ (formate) + $H_2O$	36,1	Déshydrogénation des acides gras par des acétogènes.

Ainsi, la concentration en bicarbonate correspond à  $0,038 \pm 0,037$  fois en moyenne celle du dioxyde de carbone dissous pour nos conditions expérimentales lors des expériences portant sur la réversibilité de l'inhibition de l'hydrolyse (35°C, pH final  $7,8 \pm 0,33$ ). Cependant, le formate n'a pas été détecté pendant les expériences d'ajout de  $CO_2$  dans le milieu, ce qui peut être dû soit au fait que la forme  $CO_2$  dissous serait la forme prédominante utilisée par les microorganismes, même si cela n'est pas la forme prédominante dans le milieu durant nos expériences ou soit à une consommation immédiate du formate produit par les microorganismes.

En prenant l'exemple d'un microorganisme produisant à la fois de l' $H_2$  et du  $CO_2$ , les concentrations en  $CO_2$  dissous et en  $HCO_3^-$  seront plus importantes près du microorganisme alors que la concentration en  $H_2$  dissous sera plus diffuse dans le milieu et pourra donc inhiber par exemple les bactéries hydrolytiques en absence de  $CO_2$  (Figure 3-16). Ainsi, les concentrations en  $CO_2$  dissous et  $HCO_3^-$  dans le milieu seront plus faibles (diffusion lente) et pourront devenir limitantes pour les microorganismes. De plus, lorsque la teneur en matière sèche augmente, la diffusion des gaz dissous va diminuer (Bollon et al., 2013) et l' $H_2$  et le  $CO_2$  vont s'accumuler dans le milieu. Ainsi, les performances de la digestion anaérobie vont dépendre des concentrations dissoutes en  $H_2$  mais aussi en  $CO_2$  dissous (sous forme  $CO_2$  dissous ou  $HCO_3^-$ ) dans le milieu.



---

### **3.5 CONCLUSION DU CHAPITRE 3**

---

Ce chapitre a permis d'étudier les effets des pressions partielles en  $H_2$  et en  $CO_2$  sur la digestion anaérobie par voie sèche. Des études ont été réalisées avec une épaisseur de milieu inférieure à 1 cm afin de limiter les effets des transferts de matières (diffusion et transfert gaz-liquide), qui peuvent avoir un effet limitant en voie sèche (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Xu et al., 2014). L'étude de la  $P_{H_2}$  seule dans le ciel gazeux a permis de montrer un effet inhibiteur de l' $H_2$  sur l'hydrolyse. Des études complémentaires ont permis de démontrer que cette inhibition était réversible par l'ajout de  $CO_2$ . En effet, l'inhibition de l'hydrolyse par l' $H_2$  n'a pas lieu en présence de  $CO_2$  et la production de  $CH_4$  est améliorée par l'ajout de  $CO_2$ . Cependant, un effet inhibiteur rémanent a été observé sur la production de  $CH_4$  dont les causes sont encore indéterminées avec un effet possible sur le métabolisme ou la croissance des méthanogènes acétoclastes ou des bactéries oxydant l'acétate pour 996 mbars d' $H_2$ . Ainsi, même si l' $H_2$  inhibe fortement l'hydrolyse dès 780 mbars, l' $H_2$  peut également avoir un impact sur d'autres réactions et microorganismes dans le milieu.

En conclusion, il a été montré que l'hydrogène, mais aussi par conséquent le dioxyde de carbone, pouvait avoir des effets sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche lorsqu'ils s'accumulent localement. L'inhibition de la digestion anaérobie par voie sèche pourrait ainsi être due à un déséquilibre entre les concentrations locales dissoutes d' $H_2$  et de  $CO_2$ , dues à des cinétiques de diffusion et de transfert gaz-liquide lentes et différentes pour ces molécules au sein du réacteur. Ainsi, en présence de fortes teneurs en MS, l'accumulation locale d' $H_2$  en absence de  $CO_2$  inhiberait l'hydrolyse et la production de  $CH_4$ .

Une possibilité pour améliorer la digestion anaérobie par voie sèche serait d'ajouter du  $CO_2$  dans le milieu. Néanmoins, l'ajout de  $CO_2$  seul pour une épaisseur de milieu inférieure à 1 cm améliore seulement la méthanogenèse sans améliorer la dégradation du substrat. Cette amélioration de la méthanogenèse pourrait correspondre à une simple accélération de la méthanogenèse, par consommation de l' $H_2$  dissous disponible. Le fait que l'ajout de  $CO_2$  seul n'améliore pas l'hydrolyse pourrait être dû au fait que la teneur en MS utilisée est inférieure aux teneurs en MS inhibitrices de la digestion anaérobie par voie sèche pour la paille de blé (Motte et al., 2013a, 2013b). Ainsi, l'ajout de  $CO_2$  seul ne favorise pas l'hydrolyse pour une épaisseur de milieu faible car les transferts de matières de l' $H_2$  dissous ne seraient pas limitants dans ce cas et il n'y aurait pas d'accumulation locale trop importante d' $H_2$  ni d'inhibition de l'hydrolyse dans le milieu. Cependant, l'ajout de  $CO_2$  lors de la digestion anaérobie par voie sèche de paille de blé dans un réacteur à un taux de MS supérieur à 28% (Motte et al., 2013b) pourrait améliorer les cinétiques de méthanisation par consommation de l' $H_2$  accumulé localement.

Afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu à une échelle supérieure (mésoscopique), des études supplémentaires ont été nécessaires et plus particulièrement l'étude des effets des gaz dissous soumis à un régime de diffusion lors de la digestion anaérobie par voie sèche.

Table 3-10 : Synthèse des résultats du chapitre 3

	<b>Effet des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé</b>
<b>Messages principaux</b>	Inhibition de l'hydrolyse au-delà de 780 mbars d'H <sub>2</sub> en absence de CO <sub>2</sub> .
	Inhibition de l'hydrolyse réversible par ajout de CO <sub>2</sub> .
	Effet rémanent de l'inhibition de l'H <sub>2</sub> sur les cinétiques de méthanisation et d'hydrolyse.
	La production de CO <sub>2</sub> est le facteur limitant de la consommation d'H <sub>2</sub> .
	Effet positif de l'ajout de CO <sub>2</sub> seul sur la méthanogenèse.





# **CHAPITRE 4:**

## **INFLUENCE DES GAZ DISSOUS SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE A L'ECHELLE MESOSCOPIQUE**

---

Une des hypothèses pour expliquer la diminution des performances de la digestion anaérobie avec l'augmentation de la teneur en MS est que la vitesse globale de diffusion diminue (Bollon et al., 2013) et le transfert gaz-liquide peut alors devenir un facteur limitant (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b). En effet, au niveau local, la diminution du transport diffusif est susceptible d'engendrer une accumulation de composés et en particulier de gaz dissous dans le milieu réactionnel. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l' $H_2$  possède un effet inhibiteur sur la digestion anaérobie et plus particulièrement sur l'hydrolyse à partir d'une pression partielle initiale de 780 mbars (Cazier et al., 2015). Cette inhibition peut être levée par l'ajout de  $CO_2$ , avec toutefois un effet inhibiteur rémanent de l' $H_2$  sur la dégradation de l'acétate et la méthanogenèse.

Cependant, les expériences précédentes ont été réalisées pour étudier l'échelle locale, dans des réacteurs possédant une épaisseur de milieu réactionnel de moins de 1 cm, afin de limiter l'influence de la diffusion. Dans un digesteur en voie sèche, les transferts de matière (diffusion et transfert gaz-liquide) peuvent avoir un effet important. Suivant une théorie proposée par Martin (2001), des gradients de concentration de produits issus de l'hydrolyse et de l'acidogenèse, ainsi que des gradients de pH pourraient structurer le milieu lors de la digestion anaérobie par voie sèche, avec des zones distinctes de réaction pour les étapes d'hydrolyse-acidogenèse et de méthanogenèse. Une autre hypothèse, proposée par Vavilin and Angelidaki (2005), définit deux zones avec des pH et des concentrations en AGVs différentes. La première zone correspond à des zones d'initiation à la méthanogenèse contenant peu d'AGVs et un pH basique et cette zone est entourée d'une deuxième zone d'hydrolyse-acidogenèse avec une concentration importante en AGVs et un pH acide. La vitesse de diffusion des AGVs est suffisamment faible pour limiter la concentration des AGVs arrivant dans la zone d'initiation à la méthanogenèse et éviter ainsi l'inhibition des méthanogènes. Pour ces deux hypothèses, les conditions locales (pH, concentration en AGVs) vont avoir un effet sur les microorganismes présents et structurer les communautés dans le milieu. Néanmoins, à ce jour, ces hypothèses ne considèrent pas la concentration des gaz dissous comme pouvant avoir un effet sur la

structuration en produits et en microorganismes de la digestion anaérobie par voie sèche. Puisque l' $H_2$  peut avoir un effet inhibiteur sur l'hydrolyse et sur la dégradation de l'acétate et puisque cette inhibition n'a pas lieu en présence de  $CO_2$ , les accumulations locales d' $H_2$  et de  $CO_2$ , liées à une faible vitesse de diffusion et de transfert gaz-liquide, pourraient donc résulter en une structuration spatiale du milieu réactionnel (en produits et en microorganismes) au cours de la digestion anaérobie par voie sèche.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier les effets des gaz dissous ( $H_2$  et  $CO_2$ ) sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique, c'est-à-dire en prenant en compte l'effet des transferts de matière (diffusion et transfert gaz-liquide). Pour cela, des expériences ont été réalisées avec une épaisseur de milieu plus importante que les expériences précédentes, mais dans des conditions opérationnelles similaires. Le substrat utilisé pour ces expériences est le même que précédemment, la paille de blé, en tant que modèle d'étude de la famille des résidus ligno-cellulosiques.

Une première étude a porté sur la mise en place d'une structuration des produits et des microorganismes au cours de la digestion anaérobie par voie sèche. Pour cela, des comparaisons ont été réalisées sur les dynamiques de la digestion anaérobie par voie sèche pour des épaisseurs différentes de milieu (<1 cm et 4,2 cm) et donc des transferts de matières différents. La concentration en AGVs, le pH et les communautés microbiennes ont été analysés tous les 7 mm pendant 30 jours. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article (à soumettre).

Une deuxième étude a porté sur les effets de de l'accumulation d' $H_2$  et de  $CO_2$  lors de la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique, lorsque le transfert gaz-liquide est limitant. Ainsi, différents gaz ont été ajoutés ( $N_2$ ,  $H_2$  et  $CO_2$ ) de façon quotidienne pendant 28 jours avec un milieu de 8 cm d'épaisseur. Cette étude a permis d'évaluer l'effet de l'ajout de ces gaz sur la production d'AGVs, de biogaz ou encore sur la structuration des communautés microbiennes en prenant en compte les transferts de matière. Cette étude est présentée sous la forme d'un chapitre en français.

---

## **4.1 METABOLITES GRADIENT IN SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION OF WHEAT STRAW**

---

E.A. CAZIER<sup>a</sup>, E. TRABLY<sup>a\*</sup>, J.P. STEYER<sup>a</sup>, R. ESCUDIE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>INRA, UR0050 Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

\*corresponding author : [eric.trably@supagro.inra.fr](mailto:eric.trably@supagro.inra.fr); Phone: (+33)(0) 468 425 172; Fax: (+33)(0) 468 425 160

### **4.1.1 Avant-propos**

L'augmentation de la teneur en MS peut avoir un impact important en diminuant le transfert gaz-liquide et les coefficients de diffusion de composés dissous (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Bollon et al., 2013), et peut donc impacter les performances du système. Lors de la digestion anaérobie par voie sèche, la diminution de la vitesse de diffusion peut présenter plusieurs types d'effet de répartition des sous-produits. D'une part, elle peut amener à des accumulations de produits inhibiteurs dans le milieu, comme par exemple l'hydrogène, qui peuvent ensuite inhiber localement la digestion anaérobie, pour arriver au final à une inhibition totale du processus (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Cazier et al., 2015). D'autre part, la diminution de la diffusion peut permettre l'apparition de zones de méthanisation avec une concentration faible en AGVs entourées de zones d'hydrolyse et d'acidogenèse possédant des concentrations importantes en AGVs et un pH acide (Martin, 2001; Vavilin and Angelidaki, 2005). Ainsi, une structuration des produits de réactions, du pH et des microorganismes dans le milieu peut se mettre en place dans le milieu réactionnel durant la digestion anaérobie par voie sèche. Staley et al., (2011) a démontré une variation du pH au sein du milieu au niveau du cm sans toutefois pouvoir démontrer une structuration des microorganismes et des AGVs.

L'objectif de cet article est donc d'étudier l'effet de la diffusion et du transfert gaz-liquide sur la digestion anaérobie par voie sèche et sur la structuration du milieu réactionnel. Pour cela, une comparaison a été réalisée entre deux épaisseurs différentes de milieu réactionnel (<1 cm et 4,2 cm). Le milieu possédant une épaisseur de moins d'1 cm correspond à l'épaisseur utilisée lors des expériences précédentes (cf. Chapitre 3: Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique), sans effets limitants dû à la diffusion et le transfert gaz-liquide : il sert donc de témoin pour ces expériences. Pour le milieu de 4,2 cm d'épaisseur, le milieu a été analysé tous les 7 mm afin d'étudier à cette échelle l'effet de la limitation des transferts de matière sur la structure du milieu en termes d'AGVs, de microorganismes et de pH.

### 4.1.2 Abstract

In solid-state anaerobic digestion, the diffusion and gas-liquid transfer of dissolved reaction intermediates are reduced by the high total solid content, likely due to a local accumulation of inhibitory intermediates, such as H<sub>2</sub> or VFAs. In this study, we investigated the effect of the thickness of the reactional medium, and by extension the effect of the gas-liquid transfer kinetics on solid-state anaerobic digestion. For that, two different thickness of a wheat-straw based medium (<10 and 4.2 cm) were investigated during 33 days. The results showed a decrease of the gas-liquid transfer due to hydrolysis inhibition. Local inhibition of the methanogenesis generated a gradient of the fermentative metabolites all along the reactor thickness. This gradient was likely due to a local gradient of H<sub>2</sub> which may be responsible for the inhibition of the hydrolysis step.

#### **Keywords**

VFAs, dry anaerobic digestion, diffusion, heterogeneity, gas-liquid transfer

#### **Highlights**

- The decrease of the gas-liquid transfer kinetics led to hydrolysis inhibition.
- A gradient of metabolites concentration was present in the medium after 20 days.
- The gradient of metabolites concentration may be due to a gradient of dissolved H<sub>2</sub>.

### 4.1.3 Introduction

Anaerobic digestion consists in a degradation of the organic matter into a biogas composed of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> by anaerobic microorganisms. A digested organic matter, so called digestate, is also generated and can be used as fertilizer in agriculture under some sanitary and environmental restrictions (Weiland, 2010). This global biological conversion results from a high number of microbial reactions within a complex microbial ecosystem. Meanwhile, the anaerobic digestion process can be simply described by four main microbial steps: The first step, called hydrolysis, corresponds to the transformation of organic matter into soluble molecules by extracellular enzymes (Montero et al., 2008). This step is usually considered as the limiting step for anaerobic digestion using solid matters as a substrate (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991a). Then, amino-acids, saccharides and fatty acids are converted into volatile fatty acids (VFAs) or into others organics acids, such as lactate, or in alcohols during acidogenesis step. During acetogenesis, VFAs, alcohols and fatty acids are all converted into H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and acetate by syntrophic acetogens also called Obligate Hydrogen Producing Bacteria (OHPB) (Amani et al., 2010). The OHPB are syntrophs of methanogens since the reactions are thermodynamically unfavorable and therefore require the presence of methanogenic *Archaea* consuming the products. H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are also converted into acetate by no-syntrophic homoacetogens (Amani et al., 2010), which is thermodynamically favorable and does not require the presence of methanogenic *Archaea*. During the last step, called methanogenesis, acetate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are converted into CH<sub>4</sub> by acetotrophic methanogens using acetate as substrate and producing 70% of CH<sub>4</sub> in anaerobic digestion (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991) and by hydrogenotrophic methanogens using CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as substrates.

Solid-state anaerobic digestion or dry anaerobic digestion corresponds to anaerobic digestion with total solids (TS) content over 15% (Baere et al., 2010). The recent development of solid-state anaerobic digestion plants in Europe (Baere et al., 2010) can be related to operational advantages compared to wet anaerobic digestion : e.g., reduction of water, energy demand and size of the digesters. Specific research studies have been carried out at a macroscopic level, in batch flask or in continuous laboratory reactors, in order to evaluate the effect of TS content on solid-state anaerobic digestion. Increasing the TS content always led to a reduction of the hydrogen and methane yield, substrate conversion degradation and methanogenic activities, with an increase of the VFAs concentration and a decrease of the pH (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015a; Fernández-Rodríguez et al., 2013; Forster-Carneiro et al., 2008; Le Hyaric et al., 2011; Motte et al., 2013a; Robledo-Narváez et al., 2013; Xu et al., 2014).

In this context, the biological reactions carried by the microorganisms are sensitive to their local environments. The mass transport of soluble compounds (dissolved gases and soluble metabolites) is driven by two distinct mechanisms: (1) convective transport, related to the digester mixing and (2) diffusive transport. Depending on the technology, solid-state anaerobic digestion systems are static or difficult to mix, and the poor mixing efficiency (Benbelkacem et al., 2015a), related to the complex rheological behavior of the digesting medium (Garcia-Bernet et al., 2011a), can induce low convective transport. The diffusive transport is also strongly affected by the high TS content in solid-state anaerobic digestion systems. Bollon et al. (2013) determined experimentally the diffusion coefficients in high-solid digested medium and found low diffusion coefficients in the digestate compared to the water. For example, the diffusion coefficients at 8% TS and 25% TS of iodide are respectively 55 to 185 lower than the diffusion coefficient in water. As a consequence, this low diffusion rate can generate local pockets with different local environmental conditions, with variation in the VFAs concentration, the pH or the dissolved H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. For instance, Staley et al. (2011) reported the existence of a correlation between pH, i.e. through VFAs accumulation in the local environment of the microorganisms, and the water content, ranging from 50% to 95%, in landfill. The authors suggested the presence of neutral niches in heterogeneous systems, due to the heterogeneity of the medium, which may serve to initiate methanogenesis. Indeed, with a small diffusion rate of soluble compounds, the concentration of inhibitory products can be heterogeneously distributed within the medium, and this could conduct to a formation of very distinct zones (Martin, 2001; Martin, 2003; Vavilin and Angelidaki, 2005). Hydrolysis, acidogenesis and acetogenesis would be performed mostly in a first zone with a high concentration of VFAs and an acidic pH, and methanogenesis would be mostly performed in a second zone with a low concentration of VFAs and a basic pH, due to a slow diffusion of soluble VFAs. This model implies a spatialization of the VFAs within the medium. A decrease of the diffusion and gas-liquid transfer kinetics together with the increase of the TS content may both contribute to a local increase of concentrations of dissolved gases, especially H<sub>2</sub> which has been recently reported as inhibitory of hydrolysis in solid-state anaerobic digestion (Cazier et al., 2015).

The objective of this study was to investigate the effect of the thickness of the medium, and by extension the diffusion and gas-liquid transfer limitations, on the performances of solid-state anaerobic digestion and more specifically on the subsequent spatialized production of VFAs and associated microorganisms.

#### 4.1.4 Materials and methods

##### 4.1.4.1 Substrate

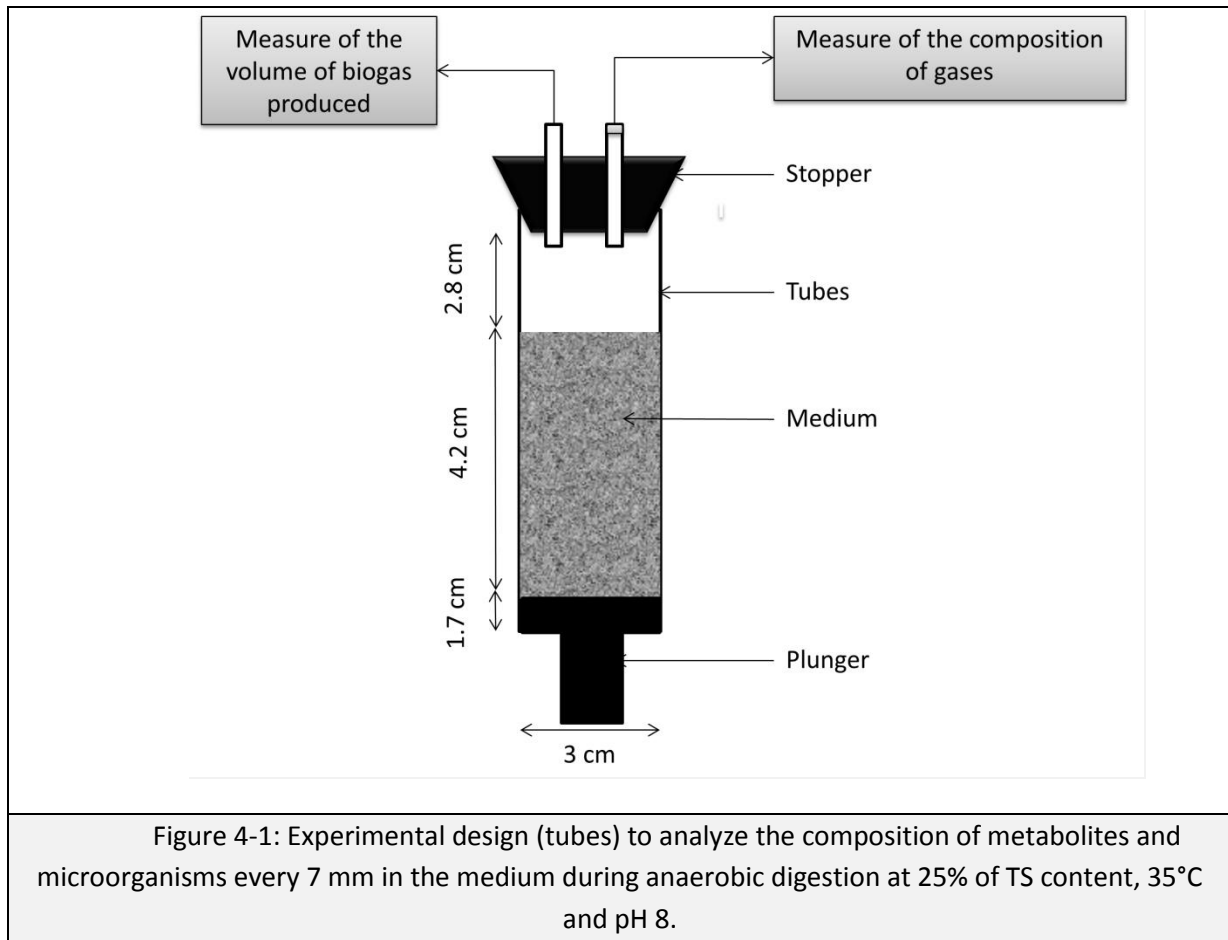
Wheat straw (*Triticum aestivum*) was used as a substrate. It was first crushed using a cutting miller through a 1 mm grid, and further sieved between grids of 1 mm and 400 µm. The final TS content of crushed wheat straw was 95%.

