



Modélisation des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie : application à l'optimisation de la valorisation des digestats

Younès Bareha

► To cite this version:

Younès Bareha. Modélisation des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie : application à l'optimisation de la valorisation des digestats. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2018. Français. NNT : 2018REN1B067 . tel-02115249

HAL Id: tel-02115249

<https://theses.hal.science/tel-02115249>

Submitted on 30 Apr 2019

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.

THESE DE DOCTORAT

De l'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Statistiques/Modélisation en écologie, géosciences,
agronomie et alimentation

Présentée par

Younès BAREHA

Modélisation des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie

Application à l'optimisation de la valorisation des digestats.

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 20 décembre 2018

Unité de recherche : OPAALE

Rapporteurs avant soutenance :

Dominique PATUREAU
Mathieu SPÉRANDIO

Directrice de recherche, LBE, INRA
Professeur, LISBP, INSA de Toulouse

Composition du Jury :

Dominique PATUREAU
Mathieu SPÉRANDIO
Safya MENASSERI-AUBRY
Thierry RIBEIRO
Anne TRÉMIER
Romain GIRAULT

Directrice de recherche, LBE INRA, Narbonne/ *présidente du jury*
Professeur, LISBP, INSA de Toulouse/ *rapporteur*
Maitre de conférences, UMR SAS, Agrocampus ouest, Rennes
Enseignant-chercheur, UniLaSalle, Beauvais
Directrice de recherche, UR OPAALE, Irstea, Rennes/ *Dir. de thèse*
Ingénieur de recherche, UR OPAALE, Irstea, Rennes/ *Encdr. thèse*

THESE DE DOCTORAT

De l'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Statistiques/Modélisation en écologie, géosciences,
agronomie et alimentation

Présentée par

Younès BAREHA

Modélisation des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie

Application à l'optimisation de la valorisation des digestats.

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 20 décembre 2018
Unité de recherche : OPAALE

Rapporteurs avant soutenance :

Dominique PATUREAU
Mathieu SPÉRADIO

Directrice de recherche, LBE, INRA
Professeur, LISBP, INSA de Toulouse

Composition du Jury :

Dominique PATUREAU
Mathieu SPÉRADIO
Safya MENASSERI-AUBRY
Thierry RIBEIRO
Anne TRÉMIER
Romain GIRAULT

Directrice de recherche, LBE INRA, Narbonne/ *présidente du jury*
Professeur, LISBP, INSA de Toulouse/ *rapporteur*
Maître de conférences, UMR SAS, Agrocampus ouest, Rennes
Enseignant-chercheur, UniLaSalle, Beauvais
Directrice de recherche, UR OPAALE, Irstea, Rennes/ *Dir. de thèse*
Ingénieur de recherche, UR OPAALE, Irstea, Rennes/ *Encdr. thèse*

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à ceux qui m'ont encadré pendant trois courtes années, ma directrice de thèse Anne Trémier et mon encadrant Romain Girault. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance il y a trois ans. Merci pour votre patience, votre disponibilité, votre honnêteté, pour tous ce qui fait de vous d'excellents encadrants. Vous m'avez transmis votre rigueur et l'approche systémique qui m'ont permis d'avoir une vision globale et justifiée de la recherche. Et je suis fier de dire que j'ai eu les meilleurs formateurs à la recherche durant cette thèse.

Je remercie ceux sans qui tous ces travaux n'auraient jamais pu être menés jusqu'au bout, les meilleurs qui ont composé la best Team : Valentine, Stevan, Mélina, Jade et Meriem. Vous avez été indispensables et ce travail est autant le vôtre que le mien.

Je souhaiterais remercier aussi les membres de mon comité de thèse :

- Sébastien Pommier pour ton soutien et tes remarques qui ont permis de renforcer les résultats,
- Patricia Garnier pour avoir éclairé ma lanterne sur les modèles agronomiques,
- Julie Jimenez pour sa transmission de son fractionnement (9 ans que tu es dessus), nos échanges longtemps sans se rencontrer qui ont permis de donner le jour à un papier dont je suis très fier
- Safya Menasseri pour son implication dans mes travaux d'un point de vue agronomique et qui ont permis de bien orienter mes travaux quant au contexte breton.

Merci pour vos sages conseils et les discussions fructueuses que l'on a pu avoir. Vos questions et votre soutien ont été un élément moteur pour continuer à aller plus loin sur le sujet.

Un merci à Sabine Houot pour nos nombreux échanges entre deux présentations notamment lors des conférences, à Sylvain Marsac pour nous avoir fourni des substrats depuis le sud-ouest et nos échanges qui ont permis d'améliorer les méthodes, Merci à Claire Ingreteau pour m'avoir facilité le contact avec les acteurs du Coglès qui m'a permis d'avoir un large panel de substrats à analyser.

Un merci aux chercheurs à Irstea qui m'ont formé: Pascal Peu, Fabrice Béline, Julie Buffet (les prélèvements de lisier et sulfatosub ont été un plaisir à faire car tu m'as trop bien vendu les concepts), Patricia St-Cast, Mylène Daumoin, Sylvie Picard, Véronique Maheux.