##### 4.1.4.2 Operational conditions of the batch reactors

Industrial UASB sludge was used to inoculate the batch reactors. The sludge was mixed during 24 h at 35°C and centrifuged (7 841 g, 20 min, and 4°C) to obtain an anaerobic inoculum with TS content of 12%. Initial TS content was fixed at 25%, since it corresponds to solid-state anaerobic digestion conditions without an inhibitory effect (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a). The substrate/inoculum ratio in volatile solid basis was 3 which is not inhibitory for lignocellulosic substrate (Liew et al., 2012). A solution of potassium phosphate mono and dibasic (0.907 mg  $\text{HK}_2\text{PO}_4^-$  and 0.343 mg  $\text{H}_2\text{KPO}_4^{2-}$  per g of substrate) was used to buffer the pH at 8 and a solution of trace elements ( $\text{FeCl}_2$  2 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{CoCl}_2$  0.5 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{MnCl}_2$  0.1 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{NiCl}_2$  0.1 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{ZnCl}_2$  0.05 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.05 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  0.05 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{CuCl}_2$  0.04 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.01 g.L<sup>-1</sup>) was added (0.2 mL per tubes) at the beginning of the experiment.

Two sets of reactors were operated. The first reactors consisted in cylindrical tubes with a height of 8.7 cm and a diameter of 3 cm. 14.5 g of the medium was packed to obtain a height of 4.2 cm (Figure 4-1). The headspace was then flushed with nitrogen. The reactors were incubated in mesophilic conditions (35°C) for 33 days. Four replicates were sacrificed after 8, 20 and 33 days; the medium was divided every 7 mm to analyze the composition of the medium in terms of VFAs and microorganisms, according to its depth.

The second set of reactors corresponded to 600 mL flasks filled with the same quantity of medium, distributed at the bottom in a thin layer lower than 1 cm. Such thin layer was used as a control to reduce the influence of gas diffusion in the medium, since the diffusion coefficient decreases with the TS content (Bollon et al., 2013). These reactors were incubated under the same conditions than the first reactors (tubes) and three replicates were sacrificed at 8, 20 and 33 days to analyze the composition of the medium in VFAs and microorganisms.



#### 4.1.4.3 ***Analytical methods***

Volumetric Biogas production was determined through the variation of the total pressure and the biogas composition was measured using gas chromatograph (Perkin Clarus 580). It was composed of an injector heated at 250°C and two capillary columns heated at 60°C. The first column was an RtUbond for the CO<sub>2</sub>. The second column was an RtMolsieve used for the detection of the O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>. The carrier gas was argon at pressure of 350 kPa at 31.8 ml.min<sup>-1</sup>. The detection was ensured by a thermal conductivity detector at 150°C.

Metabolites were quantified by diluting 2 g of medium in 8 g of deionized water during 30 minutes, centrifuged during 20 min at 39 121 g and 4°C, and then filtrated with a 0.2 µm nylon membrane. Then, VFAs were measured with a gas chromatograph Perkin Clarus 580 with an Elite-FFAP crossbond® carbowax® 15 m column connected to a flame ionization detector at 280°C and N<sub>2</sub> at 6 mL.min<sup>-1</sup> as carrier gas (Motte et al., 2013a). Others metabolites were also quantified using high performance liquid chromatograph. This chromatograph was composed of an automatic sampler (Water 717), a pre-column to filter residues (Micro guard cation H refill cartridges, Bio-rad) and an Aminex HPX-87H column (300 mm on 7.8 mm, Bio-rad) at 35°C. The eluting solution was sulfuric acid at 0.005 M at 0.4 ml.min<sup>-1</sup>.



Microbial communities (*Bacteria* and *Archaea*) were analyzed on the same samples by Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) using the same protocol than Cazier et al. (2015).

#### 4.1.4.4 **Data analysis**

R software (version 2.15.2) coupled with the package Rcmdr (version 1.8-4) was used to analyze statistically the data using an ANOVA analysis. Non-significant p-values were fixed at >0.05 and significant p-values were estimated as <0.05; <0.01 and <0.001.

R software (version 2.11.1) was also used for principal component analysis (PCA) to analyses results from Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) on the *Archaea* and *Bacteria* communities of the medium.

Total substrate degradation (expressed in Chemical Oxygen Demand –COD) was estimated theoretically from a mass balance between the start-up and the sampling date using the protocol of Cazier et al. (2015). A COD mass balance was performed by accounting from the concentration of metabolites (acetate, propionate, butyrate, valerate, caproate, succinate, ethanol, formate...) and the cumulated biogas produced. The total substrate degradation was expressed according to initial TS content of wheat straw, as follows:

$$\text{Total Substrate Degradation} = \frac{A_{\text{CH}_4,f} + A_{\text{met},f} + A_{\text{GC}}}{\text{g TS}} - \frac{A_{\text{met},i}}{\text{g TS}}$$

With  $A_{\text{H}_2,f}$  the final amount of  $\text{H}_2$  produced in the headspace,  $A_{\text{CH}_4,f}$  the final amount of  $\text{CH}_4$  accumulated in headspace,  $A_{\text{met},f}$  the final amount of metabolites accumulated,  $A_{\text{GC}}$  the total amount of gas ( $\text{H}_2$  and  $\text{CH}_4$ ) sampled for biogas analyses and  $A_{\text{met},i}$  the initial amount of metabolites in the medium.

## 4.1.5 **Results and discussion**

### 4.1.5.1 **Effect of reactor configuration on the performance of solid-state anaerobic digestion**

Methane yields in  $\text{ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$  are shown in Figure 4-2 for the two different configurations: flasks (layer of medium lower than 1 cm) and tubes (layer of medium of 4.2 cm). After 33 days of reaction, methane yield was significantly higher in the flasks ( $86 \pm 26 \text{ ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$ ) than in the tubes ( $26 \pm 7 \text{ ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$ ). The dynamics of  $\text{CH}_4$  production in the flasks corresponded to a linear phase from 0 to 26 days (methane yield of  $83 \pm 18 \text{ ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$  on day 26) followed by a stabilization phase from 26 to 33 days. The  $\text{CH}_4$  production in the flasks was far below the BMP test of wheat straw ( $237 \pm 1 \text{ ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$ ), which might be due to the high TS content which can decrease the overall performances of anaerobic digestion (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Forster-Carneiro et al., 2008; Li et al., 2013).

In the tubes, the CH<sub>4</sub> production was very low from the first days of the experiment (from 3 ± 0.24 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 1 day to 9 ± 2 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 33 day). It can be easily concluded that CH<sub>4</sub> production was strongly inhibited when the medium was set up in a thick layer. This global behavior is consistent with previous observations of Abbassi-Guendouz et al. (2012) and Benbelkacem et al. (2015b). These authors showed also that the gas-liquid mass transfer coefficient (k<sub>L</sub>a) plays a key role in the performance limitation of high solid anaerobic digestion. Moreover, the diffusion coefficient (D<sub>i</sub>) decreases with the TS content (Bollon et al., 2013) and will also decrease the gas-liquid transfer coefficient (k<sub>L</sub>a) as followed in Eq. (1):

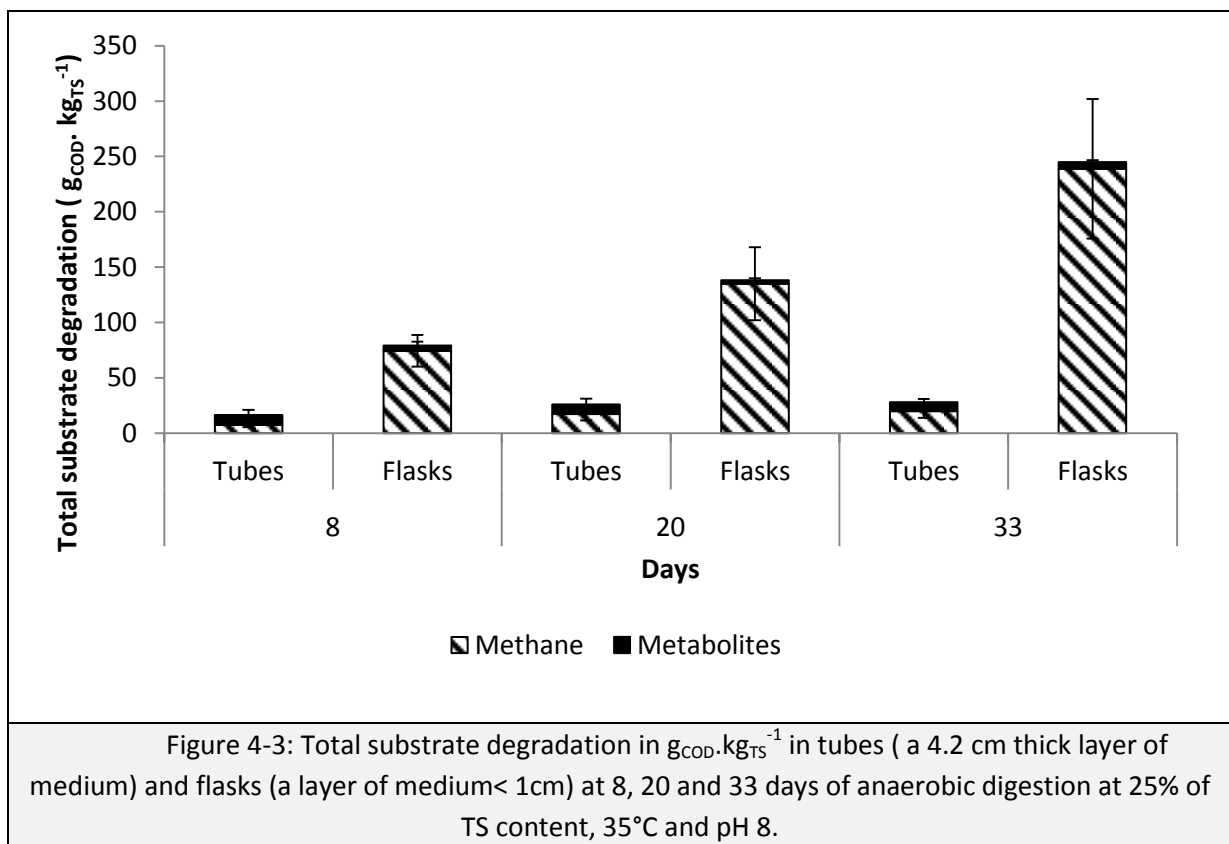
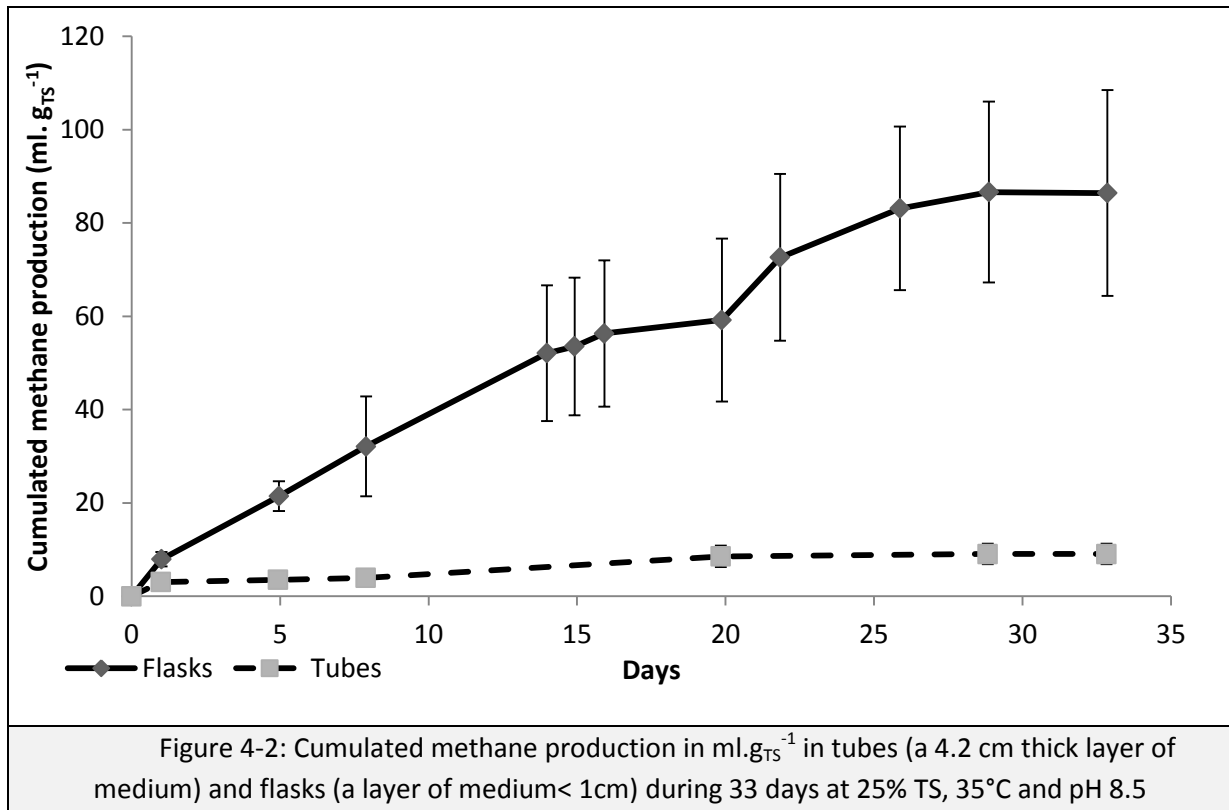
$$k_{L}a(\text{digestate}) = k_{L}a(\text{water}) * \left( \frac{D_{i}(\text{digestate})}{D_{i}(\text{water})} \right)^{0,5} \text{ Eq.(1)}$$

During the anaerobic digestion process, microorganisms produce metabolites in the soluble phase. In unmixed conditions, soluble gases (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>...) are transported by diffusive convection to the liquid-gas interface and are transferred into the gas phase. As a consequence, the specific surface (a) corresponding to the total surface of the liquid-gas interface per unit bulk volume is the key parameter governing the mass transfer rate of soluble gases from the bulk phase to the gas phase. In unmixed cylindrical flasks, the total surface of the liquid-gas interface corresponds to the surface of the disk of the cylindrical reactor (S). As a consequence, the specific surface (a) can be deduced as followed in Eq. (2) with V the bulk volume:

$$a = \frac{S}{V} \text{ Eq.(2)}$$

In the present work, experiments were carried out in two different types of cylindrical reactor to obtain two distinct specific surfaces: a = 23.8 m<sup>2</sup>·m<sup>-3</sup> for the tubes (height of 4.2 cm and diameter of 3 cm) and a =100 m<sup>2</sup>·m<sup>-3</sup> for the flasks (height of 1 cm and diameter of 9 cm). Therefore, the decrease of the specific surface (a) caused a reduction of the global gas-liquid mass transfer (k<sub>L</sub>a). The present result confirms that the k<sub>L</sub>a might have a strong effect on methanogenic performances in solid-state anaerobic digestion.

The estimated substrate degradation is presented in Figure 4-3 for the two reactors configurations at three different times. The total substrate degradation was higher in the flasks (245 ± 65 g<sub>COD</sub>·kg<sub>TS</sub><sup>-1</sup>) than in the tubes (28 ± 9 g<sub>COD</sub>·kg<sub>TS</sub><sup>-1</sup>) after 33 days of operation. In the flasks, the total substrate degradation increased with the time, from 79 ± 18 g<sub>COD</sub>·kg<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 8 days to 245 ± 65 g<sub>COD</sub>·kg<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 33 days. Meanwhile, the substrate degradation did not change in the tubes, from 17 ± 7 at 8 days to 28 ± 8 g<sub>COD</sub>·kg<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 33 days, with the similarity of the substrate degradation at 8, 20 and 33 days validated by ANOVA with a p-value > 0.01. Therefore, it can be concluded that the hydrolysis step was inhibited in the tubes after 8 days.



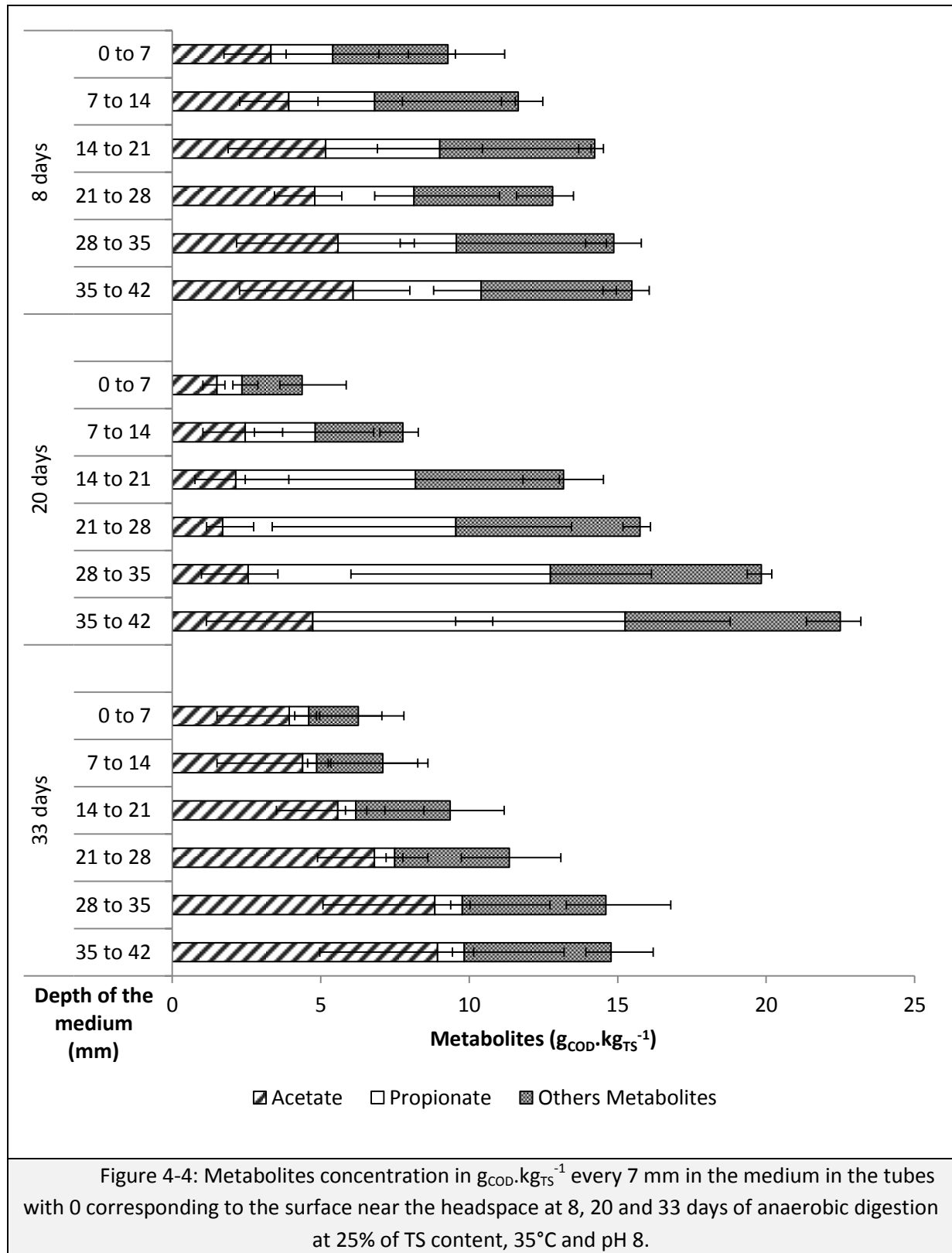
The composition of the metabolic by-products was different in the flasks and in the tubes. In the flasks, 96% of the substrate was converted to CH<sub>4</sub> and only 4% to VFAs. In the tubes, the composition changed by the time of operation: at day 8, 45% of the substrate was used to produce CH<sub>4</sub> and 55% for VFAs and at day 33, 71% was converted to CH<sub>4</sub> and 29% to VFAs. Therefore, the methanogenesis seems to be the predominant reaction in the flasks. In contrast, in the tubes, methanogenesis was not the predominant reaction with a similar production of VFAs in concentration than in the flasks.

Since the substrate degradation was smaller in the tubes than in the flasks, the hydrolysis step seems to be inhibited in this configuration. This inhibition may be due to the pH, the metabolites concentration or the local concentration of H<sub>2</sub>. The pH was the same in the flasks than in the tubes and decreased slightly during the experiment, from 8.73 ± 0.03 at 8 days to 8.13 ± 0.29 at 33 days for the flasks and from 8.74 ± 0.22 at 8 days to 8.52 ± 0.28 at 33 days for the tubes. The pH had therefore no inhibitory effect on the hydrolysis step since it was always higher than 6 (Veeken et al., 2000). In addition, the total metabolites concentration in the tubes stayed around 13 ± 8 g<sub>COD</sub>.kg<sub>TS</sub><sup>-1</sup>, which corresponded to a maximum of 4.5 g.L<sup>-1</sup> of VFAs. Such VFAs concentration is below the inhibitory level reported in the literature, ie. 20 g.L<sup>-1</sup>, for CH<sub>4</sub> inhibition (Siegert and Banks, 2005) and 30 g.L<sup>-1</sup> for hydrolysis inhibition (Veeken et al., 2000). Therefore, the pH and the metabolites concentration were likely not responsible for the inhibition of the hydrolysis step. Since the mass transfer was limited in the tubes, local accumulations of dissolved gases may have occurred in the tubes (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Indeed, H<sub>2</sub> is known to be an inhibitor of the hydrolysis step in solid-state anaerobic digestion (Cazier et al., 2015). Therefore, this hydrolysis inhibition with medium thickness of only 4.2 cm may be due to an accumulation of high P<sub>H<sub>2</sub></sub> in the medium, due to the decrease of the mass transfer (diffusion and gas-liquid transfer).

Moreover, the CO<sub>2</sub> production was higher in the flasks (maximum of 98 ml<sub>CO<sub>2</sub></sub>.g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 29 days) than in the tubes (maximum of 6 ml<sub>CO<sub>2</sub></sub>.g<sub>TS</sub><sup>-1</sup> at 20 days) (Supplementary material). The CO<sub>2</sub> produced in the flasks started to decrease at 29 days, when the CH<sub>4</sub> production was stabilized. Meanwhile, no CO<sub>2</sub> was produced in the tubes, which is typical of an inhibition of the hydrolysis by H<sub>2</sub> (Cazier et al., 2015). Indeed, the diffusion and the gas-liquid transfer have a strong effect on the performance of solid-state anaerobic digestion in non-agitated batch. As a consequence, to limit this effect when performing solid-state anaerobic digestion in batch, it can be recommended to agitate the medium or increase the specific exchange surface.

#### 4.1.5.2 ***Spatial distribution of VFAs***

Since the medium is thicker and slow diffusion rates of soluble and dissolved gas are lower by the high TS content (Bollon et al., 2013), concentration gradients of metabolites was expected in the tubes (Martin, 2001; Vavilin and Angelidaki, 2005). In order to test this hypothesis, the concentrations of metabolites were analyzed in the tubes every 7 mm at 8, 20 and 33 days, and are represented in Figure 4-4.



First, no concentration gradient was detected at 8 days. Indeed, the concentrations of the total metabolites were globally similar along the medium depth ( $6 \pm 5 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  for the layer 0-7 mm and  $15 \pm 6 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  for the layer 35-42 mm). A concentration gradient appeared at 20 days, with an increase of metabolites concentration with the depth, from  $4 \pm 1 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  for the layer 0-7 mm to

$23 \pm 8 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  for the layer 35-42 mm. The difference of metabolites concentrations between 0-7 mm and 35-42 mm was validated by ANOVA, with a p-value of 0.0301. The concentration gradient was smaller at 33 days from  $9 \pm 1 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  for the layer 0-7 mm to  $15 \pm 1 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  for the layer 35-42 mm since the p-value increased to 0.0721 (ANOVA). To conclude, a spatialization of the metabolites concentrations was detected in the tubes, with the lowest concentration close to the interface between the gas headspace and the digested medium. The total metabolites concentration for the layer 0-7 mm corresponded to the total metabolites concentration in the flasks, and did not change during the experiment, from  $5 \pm 4 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  at 8 days,  $4 \pm 3 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  at 20 days and to  $6 \pm 3 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  at 33 days. This result confirmed that there was no effect of the diffusion in the thin layer of medium in the flasks.

The composition of metabolites changed between 8, 20 and 33 days, especially the percentage of acetate and propionate. At 8 days, the composition of the metabolites was the same for 0-42 mm and the acetate corresponded to 37% of the total metabolites (in terms of COD), and propionate at 26%. At 20 days, the percentages changed between 0-7 mm (34% acetate and 19% propionate), which was similar to the composition at 8 days, and 35-42 mm (21% acetate and 47% propionate). At 33 days, the composition of the metabolites was the same for 0-42 mm and the percentage of acetate increased compared to 20 days to 61% with a decrease of the propionate to 7%. Therefore, acetate and propionate were the principal metabolites produced, with an effect of graduation visible at 20 days but not at 8 and 33 days.

In fact, at 20 days, the propionate concentration varied between 0-7 mm ( $0.8 \pm 0.5 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$ ) and 35-42 mm ( $11 \pm 6 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$ ) and was responsible of the increase of the total metabolites concentration with the depth. Moreover, propionate can be produced during acidogenesis by glucose and  $\text{H}_2$  (Eq. (3) in Table 4-1) (Thauer et al., 1977). Since the concentration of propionate was higher in the depth of the medium, and the mass transfer was limited, the concentration of dissolved  $\text{H}_2$  may be higher in the depth than near the surface. Therefore, a concentration gradient of dissolved  $\text{H}_2$  may happen in the medium during solid-state anaerobic digestion. Additionally, the  $\text{H}_2$  may have been consumed near the exchange surface with the small quantities of  $\text{CO}_2$  present in the headspace to produce  $\text{CH}_4$ , even though this production was very low. This hypothesis may explain why the  $\text{CO}_2$  present in the headspace was very low in the tubes compared to the flasks, since  $\text{CO}_2$  is the limiting reactive agent when  $P_{\text{H}_2}$  is high (Cazier et al., 2015).

Table 4-1: Free reaction enthalpies for the production of propionate from  $\text{H}_2$  and the consumption of propionate and  $\text{H}_2$  to produce acetate (De Bok et al., 2004; Thauer et al., 1977)

Equations	$\Delta G^{\circ}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Eq. number
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2 \leftrightarrow 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	-359	(3)
$\text{C}_2\text{H}_5\text{COO}^- + 3 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3 \text{H}_2$	+76	(4)
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	-105	(5)

The increase of the percentage of acetate in the total metabolites between 20 and 33 days is related to the decrease of the propionate concentration during the same period. For example, for the layer 35-42 mm, the propionate concentration decreased from  $11 \pm 6$  at 20 days to  $0.8 \pm 0.4$

$\text{g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  at 33 days, and the acetate concentration increased from  $5 \pm 6$  at 20 days to  $9 \pm 4 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  at 33 days. Therefore, the propionate may be consumed to produce acetate (Eq. (4) in Table 4-1) (De Bok et al., 2004). The  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$  produced during this reaction may also be used to produce acetate (Eq. (5) in Table 4-1). Using Eq. (4) and (5), the propionate consumed during 20 and 33 days (average in the tubes) may produce at the maximum  $7.19 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$  of acetate, which is near the measured acetate production at 33 days ( $6.41 \pm 3.31 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$ ). These results seem to show a change of the reactions in the medium, from acidogenesis at day 20 to acetogenesis at day 33.

Therefore, a concentration gradient of metabolites, and mostly propionate accumulated at 20 days, may be due to a local accumulation of  $\text{H}_2$ , with an accumulation of dissolved  $\text{H}_2$  at 35-42 mm, due to the limitation of the mass transfer in the tubes, compared to the flasks. A gradient of metabolites concentration was still visible at 33 days, mostly of acetate but the difference of metabolites concentration between 0-7 cm and 35-42 cm seems to be reduced, due to a change of the main reaction in the medium from acidogenesis at 20 days to acetogenesis at 33 days.

In the tubes, with the decrease of the diffusion and the liquid-gas transfer, the maximum metabolites concentration was  $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , which is below inhibitory values for anaerobic digestion (over  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Siegert and Banks, 2005). However, the presence of propionate and the inhibition of the hydrolysis seems to indict an accumulation of dissolved  $\text{H}_2$  in the medium (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Cazier et al., 2015). In the literature, the increase of the TS content will decrease the diffusion and the liquid-gas transfer, and the total metabolites concentration will increase enough to be inhibitory, with a decrease of the pH and the  $\text{CH}_4$  production (for example:  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  at 35% of TS, and pH 6, using cardboard as a substrate at  $35^\circ\text{C}$  and during 298 days (Abbassi-Guendouz et al., 2012)). This fact that the hydrolysis step does not seem to be inhibited in the literature at high TS content, contrary to our results, may be due to a difference in the mass transfer. Indeed, the limitation of the diffusion coefficient will be higher at 30-35% TS than at 25% TS (Bollon et al., 2013), however it is difficult to compare the liquid-gas transfer used in the tubes and the flasks (unknown) to the value of liquid-gas transfer used in ADM1 from 10 to 35% TS (between 0.5 to  $0.02 \text{ days}^{-1}$ ) (Abbassi-Guendouz et al., 2012). An explanation may be that the liquid-gas transfer was slower in our experiment, compared to the literature, and the local  $\text{H}_2$  accumulation increased enough to inhibit the hydrolysis step.

In addition, the *Bacteria* and *Archaea* communities did not change with the depth of the medium, contrary to the metabolites concentration (Supplementary materials). The fact that the microorganisms did not change with the depth may be due a low growth since the substrate degradation was also low.

In the present experiment, because of the pH buffer, the pH was stable around an average value of  $8.65 \pm 0.12$ . In a non-buffered solid-state anaerobic digestion reactor, the pH change may have an effect on the structuration of the medium. For example, Staley et al., (2011) reported a gradient of pH (from 8.2 at the surface to 6.2 at 22 cm) with a gradient of the TS content (from 15% at the surface to 35% at 22 cm), in a reactor with a depth of 22 cm of medium, with household waste as substrate. In our experiment, no spatial zone of pH or methanogens were detected, contrary to the hypothesis of initiation center for methanogenesis by Martin, (2001), Staley et al., (2011) and Vavilin and Angelidaki, (2005). This hypothesis considers that, for solid-state anaerobic digestion, two different zones are present in the medium: (1) a hydrolysis, acidogenesis and acetogenesis zone with

a high concentration of VFAs and a low pH and (2) a methanogenesis zone with a low VFAs concentration and a high pH. The limitation of the mass transfer regulates the diffusion of the VFAs in the medium to obtain a low VFAs concentration for the methanogens, with immediate consumption of all VFAs by the methanogens. Therefore, in a non-buffered solid-state anaerobic digestion reactor, the difference of dissolved H<sub>2</sub> concentration may have an effect on metabolites concentration, especially on the propionate and acetate concentration. The increase of the metabolites concentration in the depth of the medium will decrease the pH, which may have an effect on biological kinetics and inhibition, as well as microbial communities.

#### 4.1.6 Conclusion

This study provides new insights about the functioning of solid-state anaerobic digestion, especially on the role of dissolved gases. Since the diffusion is slowed down for solid-state anaerobic digestion, an increase of the depth of medium and a decrease of gas-liquid transfer can induce a decrease of the global performance of the solid-state anaerobic digestion, by inhibiting the hydrolysis. The limitation of mass transfer can also be responsible for a concentration gradient of metabolites in the medium, which may be due to local dissolved gases accumulation (especially H<sub>2</sub>) without effect on the communities of microorganisms.

#### **Acknowledgements**

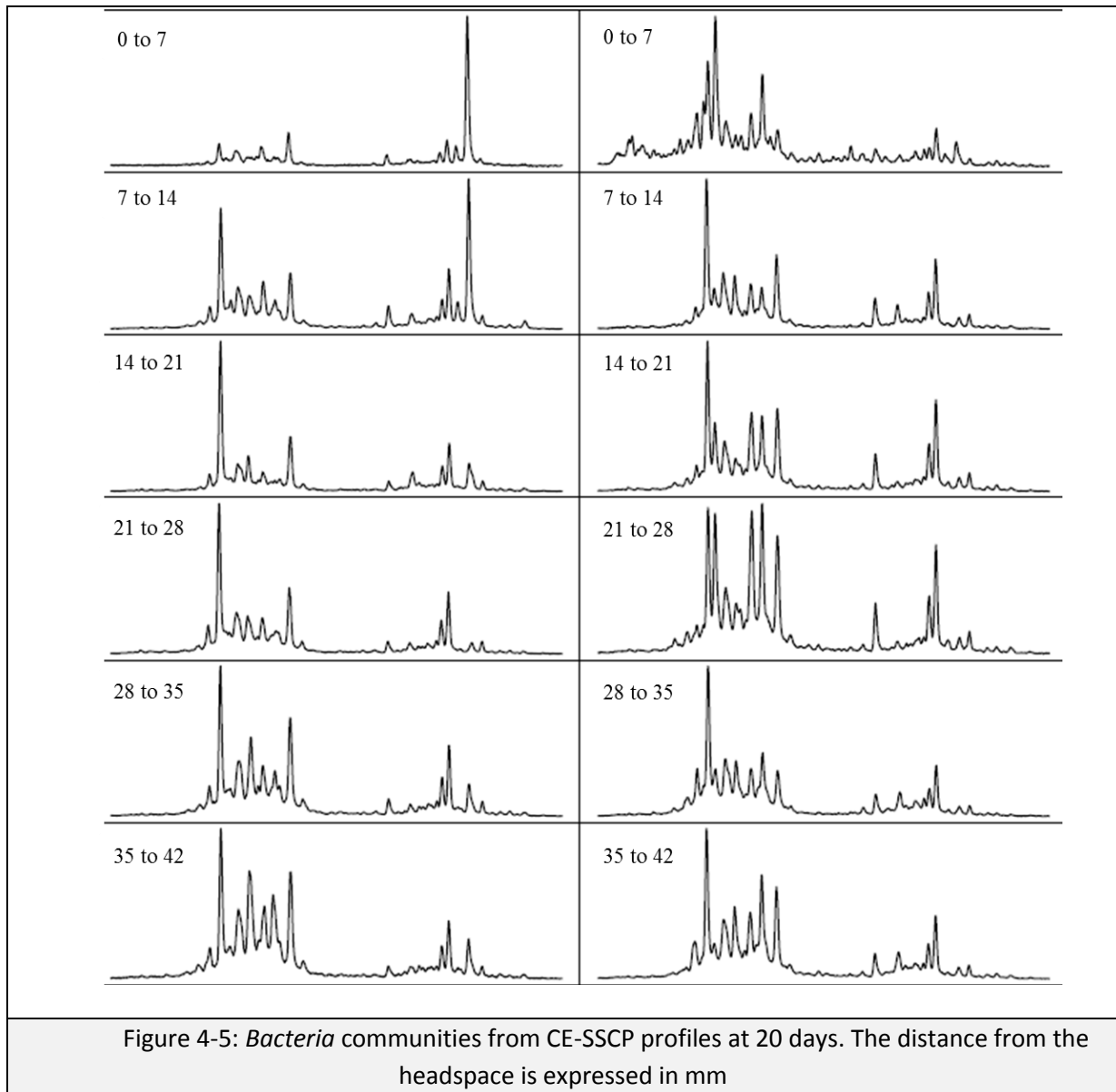
We thank Gaëlle Gevaudan for the technical assistance with the microbial analysis of this experiment. This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and the French Institute for Agricultural and Food Research (INRA).

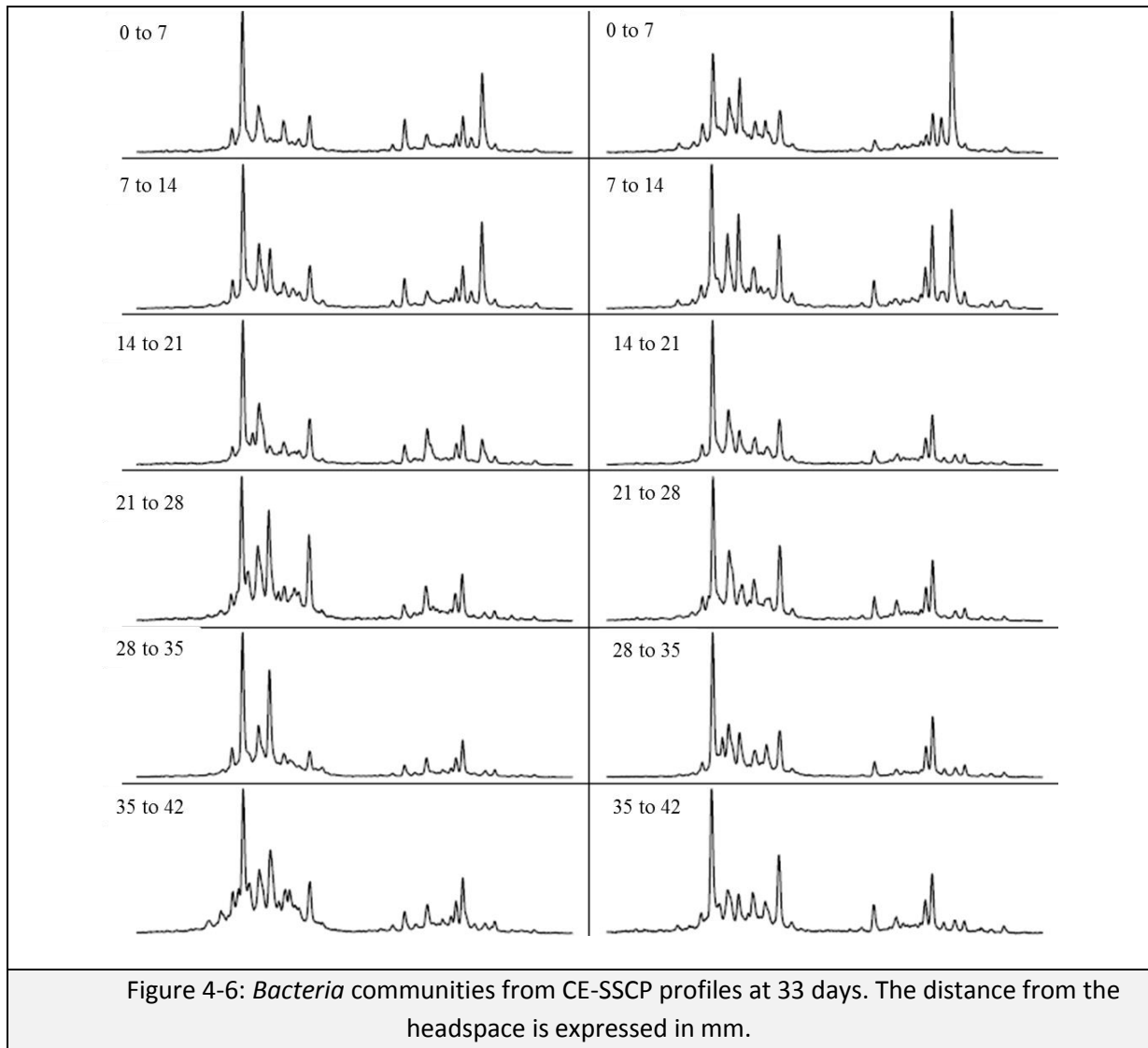
#### 4.1.7 Supplementary material

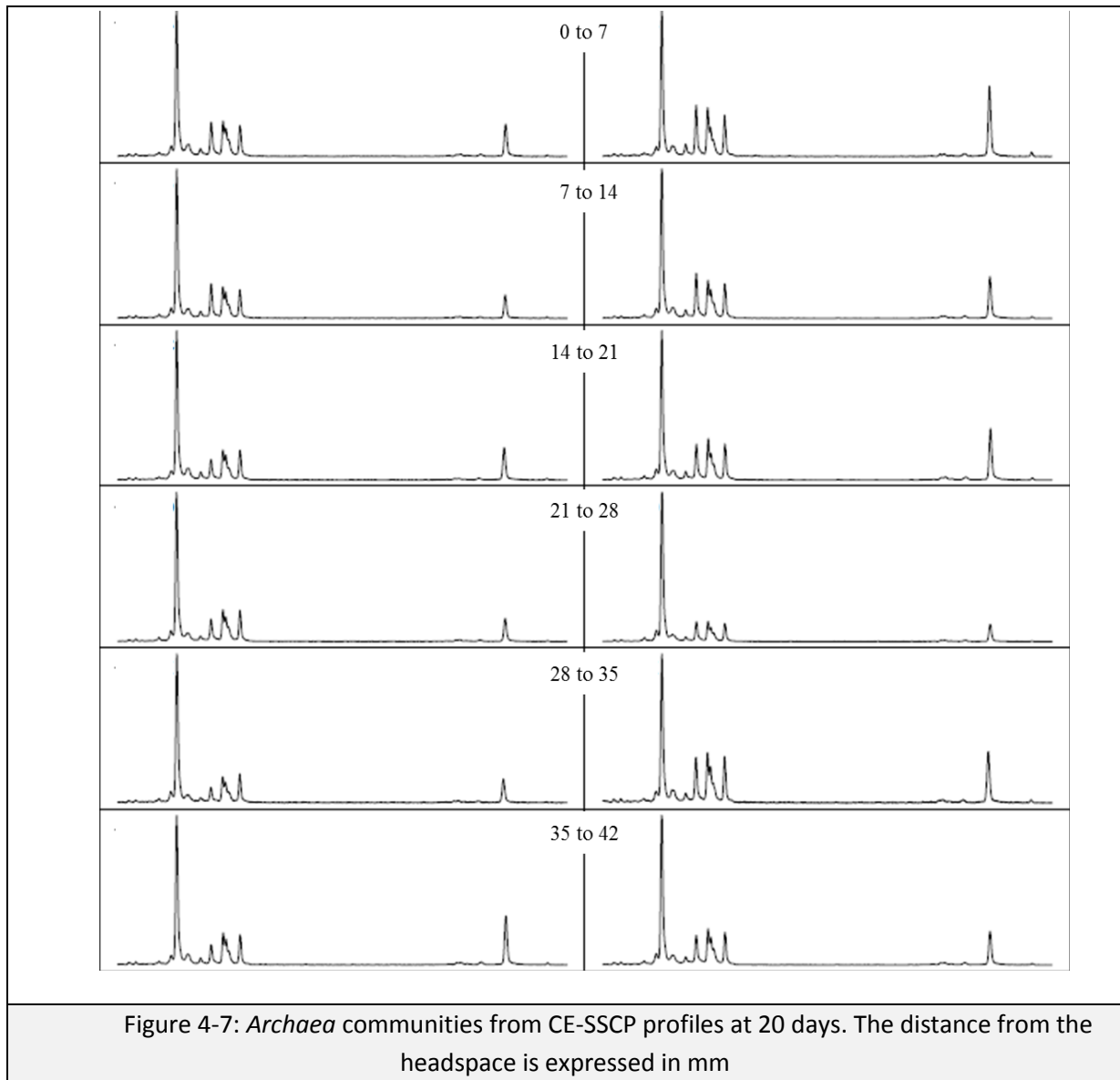
##### 4.1.7.1 **Profiles of the Bacteria and Archaea communities'**

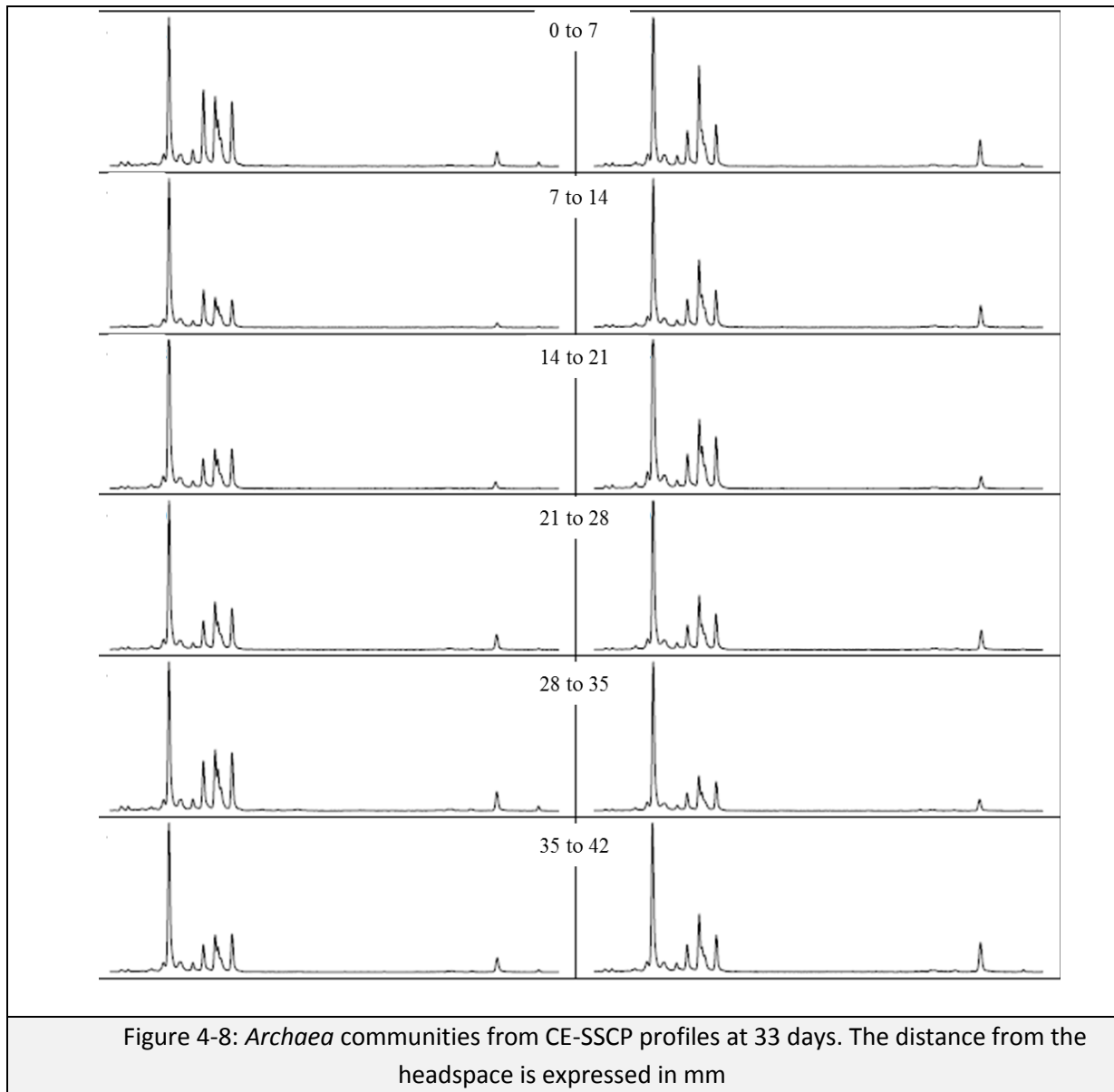
The profiles of the *Bacteria* and *Archaea* communities at 20 and 33 days are represented every 7 mm of medium. No differences were detected in the majority pics, from 0-7 mm to 35-42 mm, for the *Bacteria* and *Archaea* communities. Therefore, no structuration of microorganisms was visible, even if a structuration of VFAs was visible.