A ma coloc de bureau, qui m'accueilli, intégré au centre et qui m'a vu grandir pendant trois ans. Merci Christine et désolé si j'ai pu être chiant par moments.

Merci à tous les jeunes et vieux chercheurs avec qui j'ai pu partager des moments moins « professionnels » : le groupe de basketteurs anti-foot (Nicolas, Lionel), mes amis de risque du centre-ville qui m'ont permis de souffler pendant cette thèse à savoir mon bon vieux Clément, Simon, Amandine, Stéphanie, Simon De, Anne Laure, Likiliki (je vous ai démoli au molki toi et Caro), Lorraine, Lorraine, Lorette, Romain Le Batch (et son pilote degueur), Henry (merci pour ton soutien à la fin), Axelle D (pour m'avoir mis le pied à l'étrier à Irstea), Cyril Marcilhac (pour tes blagues sans fin entre Beauvais et Rennes), Mégane la pitite nouvelle en microbio qui m'a énormément soutenu dans les derniers jours et mes side kicks de labo, j'ai nommé Benjamin et Victor avec qui le labo devenait un terrain de jeu !

Une mention spéciale à Amine et Rim sans qui les fêtes de l'Aid n'auraient pas été aussi chouettes. Merci de m'avoir soutenu pendant cette thèse et bon courage à vous pour vos projets.

Je souhaite aussi remercier mes parents pour leur soutien pendant ces trois ans dont 2 ans et demi passés sous votre toit après 5 ans de vadrouille. Je vous remercie de tout mon cœur pour votre soutien tout au long de ces 9 dernières années et j'espère que vous serez fiers de mon travail. Un merci à mes sœurs Marwa et Maryam ainsi que mon frère Bilal, merci pour les sorties et activités qui nous ont permis de bien rigoler ! Un grand merci à ma grand-mère qui a toujours prié pour moi et à qui je souhaite une longue et tranquille vie. A ma tante Mina, mon oncle Mous, ma grand-tante Fatima qui m'ont toujours inspiré, à toute ma famille au Maroc et en France envers qui je suis reconnaissant.

Une grosse pensée pour mes grands-pères et ma grand-mère, c'est grâce à eux que j'en suis la aujourd'hui et grâce à leurs sacrifices que des opportunités ont pu se présenter aux personnes de ma génération... Et à chaque fois que j'ai eu un doute, j'ai repensé à votre courage et à la manière avec laquelle vous avez affronté l'inconnu pour nous donner une vie meilleure.

Un merci à celle qui m'a soutenu et bien voulu me suivre dans cette aventure : Esther. Merci, merci, merci. Tu m'as été d'un grand soutien et cette étape de ma vie m'a fait comprendre que si tout s'est bien passé, c'est parce que tu as toujours été à mes côtés !

Et un merci à tout le Gang, pour nos nouvel an, anniversaires, retrouvailles, mariages qui nous m'ont permis de garder la pêche pendant 3 ans. Vous avez mis du temps à comprendre ce que je faisais mais votre obstination à comprendre m'a aidé à vulgariser mes travaux. Et vous ne savez pas à quel point ça a été utile par la suite.

Ces travaux de thèse sont le reflet de mon environnement et n'auraient jamais été possibles sans le concours de ces personnes. Ces travaux sont autant les miens que ceux qui ont été mentionnés plus haut ainsi que ceux que j'ai oublié de mentionner.

Liste des communications relatives à cette thèse

Articles à comité de lecture

Bareha, Y., Girault, R., Jimenez, J., Trémier, A., 2018. Characterization and prediction of organic nitrogen biodegradability during anaerobic digestion: A bioaccessibility approach. *Bioresource Technology*. 263, 425–436.

Fisgativa, H., Marcilhac, C., Jaudoin, C., Bareha, Y., Girault, R., Tremier, A., Béline, F., 2018. A new methodology to estimate nitrogen transformations during anaerobic digestion of organic substrates. *En cours de révision par Waste and Biomass Valorization*

Bareha, Y., Guezel, S., Chaker, J., Girault, R., Trémier, A., 2019. Modeling the fate of organic nitrogen during anaerobic digestion: development of a bioaccessibility based ADM1. *En cours de soumission à Water Research*.

Bareha, Y., Chaker, J., Dourlens, M., Gabaji, M., Awhangbo, L., Girault, R., Trémier, A., 2019. Dynamic modelling of organic nitrogen degradation into anaerobic digestion process: application to the prediction of the effect of HRT. *En preparation pour soumission à Bioresource Technology*

Communication à des congrès nationaux et internationaux

Marcilhac, C., Bareha, Y., Girault, R., Beline, F., 2017. Devenir de l'azote lors de la dégradation anaérobie de la matière organique : potentiel et cinétique de minéralisation de l'azote. Journées Recherche Innovation biogaz méthanisation (JRI2017). Présentation orale. 11-12-13 avril 2017. UniLaSalle Beauvais.

Bareha, Y., Girault, R., Jimenez, J., Trémier, A., 2017. Understanding the organic nitrogen biodegradability during anaerobic digestion: application to ammonium content prediction in digestates. 17th International RAMIRAN Conference. Oral presentation. 4-6th September, 2017. Wexford, Ireland.