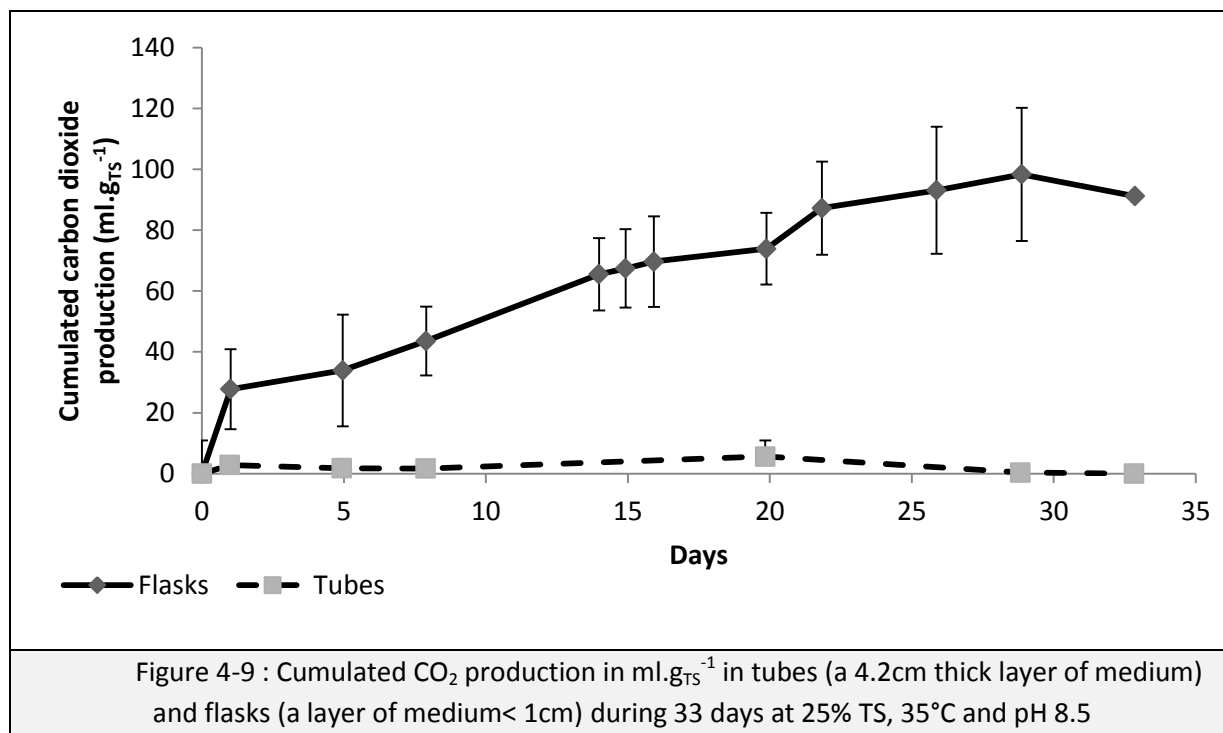






#### 4.1.7.2 ***Cumulated CO<sub>2</sub> production***

The CO<sub>2</sub> produced by the flask was higher than the CO<sub>2</sub> produced in the tubes since the beginning ( $27.7 \pm 1.5 \text{ ml}_{\text{CO}_2 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$  for the flasks and  $7.9 \pm 13 \text{ ml}_{\text{CO}_2 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$  for the tubes at 1 day) with a maximum of  $98 \text{ ml}_{\text{CO}_2 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$  at 29 days for the flask and maximum of  $6 \text{ ml}_{\text{CO}_2 \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}}$  at 20 days for the tubes. Therefore, no CO<sub>2</sub> was produced in the tubes, which is typical of an inhibition of the hydrolysis by H<sub>2</sub>.



#### 4.1.8 Résultats majeurs

Les transferts de matières (diffusion et transfert gaz-liquide) peuvent avoir un effet important sur le déroulement de la digestion anaérobie par voie sèche. En effet, les transferts de matières diminuent avec l'augmentation de la teneur en MS et le transfert gaz-liquide peut devenir limitant au-delà de 30% de MS (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013), ce qui peut provoquer des accumulations locales de molécules inhibitrices, comme par exemple l'H<sub>2</sub> (Cazier et al., 2015). Lorsque la diffusion est ralentie et le transfert gaz-liquide limitant, les performances de la digestion anaérobie diminuent, avec une baisse de la dégradation du substrat et de la production de CH<sub>4</sub>. Cette baisse de la performance de la digestion anaérobie peut être due à des accumulations locales d'H<sub>2</sub> dans le milieu qui inhibent l'hydrolyse (Cazier et al., 2015). De plus, la baisse des transferts de matière entraîne une structuration des AGVs dans le milieu (surtout du propionate), probablement à cause d'un gradient de concentration d'H<sub>2</sub> dans le milieu.

---

## **4.2 INFLUENCE DE L'HYDROGENE ET DU DIOXYDE DE CARBONE SUR LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE DE LA PAILLE DE BLE**

---

### **4.2.1 Introduction**

Dans le Chapitre 3: Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique, des expérimentations à l'échelle microscopique ont permis de démontrer que l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> était réversible par ajout de CO<sub>2</sub> lors de la digestion anaérobie par voie sèche. Ainsi, l'H<sub>2</sub> présent était consommé avec le CO<sub>2</sub> ajouté pour produire du CH<sub>4</sub>, et l'hydrolyse n'était plus inhibée, avec cependant un effet inhibiteur encore visible de cet H<sub>2</sub> sur la dégradation de l'acétate. Cependant, ces expériences ont été réalisées avec un milieu de moins d'1 cm d'épaisseur afin de limiter les effets de la diffusion. Cette réversibilité de l'inhibition de l'hydrolyse a donc été démontrée à une échelle locale. En voie humide, le mélange d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> peut aussi éviter l'effet inhibiteur de l'H<sub>2</sub>, avec une augmentation des produits, pour un effluent riche en carbohydrates avec un pH entre 5 et 3,7 (Arslan et al., 2012). L'ajout de CO<sub>2</sub> peut aussi avoir des effets négatifs, comme par exemple une baisse du pH, des effets inhibiteurs sur la dégradation du glucose, de l'acétate et du propionate ou sur la production d'acétate et de propionate ou encore sur la production de CH<sub>4</sub> (pour 1 bar de CO<sub>2</sub> à pH 7 et pour 2 bars de CO<sub>2</sub> à pH 5) (Arslan et al., 2012; Hansson and Molin, 1981).

L'objectif de cette étude a donc été de tester les effets de l'ajout du CO<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique. Ainsi, des expériences ont été réalisées pour évaluer l'ajout du CO<sub>2</sub> pour un milieu plus épais, en le comparant à l'effet de l'ajout de N<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>. Lors de ces expériences, un milieu contenant de la paille et un inoculum (teneur en MS de 25%), tamponné à pH 8 a été ajouté sur une hauteur de 8 cm et un diamètre de 3 cm. Ce dispositif comprenant deux ciels gazeux, de chaque côté du milieu réactionnel, avec un ajout journalier de gaz (N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>) dans le ciel gazeux du bas. Le matériel et méthodes sont décrits dans le chapitre 2.2.1 Echelle microscopique: tests en couche mince.

### **4.2.2 Résultats et discussion**

#### **4.2.2.1 Effet de l'ajout d'N<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche**

La production de CH<sub>4</sub> en fonction du temps est représentée dans la Figure 4-10 pour les différents gaz ajoutés. Les courbes de production de CH<sub>4</sub> sont proches lorsque de l'H<sub>2</sub> ou du N<sub>2</sub> ont été ajoutés. En effet, la production de CH<sub>4</sub> est proche après 28 jours de réaction dans le tubes où de l'N<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> ont été ajoutés ( $22 \pm 2,47 \text{ ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1}}$  et  $28 \pm 9,13 \text{ ml}_{\text{CH}_4 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1}}$ , respectivement). Une analyse ANOVA ne permet pas de distinguer statistiquement ces deux conditions expérimentales (Table 4-2). Ces deux gaz devraient cependant avoir un impact différent sur les réactions biologiques : le N<sub>2</sub> est un gaz neutre, sans effet particulier sur la digestion anaérobie, tandis que l'H<sub>2</sub> peut être utilisé

directement pour la production de CH<sub>4</sub> et peut avoir un effet inhibiteur sur l'hydrolyse pour de fortes pressions partielles (Cazier et al., 2015). De plus, si l'H<sub>2</sub> ajouté est transformé entièrement en CH<sub>4</sub>, au final, la production de CH<sub>4</sub> maximum correspondrait à  $6,4 \pm 0,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MS}}^{-1}$ , ce qui correspondrait à 8% environs du CH<sub>4</sub> produit à 28 jours. Ainsi, la quantité de CH<sub>4</sub> produite potentiellement à partir de l'ajout d'H<sub>2</sub> est minime par rapport à la quantité de CH<sub>4</sub> produite à 28 jours ( $80 \pm 19,7 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MS}}^{-1}$ ). Comme la production de CH<sub>4</sub> est similaire pour les deux gaz ajoutés, ce résultat semble indiquer que l'H<sub>2</sub> ajouté n'a pas eu d'effet sur la production de CH<sub>4</sub> par rapport au N<sub>2</sub> ajouté. De plus, il est possible que de l'H<sub>2</sub> dissous soit déjà présent dans les tubes où du N<sub>2</sub> a été ajouté.

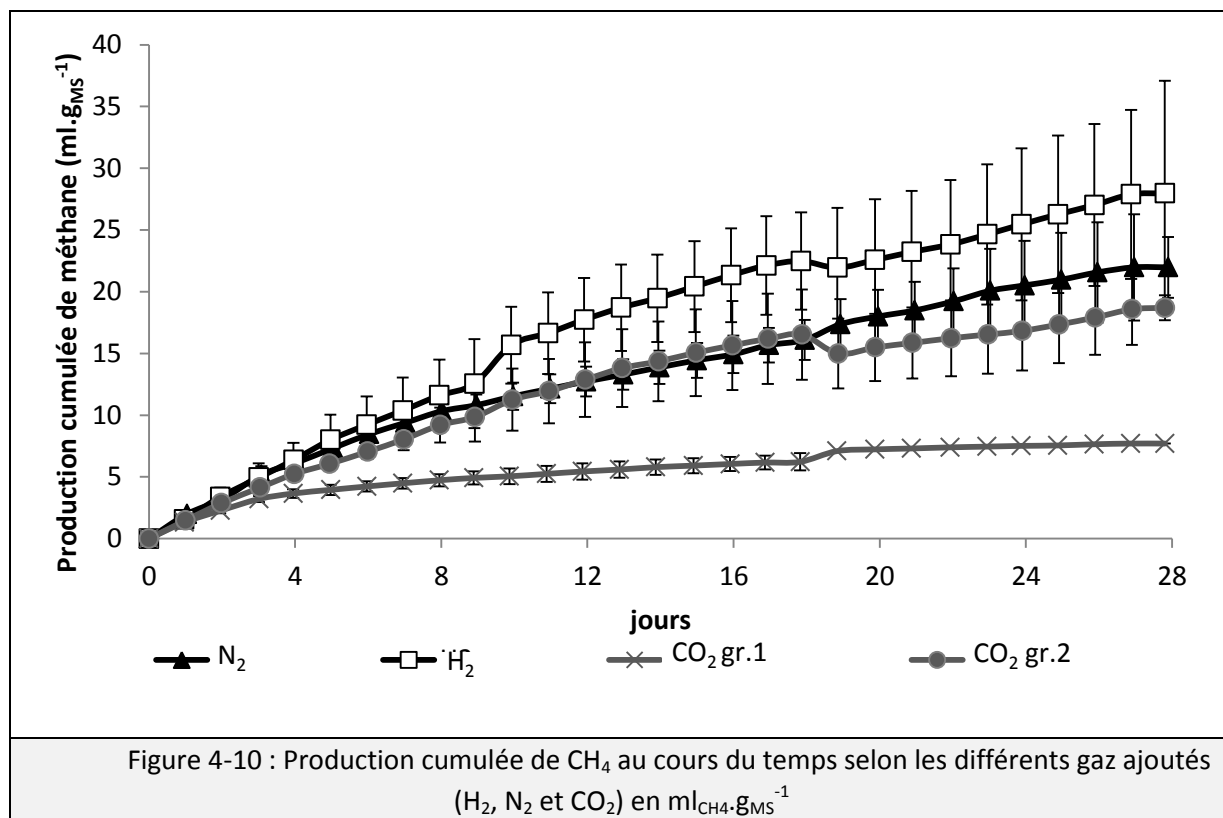
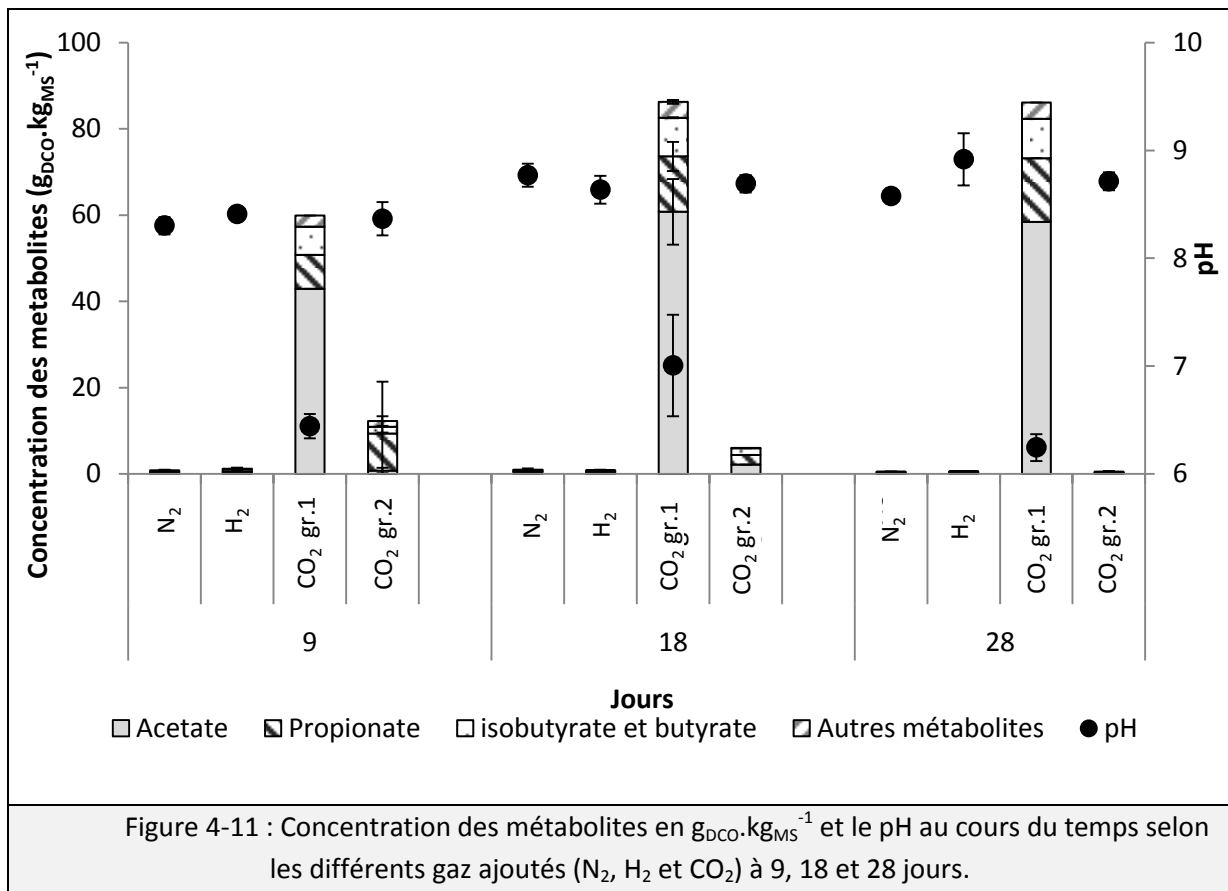


Table 4-2 : Similarités (p-value) par ANOVA pour la production cumulée de CH<sub>4</sub> et la dégradation de substrat à 9, 18 et 28 jours pour l'ajout de N<sub>2</sub>, de H<sub>2</sub>

Similaire pour une p-value > 0,05 et différent pour une p-value < 0,05.

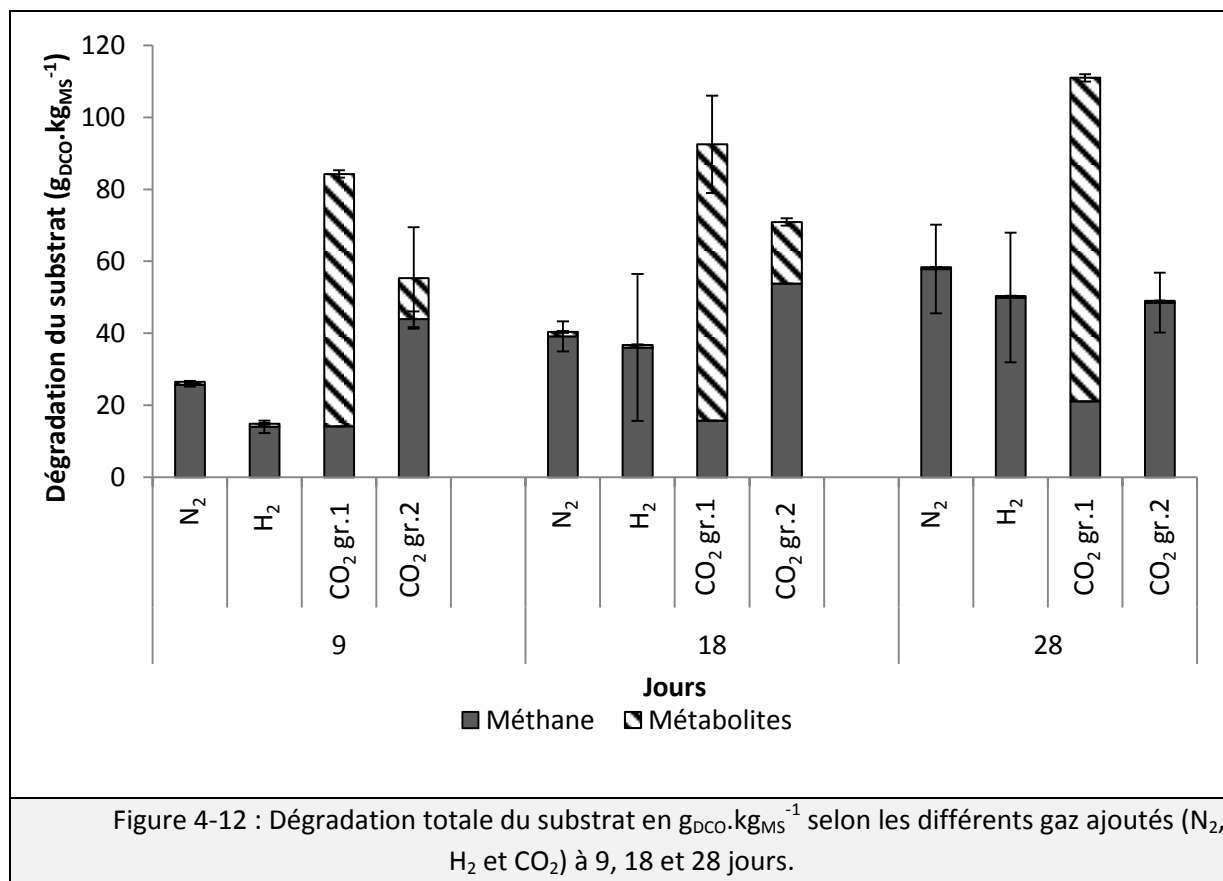
Conditions (gaz ajouté, temps d'analyse)	Comparé à (gaz ajouté, temps d'analyse)	p-value de la production cumulée de CH <sub>4</sub>	p-value de la dégradation totale du substrat
N <sub>2</sub> à 9 jours	N <sub>2</sub> à 28 jours	0,1109 (Similaire)	0,1594 (Similaire)
H <sub>2</sub> à 9 jours	H <sub>2</sub> à 28 jours	< 0,01 (Différent)	0,5935 (Similaire)
N <sub>2</sub> à 9 jours	H <sub>2</sub> à 9 jours	1 (Similaire)	0,9857 (Similaire)
N <sub>2</sub> à 18 jours	H <sub>2</sub> à 18 jours	0,9584 (Similaire)	1 (Similaire)
N <sub>2</sub> à 28 jours	H <sub>2</sub> à 28 jours	0,8071 (Similaire)	0,9994 (Similaire)



La Figure 4-11 présente la concentration en métabolites après 9, 18 et 28 jours de réaction pour les trois gaz ajoutés. La concentration de métabolites a été faible pour les tubes où de l' $N_2$  ( $0,8 \pm 0,5$  à 9 jours à  $0,5 \pm 0,1 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours) et de l' $H_2$  ( $1 \pm 0,7$  à 9 jours à  $0,6 \pm 0,3 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours) ont été ajoutés. Les métabolites produites sont essentiellement de l'acétate ( $0,46 \pm 0,02 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 9 jours à  $0,31 \pm 0,08 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours pour les deux gaz), du propionate ( $0,10 \pm 0,01 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 9 jours à  $0,04 \pm 0,01 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours) et du butyrate ( $0,36 \pm 0,03 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 9 jours à  $0,15 \pm 0,04 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours). La concentration en AGVs a augmentée pendant les 9 premiers jours puis est restée constante entre 9 et 28 jours. Le pH est resté constant au cours du temps, entre 8 et 9.

De plus, la dégradation du substrat, représentée dans la Figure 4-12, montre que celle-ci a été similaire dans les tubes ayant eu un ajout de  $N_2$  (de  $26 \pm 0,7$  à 9 jours à  $58 \pm 12 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours) ou de l' $H_2$  ( $15 \pm 2$  à 9 jours à  $50 \pm 18 g_{DCO} \cdot kg_{MS}^{-1}$  à 28 jours). Cette similarité de la dégradation du substrat entre les tubes avec ajout de  $N_2$  et de  $H_2$  a été validée statistiquement de 9 à 28 jours par ANOVA ( $p$ -value > 0,05) (Table 4-2). Lors du calcul de la dégradation du substrat, la quantité d' $H_2$  ajoutée est prise en compte dans l'état initial du système, ce qui conforte ici le peu d'effet de l' $H_2$  ajouté sur l'hydrolyse par rapport les tubes où du  $N_2$  est ajouté.





De plus, la dégradation du substrat pour N<sub>2</sub> est statistiquement identique à 9, 18 et 28 jours (test ANOVA, p-value > 0,05) (Table 4-2). De même, la dégradation du substrat a été similaire pour 9, 18 et 28 jours lorsque de l'H<sub>2</sub> est ajouté (Table 4-2). Par conséquent, l'hydrolyse semble avoir surtout lieu avant 9 jours. Ce résultat expliquerait pourquoi la concentration en métabolites n'a pas changé entre 9 et 28 jours, avec une inhibition de l'hydrolyse après les 9 premiers jours pour les tubes où de l'H<sub>2</sub> et du N<sub>2</sub> ont été ajoutés.

Du CO<sub>2</sub> a été produit dans le ciel gazeux pour les deux gaz ajoutés, avec une production finale de 8 ± 0,17 ml<sub>CO2</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours pour le N<sub>2</sub> et 12 ± 3 ml<sub>CO2</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours pour l'H<sub>2</sub>. Le fait que l'inhibition de l'hydrolyse est moins importante dans cette expérience que dans l'expérience précédente (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw) pourrait être due au fait que le milieu est mélangé par l'ajout des gaz (H<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>) avec une accumulation locale d'H<sub>2</sub> dissous plus faible.

L'H<sub>2</sub> est connu comme un inhibiteur de l'hydrolyse au niveau local, démontré en couche mince (Cazier et al., 2015), avec une inhibition à partir de 780 mbars d'H<sub>2</sub>. Or la dégradation du substrat a été la même pour N<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>, ce qui veut dire que l'inhibition de l'hydrolyse n'a pas été plus importante avec l'ajout d'H<sub>2</sub> qu'avec l'ajout de N<sub>2</sub>. Ainsi, il est possible de supposer que l'hydrolyse était déjà inhibée dans les tubes où de l'N<sub>2</sub> a été ajouté. Cette inhibition de l'hydrolyse semble confirmée par le fait que les valeurs de dégradation du substrat dans ces deux conditions correspondent aux valeurs de dégradation du substrat obtenues en couche mince sous inhibition par l'H<sub>2</sub> (50 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) (Cazier et al., 2015).

#### 4.2.2.2 Effet de l'ajout du CO<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche

Tout d'abord, de grandes différences ont été observées entre les réplicas des tubes où du CO<sub>2</sub> a été ajouté. Ainsi, la production cumulée de CH<sub>4</sub> (Figure 4-10) a été beaucoup plus faible pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 (22 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours) que pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2, (53 ± 8 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours). De plus, la production de méthane du groupe CO<sub>2</sub> gr.2 était similaire à celle de N<sub>2</sub>, confirmé par ANOVA (p-value > 0,8). La vitesse de production de CH<sub>4</sub> pour les deux groupes de CO<sub>2</sub> a été la même lors du premier jour de réaction (1,42 ± 0,08 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup>) avant de diminuer pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 (0,96 ± 0,2 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup> à 2 jours pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 et 1,42 ± 0,2 ml<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup> à 2 jours pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2).

La concentration totale en métabolites et le pH étaient également différents pour ces deux groupes (Figure 4-11). Ainsi, pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1, la concentration en métabolites augmente de 60 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 9 jours à 86 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 avec un pH de 6,57 ± 0,4. Pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2, la concentration en métabolites diminue de 12 ± 15 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 9 jours à 0,5 ± 0,2 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours avec un pH de 8,59 ± 0,2. La différence importante entre les concentrations en métabolites de ces deux groupes a été confirmée statistiquement par ANOVA (Table 4-3). En outre, la concentration totale en métabolites du groupe CO<sub>2</sub> gr.2 était similaire à celle de N<sub>2</sub>, confirmée par ANOVA (p-value > 0,05).

Table 4-3 : Similarités (p-value) par ANOVA pour la dégradation de substrat et la concentration en métabolites à 9, 18 et 28 jours pour les deux groupes de CO<sub>2</sub> (Différent pour une p-value < 0,05 et similaire pour une p-value > 0,05)

Conditions (gaz ajouté, temps d'analyse)	Comparé à (gaz ajouté, temps d'analyse)	p-value de la dégradation totale du substrat	p-value de la concentration des métabolites
CO <sub>2</sub> gr. 2 à 9 jours	CO <sub>2</sub> gr. 1 à 9 jours	0,7415 (Similaire)	<0,01 (Différent)
CO <sub>2</sub> gr. 2 à 18 jours	CO <sub>2</sub> gr. 1 à 18 jours	0,9418 (Similaire)	<0,01 (Différent)
CO <sub>2</sub> gr. 2 à 28 jours	CO <sub>2</sub> gr. 1 à 28 jours	<b>0,0322 (Différent)</b>	<0,01 (Différent)

Pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1, l'acétate est l'AGV qui possède la concentration la plus importante, allant de 43 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 9 jours à 59 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours (soit 18 g·L<sup>-1</sup> d'acétate pour une concentration totale en métabolites de 26 g·L<sup>-1</sup>). Cette forte concentration en acétate semble indiquer que le CO<sub>2</sub> ajouté a été utilisé pour produire de l'acétate par homoacétogénèse au lieu de produire du CH<sub>4</sub> comme cela a été le cas pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2. De plus, l'acétate produit n'a pas été converti en CH<sub>4</sub> par les méthanogènes acétotrophes, ce qui peut être dû au fait que cette concentration en acétate est supérieure à la concentration inhibitrice en voie sèche, qui est de 13 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 30% de MS et à pH 7 (Staley et al., 2011), ou à une concentration faible en méthanogènes acétotrophes. En outre, le pH est descendu de 7 à 6,2, ce qui peut inhiber l'activité des méthanogènes (pour un pH inférieur à 6,6) (Chandra et al., 2012; Dague, 1968; Huang et al., 2014; Meena Krishania et al., 2013) et augmenter également la toxicité des AGVs (Mata-Alvarez, 2003). Les autres métabolites produits ont été le propionate (8 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 9 jours à 15 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours) et le butyrate (7 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 9 jours à 9 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours). Ces concentrations élevées en AGVs peuvent être expliquées par le fait que le CO<sub>2</sub> est connu pour avoir un effet inhibiteur sur la

dégradation d'acétate et de propionate pour 1 bar de CO<sub>2</sub> à pH 7 (Hansson and Molin, 1981) avec un effet positif sur la production de butyrate à un pH acide (Arslan et al., 2012; Kim et al., 2006).

La dégradation du substrat a été similaire entre les deux groupes à 9 (84 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 et 55 ± 16 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2) et 18 jours (92 ± 14 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 et 71 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2). Cependant, après 28 jours, la dégradation du substrat est plus importante pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 (110 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup>) que le groupe CO<sub>2</sub> gr.2. (49 ± 8 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours), et cette différence est validée statistiquement par ANOVA (Table 4-3). En outre, la dégradation du substrat pour les deux groupes à 9 jours a été beaucoup plus importante que celles obtenues dans les tubes dans lequel de N<sub>2</sub> a été ajouté à 9 jours (26 ± 0,67 g<sub>DCO</sub>·kg<sub>MS</sub><sup>-1</sup>). Cette amélioration de l'hydrolyse par ajout de CO<sub>2</sub> pourrait être expliquée par la présence d'H<sub>2</sub> dissous dans le milieu et une consommation de l'H<sub>2</sub> dissous avec le CO<sub>2</sub> ajouté, ce qui lèverait l'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> à 9 jours (cf. 3.2 Reversibility of hydrolysis inhibition by hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion). Cependant, après l'hydrolyse, les produits majoritaires sont différents pour les deux groupes dès 9 jours, avec des AGVs pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.1 (82% ± 2% de métabolites) et du méthane pour le groupe CO<sub>2</sub> gr.2 (88% ± 14% de CH<sub>4</sub>).

La dégradation totale du substrat a peu évolué entre 9 et 28 jours pour les deux groupes, mais pour des raisons différentes. Ainsi, le peu de variation pour le groupe CO<sub>2</sub> gr. 1 serait plutôt dû à une inhibition de l'hydrolyse par le pH et la concentration en AGVs (Siegert and Banks, 2005; Veeken et al., 2000) alors qu'il est plus difficile d'expliquer le peu d'évolution de la dégradation du substrat pour le groupe CO<sub>2</sub> gr. 2. La dégradation du substrat du groupe CO<sub>2</sub> gr. 2 à 28 jours est proche de celles obtenues au final pour les tubes avec ajout de N<sub>2</sub> ou de H<sub>2</sub>. Ce résultat peut laisser supposer que la concentration en H<sub>2</sub> dans le milieu entre 9 et 28 jours est devenue suffisamment importante pour inhiber l'hydrolyse, malgré l'ajout de CO<sub>2</sub> pour le groupe CO<sub>2</sub> gr. 2.

Dans cette expérience, la concentration en H<sub>2</sub> dissoute dans le milieu pourrait donc être proche de la valeur limite d'inhibition de l'hydrolyse. L'ajout de CO<sub>2</sub> pourrait potentiellement lever cette inhibition en consommant l'H<sub>2</sub> présent pour faire de l'acétate ou du CH<sub>4</sub>. Cependant, l'ajout de CO<sub>2</sub> peut abaisser le pH et inhiber ainsi l'hydrolyse et la méthanogenèse. La levée de cette inhibition n'a pas été réalisée à chaque fois que CO<sub>2</sub> a été ajouté (4 tubes avec une production de CH<sub>4</sub> importante mais avec l'hydrolyse bloquée de nouveau après 9 jours et 5 tubes avec une production de métabolites importante et une inhibition de l'hydrolyse par le pH à partir de 9 jours), ce qui est différent de ce qui a été obtenu à l'échelle microscopique (Cazier et al., 2015). La différenciation entre ces deux groupes pourraient être due à une disponibilité de l'H<sub>2</sub> dissous différente dans le milieu, due à une hétérogénéité importante en voie sèche (Staley et al., 2011). Ainsi, la disponibilité plus faible de l'H<sub>2</sub> dissous dans le milieu peut être un facteur limitant pour les méthanogènes hydrogénotrophes (Bagi et al., 2007) et donc favoriser la production de métabolites.

De plus, la surface d'échange faible dans ces réacteurs (diamètre de 3 cm) va diminuer la surface d'échange spécifique (a) selon la formule suivante, avec le volume (V) :  $a = \frac{S}{V}$ . Ainsi, la surface d'échange spécifique est de 12,5 m<sup>3</sup>·m<sup>2</sup> pour cette expérience (hauteur de 8 cm), ce qui est faible (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw), puisque dans les expériences précédentes, la surface d'échange spécifique était de 23,8 m<sup>3</sup>·m<sup>2</sup> pour les tubes (transfert gaz-liquide limitant) et de 100 m<sup>3</sup>·m<sup>2</sup> pour les fioles en couche mince (transfert gaz-liquide non limitant). Ainsi, le transfert gaz-liquide va être limitant durant l'expérience, ce qui correspond à

ce qui se passe lors de la digestion anaérobie par voie sèche pour une teneur en MS inhibitrice (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b). Ainsi, lorsque le transfert gaz-liquide devient limitant, l' $H_2$  s'accumule dans le milieu et va inhiber l'hydrolyse (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw). De plus, lorsque le  $CO_2$  s'accumule, deux effets différents peuvent se passer : (1) une production importante d'AGVs avec une baisse du pH et de la méthanogénèse ou (2) une production normale de  $CH_4$  avec une inhibition de l'hydrolyse. La première situation est similaire à ce qui est obtenu au-delà de 30% de MS lors de la digestion anaérobie du carton à 35°C, avec une limitation du transfert gaz-liquide (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Ainsi, en passant de 25% à plus de 30% de MS, la concentration en AGVs passe de 0 à plus de 30  $g.L^{-1}$ , le pH diminue de 8 à 6 et la production de  $CH_4$  de 180 à 50  $ml.g_{MV}^{-1}$ . L'accumulation de  $CO_2$  pourrait donc être responsable de la diminution des performances de la digestion anaérobie avec l'augmentation de la teneur en MS.

Aucun effet de l'ajout des gaz n'a été détecté sur les communautés d'archées ou de bactéries au cours du temps. Ce résultat peut être dû au fait que la dégradation du substrat a été faible, ce qui a pu limiter la croissance des microorganismes.

### **4.2.3 Conclusion**

Cette étude apporte une meilleure compréhension sur le rôle des gaz dissous lors de la digestion anaérobie par voie sèche et plus spécifiquement sur l' $H_2$ . Ainsi, la concentration en  $H_2$  dissoute dans le milieu semble jouer un rôle important, puisqu'elle peut inhiber l'hydrolyse lors de la digestion anaérobie par voie sèche. L'ajout de  $CO_2$  dans le milieu peut lever cette inhibition avec cependant deux comportements différents possibles. Dans un 1<sup>er</sup> cas, la production d'AGVs est importante avec une baisse rapide du pH et une faible production de  $CH_4$ . Dans un 2<sup>ème</sup> cas, la production de  $CH_4$  est plus importante, avec un pH basique et sans production importante d'AGVs. La formation de deux groupes différents pour l'ajout de  $CO_2$  pourrait dépendre d'autres caractéristiques, comme par exemple de variations des concentrations locales en  $H_2$  dissous. Ainsi, l'accumulation de  $CO_2$  pourrait être responsable de la diminution des performances de la digestion anaérobie pour des teneurs en MS trop importante.

### 4.3 DISCUSSION DU CHAPITRE 4

En digestion anaérobie par voie sèche, le transfert de matière des molécules dissoutes diminue avec la teneur en MS (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013). Cette diminution des transferts de matières peut amener des accumulations locales de gaz dissous, comme par exemple l'H<sub>2</sub> ou le CO<sub>2</sub>, qui peuvent avoir un effet sur la digestion anaérobie. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre a été d'étudier l'influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé à l'échelle mésoscopique, dont les résultats sont résumés dans la Figure 4-13.

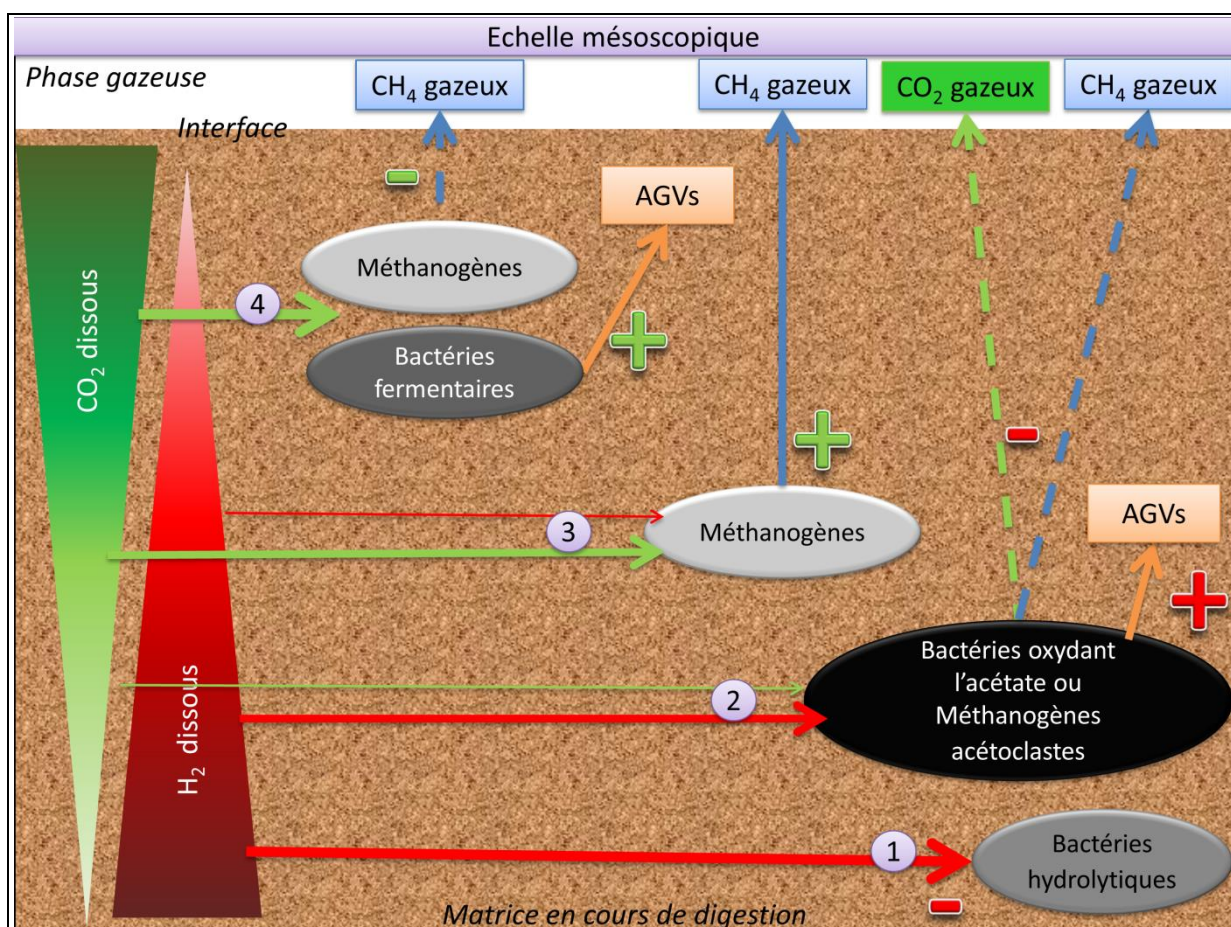


Figure 4-13 : Schéma de synthèse du chapitre 4 :

Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique .  
Rapport des effets de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie à l'échelle mésoscopique.

Avec 1 : inhibition de l'hydrolyse dû à une concentration importante en H<sub>2</sub> dissous; 2 : production d'AGVs sans effet sur le pH et baisse faible de la production de CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub>; 3 : amélioration de la production de CH<sub>4</sub>; 4 : production importante d'AGVs, baisse de pH et inhibition de la production de CH<sub>4</sub>. En pointillé : la baisse de la production des gaz ; en rouge : l'hydrogène ; en vert : le dioxyde de carbone ; en bleu : le méthane et en orange : les acides gras volatiles.

Tout d'abord, une première expérience a testé l'influence du transfert gaz-liquide sur la digestion anaérobie par voie sèche, en faisant varier l'épaisseur du milieu. Cette expérience a permis de démontrer que la surface d'échange et la diffusion avaient des effets importants sur la digestion anaérobie par voie sèche, avec une diminution de la production de  $\text{CH}_4$  et de l'hydrolyse avec la surface d'échange. Cette expérience a ainsi confirmé que la diminution du transfert de gaz-liquide (qui diminue avec la surface d'échange) a un effet limitant sur la digestion anaérobie par voie sèche. De plus, un gradient de concentration d'AGVs peut se mettre en place au sein du milieu pendant la digestion anaérobie et son origine peut être potentiellement liée à un gradient de concentration en  $\text{H}_2$ . Ainsi, la concentration en  $\text{H}_2$  dissous dans le milieu serait hétérogène et aurait un rôle important dans le déroulement de la digestion anaérobie par voie sèche ainsi que dans la structuration des métabolites dans le milieu. Cependant, aucune variation des communautés microbiennes et du pH n'ont été détectés, contrairement aux hypothèses de Martin, (2001; Vavilin and Angelidaki, (2005).

Une deuxième expérience a testé les effets de l'ajout de différents gaz ( $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  et  $\text{CO}_2$ ) sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique. Ces gaz ont été ajoutés tous les jours pendant 28 jours dans des tubes. Tout d'abord, cette expérience a permis de démontrer que lors de la digestion anaérobie par voie sèche, la concentration en  $\text{H}_2$  joue un rôle important et peut expliquer les performances plus faibles de la digestion anaérobie en voie sèche par des inhibitions locales de l'hydrolyse, dues à des concentrations locales dissoutes de  $\text{H}_2$  importantes. L'ajout de  $\text{CO}_2$  pourrait lever cette inhibition avec cependant des risques d'acidification du milieu, avec des baisses de pH pouvant limiter la méthanogenèse. Cependant, cette expérience montre aussi que l'hétérogénéité du milieu est importante en voie sèche. Ainsi, l'ajout de  $\text{CO}_2$  dans les mêmes conditions a donné lieu à deux groupes ayant des comportements très différents. Ainsi, un groupe avait une hydrolyse plus faible, un pH basique et une production de  $\text{CH}_4$  équivalente aux tubes avec ajout de  $\text{N}_2$  alors que l'autre groupe avait une hydrolyse plus importante, une concentration en AGVs plus importante mais une production de  $\text{CH}_4$  plus faible, l'hydrolyse ayant été activée mais ayant provoqué une inhibition proche de celle observée pour des teneurs en MS trop élevées (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Motte et al., 2013a).

#### 4.3.1 Les gaz dissous lors de la digestion anaérobie par voie sèche: de l'échelle microscopique à l'échelle mésoscopique.