Bareha, Y., Girault, R., Trémier, A., 2018. Caractériser l'accessibilité de la matière organique : application à la prédiction de la minéralisation de l'azote organique en digestion anaérobie. Séminaire ResMO. Poster. 4-7 février 2018. Trégastel.

Bareha, Y., Trémier, A., Girault, R., 2018. How to accurately estimate ammonium content in the digestates: a lab-scale study. WasteEng Conference. Oral presentation. 2-5th July, 2018. Prague, Czech Republic.

Bareha, Y., Trémier, A., Fisgativa, H., Marcilhac, C., Béline, F., Girault, R., 2018. Impact des cocktails de cosubstrats sur les propriétés fertilisantes azotées des digestats. Journées Recherche Innovation biogaz méthanisation (JRI2018). Présentation orale. 2-4 octobre 2018. Rennes.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	5
Contexte de la thèse et objectifs opérationnels.....	7
1. Cycle de l'azote en agriculture	9
2. Enjeux de la substitution de l'azote minéral par de l'azote organique.	12
2.1. Enjeux économiques.....	12
2.2. Enjeux environnementaux	13
3. Les digestats comme substituts aux engrais minéraux azotés.	15
4. Objectif de la thèse	18
Chapitre 1 : Etat de l'art et objectifs scientifiques	21
Partie 1 : Transformation du carbone et de l'azote en digestion anaérobie.....	23
1. La digestion anaérobie.....	23
1.1. La désintégration	23
1.2. L'hydrolyse	24
1.3. L'acidogenèse.....	25
1.4. L'acétogenèse.....	26
1.5. La méthanogenèse	26
2. Transformations biochimiques des composés azotés en digestion anaérobie	28
2.1. La protéine.....	28
2.2. Hydrolyse des protéines	29
2.3. Acidogenèse des acides aminés.....	31
2.4. Assimilation de l'azote en digestion anaérobie	33
3. Inhibitions en digestion anaérobie.....	34
3.1. Inhibitions par l'azote ammoniacal	35
3.2. Perturbations des transformations de l'azote par des composés ne résultant pas de la dégradation de molécules azotées.	37
4. Transformations physiques des composés azotés et non azotés en digestion anaérobie	39
5. Conclusion de la partie 1	42
Partie 2 : Modélisation de la digestion anaérobie.....	43
1. Principe du modèle.....	43
2. Processus et données d'entrée : influence sur les dynamiques de transformation de l'azote... ..	45
2.1. Données d'entrée	45
2.2. Processus impliquant des transferts d'azote.	46

2.3. Processus impliquant des transformations de l'azote	47
3. Méthodes de détermination des données d'entrée, coefficients stœchiométriques et paramètres cinétiques.....	49
3.1. Stratégies de fractionnement des substrats pour ADM1.	49
3.2. Stratégies de calage	50
3.3. Paramètres calés liés à l'azote	51
4. Principales limites du modèle et modifications.....	51
4.1. Un modèle complexe et ciblé.	51
4.2. Modification de la cinétique de désintégration et d'hydrolyse : l'ordre Contois	52
4.3. Modification du fractionnement.	53
5. Conclusion de la partie 2	55
Partie 3 : Questions de recherche spécifiques à la thèse et proposition d'approche méthodologique.	57
Chapitre 2 : Développements méthodologiques préliminaires.....	61
1. Introduction	63
2. Dispositif de détermination du potentiel de minéralisation de l'azote organique en digestion anaérobie : la « méthode ANMP » (Apparent Nitrogen Mineralized Potential)	66
2.1. Principe.....	66
2.2. Méthodologie.....	66
2.3. Résultats	71
2.4. Bilan	75
3. Dispositif de suivi des transformations de l'azote apporté par le substrat en réacteurs batch : Nitrobatch.....	76
3.1. Pilote expérimental.....	76
3.2. Protocole expérimental.....	77
3.3. Analyses effectuées sur les digestats.....	78
3.4. Résultats	81
3.5. Bilan	84
4. Pilote semi-industriel de digestion anaérobie : Nitrominator.....	85
4.1. Description des pilotes	85
4.2. Intrants utilisés	87
4.3. Conditions opératoires.....	88
4.4. Détermination des incertitudes de mesure.....	88
4.5. Résultats	89
4.6. Bilan	93
5. Conclusion.....	94
Chapitre 3 : Caractérisation et prédiction de la biodégradabilité de l'azote organique.....	97

1. Introduction	100
2. Material and methods	103
2.1. Substrates.....	103
2.2. Physico-chemical characterization	105
2.3. Organic matter fractionation.....	105
2.4. Organic carbon and nitrogen biodegradability	108
2.5. Statistical analysis	110
3. Results and discussion.....	112
3.1. Organic carbon and nitrogen distribution in bioaccessibility based fractionation.....	112
3.2. Organic carbon and nitrogen biodegradability under anaerobic conditions.....	115
3.3. Prediction of organic nitrogen biodegradability from bioaccessibility indicators.....	124
4. Conclusion.....	133
Chapitre 4 : Modélisation des transformations de l’azote organique : développement d’un modèle basé sur la bioaccessibilité.....	135
1. Introduction	141
2. Material and method.....	144
2.1. Substrates.....	144
2.2. Physical-chemical characterization	146
2.3. Organic matter fractionation: modified “EPS” fractionation	146
2.4. Experimental set up	148
2.5. Modeling batch experiments	148
3. Results	160
3.1. The fate of nitrogen considering modified EPS fractionation: batch reactor monitoring	160
3.2. Model calibration	170
3.3. Sensitivity analysis.....	179
3.4. Model evaluation.....	181
4. Conclusion.....	187
Chapitre 5 : Evaluation des effets des paramètres opératoires de la digestion anaérobie sur la qualité azotée des digestats	189
1. Introduction	194
2. Material and methods	197
2.1. Influent composition.....	197
2.2. Physico-chemical analysis.....	199
2.3. Bioaccessibility characterization.	199
2.4. CSTR experiments	201
2.5. Modeling methane production, ammonium production and bioaccessibility.....	202

3. Results and discussion.....	208
3.1. Impact of the hydraulic retention time on methane and ammonium production at steady-state.	208
3.2. Impact of the hydraulic retention time on bioaccessibility fractions.....	211
3.3. Modelling methane production and digestate quality.....	214
4. Conclusion.....	230
5. Supplementary data	231
Supplementary data 1-a : General scheme of ADMacc processes	231
Conclusion.....	239
1. Synthèse des résultats scientifiques.....	241
1.1. Compréhension des transformations de l'azote en digestion anaérobie.....	241
1.2. La modélisation comme outil de prédiction.	244
2. Applications des résultats de la thèse au pilotage de la qualité azotée des digesteurs.	247
2.1. Impact des cocktails de substrats sur les propriétés azotées des digestats	247
2.2. Impact du temps de séjour des matières sur les propriétés fertilisantes azotées des digestats	251
Perspectives	253
Références bibliographiques	261

Liste des figures

Figure 1 : Schéma simplifié de la cascade d'azote (adapté de l'ESCO MAFOR).....	10
Figure 2 : Evolution de la production et de la demande mondiale et française en engrais azotés minéraux. (Source : International Fertilizer Industries Association).....	11
Figure 3: Corrélation entre le prix de la tonne d'engrais azoté minéral et le prix du baril de pétrole. (Source : Mineral Commodity Summaries, 2015 et NASDAQ).....	12
Figure 4 : Variabilité des CAU (a) de l'azote et des compositions (b) des digestats (Decoopman et al., 2017).....	16
Figure 5: Fuites et immobilisation d'azote sur une filière de valorisation de produits résiduaux organiques comprenant une étape de digestion anaérobie en amont de la valorisation agronomique.	17
Figure 6: Chaîne réactionnelle de la digestion anaérobie. (adaptée de Batstone et al, 2002)	23
Figure 7: Structures des protéines. La structure secondaire est formée par les liaisons hydrogène. La structure tertiaire présente de nombreuses interactions entre chaînes latérales (Source : Mariana Ruiz, 2010).	28
Figure 8: Hydrolyse d'une protéine. (Auteur : Martin Dion, Infoscan Colette)	30
Figure 9: Réaction de Stickland couplée (Source : Wikicommons).....	31
Figure 10: Structure de la lignocellulose	39
Figure 11: Processus d'ADM1 (Batstone et al., 2002).....	44
Figure 12: Modèle ADM1 modifié par Jimenez et al. (2016) prenant en compte la bioaccessibilité des espèces chimiques.....	55
Figure 13: Ecart dans la détermination du BMP entre la « méthode BMP » selon Vedrenne et al. (2008) et la « méthode ANMP » (Bareha et al., 2018).....	71
Figure 14: Vitesse de production de méthane les 10 premiers jours avec la « méthode BMP » (bleu) et avec la « méthode ANMP » (rouge).	72
Figure 15: Part de l'azote organique du substrat par rapport à l'azote total selon la méthode ANMP et BMP (a) ainsi que la part d'azote ammoniacal issu de l'inoculum par rapport à l'azote total (b)..	72
Figure 16: Distribution des écart-types de mesure calculée par la méthode Monte Carlo sur des essais avec la « méthode BMP » et la « méthode ANMP ».	73
Figure 17: Biodégradabilité de l'azote organique des substrats testés.....	74
Figure 18: Schéma du dispositif Nitrobatch.	77
Figure 19: Evolution des concentrations en AGV (a), en ammonium (b) et du pH (c) au cours des essais Nitrobatch sur le déchet d'aliment pour bétail (bleu) et le lisier bovin (bleu).	81
Figure 20: Ecart de valeurs observés avec la méthode Nitrobatch sur la mesure du BMP et de l'ANMP.....	82
Figure 21: Part de l'azote organique issue du fumier de volaille (bleu) ainsi que la part d'azote organique issue de l'inoculum dans le mélange (rouge) selon le fractionnement Van Soest (a) et le fractionnement EPS (b). Les incertitudes de mesures sont déterminées sur la fraction du mélange soit l'addition de contributions azotées du substrat et de l'inoculum.....	83
Figure 22: Schéma et photo d'un réacteur de digestion anaérobie du pilote Nitrominator	86
Figure 23 : Evolution de la vitesse de production de méthane (a) et de la concentration en ammonium (b) du digestat pendant 48 jours sur les trois pilotes.	89
Figure 24: Stabilité des teneurs en azote des fractions EPS des digestats au temps de séjour 48 jours sur les réacteurs I1 (a), I2 (b) et I3 (c).....	90