**Le dioxyde de carbone présente des effets très différents selon l'échelle d'analyse.** Ainsi, dans un milieu de moins de 1 cm d'épaisseur (transferts de matière non limitants), l'ajout de  $\text{CO}_2$  seul n'a pas eu d'effet inhibiteur, avec une amélioration de la production de  $\text{CH}_4$ . Ainsi, le  $\text{CO}_2$  ne va pas avoir d'effet inhibiteur à l'échelle locale. Cependant, dans un milieu de 8 cm d'épaisseur (avec en plus le transfert gaz-liquide limitant et l'effet de la diffusion), le  $\text{CO}_2$  a eu deux comportements différents :

- Une levée de l'inhibition de l'hydrolyse, puis une acidification rapide avec une baisse du pH.
- Une production de  $\text{CH}_4$  sans effets sur la production d'AGVs ou sur le pH.

Ainsi, à l'échelle mésoscopique, la diffusion du  $\text{CO}_2$  dans le milieu peut poser problème et l'ajout de  $\text{CO}_2$  peut avoir un rôle inhibiteur sur les performances de la digestion anaérobie par voie

sèche. Comme le CO<sub>2</sub> n'a pas eu d'effet inhibiteur à l'échelle microscopique, il semble probable que l'effet inhibiteur du CO<sub>2</sub> dans les tubes soit lié à la limitation de transfert gaz-liquide et à l'effet de la diffusion dans le milieu, ce qui peut amener à l'accumulation de l'H<sub>2</sub> dans le milieu, visible dans les tubes avec N<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Il est possible de poser des hypothèses afin d'expliquer ces comportements, en prenant en compte les concentrations locales dissoutes en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> mais en prenant surtout en compte le rapport des effets de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>. Ainsi, la production importante d'AGVs avec une baisse du pH et une production faible en CH<sub>4</sub> se déroulerait lorsque la concentration dissoute locale en H<sub>2</sub> est faible et la concentration en CO<sub>2</sub> importante alors que la production d'AGVs faible, avec un pH basique et une production plus importante de CH<sub>4</sub> se déroulerait lorsque les concentrations locales en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> sont importantes en voie sèche (Table 4-4), comme par exemple pour une teneur en MS supérieure à 30% (Abbassi-Guendouz et al., 2012).

Table 4-4 : Hypothèses de fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche selon les concentrations locales d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>.

Avec en italique les résultats expérimentaux de cette thèse ; <sup>(1)</sup> 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw ; <sup>(2)</sup> 4.2 Influence de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé ; <sup>(3)</sup> 3.2 Reversibility of hydrolysis inhibition by hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion; <sup>(4)</sup> 3.3 L'effet du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique; <sup>(5)</sup> Amani et al., (2010); <sup>(6)</sup> Arslan et al., (2012); <sup>(7)</sup> Bru et al., (2012); <sup>(8)</sup> Cazier et al., (2015); <sup>(9)</sup> Hansson and Molin, (1981); <sup>(10)</sup> Massé and Droste, (2000).

Quantité d'H <sub>2</sub> locale	Quantité de CO <sub>2</sub> locale	Hypothèses de fonctionnement	Observations
Faible	Faible	Pas d'inhibition Déroulement normale de la digestion anaérobie	<i>Pas de variation de la production de CH<sub>4</sub> ou d'AGVs pour une P<sub>H2</sub> ≤ 500 mbars <sup>(8)</sup></i>
Moyenne	Faible	Production d'AGVs Pas d'effet sur le pH	<i>La production d'AGVs augmente pour 500 &lt; P<sub>H2</sub> &lt; 780 mbars <sup>(8)</sup></i>  <i>Un gradient de propionate se met en place lors de la digestion anaérobie par voie sèche <sup>(1)</sup></i>  <i>La dégradation des AGVs (acétate, propionate, butyrate) est inhibée pour P<sub>H2</sub> &lt; 40 mbar <sup>(5);(10)</sup></i>  <i>La production d'AGVs augmente avec l'ajout de 2 bars d'H<sub>2</sub> (pH 4,4) <sup>(6)</sup></i>
Elevée	Faible	Inhibition de l'hydrolyse	<i>Inhibition de l'hydrolyse pour une P<sub>H2</sub> &lt; 780 mbars <sup>(8)</sup></i>
Faible	Moyenne	Amélioration de la production de CH <sub>4</sub>	<i>Amélioration de la production de CH<sub>4</sub> dès P<sub>CO2</sub> ≥ 737 mbars <sup>(4)</sup></i>

Quantité d'H <sub>2</sub> locale	Quantité de CO <sub>2</sub> locale	Hypothèses de fonctionnement	Observations
Faible	Elevée	Production d'AGVs Baisse du pH Baisse de la production de CH <sub>4</sub>	<p><i>La production d'AGVs augmente avec une diminution du pH lorsque du CO<sub>2</sub> est ajouté quotidiennement<sup>(2)</sup></i></p> <p>La quantité de NaOH ajoutée pour maintenir le pH à 5,5 augmente pour un débit de CO<sub>2</sub> de 500 ml.min<sup>-1</sup> par rapport à 30 ml.min<sup>-1</sup><sup>(7)</sup></p> <p>La production d'AGVs augmente pour un ajout de 2 bars de CO<sub>2</sub> (pH 4,5)<sup>(6)</sup></p> <p>Inhibition de la dégradation des AGVs pour une P<sub>CO2</sub> de 50 à 1 000 mbars et baisse du rendement de production de CH<sub>4</sub> de 10%<sup>(9)</sup></p>
Elevée	Elevée	Pas d'inhibition Déroulement normale de la digestion anaérobie	<i>Déroulement normale de la digestion anaérobie lorsque le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> sont ajoutés en même temps<sup>(8)</sup></i>

Ainsi, la concentration dissoute en H<sub>2</sub> seule ne serait pas le seul facteur à avoir un effet sur la digestion anaérobie par voie sèche et ce serait **le rapport des effets simultanés des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> qui aurait un effet inhibiteur visible ou non**. Cette hypothèse semble être validée par les travaux de Bru et al., (2012). Durant ces expériences, du CO<sub>2</sub> a été ajouté pendant 20 min à différents débits avant de flusher de nouveau à l'azote et de mesurer la production d'H<sub>2</sub> dans le milieu. Pendant les expériences, le pH a été maintenu à 5,5 par ajout d'acide ou de base. Pour un débit de CO<sub>2</sub> de 500 ml.min<sup>-1</sup>, c'est-à-dire peu ou pas d'H<sub>2</sub> et beaucoup de CO<sub>2</sub>, une quantité de base importante a été nécessaire pour maintenir le pH, alors que pour un débit de 30 ml.min<sup>-1</sup>, c'est-à-dire un peu d'H<sub>2</sub> et peu de CO<sub>2</sub>, une quantité plus faible d'acide a été nécessaire pour maintenir le pH. En comparant avec notre hypothèse, lorsque la quantité de d'H<sub>2</sub> est faible et la quantité de CO<sub>2</sub> est élevée, la concentration en AGVs est importante avec un pH acide, comme dans le cas de Bru et al., (2012). De plus, lorsque les concentrations de H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> seraient plus proches, aucun effet de ces deux gaz ne serait visible sur le déroulement de la digestion anaérobie, comme par exemple pour un débit de CO<sub>2</sub> de 100 ml.min<sup>-1</sup> chez Bru et al., (2012), avec le même comportement que pour le témoin sans ajout de CO<sub>2</sub>.

Ainsi, lorsque la teneur en MS augmente en digestion anaérobie, la production de CH<sub>4</sub> diminue avec une augmentation de la concentration en AGVs et une baisse du pH (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Forster-Carneiro et al., 2008; Xu et al., 2014), ce qui pourrait être expliqué par des accumulations locales de CO<sub>2</sub> plus importantes que les accumulations locales d'H<sub>2</sub>. De même, le fait que l'acidité du milieu soit plus importante à 30% de MS par rapport à 20% de MS pourrait être expliqué par une concentration dissoute en H<sub>2</sub> locale plus faible à 30% de MS qu'à 20% par rapport à la concentration en CO<sub>2</sub> (accumulation locale plus importante de CO<sub>2</sub>), dû à une diminution du transfert gaz-liquide et de la vitesse de diffusion (Benbelkacem et al., 2015b; Fernández et al., 2008). De plus, la dégradation du substrat diminue aussi avec la teneur en MS, ce qui semble aussi indiquer



une concentration locale en H<sub>2</sub> plus importante (Fernández et al., 2008). Ainsi, les concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> seraient hétérogènes localement lors de la digestion anaérobie par voie sèche, et auraient des effets inhibiteurs locaux différents selon ces concentrations, ce qui expliquerait aussi les hétérogénéités de pH et des AGVs selon la profondeur dans des réacteurs non agités où la variation de teneurs en MS est importante (13 à 50% de MS sur 22 cm de milieu) (Staley et al., 2011).

#### 4.3.2 Le rôle du transfert de matière lors de la digestion anaérobie par voie sèche.

Lors de la digestion anaérobie par voie sèche, les transferts de matières diminuent jusqu'à pouvoir inhiber indirectement la digestion anaérobie si la teneur en matière sèche est suffisamment élevée (Abbassi-Guendouz et al., 2012). Au-delà de l'accumulation d'AGVs, largement documentée, **le transfert gaz-liquide semble jouer un rôle primordial lors de la digestion anaérobie par voie sèche** et il peut être amélioré en augmentant la surface d'échange. En effet, les performances de la digestion anaérobie par voie sèche sont plus importantes avec un milieu de faible épaisseur qu'avec un milieu avec une épaisseur plus importante (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw). Ainsi, lors d'études de la digestion anaérobie en voie sèche dans des réacteurs batchs non mélangés, il semble nécessaire d'utiliser des digesteurs possédant une surface d'échange importante et une épaisseur du milieu faible, comme des réacteurs à « couche mince », utilisés dans nos travaux, afin d'améliorer les transferts de matières dans le milieu.

Contrairement à ce qui a été supposé par Martin, (2001) et Vavilin et Angelidaki, (2005), aucune structuration des microorganismes n'a été détecté dans nos expériences, malgré la structuration de la concentration en H<sub>2</sub> dissous et des AGVs. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette absence de structuration des microorganismes pendant nos expériences, malgré la baisse du transfert gaz-liquide :

- **Les différences de concentrations en AGVs** produites à partir de l'H<sub>2</sub> dans nos expériences ne sont pas suffisantes pour avoir un effet sur les communautés microbiennes.
- **Les AGVs sont beaucoup moins toxiques pour un pH supérieur à 6**, comme cela est le cas pour nos expériences. En effet, la toxicité des AGVs dépend aussi du pH, puisque la forme toxique est la forme non dissociée des AGVs. Cette forme devient majoritaire pour un pH faible et peut inhiber les méthanogènes (Vedrenne, 2007) et les bactéries hydrolytiques (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Veeken et al., 2000).
- **L'inhibition de l'hydrolyse par l'H<sub>2</sub> ou par la baisse du pH inhibe la croissance des microorganismes**, ce qui empêche d'observer une modification de la structure des communautés microbiennes. Ainsi, les microorganismes peuvent être présents malgré des conditions non favorables mais sans croissance. Par exemple, les méthanogènes peuvent être présentes pour un pH de 5 (Grimberg et al., 2015) et devenir actives lorsque le pH augmente de nouveau (Ariunbaatar et al., 2015; Chandra et al., 2012). Ainsi, cette hypothèse pourrait aussi de justifier pourquoi aucune structuration des microorganismes n'a été trouvé dans les réacteurs de Staley et al., (2011), malgré les variations de pH (6 à 8,4).

Une inhibition de la croissance des microorganismes par l'hydrogène (dû à l'inhibition de l'hydrolyse) semble être l'hypothèse la plus probable pour expliquer la non-structuration des microorganismes. En effet, aucune variation de la quantité de microorganismes au cours du temps n'a été vu lors de l'inhibition de l'hydrolyse par l'hydrogène en couche mince (Cazier et al., 2015).

### **4.3.3 Effet de l'agitation sur la digestion anaérobie par voie sèche**

Lors des expériences d'ajout de gaz dans les tubes (cf. 4.2 Influence de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé), aucune structuration des AGVs en fonction de la concentration en hydrogène n'a été visible sur les 8 cm de hauteur de milieu, comme cela a été le cas lors des expériences précédentes (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw). **Ainsi, l'ajout de gaz dans le milieu (N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) peut aussi agiter le milieu**, malgré les précautions prises pour éviter cette agitation pendant les expériences (ajout du gaz par flushage, cf.4.2 Influence de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé).

Le fait d'agiter le milieu peut avoir eu un effet sur :

- **Les performances de la fermentation et de la digestion anaérobie** (Bru et al., 2012; Kaparaju et al., 2008; Karim et al., 2005; Kim et al., 2006).
- **Les transferts de gaz** dans le milieu en désorbant les gaz dissous sursaturés dans le milieu réactionnel (Kaparaju et al., 2008; Ward et al., 2008).
- **Le mélange des composés solubles et dissous** ce qui va diminuer les accumulations locales de molécules comme par exemple les AGVs (Ghanimeh et al., 2012). Cette hypothèse pourrait expliquer **pourquoi la dégradation du substrat est plus importante lorsque du gaz a été ajouté** (58 g<sub>DCO</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 28 jours pour N<sub>2</sub> ajouté) que dans les tubes (28 g<sub>DCO</sub>·g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> à 33 jours) (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw et 4.2 Influence de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé). Ainsi, les concentrations locales de l'H<sub>2</sub> dissous dans tout le milieu seraient plus faibles avec l'agitation, ce qui implique une inhibition de l'hydrolyse plus faible et plus longue à mettre en place par rapport aux tubes non agités. Ainsi, un ajout plus lent et plus régulier des gaz aurait peut-être permis de détecter une structuration des produits, liés aux gaz ajoutés, sans modifier de façon trop importante les transferts de matières et les concentrations locales en gaz dissous.
- **L'hétérogénéité du milieu** en diminuant la stratification du milieu (Ward et al., 2008).

Ainsi, **l'agitation faible par ajout de gaz** durant l'expérience (cf. 4.2 Influence de l'hydrogène et du dioxyde de carbone sur la digestion anaérobie par voie sèche de la paille de blé) pourrait expliquer pourquoi aucune structuration des produits (et plus particulièrement des AGVs) n'a été visible, contrairement à ce qui a été vu précédemment (cf. 4.1 Metabolites gradient in solid-state anaerobic digestion of wheat straw ).

#### **4.3.4 Influence de la composition de l'inoculum sur la digestion anaérobie**

**La composition initiale de l'inoculum** a pu également avoir un effet sur les performances de la digestion anaérobie. Ainsi, pour un inoculum riche en méthanogènes hydrogénotrophes, les interactions syntrophes seront plus importantes et la consommation de l' $H_2$  plus rapide par rapport à un inoculum riche en méthanogènes acétotrophes (Ghanimeh et al., 2012). De plus, un inoculum pauvre en méthanogènes acétoclastes va être riche en bactéries oxydants l'acétate et une étape syntrophe supplémentaire sera nécessaire afin de produire du  $CH_4$  à partir de l'acétate (Hao et al., 2011; Rivera-Salvador et al., 2014; Westerholm et al., 2011). Lorsque la diffusion et le transfert gaz-liquide sont limitants, les transmissions d'intermédiaires réactionnels entre les microorganismes syntrophes sont plus lentes et peuvent amener à des accumulations de produits inhibiteurs dans le milieu. Ainsi, les performances de la digestion anaérobie par voie sèche pour un inoculum riche en méthanogènes hydrogénotrophes peuvent être plus faibles que pour un inoculum riche en méthanogènes acétotrophes.

---

## **4.4 CONCLUSION DU CHAPITRE 4**

---

Ce chapitre a permis d'étudier l'influence de l' $H_2$  et du  $CO_2$  dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique. Ainsi des études ont été réalisées avec une épaisseur de milieu plus importante que dans le Chapitre 3: Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique, afin de prendre en compte les effets des transferts de matières, qui peuvent être limitants en voie sèche et donc avoir un effet important sur la voie sèche (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Xu et al., 2014). L'étude de l'effet de l'augmentation de l'épaisseur du milieu lors de la digestion anaérobie par voie sèche a permis de démontrer l'effet inhibiteur de la diminution des transferts de matière (diffusion et transfert gaz-liquide) sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche. De plus, la concentration en AGVs au sein du milieu varie au cours de la digestion anaérobie par voie sèche. Ces variations de concentration d'AGVs seraient potentiellement dues à des variations de la concentration en  $H_2$  et en  $CO_2$  dissous au sein du milieu.

L'étude de l'effet de l'ajout de  $H_2$  et de  $CO_2$  sur la digestion anaérobie par voie sèche avec un milieu plus épais a permis de confirmer l'existence d'une concentration en  $H_2$  dissous importante lors du déroulement de la digestion anaérobie par voie sèche. De plus, l'ajout de  $CO_2$  résulte en une augmentation rapide de l'hydrolyse puis deux comportements différents, avec d'un côté aucun effet de l'ajout de  $CO_2$  et de l'autre une augmentation de la production d'AGVs et une baisse du pH et de la production de  $CH_4$ . Ce comportement se rapproche de ce qui se passe lorsque la teneur en MS augmente au-delà de 30%. Ainsi, la concentration en  $H_2$  dissous ne semble donc pas être le seul facteur influençant la performance de la digestion anaérobie par voie sèche, avec une importance aussi de la concentration en  $CO_2$  dissous. Le rapport des effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  selon les concentrations de gaz dissous semble donc avoir une grande importance, avec des diminutions des performances de la digestion anaérobie par voie sèche dès qu'il y aurait un déséquilibre entre ces deux concentrations.

Table 4-5 : Synthèse des résultats du chapitre 4

	<b>Influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique de la paille de blé</b>
<b>Messages principaux</b>	La diminution du transfert gaz-liquide va inhiber l'hydrolyse lors de la digestion anaérobie par voie sèche, ce qui pourrait être dû à des accumulations locales d' $H_2$ dissous.
	Un gradient de concentrations des AGVs se met en place lors de la digestion anaérobie par voie sèche lorsque la diffusion et les transferts gaz-liquide diminuent. L'origine de ce gradient pourrait être liée à un gradient de concentration d' $H_2$ .
	L'ajout de $CO_2$ lors de la digestion anaérobie par voie sèche peut débloquent l'inhibition de l'hydrolyse par l' $H_2$ mais provoquer aussi l'acidification du milieu.
	Le rapport des effets de l' $H_2$ et du $CO_2$ semble avoir un effet important sur le fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche.

---

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'influence des gaz dissous sur la digestion anaérobie par voie sèche et plus particulièrement l' $H_2$  et le  $CO_2$ . Pour parvenir à cet objectif, une stratégie a été mise en place afin d'étudier les effets de ces gaz à deux échelles différentes, microscopique et mésoscopique.

Ainsi, une première série d'études a porté sur les effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  à l'échelle microscopique, avec un milieu de faible épaisseur afin d'éviter l'influence de la diffusion lors de la digestion anaérobie par voie sèche. Ces études ont permis de démontrer qu'à l'échelle microscopique, **une forte concentration en l' $H_2$  inhibait l'hydrolyse mais que cette inhibition était réversible par ajout de  $CO_2$ , avec un effet rémanent de cette inhibition sur la dégradation de l'acétate.** De plus, **le  $CO_2$  seul a un effet positif sur la production de  $CH_4$  mais pas sur l'hydrolyse.**

Une deuxième série d'étude a porté sur les effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  à l'échelle mésoscopique, avec un milieu ayant une épaisseur plus importante. Ces études ont permis tout d'abord de confirmer l'importance de la limitation du transfert gaz-liquide dans la diminution des performances de la digestion anaérobie par voie sèche. Ainsi, la diminution de la surface d'échange et donc du transfert gaz-liquide a provoqué une diminution de l'hydrolyse, de la production de  $CH_4$  avec une augmentation faible de la quantité d'AGVs produites. De plus, un gradient de concentrations d'AGVs s'est mis en place dans le milieu avec une concentration plus importante en profondeur. Ce gradient de concentration serait potentiellement lié à un gradient de concentration de l' $H_2$  dissous dans le milieu lors de la digestion anaérobie par voie sèche. De plus, l'ajout d' $H_2$  à l'échelle mésoscopique a permis de confirmer la présence d' $H_2$  dissous dans le milieu suffisante pour limiter l'hydrolyse, lorsque le transfert gaz-liquide est limitant pendant la digestion anaérobie par voie sèche. L'ajout de  $CO_2$  à l'échelle mésoscopique semble indiquer que c'est **le rapport des effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$ , selon leurs concentrations locales dissoutes, qui serait un facteur important du déroulement de la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle mésoscopique.** Ainsi, une concentration importante en  $CO_2$  peut lever l'inhibition de l'hydrolyse mais peut aussi acidifier le milieu de façon importante et abaisser le pH, ce qui correspond aux performances de la digestion anaérobie obtenues pour une teneur en matière sèche inhibitrice. Cependant, aucune structuration de microorganismes dans le milieu n'a été visible lors des expériences.

Cette thèse apporte donc de nombreux éléments pour mieux comprendre la digestion anaérobie par voie sèche et plus particulièrement le rôle des gaz dissous. Cependant, un besoin de validation reste nécessaire à l'échelle macroscopique (échelle pilote), pour se rapprocher de la réalité industrielle.

Ce travail ouvre aussi de nombreuses perspectives, que ce soit au niveau académique ou industriel. Tout d'abord, **une meilleure compréhension des mécanismes de l'hydrolyse lors de la digestion anaérobie par voie sèche** semble nécessaire. Ainsi, une modélisation de l'inhibition de l'hydrolyse par l' $H_2$  en utilisant l'ADM1 pourrait déjà permettre d'identifier le type d'inhibition comme par exemple une inhibition non compétitive ou compétitive (Table 1). Cette modélisation

pourrait aussi essayer de prédire les pressions partielles en H<sub>2</sub> inhibitrices de l'hydrolyse pour des substrats ayant des viscosités différentes et à différents teneurs en MS, ce qui impacterait les transferts de matières (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Benbelkacem et al., 2015b; Bollon et al., 2013; Garcia-Bernet et al., 2011b). Ainsi, les effets de la P<sub>H<sub>2</sub></sub> et de la P<sub>CO<sub>2</sub></sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche ont été démontrés sur la paille de blé, qui est un substrat ligno-cellulosique modèle. **D'autres substrats plus complexes comme par exemple les déchets alimentaires peuvent avoir des comportements très différents.** En effet, la viscosité de ces milieux est très différente pour une même teneur en MS, ce qui peut avoir un effet sur la diffusion et donc sur le transfert gaz-liquide. Il est possible de supposer un effet semblable de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> sur la digestion anaérobie par voie sèche mais pour des valeurs de P<sub>H<sub>2</sub></sub> et de la P<sub>CO<sub>2</sub></sub> différentes ainsi que pour des teneurs en MS différentes.

Table 1 : Principales formes d'inhibitions rencontrées pour la modélisation de la digestion anaérobie dans ADM1.

Avec I la fonction d'inhibition ; K<sub>I</sub>= constante d'inhibition ; S= concentration du substrat [M].[L]<sup>-3</sup> ; S<sub>I</sub>= concentration du substrat inhibiteur [M].[L]<sup>-3</sup> ; n= index de degré ; pH<sub>UL</sub> : limite de pH maximum pour une inhibition de 50% du groupe de microorganismes et pH<sub>LL</sub> : limite de pH minimum pour une inhibition de 50% du groupe de microorganismes ; pH\*<sub>UL</sub> : limite de pH maximum sans inhibition de microorganismes et pH\*<sub>LL</sub> : limite de pH minimum où tous les microorganismes sont inhibés.

D'après Keller and IWA Anaerobic Digestion Modelling Task Group, (2001); Vavilin and Angelidaki, (2005)

Description de l'inhibition	Equation	Utilisé pour l'inhibition par
Inhibition non compétitive	$I = \frac{1}{1 + S_I/K_I}$	L'hydrogène et l'ammoniac
Inhibition empirique haute et basse	$I = \frac{1 + 2 * 10^{0,5*(pH_{LL}-pH_{UL})}}{1 + 10^{(pH-pH_{UL})} - 10^{(pH_{LL}-pH)}}$	Pour un pH haut et bas à la fois
Inhibition empirique basse seule	$I = e^{-2 * \frac{pH-pH_{UL}^*}{pH_{UL}^*-pH_{LL}^*}}$ lorsque pH < pH* <sub>UL</sub> I=1 lorsque pH > pH* <sub>UL</sub>	Pour un pH bas seulement
Consommation compétitive	$I = \frac{1}{1 + S_I/S}$	Compétition du butyrate et du valérate pour les C <sub>4</sub>
Substrat secondaire	$I = \frac{1}{1 + K_I/S}$	Pour tous les processus de consommation
Inhibition	$I = \frac{1}{1 + (\frac{S_I}{K_I})^n}$	Des AGVs de l'hydrolyse

De plus, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnements de l'hydrolyse enzymatique (hydrolyse simple ou double, enzymes libres ou liées à des microorganismes, cf. 3.4.1 Hydrolyse enzymatique de la paille de blé). En effet, les hypothèses de l'effet de l'H<sub>2</sub> sur l'hydrolyse dépendent aussi des mécanismes de l'hydrolyse.

Une étude pourrait porter sur la question de l'emplacement des enzymes hydrolytiques (si les enzymes sont libres ou liées aux microorganismes) en étudiant **l'activité hydrolytique en fonction de la pression partielle en hydrogène**:

- **En mesurant la concentration en enzymes dans le milieu en fonction de la  $P_{H_2}$ .** Ainsi, si la concentration en enzymes diminue avec l'augmentation de la  $P_{H_2}$ , les enzymes hydrolytiques seraient libres et l' $H_2$  pourrait avoir un effet sur la production ou la libération des enzymes dans le milieu.
- **En étudiant la fixation possible des microorganismes et du substrat selon la  $P_{H_2}$**  avec un microscope électronique à balayage (MEB). Si les enzymes sont liées aux microorganismes, les microorganismes se fixeront sur le substrat. Une  $P_{H_2}$  importante aura alors un effet sur la fixation des microorganismes sur le substrat.

**Le rapport des effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  sur la digestion anaérobie par voie sèche est aussi à creuser** afin de valider nos hypothèses. De plus, des tests en pilote de l'ajout de  $CO_2$  seraient intéressants, afin de tester si le  $CO_2$  acidifie le milieu ou si le  $CO_2$  pourrait potentiellement débloquent la limitation de l'hydrolyse en voie sèche pour des teneurs en MS inhibitrices. De plus, des ajouts plus faibles et continus pourrait avoir des effets différents de ceux obtenus pendant les expériences, avec une meilleure diffusion des gaz dissous au sein du milieu.

En outre, **l'étude du rapport des effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  selon les quantités ajoutées dans le ciel gazeux serait aussi intéressante mais au niveau industriel.** En effet, dans certains digesteurs, de l' $H_2$  est ajouté afin d'augmenter le pourcentage de  $CH_4$  produit en diminuant la quantité de  $CO_2$  présente. L' $H_2$  ajouté peut être produit par l'électrolyse de l'eau, en utilisant un surplus d'électricité, provenant d'un digesteur ou de l'énergie solaire ou éolienne (Power to gas). Ensuite, l' $H_2$  peut être ajouté directement dans le digesteur, pour être consommé avec le  $CO_2$  présent pour produire du  $CH_4$  (Jentsch et al., 2014; Schiebahn et al., 2015). La quantité d' $H_2$  ajouté par rapport au  $CO_2$  dans le réacteur de méthanisation se rapproche de 4, ce qui correspond aux quantités stœchiométriques nécessaires pour produire du  $CH_4$  (De Saint Jean et al., 2014). Un rapport de 4,2 amène à un déséquilibre entre la production de  $CH_4$  et la consommation de  $H_2$  sans toutefois avoir un effet néfaste sur la digestion anaérobie par voie sèche (De Saint Jean et al., 2014). Il serait intéressant de déterminer pour quelle quantité d' $H_2$  ajouté par rapport au  $CO_2$  présent, le rapport des effets d' $H_2$  et de  $CO_2$  deviendrait défavorable pour la digestion anaérobie par voie sèche. Suite à nos résultats, l'ajout d' $H_2$  pour de la digestion anaérobie par voie sèche semble être plus intéressant lorsqu'il est ajouté dans le ciel gazeux et en présence de  $CO_2$  déjà produit afin d'éviter une production d'AGVs importante ou une inhibition de l'hydrolyse par du surplus d' $H_2$ .

**La composition de l'inoculum utilisé peut avoir un effet important sur les performances de la digestion anaérobie.** En effet, selon par exemple la composition en archées (hydrogénotrophes et acétotrophes), la production de  $CH_4$  pourra être très différente. Par exemple, pour un inoculum contenant beaucoup de méthanogènes hydrogénotrophes et peu de méthanogènes acétotrophes, une concentration importante en acétate sera dégradée par des bactéries oxydant l'acétate en  $H_2$  et  $CO_2$ , qui sont beaucoup plus lentes pour dégrader l'acétate que les méthanogènes acétotrophes (Karakashev et al., 2006), ce qui peut diminuer la production de  $CH_4$  par exemple. La composition initiale de l'inoculum devrait donc être prise en compte à chaque fois lors de l'analyse de résultats expérimentaux et des expériences seraient nécessaires pour comparer les performances de la digestion anaérobie selon la composition de l'inoculum, en fonction aussi de la nature du substrat. Il



serait aussi intéressant de tester les effets de la réversibilité de l'inhibition de l'hydrolyse par l' $H_2$  par ajout de  $CO_2$  en prenant des inocula enrichis en méthanogènes hydrogénotrophes ou acétotrophes puisque l'hydrogène semble avoir un effet inhibiteur rémanent sur la dégradation de l'acétate.

Cette thèse montre donc que les gaz dissous peuvent avoir un impact important lors de la digestion anaérobie par voie sèche, en particulier l' $H_2$  et le  $CO_2$ . L'optimisation de la digestion anaérobie par voie sèche passe donc par une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement de la digestion anaérobie, en reliant les paramètres de procédés avec leurs effets sur les microorganismes et sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche. Ainsi, l'étude de l'impact des gaz dissous à différentes échelles a montré l'importance du transfert gaz-liquide et de la diffusion des molécules dissoutes sur la digestion anaérobie par voie sèche. De plus, la composition mais aussi la rhéologie d'un substrat peuvent avoir des effets importants sur le fonctionnement de la digestion anaérobie par voie sèche en faisant varier les transferts de matière dans le milieu, ce qui peut avoir des effets sur les concentrations locales en molécules dissoutes et donc un effet possible sur les performances de la digestion anaérobie par voie sèche.

---

# RÉFÉRENCES

---

- Abbasi, T., Abbasi, S. a., 2010. Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 919–937.
- Abbassi-Guendouz, A., 2012. Lien entre paramètre opératoires, microorganismes et performance de la digestion anaérobie par voie sèche. *Montpellier 2*.
- Abbassi-Guendouz, A., Brockmann, D., Trably, E., Dumas, C., Delgenès, J.-P., Steyer, J.-P., Escudié, R., 2012. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresour. Technol.* 111, 55–61.
- Abbassi-Guendouz, A., Trably, E., Hamelin, J., Dumas, C., Steyer, J.P., Delgenès, J.-P., Escudié, R., 2013. Microbial community signature of high-solid content methanogenic ecosystems. *Bioresour. Technol.* 133, 256–262.
- ADEME, 1998. Résidus de culture: Paille de cereales. *ITCF* 1–6.
- ADEME, AFGNV, Biogaz, A.C., Suez, G., IFP, MEEDDAT, 2008. État des lieux et potentiel du biométhane carburant. *Ademe* 1–8.
- ADEME, AILE, Solagro, Trame, 2011. *La Méthanisation à la ferme: guide pratique*.
- ADEME, Bastide, G., 2009. Méthanisation agricole et utilisation des cultures énergétiques en codigestion: Avantages / inconvénients et optimisation Rapport final. *ADEME*.
- Ahring, B.K., Ibrahim, a a, Mladenovska, Z., 2001. Effect of temperature increase from 55 to 65 degrees C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Res.* 35, 2446–52.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I., 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 559–565.
- Ahring, B.K., Westermann, P., 1988. Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2393–7.
- Ahring, B.K., Westermann, P., Mah, R.A., 1991. Hydrogen inhibition of acetate metabolism and kinetics of hydrogen consumption by *Methanosarcina thermophila* TM-1. *Arch. Microbiol.* 157, 38–42.
- Amani, T., Nosrati, M., Sreerkrishnan, T., 2010. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environ. Rev.* 18, 255–278.

- Amani, T., Nosrati, M., Sreekrishnan, T.R., 2011. A Precise Experimental Study on Key Dissimilarities between Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge. *Int. J. Environ. Res* 5, 333–342.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Hopfner-Sixt, K., Bodiroza, V., Hrbek, R., Friedel, J., Pötsch, E., Wagentristl, H., Schreiner, M., Zollitsch, W., 2007. Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresour. Technol.* 98, 3204–12.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., 2003. Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 109, 95–105.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K., 2003. Applications of the anaerobic digestion process. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 82, 1–33.
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781.
- Ariunbaatar, J., Scotto Di Perta, E., Panico, A., Frunzo, L., Esposito, G., Lens, P.N.L., Pirozzi, F., 2015. Effect of ammoniacal nitrogen on one-stage and two-stage anaerobic digestion of food waste. *Waste Manag.* 38, 388–98.
- Arslan, D., Steinbusch, K.J.J., Diels, L., De Wever, H., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M., 2012. Effect of hydrogen and carbon dioxide on carboxylic acids patterns in mixed culture fermentation. *Bioresour. Technol.* 118, 227–34.
- Baere, L. De, Mattheeuws, B., Velghe, F., 2010. State of the art of anaerobic digestion in Europe. *12th World Congr. Anaerob. Dig.* 32.
- Bagi, Z., Ács, N., Bálint, B., Horváth, L., Dobó, K., Perei, K.R., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2007. Biotechnological intensification of biogas production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 473–482.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J.S., Walton, J.D., 2010. Improving enzymes for biomass conversion: A basic research perspective. *Bioenergy Res.* 3, 82–92.
- Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X., 2013. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. *Bioresour. Technol.* 134, 362–73.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V, Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V. a, 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* 45, 65–73.

- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. Van, Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 125–197.
- Bauer, A., Bösch, P., Friedl, A., Amon, T., 2009. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *J. Biotechnol.* 142, 50–5.
- Benbelkacem, H., Bollon, J., Bayard, R., Escudié, R., Buffière, P., 2015a. Towards optimization of the total solid content in high-solid (dry) municipal solid waste digestion. *Chem. Eng. J.* 273, 261–267.
- Benbelkacem, H., Bollon, J., Gourdon, R., Buffière, P., 2015b. Dry anaerobic digestion modelling: Parameter sensitivity. *Can. J. Chem. Eng.* 93, 386–390.
- Bernet, N., Buffière, P., 2008. Caractérisation de la mise en oeuvre de la méthanisation, in: Moletta, R. (Ed.), *La Méthanisation*.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the Biochemical Features and Histology of Wheat Residues Explain their Decomposition in Soil? *Plant Soil* 281, 291–307.
- Bledzki, A., Gassan, J., 1999. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog. Polym. Sci.* 24, 221–274.
- Bollon, J., Benbelkacem, H., Gourdon, R., Buffiere, P., 2013. Measurement of diffusion coefficients in dry anaerobic digestion media. *Chem. Eng. Sci.* 89, 115–119.
- Bolzonella, D., Innocenti, L., Pavan, P., Traverso, P., Cecchi, F., 2003. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Focusing on the start-up phase. *Bioresour. Technol.* 86, 123–129.
- Borzacconi, L., Lápé, I., Anido, C., 1997. Hydrolysis constant and VFA inhibition in acidogenic phase of MSW anaerobic degradation. *Water Sci. Technol.* 36, 479–484.
- Bouallagui, H., Torrijos, M., Godon, J.J., Moletta, R., Ben Cheikh, R., Touhami, Y., Delgenès, J.-P., Hamdi, M., 2004. Two-phases anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: bioreactors performance. *Biochem. Eng. J.* 21, 193–197.
- Braun, F., Hamelin, J., Gévaudan, G., Patureau, D., 2011. Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8487–93.
- Brender, P., Goubet, C., De guibert, O., Croquette, G., Simiu, A., Vieillefosse, D., 2013. 5. Les objectifs européens énergie-climat, in: *Panorama Énergies-Climat*. pp. 1–5.

- Brijwani, K., Oberoi, H.S., Vadlani, P. V., 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem.* 45, 120–128.
- Brouckaert, C.J., Foxon, K.M., Osborne, C.F., Lees, C.M., 2011. The role of CO<sub>2</sub> liquid-gas exchange in pH prediction for anaerobic digestion modelling .
- Brown, D., Shi, J., Li, Y., 2012. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. *Bioresour. Technol.* 124, 379–86.
- Brown Jr, M., Saxena, I., Kudlicka, K., 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant Sci.* 1.
- Bru, K., Blazy, V., Joulain, C., Trably, E., Latrille, E., Quéméneur, M., Dictor, M.-C., 2012. Innovative CO<sub>2</sub> pretreatment for enhancing biohydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 14062–14071.
- Brulé, M., 2014. The effect of enzyme additives on the anaerobic digestion of energy crops. des Fachausschusses Forchung und Lehrer des Max-Eyth-Gesellschaft Agrartechnik im VDI Hohenheim.
- Buffière, P., Bayard, R., Germain, P., 2009. Freins et développements de la filière biogaz : les besoins en recherche et développement. *Etude Rec.* 07-0418/1A.
- Buranov, A., Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. Crops Prod.* 28, 237–259.
- Cazier, E.A., Trably, E., Steyer, J.P., Escudie, R., 2015. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 190, 106–113.
- Chandel, A.K., Singh, O. V., 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: Advancing the generation of “Biofuel.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1289–1303.
- Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T., 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 1462–1476.
- Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, a., Pan, X., Saddler, J.N., 2007. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 67–93.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–64.

- Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y., 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 582–594.
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H., Conrad, R., 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 350–357.
- Cui, Z., Shi, J., Li, Y., 2011. Solid-state anaerobic digestion of spent wheat straw from horse stall. *Bioresour. Technol.* 102, 9432–9437.
- Dague, R., 1968. Application of digestion theory to digester control. *J. Water Pollut. Control Fed.* 2021–2032.
- De Bok, F.A.M., Plugge, C.M., Stams, A.J., 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Res.* 38, 1368–1375.
- De Saint Jean, M., Baurens, P., Bouallou, C., 2014. Parametric study of an efficient renewable power-to-substitute-natural-gas process including high-temperature steam electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 17024–17039.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W., 2012. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour. Technol.* 112, 1–9.
- Demirbas, A., 2004. Combustion characteristics of different biomass fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 30, 219–230.
- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173–190.
- Deublein, D., Steinhauser, A., 2008. *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Weinheim, Germany.
- Diekert, G., Wohlfarth, G., 1994. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209–221.
- Ding, H.-B., Tan, G.-Y.A., Wang, J.-Y., 2010. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production., *Bioresource technology*. Elsevier Ltd.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T., 2005. Hemicellulose, in: Heinze, T. (Ed.), *Polysaccharides I SE - 136816*, *Advances in Polymer Science*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–67.

- El-Mashad, H.M., Zeeman, G., van Loon, W.K.P., Bot, G.P. a, Lettinga, G., 2004. Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresour. Technol.* 95, 191–201.
- Elnekave, M., Tüfekçi, N., Kimchie, S., Shelef, G., 2006. Tracing the mixing efficiency of a primary mesophilic anaerobic digester in a municipal wastewater treatment plant., in: *Fresenius Environmental Bulletin* 2006 Vol. 15 No. 9b. pp. 1098–1105.
- Erdei, B., Barta, Z., Sipos, B., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G., 2010. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. *Biotechnol. Biofuels* 3, 16.
- Fang, J.M., Sun, R.C., Salisbury, D., 1999. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polym. Degrad. ...* 66, 423–432.
- Fernández, J., Pérez, M., Romero, L.I., 2008. Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Bioresour. Technol.* 99, 6075–80.
- Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., Romero, L.I., 2013. Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis. *Chem. Eng. J.* 232, 59–64.
- Ferreira, L.C., Nilsen, P.J., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2014. Biomethane potential of wheat straw: Influence of particle size, water impregnation and thermal hydrolysis. *Chem. Eng. J.* 242, 254–259.
- Florin, N.H., Harris, A.T., 2008. Enhanced hydrogen production from biomass with in situ carbon dioxide capture using calcium oxide sorbents. *Chem. Eng. Sci.* 63, 287–316.
- Forster-Carneiro, T., Pérez, M., Romero, L.I., 2008. Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresour. Technol.* 99, 6994–7002.
- Fournié, L., Chiche, A., Faure, N., Bardet, R., Alais, J.-C., Girard, R., Bossavy, A., Le Gars, L., Biau, J.-B., Piqueras, U., Peyrusse, C., 2014. Vers un mix électrique 100% renouvelable en 2050. ADEME.
- Fritsch, M., Hartmeier, W., Chang, J.S., 2008. Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fittings. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6549–6557.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4, 634–43.

- Garcia, J.L., Patel, B.K., Ollivier, B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6, 205–26.
- Garcia-Bernet, D., Buffière, P., Latrille, E., Steyer, J.-P., Escudé, R., 2011a. Water distribution in biowastes and digestates of dry anaerobic digestion technology. *Chem. Eng. J.* 172, 924–928.
- Garcia-Bernet, D., Loisel, D., Guizard, G., Buffière, P., Steyer, J.-P.P., Escudé, R., García-Bernet, D., 2011b. Rapid measurement of the yield stress of anaerobically-digested solid waste using slump tests. *Waste Manag.* 31, 631–5.
- Gerardi, M.H., 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*, Wastewater Microbiology Series. Wiley. com, Hoboken, NJ, USA.
- Ghanimeh, S., El Fadel, M., Saikaly, P., 2012. Mixing effect on thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 117, 63–71.
- Ghizzi Damasceno Da Silva, G., 2011. Fractionnement par voie sèche de la biomasse lignocellulosique: Broyage poussé de la paille de blé et effets sur ses bioconversions. Montpellier II.
- Ghizzi, G., Silva, D., Couturier, M., Berrin, J., Buléon, A., Rouau, X., 2012. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 103, 192–200.
- Gianfreda, L., Rao, M. a., 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 339–354.
- Godon, J., Zumstein, E., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63.
- Grimberg, S.J., Hilderbrandt, D., Kinnunen, M., Rogers, S., 2015. Anaerobic digestion of food waste through the operation of a mesophilic two-phase pilot scale digester – Assessment of variable loadings on system performance. *Bioresour. Technol.* 178, 226–229.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10660–10673.
- Haeusler, L., Berthoin, G., Mathery, C., Économie, D., 2015. *Déchets, Chiffres-clés*. ADEME.



- Hallenbeck, P.C., 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52, 21–9.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic Digestion of Swine Manure: Inhibition By Ammonia. *Water Res.* 32, 5–12.
- Hansson, G., Molin, N., 1981. End product inhibition in methane fermentations: Effects of carbon dioxide on fermentative and acetogenic bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol.* ... 236–241.
- Hao, L.P., Lü, F., He, P.J., Li, L., Shao, L.M., 2011. Predominant contribution of syntrophic acetate oxidation to thermophilic methane formation at high acetate concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 45, 508–513.
- Harper, S.R., Pohland, F.G., 1986. Management During Anaerobic Biological Wastewater Treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 585–602.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., 2000. a strictly anaerobic , thermophilic , syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1601–1609.
- Haynie, D.T., 2001. Chapter 4 : Gibbs free energy theory, in: *Biological Thermodynamics*. p. 97.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Dynamic Transition of a Methanogenic Population in Response to the Concentration of Volatile Fatty Acids in a Thermophilic Anaerobic Digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 72.
- Huang, W., Wang, Z., Zhou, Y., Ng, W.J., 2014. The role of hydrogenotrophic methanogens in an acidogenic reactor. *Chemosphere* 140, 40–46.
- Hwang, M.H., Jang, N.J., Hyun, S.H., Kim, I.S., 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *J. Biotechnol.* 111, 297–309.
- Iqbal, H.M.N., Kyazze, G., Keshavarz, T., 2013. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. *BioResources* 8, 3157–3176.
- Jentsch, M., Trost, T., Sterner, M., 2014. Optimal use of Power-to-Gas energy storage systems in an 85% renewable energy scenario. *Energy Procedia* 46, 254–261.
- Jeoh, T., Ishizawa, C.I., Davis, M.F., Himmel, M.E., Adney, W.S., Johnson, D.K., 2007. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 112–122.
- Jha, A., Li, J., Nies, L., Zhang, L., 2011. Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes. *Afr J Biotechnol* 10, 14242–14253.