Figure 25: Répartition de l'azote selon le fractionnement EPS dans le mélange initial de l'intrant avec le digestat avec une simple alimentation pour les essais avec les intrants I1 (a), I2 (b) et I3 (c). La part de l'azote apporté par l'intrant est représentée en rouge et celle du digestat en bleu.....	91
Figure 26: Répartition de l'azote selon le fractionnement EPS dans le mélange initial de l'intrant avec le digestat avec une double alimentation pour les essais avec les intrants I1 (a), I2 (b) et I3 (c). La part de l'azote apporté par l'intrant est représentée en rouge et celle du digestat en bleu.....	92
Figure 27: Organic carbon (a) and organic nitrogen (b) distribution according to Van Soest and EPS fractionation (Fraction abbreviations are explained table 12).....	112
Figure 28: Hierarchical Cluster Analysis of the panel of substrates (a) and (b) the distribution of the ratio NH_4^+/TKN according to the substrate typology (Substrate abbreviations are explained in table 12).....	118
Figure 29: Box plots of the distribution of organic carbon and nitrogen biodegradability for G1 (a) and G2 (b).	120
Figure 30: Organic carbon (a) and organic nitrogen (b) content for G1 and G2 substrates according to modified EPS fractionation (Fraction abbreviations are explained table 12).....	123
Figure 31: Normalized coefficient for model N_{EPS_G1} (a) and N_{EPS_G2} (b) explaining organic nitrogen biodegradation on G1 and on G2 (Fraction abbreviations are explained table 2).	131
Figure 32: Modifications to ADM1 fractionation.....	151
Figure 33: Biomass of active biomass and its distribution in the inoculum used for the biodegradation tests.....	155
Figure 34: Changes in C/N during the incubation in CF (a) and BS (b).	160
Figure 35: Changes in protein and non-protein contents in the LIGN (a and b), HOLO (c and d) and PROT (e and f) fractions in the CF and BS biodegradation tests. (the blue curve represents the protein content in the fraction; the red curve the non-protein content in the fraction; the green curve the sum of protein and non-protein contents in the fraction).	162
Figure 36: Changes in soluble carbon and nitrogen compounds (a and b), propionate and acetate (c and d), and ammonium and methane production (e and f) in CF and BS biodegradability tests.	165
Figure 37: General scheme of ADMacc processes.....	167
Figure 38: Simulation of ammonium (a and b) and methane production (c and d) using ADMacc calibrated on CF and BS biodegradability tests. (Blue dots represent measured values and the black line represents simulated values)	170
Figure 39: Calibration performance on X_{LIGN_P} (a), X_{LIGN_C} (b), X_{HOLO_P} (c), X_{HOLO_C} (d), the sum of $X_{PROT_P} + X_{PROT_C}$ (e) and the sum of soluble materials SOL (f) on the CF biodegradation test.....	171
Figure 40: Calibration performance on X_{LIGN_P} (a), X_{LIGN_C} (b), X_{HOLO_P} (c), X_{HOLO_C} (d), the sum of $X_{PROT_P} + X_{PROT_C}$ (e) and the sum of soluble materials SOL (f) on the BS biodegradation test.	172
Figure 41: Comparison of measured methane (blue dotted line) and ammonium (green dots) production rates with simulated methane (plain blue line) and ammonium (plain green line) production rates. The dataset is composed of GS (a), O (b), FB (c), BM (d), PS (e), OS (f).	182
Figure 42: Predicted versus measured values in fractions X_{LIGN_P} (a), X_{LIGN_C} (b), X_{HOLO_P} (c), X_{HOLO_C} (d), sum of $X_{PROT_P} + X_{PROT_C}$ (e) and sum of the soluble fractions (f).....	184
Figure 43: Modifications brought to ADM1 in ADMacc.	202
Figure 44: Modelling methodology used for this study.	204
Figure 45: Non-protein reduction for I1 (a), I2 (c), I3 (e) and protein reduction for I1 (b), I2 (d), I3 (f) according to bioaccessibility at HRT 28 and 48 days.	211
Figure 46: Calibration results on methane (a) and ammonium (b) got from steady state experiments. (Red: measured value; blue: simulated value).	214
Figure 47: Calibration results on methane (blue) and ammonium (green) production for I1 (a), I2 (b) and I3 (c) (experimental points: dot, simulation : dotted line) along with bioaccessibility of non-	

protein (blue) and protein (green) content in I1 (d), I2 (e) and I3 (f) digestates after digestion at HRT48 (experimental digestate: plain plot, simulate digestate: dotted plot).	215
Figure 48: Calibration of ADMacc on I1 substrate pulse evolution of the fractions X_{LIGN_C} (a), X_{LIGN_P} (b), X_{HOLO_C} (c), X_{HOLO_P} (d), X_{PROT_C} (f), X_{PROT_P} (g), X_{SOL_C} (h) and S_{AA} (i). (Blue dots: experimental ; plain red line: simulation).....	216
Figure 49: Confidence areas for the parameter couples $k_{hyd,XLIGN_C}/X_{LIGN_C}$ (a), $k_{hyd,XLIGN_P}/X_{LIGN_P}$ (b), $k_{hyd,XHOLO_C}/X_{HOLO_C}$ (c), $k_{hyd,XHOLO_P}/X_{HOLO_P}$ (d) and $k_{m,XSOL_C}/K_{S,XSOL_C}$ (e) along with the confidence interval of $k_{hyd,XPROT_C}$ (f) for I1 (blue), I2 (red) and I3 (green).....	223
Figure 50: Validation results on methane (a) and ammonium (b) got from steady state experiments. (Red: measured value; blue: simulated value).	227
Figure 51: Evaluation results on methane (blue) and ammonium (green) production for I1 (a), I2 (b) and I3 (c) (experimental points: dot, simulation : dotted line) along with bioaccessibility of non-protein (blue) and protein (green) content in I1 (d), I2 (e) and I3 (f) digestates after digestion at HRT28 (experimental digestate: plain plot, simulate digestate: dotted plot).	228
Figure 52: Impact du substrat de base sur les taux de minéralisation de l'azote (a) et le C/N (b) des digestats.....	248
Figure 53: Résultat de l'analyse en composantes principales réalisée sur l'ensemble des digestats simulés.	250
Figure 54: Simulation de l'impact du temps de séjour des matières sur le taux de minéralisation de l'azote organique dans le digesteur.	251
Figure 55: Effet du temps de séjour sur le ratio C/N et la concentration en ammonium (a et b) du digestat.	252
Figure 56: Evolution de l'azote organique dans les fractions NSOL (a), NPROT (b), NHOLO (c) et NLIGN (d) selon le fractionnement Van Soest (bleu) et EPS (rouge) pour les déchets d'aliment pour bétail.....	257

Liste des tableaux

Tableau 1: Produits issus de la dégradation des acides aminés par couplage de Stickland (Ramsay, 1997).....	32
Tableau 2: Solvants utilisés et molécules ciblées par les méthodes d'extraction Van Soest et EPS.	40
Tableau 3: Description des variables d'état du modèle ADM1.....	45
Tableau 4: Coefficients stœchiométriques.	45
Tableau 5: Constantes cinétiques.	46
Tableau 6: Synthèse des méthodes de fractionnement (adapté de Girault (2011)).....	50
Tableau 7: Caractéristiques azotées de l'inoculum non centrifugé et centrifugé.....	67
Tableau 8: Caractéristiques chimiques des substrats utilisés pour le développement méthodologique.	68
Tableau 9: Caractéristiques des substrats constituant les intrants.	87
Tableau 10 : Conditions opératoires expérimentées.	88
Table 11 : Characterization of the panel of substrates.	104
Table 12 : Fractions and extractions steps for modified Van Soest and EPS methods.....	106
Table 13: Results of carbon and nitrogen biodegradability	116
Table 14: Statistical models for the prediction of organic nitrogen biodegradability considering the whole set of substrates and associated quality parameters.....	125
Table 15: Statistical models for the prediction of organic nitrogen biodegradability considering substrate group G1 and G2 and associated quality parameters.	125
Table 16: Comparison of organic nitrogen biodegradability values obtained from experiments and models.....	129
Table 17: Physical and chemical characteristics of the substrates	145
Table 18: Methods of determination of the initial state variables used to initialize the ADMacc model	153
Table 19: Stoichiometry and kinetic parameters added to the ADMacc model and the method of calculating the parameters.....	157
Table 20: ADM1 Petersen matrix modified with biochemical rate coefficients and kinetic rate equations for soluble compounds ($i = 8-21$, $j = 8-15$) and for particulate compounds ($i = 1-7$, $22-29$, $j = 1-7$, $16-22$).....	168
Table 21: Calibrated stoichiometric parameters used in ADMacc for CF and BS.	173
Tableau 22: Kinetic parameters calibrated on CF and BS used in ADMacc.....	175
Table 23: Sensitivity indexes of the most effective parameters on the objectives functions.....	179
Table 24: Physicochemical characteristics of the substrates and influents used.	198
Table 25: Distribution of protein and non-protein compounds into the fractions.	200
Table 26: Operating parameters.....	201
Table 27: Method used for influent characterization aiming model initialization.	205
Table 28: Effect of HRT on methane and ammonium production at steady-state.....	208
Table 29: Stoichiometric parameter found under CSTR experiment and batch experiments.....	217
Tableau 30: Kinetic parameters calibrated under CSTR experiments compared to the one determined with batch experiments and ADM1 default values.....	220