- Kalia, A.K., Singh, S.P., 1998. Horse dung as a partial substitute for cattle dung for operating family-size biogas plants in a hilly region. *Bioresour. Technol.* 64, 63–66.
- Kaparaju, P., Buendia, I., Ellegaard, L., Angelidakia, I., 2008. Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresour. Technol.* 99, 4919–28.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., Angelidaki, I., 2006. Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5138–41.
- Karellas, S., Boukis, I., Kontopoulos, G., 2010. Development of an investment decision tool for biogas production from agricultural waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1273–1282.
- Karim, K., Hoffmann, R., Klasson, K.T., Al-Dahhan, M.H., 2005. Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mode of mixing. *Water Res.* 39, 3597–3606.
- Karthikeyan, O.P., Visvanathan, C., 2012. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.*
- Kayhanian, M., 1994. Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 59, 349–352.
- Kayhanian, M., 1999. Ammonia Inhibition in High-Solids Biogasification: An Overview and Practical Solutions. *Environ. Technol.* 20, 355–365.
- Keller, J., IWA Anaerobic Digestion Modelling Task Group, 2001. Iwa Report : ADM1. Iwa Publ.
- Kim, D., Han, S., Kim, S., Shin, H., 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 2158–2169.
- Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375.
- Krishania, M., Kumar, V., Vijay, V.K., Malik, A., 2013. Analysis of different techniques used for improvement of biomethanation process: A review. *Fuel* 106, 1–9.
- Krishania, M., Vijay, V.K., Chandra, R., 2013. Methane fermentation and kinetics of wheat straw pretreated substrates co-digested with cattle manure in batch assay. *Energy* 57, 359–367.

- Kristensen, J.B., Felby, C., Jørgensen, H., 2009. Biotechnology for Biofuels Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose 10, 1–10.
- Kusch, S., Oechsner, H., Jungbluth, T., 2012. Effect of various leachate recirculation strategies on batch anaerobic digestion of solid substrates. *Int. J. Environ. Waste Manag.* 9, 69.
- Kusch, S., Schäfer, W., Kranert, M., 2011. Dry digestion of organic residues. *Integr. Waste Manag.*
- Lal, R., 2008. Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. *Waste Manag.* 28, 747–58.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass: Characterization of Pretreated Corn Stover. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 124, 1081–1100.
- Lay, J.J., Li, Y.Y., Noike, T., Endo, J., Ishimoto, S., 1997. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste. *Water Sci. Technol.* 36, 493–500.
- Le Hyaric, R., Chardin, C., Benbelkacem, H., Bollon, J., Bayard, R., Escudié, R., Buffière, P., 2011. Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. *Bioresour. Technol.* 102, 822–7.
- Li, Y., Park, S.Y., Zhu, J., 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 821–826.
- Li, Y., Zhang, R., Chen, C., Liu, G., He, Y., Liu, X., 2013. Biogas production from co-digestion of corn stover and chicken manure under anaerobic wet, hemi-solid, and solid state conditions. *Bioresour. Technol.* 149, 406–12.
- Li, Y., Zhu, J., Wan, C., Park, S.Y., 2011. Solid-state anaerobic digestion of corn stover for biogas production 54, 1415–1421.
- Liew, L.N., Shi, J., Li, Y., 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy* 1–8.
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 627–642.
- Lü, F., He, P., Li-ming, S., 2006. Partial least square modeling of hydrolysis : analysing the impacts of pH and acetate. *J. Environ. Sci. (China)* 18, 805–809.

- Lu, S., Imai, T., Ukita, M., Sekine, M., 2007. Start-up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes. *J. Environ. Sci. (China)* 19, 416–20.
- Luo, G., Angelidaki, I., 2013. Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H<sub>2</sub>: process performance and microbial insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1373–81.
- Luo, G., Johansson, S., Boe, K., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I., 2012. Simultaneous hydrogen utilization and in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1088–94.
- Makaruk, a., Miltner, M., Harasek, M., 2010. Membrane biogas upgrading processes for the production of natural gas substitute. *Sep. Purif. Technol.* 74, 83–92.
- Malherbe, S., Cloete, T.E., 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1, 105–114.
- Martin, D.J., 2001. The site of reaction in solid-state digestion: a new hypothesis. *Trans IChemE* 79, part B.
- Martin, D.J., 2001. The Site of Reaction in Solid-State Digestion. *Process Saf. Environ. Prot.* 79, 29–37.
- Martin, D.J., 2003. Thickness of the buffer layer in the “reaction front” model of solid-state digestion. *Waste Manag.* 23, 411–7.
- Massé, D.I., Droste, R.L., 2000. Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 34, 3087–3106.
- Mata-Alvarez, J., 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes, Iwa Publishing.
- McCartney, D.M., Oleszkiewicz, J. a., 1991. Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* 25, 203–209.
- Mckean, W., Jacobs, R., 1997. Wheat straw as a paper fiber source. Washington, USA Clean Washingt. Cent.
- McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresour. Technol.* 83, 37–46.
- McMahon, K.D., Stroot, P.G., Mackie, R.I., Raskin, L., 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions--II: Microbial population dynamics. *Water Res.* 35, 1817–27.

- McMahon, K.D., Zheng, D., Stams, A.J.M., Mackie, R.I., Raskin, L., 2004. Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 823–34.
- Menardo, S., Airoidi, G., Balsari, P., 2012. The effect of particle size and thermal pre-treatment on the methane yield of four agricultural by-products. *Bioresour. Technol.* 104, 708–14.
- Ministère de l'écologie et du développement durable et du logement et des transports, 2011. Dossier de presse Méthanisation [WWW Document]. Présent pour l'avenir. URL [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Dossier\\_de\\_presse\\_Methanisation.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Dossier_de_presse_Methanisation.pdf)
- Moletta, R., 2003. Le biogaz « à la ferme ». *Record (Washington)*. 72–92.
- Moletta, R., 2009. Les traitements biologiques, in: Lavoisier (Ed.), *Le Traitement Des Déchets*. pp. 408–587.
- Moletta, R., 2011. *La méthanisation*, 2nd édition, Lavoisier. ed.
- Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.-P., Carrere, H., 2012. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatment on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresour. Technol.* 120, 241–7.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2013. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43, 260–322.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X.M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.P., Carrere, H., 2012. Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12217–12225.
- Montané, D., Farriol, X., Salvadó, J., Jollez, P., Chornet, E., 1998. Fractionation of Wheat Straw by Steam-Explosion Pretreatment and Alkali Delignification. Cellulose Pulp and Byproducts from Hemicellulose and Lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 18, 171–191.
- Montero, B., Garcia-Morales, J.L., Sales, D., Solera, R., 2008. Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 99, 3233–43.
- Montero, B., Garcia-Morales, J.L., Sales, D., Solera, R., 2009. Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: use of fluorescent in situ hybridization. *Waste Manag.* 29, 1144–51.

- Mora-Naranjo, N., Meima, J. a, Haarstrick, a, Hempel, D.C., 2004. Modelling and experimental investigation of environmental influences on the acetate and methane formation in solid waste. *Waste Manag.* 24, 763–73.
- Morrison, I.M., 1974. Changes in the hemicellulosic polysaccharides of rye-grass with increasing maturity. *Carbohydr. Res.* 36, 45–51.
- Motte, J.-C., 2013. Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques: Etude dynamique des relations entre paramètres de procédés, caractéristiques du substrat et écosystème microbien. Montpellier II.
- Motte, J.-C., Escudié, R., Beaufils, N., Steyer, J.-P., Bernet, N., Delgenès, J.-P., Dumas, C., 2014. Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Ind. Crops Prod.* 52, 695–701.
- Motte, J.-C., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J.-P.P., Steyer, J.-P.P., Dumas, C., 2013a. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 144, 141–148.
- Motte, J.-C., Trably, E., Escudié, R., Hamelin, J., Steyer, J.-P., Bernet, N., Delgenes, J.-P., Dumas, C., 2013b. Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnol. Biofuels* 6, 164.
- Motte, J.-C., Trably, E., Hamelin, J., Escudié, R., Bonnafous, A., Steyer, J.-P., Bernet, N., Delgenès, J.-P., Dumas, C., 2014. Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. *Bioresour. Technol.* 166, 610–5.
- Naik, S., Goud, V. V., Rout, P.K., Jacobson, K., Dalai, A.K., 2010. Characterization of Canadian biomass for alternative renewable biofuel. *Renew. Energy* 35, 1624–1631.
- Nakashimada, Y., Ohshima, Y., Minami, H., Yabu, H., Namba, Y., Nishio, N., 2008. Ammonia-methane two-stage anaerobic digestion of dehydrated waste-activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 1061–1069.
- Nielsen, H., Uellendahl, H., Ahring, B.K., 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* 31, 820–830.
- Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H., 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I<sub>β</sub> from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9074–82.
- Nkemka, V.N., Murto, M., 2013. Biogas production from wheat straw in batch and UASB reactors: the roles of pretreatment and seaweed hydrolysate as a co-substrate. *Bioresour. Technol.* 128, 164–72.

- Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., 2013. Package “vegan”: community ecology package.
- OWS, n.d. Technologie DRANCO [WWW Document]. URL [http://www.ows.be/pages/index.php?menu=85&choose\\_lang=FR](http://www.ows.be/pages/index.php?menu=85&choose_lang=FR) (accessed 9.26.15).
- Pain, B.F., Phillips, V.R., West, R., 1988. Mesophilic anaerobic digestion of dairy cow slurry on a farm scale: Energy considerations. *J. Agric. Eng. Res.* 39, 123–135.
- Park, W., Hyun, S.H., Oh, S.-E., Logan, B.E., Kim, I.S., 2005. Removal of Headspace CO<sub>2</sub> Increases Biological Hydrogen Production. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4416–4420.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, G., 1991a. Kinetics of anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* 24, 35–59.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, G., 1991b. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Crit. Rev. Environ. Control* 21, 411–490.
- Peiji, G., Yinbo, Q., Xin, Z., Mingtian, Z., Yongcheng, D., 1997. Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 581–584.
- Pohl, M., Mumme, J., Heeg, K., Nettmann, E., 2012. Thermo- and mesophilic anaerobic digestion of wheat straw by the upflow anaerobic solid-state (UASS) process. *Bioresour. Technol.* 124, 321–327.
- Pommier, S., Chenu, D., 2007. A logistic model for the prediction of the influence of water on the solid waste methanization in landfills. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 473–482.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recycl.* 50, 1–39.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W., 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.* 3, 29–60.
- Raveendran, K., Ganesh, A., Khilart, K.C., 1995. Influence of mineral matter pyrolysis characteristics on biomass 74, 1812–1822.
- Reddy, G. V., Ravindra Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K.R.R.M., Kothari, I.L., 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.* 38, 1457–1462.

- Rivera-Salvador, V., López-Cruz, I.L., Espinosa-Solares, T., Aranda-Barradas, J.S., Huber, D.H., Sharma, D., Toledo, J.U., 2014. Application of Anaerobic Digestion Model No. 1 to describe the syntrophic acetate oxidation of poultry litter in thermophilic anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 167, 495–502.
- Robledo-Narváez, P.N., Muñoz-Páez, K.M., Poggi-Varaldo, H.M., Ríos-Leal, E., Calva-Calva, G., Ortega-Clemente, L.A., Rinderknecht-Seijas, N., Estrada-Vázquez, C., Ponce-Noyola, M.T., Salazar-Montoya, J.A., 2013. The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *J. Environ. Manage.* 128, 126–137.
- Roustan, M., 2003. *Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux*, Lavoisier. ed.
- Sambusiti, C., Monlau, F., Ficara, E., Carrère, H., Malpei, F., 2013. A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates. *Appl. Energy* 104, 62–70.
- Sander, B., 1997. Properties of Danish biofuels and the requirements for power production. *Biomass and Bioenergy* 12, 177–183.
- Sapci, Z., 2013. The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws. *Bioresour. Technol.* 128, 487–494.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energy* 37, 19–27.
- Schiebahn, S., Grube, T., Robinius, M., Tietze, V., Kumar, B., Stolten, D., 2015. Power to gas: Technological overview, systems analysis and economic assessment for a case study in Germany. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 4285–4294.
- Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R. a., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
- Schnurer, a, Schink, B., Svensson, B.H., 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1145–1152.



- Schrör, H., 2011. Generation and treatment of waste in Europe 2008: Steady reduction in waste going to landfills. Eurostat.
- Sharma, S.K., Mishra, I.M., Sharma, M.P., Saini, J.S., 1988. Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. *Biomass* 17, 251–263.
- Shi, J., Wang, Z., Stiverson, J. a, Yu, Z., Li, Y., 2013. Reactor performance and microbial community dynamics during solid-state anaerobic digestion of corn stover at mesophilic and thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 136, 574–81.
- Siegert, I., Banks, C., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* 40, 3412–3418.
- Singh, P., Sulaiman, O., Hashim, R., Rupani, P.F., Peng, L.C., 2010. Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 9, 141–151.
- Snell-Castro, R., Godon, J.-J., Delgenès, J.-P., Dabert, P., 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 229–42.
- Sprott, G.D., Shaw, K.M., Jarrell, K.F., 1984. Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* 259, 12602–8.
- Staley, B.F., de Los Reyes, F.L., Barlaz, M. a, 2011. Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2381–91.
- Stams, A.J., Plugge, C., De Bok, F.A., Van Houten, B.H.G.W., Lens, P., Dijkman, H., Weijma, J., 2005. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. *Water Sci. Technol.* 52, 13–20.
- Stams, A.J.M., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271–94.
- Strabag, n.d. STRABAG DRY DIGESTION: LARAN PLUG FLOW DIGESTER [WWW Document]. URL [http://www.strabag.de/databases/internet/\\_public/files.nsf/SearchView/D2FEDEBF61AC95EFC12579FE004C5A52/\\$File/verfahren\\_dry\\_e\\_v10.pdf?OpenElement](http://www.strabag.de/databases/internet/_public/files.nsf/SearchView/D2FEDEBF61AC95EFC12579FE004C5A52/$File/verfahren_dry_e_v10.pdf?OpenElement) (accessed 9.26.15).
- Stroot, P.G., McMahon, K.D., Mackie, R.I., Raskin, L., 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions--I. Digester performance. *Water Res.* 35, 1804–16.

- Subramaniyan, S., Prema, P., 2002. Biotechnology of Microbial Xylanases : Enzymology , Molecular Biology and Application. Crit. Rev. Biotechnol. 22, 33–46.
- Sun, R., Tomkinson, J., Wang, Y., Xiao, B., 2000. Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. Polymer (Guildf). 41, 2647–2656.
- Sun, R.-C., 2010. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels.
- Sung, S., Liu, T., 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. Chemosphere 53, 43–52.
- Tabil, L., Adapa, P., Kashaninejad, M., 2011. Biomass Feedstock Pre-Processing-Part1: Pretreatment, in: Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), Biofuel's Engineering Process Technology. pp. 411–438.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. Int. J. Mol. Sci. 9, 1621–51.
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresour. Technol. 101, 4744–53.
- Tamaki, Y., Mazza, G., 2010. Measurement of structural carbohydrates, lignins, and micro-components of straw and shives: Effects of extractives, particle size and crop species. Ind. Crops Prod. 31, 534–541.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., Pi, P.P.H.--, 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 809.
- Thauvin, P., Vernier, A., 2013. Réduire, Trier Et Valoriser Les Biodéchets Des Gros Producteurs. ADEME.
- Theander, O., 1985. Review of straw carbohydrate research. New Approaches to Res. Cereal Carbohydrates 217-230.
- Théobald, O., Bahmani-piaseczny, I., Quaak, M., Daillet, J.-J., 2014. Méthanisation solution d'avenir. ADEME 75.
- Tian, Z., Chauillac, D., Pullammanappallil, P., 2013. Comparison of non-agitated and agitated batch, thermophilic anaerobic digestion of sugarbeet tailings. Bioresour. Technol. 129, 411–420.
- Triolo, J.M., Sommer, S.G., Møller, H.B., Weisbjerg, M.R., Jiang, X.Y., 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion:

- influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour. Technol.* 102, 9395–402.
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Alkalinity and high total solids affecting H<sub>2</sub> production from organic solid waste by anaerobic consortia. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 3639–3646.
- Valorga International, 2006. Procédé Valorga [WWW Document]. URL <http://www.valorgainternational.fr/fr/mpg3-128079--LE-PROCEDE-DE-METHANISATION-VALORGA.html> (accessed 9.26.15).
- Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G., Morgan, T.J., 2012. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel* 94, 1–33.
- Vavilin, V. a, Angelidaki, I., 2005. Anaerobic degradation of solid material: importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 113–22.
- Vavilin, V. a, Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manag.* 28, 939–51.
- Vavilin, V. a, Rytov, S. V, Lokshina, L.Y., Pavlostathis, S.G., Barlaz, M. a, 2003. Distributed model of solid waste anaerobic digestion: effects of leachate recirculation and pH adjustment. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 66–73.
- Vavilin, V. a, Shchelkanov, M.Y., Rytov, S. V, 2002. Effect of mass transfer on concentration wave propagation during anaerobic digestion of solid waste. *Water Res.* 36, 2405–9.
- Vavilin, V.A., Rytov, S., Lokshina, L.Y., 1996. A Description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technol.* 56, 229–237.
- Vedrenne, F., 2007. Etude des processus de dégradation anaérobie et de production de méthane au cours du stockage des lisiers [WWW Document]. URL <http://cemadoc.cemagref.fr/cemoa/PUB00021582> (accessed 9.26.15).
- Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H., Hamelers, B., Kalyuzhnyi, S., 2000. Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *J. Environ. Eng.* 06, 1076–1081.
- Vidal, B.C., Dien, B.S., Ting, K.C., Singh, V., 2011. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion--a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1405–21.
- Vinci Environnement, 2011. Nos procédés: Kompogas [WWW Document]. URL [http://www.vinci-environnement.com/france/VCE/Minisites.nsf/0/E33AAC121B8F9066C125792600443F10/\\$File/Procédé KOMPOGAS.pdf](http://www.vinci-environnement.com/france/VCE/Minisites.nsf/0/E33AAC121B8F9066C125792600443F10/$File/Procédé%20KOMPOGAS.pdf) (accessed 9.26.15).

- Wang, Z., Xu, F., Li, Y., 2013. Effects of total ammonia nitrogen concentration on solid-state anaerobic digestion of corn stover. *Bioresour. Technol.* 144, 281–287.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* 99, 7928–40.
- Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–60.
- Wéry, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgènes, J.-P., Garrelly, L., Godon, J.-J., 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3030–7.
- Westerholm, M., Dolfing, J., Sherry, A., Gray, N.D., Head, I.M., Schnürer, A., 2011. Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 500–505.
- Westerholm, M., Roos, S., Schnürer, A., 2010. *Syntrophaceticus schinkiigen. nov., sp. nov.*, an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiol. Lett.* 309, 100–104.
- Xu, F., Wang, Z.-W., Tang, L., Li, Y., 2014. A mass diffusion-based interpretation of the effect of total solids content on solid-state anaerobic digestion of cellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 167C, 178–185.
- Yang, L., Xu, F., Ge, X., Li, Y., 2015. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 44, 824–834.
- Ye, N.-F., Lü, F., Shao, L.-M., Godon, J.J., He, P.-J., 2007. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1055–65.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Groups specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 670–679.
- Zeitoun, R., 2011. Procédés de fractionnement de la matière végétale: application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. Université de toulouse.
- Zhang, B., He, P.-J., Lü, F., Shao, L.-M., Wang, P., 2007. Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Res.* 41, 4468–78.
- Zhang, Y., Banks, C.J., 2013. Impact of different particle size distributions on anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. *Waste Manag.* 33, 297–307.

- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824.
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Biorefining.*
- Zhbankov, R., 1992. Hydrogen bonds and structure of carbohydrates. *J. Mol. Struct.* 270, 523–539.
- Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzapple, M.T., 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresour. Technol.* 99, 3817–3828.
- Zinder, S., 1993. Physiological Ecology of Methanogens, in: Ferry, J. (Ed.), *Methanogenesis SE - 4*, Chapman & Hall Microbiology Series. Springer US, pp. 128–206.

## **ROLE DES GAZ DISSOUS DANS LA DIGESTION ANAEROBIE PAR VOIE SECHE DE DECHETS LIGNO-CELLULOSIQUES**

La digestion anaérobie par voie sèche est un procédé de valorisation des déchets organiques qui est défini par une teneur en matière sèche supérieure à 15%. Ce procédé est particulièrement adapté aux déchets ligno-cellulosiques puisqu'il ne nécessite qu'un ajout limité en eau. Cependant, la digestion anaérobie est inhibée pour des teneurs en matière sèche élevées, due à une diminution du transfert gaz-liquide au sein du milieu qui provoquerait des accumulations locales de produits inhibiteurs comme les gaz dissous. L'objectif de cette thèse est donc de comprendre le rôle des gaz dissous dans la digestion anaérobie par voie sèche à l'échelle microscopique et mésoscopique. Les principaux résultats montrent que l'hydrogène inhibe spécifiquement l'hydrolyse de la matière ligno-cellulosique à l'échelle microscopique. Cette inhibition est réversible en ajoutant du dioxyde de carbone, par consommation de l'hydrogène, avec cependant des effets rémanents inhibiteurs visibles sur la méthanogenèse et la dégradation de l'acétate. A l'échelle mésoscopique, la diminution des transferts de matière inhiberait l'hydrolyse, par l'accumulation locale d'hydrogène. De plus, un gradient de concentration d'hydrogène se met en place et serait responsable du gradient de concentration des acides gras volatils au sein du milieu. De plus, l'ajout de dioxyde de carbone à l'échelle mésoscopique avec un transfert gaz-liquide limitant augmente la concentration en acides gras volatils et baisse le pH du milieu, ce qui indique le rôle important du dioxyde de carbone dans la diminution des performances de la digestion anaérobie pour de fortes teneurs en matières sèches.

---

**MOTS-CLES:** Digestion anaérobie par voie sèche, transfert de matière, inhibition par l'hydrogène, dioxyde de carbone

---

---

### **IMPACT OF DISSOLVED GAS ON DRY ANAEROBIC DIGESTION OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES**

---

Dry anaerobic digestion is a method of organic waste treatment and conversion to bioenergy, defined by a total solid content over 15%. This process is particularly suitable for lignocellulosic residues since the quantity of water to be added for the process is rather limited. However, dry anaerobic digestion processes is inhibited for a high total solid content, due to a decrease of the gas-liquid transfer within the medium, which may cause local accumulations of inhibitory byproducts, such as dissolved gases. This thesis aims to better understand the role of dissolved gas in dry anaerobic digestion at microscopic and mesoscopic scale. It was shown that hydrogen can inhibit specifically the hydrolysis step of lignocellulosic residues at microscopic level. This inhibition was reversible after addition of carbon dioxide, with remaining inhibitory effect on the acetate degradation and methanogenesis. At mesoscopic scale, the decrease of the mass transfer inhibits the hydrolysis, by dissolved hydrogen accumulation. Moreover, a local hydrogen concentration gradient was present and seems responsible for a concentration gradient of volatile fatty acids in the medium. Moreover, adding carbon dioxide at mesoscopic scale, with a limited gas-liquid transfer, increased the volatile fatty acids concentration and decreased the pH, which showed the important role of carbon dioxide in the inhibition of anaerobic digestion under high dry matter content.

---

**KEYWORDS:** Solid-state anaerobic digestion, mass transfer, hydrogen inhibition, Carbon dioxide

---

---

**DISCIPLINE :** APAB (Agroressources, Procédés, Aliments, Bioproduits)

---

---

**INRA, UR050 Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne.**

---