Contexte de la thèse et objectifs opérationnels

1. Cycle de l'azote en agriculture

Elément indispensable à la croissance des végétaux, l'azote entre dans un cycle naturel mettant en jeu des transformations entre les formes d'azote réactives et inertes. Avec le développement de procédés industriels de fixation de l'azote pour la fabrication d'engrais de synthèse, l'azote est passé de facteur limitant à élément présent en abondance sous forme d'engrais à partir de la seconde partie du XX^{ème} siècle. La figure 1 présente la cascade de l'azote dans un système agricole avec un équilibre entre les cultures et l'élevage. Il existe deux types de flux d'azote réactif dans ce système : intentionnel et non intentionnel. Le flux intentionnel considère l'apport d'azote réactif dans les cultures pour la fertilisation, la nutrition des animaux à partir des cultures et le retour au sol de l'azote via les effluents produits par l'élevage. Dans ces systèmes, des flux non intentionnels d'azote réactif appelés fuites sont rapportés. Dans les cultures, la volatilisation d'ammoniac à l'épandage majoritairement, le lessivage des nitrates lors des précipitations et les émissions de protoxyde d'azote des sols participent à ces fuites. Au niveau de l'élevage, des fuites par volatilisation sous forme de protoxyde d'azote et d'ammoniac sont significative lors du stockage des effluents avant leur épandage. Cette cascade de fuites fait perdre de la valeur fertilisante aux effluents, ce qui doit être compensé par l'apport d'engrais d'origine industrielle communément nommés engrais minéraux.

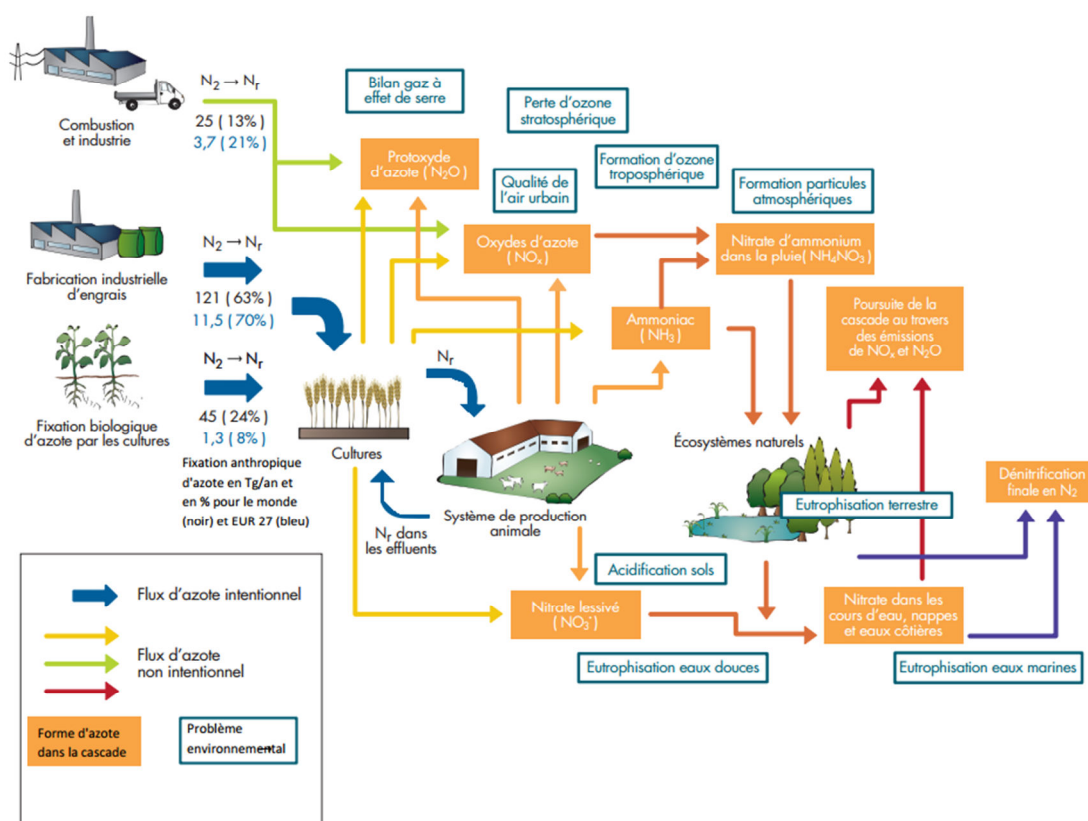


Figure 1 : Schéma simplifié de la cascade d'azote (adapté de l'ESCO MAFOR)

Partant de ce constat, la demande mondiale en engrais n'a fait qu'augmenter de manière continue depuis les années 60 pour compenser ce défaut d'azote lors du retour au sol des effluents (figure 2). Ce phénomène a été amplifié par la spatialisation différentielle des territoires en termes de systèmes agricoles engendrant des régions avec des grosses carences en azote et d'autres en excédent. La dépendance aux engrais minéraux entraîne des conséquences économiques et environnementales qui seront décrites dans les prochains paragraphes.

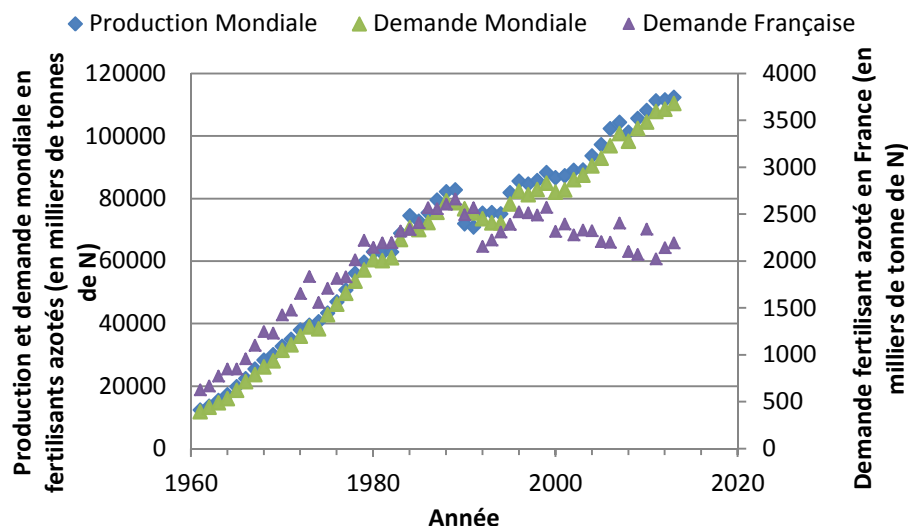


Figure 2 : Evolution de la production et de la demande mondiale et française en engrais azotés minéraux. (Source : International Fertilizer Industries Association)

Dans un système similaire à la figure 1, plusieurs flux peuvent être optimisés notamment le retour au sol de l'azote organique issu de produits résiduels organiques tels que des effluents d'élevage. Le but de ce retour au sol est de substituer l'azote minéral par de l'azote organique mais pour cela, il faut que le produit résiduel organique garde une valeur fertilisante intéressante et donc limiter les fuites en amont de l'épandage. En France, des efforts dans ce sens sont visibles par la baisse de la demande en fertilisants minéraux azotés depuis plus de 10 ans (figure 2). Cette diminution de la demande est en partie due au changement de pratiques de fertilisation. Une meilleure substitution des engrais minéraux, des apports plus adaptés et la mise en place de rotations de cultures ont permis une baisse de la demande en engrais azotés.

2. Enjeux de la substitution de l'azote minéral par de l'azote organique.

2.1. Enjeux économiques

Comme exposé précédemment, l'agriculture contemporaine est devenue très dépendante des engrais minéraux, ce qui s'est traduit par la croissance de la demande mondiale en engrais azotés. Cette industrie utilisant du méthane et du pétrole pour la production d'ammoniac par le procédé Haber, le prix de l'engrais évolue en fonction de ces matières premières. La figure 3 montre que le prix de la tonne d'engrais suit la même tendance que le prix du baril de pétrole. Soumis à des variations de prix très importantes depuis les années 70, le cours du baril de pétrole est très volatil ce qui se répercute nettement sur le prix de la tonne d'engrais azoté.

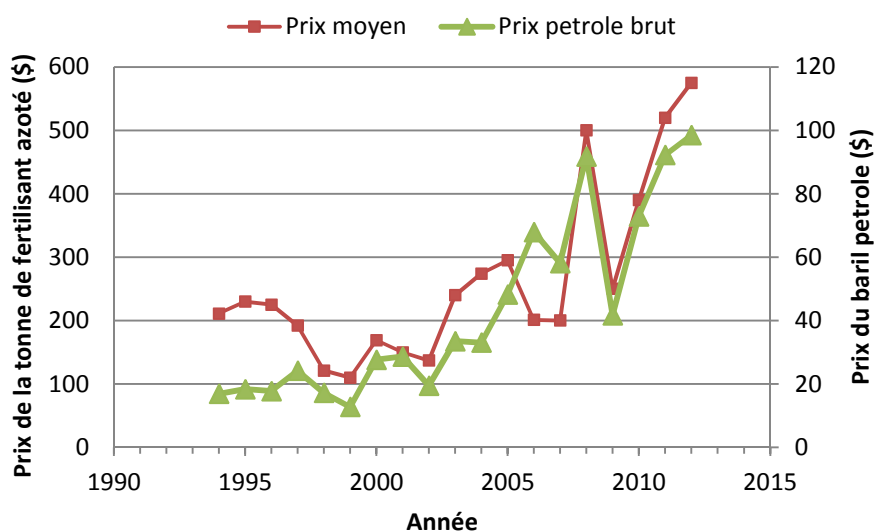


Figure 3: Corrélation entre le prix de la tonne d'engrais azoté minéral et le prix du baril de pétrole. (Source : Mineral Commodity Summaries, 2015 et NASDAQ)

Les dépenses associées à l'achat des engrais représentent une part non négligeable des charges des agriculteurs. Elles peuvent représenter 40% des charges opérationnelles pour des cultures de blé tendre en Bretagne (Quéré, 2015). La substitution par des engrais organiques pourrait diminuer de manière importante les coûts liés à la fertilisation. Les produits résiduaux organiques, s'ils sont de qualité contrôlée, pourraient donc dans le même temps gagner en valeur marchande et un nouveau marché pourrait se développer permettant de s'affranchir des fluctuations du cours du pétrole. Cependant, le

statut de déchet ne permet pas l'exportation pour beaucoup d'entre eux. De plus, la spécialisation des régions a pour conséquence un accès limité à cette ressource pour certains territoires.

2.2. Enjeux environnementaux

Les conséquences des fuites d'azote décrites à la figure 1 sur l'environnement existent à plusieurs niveaux : la qualité des sols, la qualité de l'air, la qualité de l'eau et la biodiversité. Ces bouleversements dans le cycle de l'azote sont engendrés par l'activité humaine et principalement l'activité agricole via l'usage de fertilisants dont l'azote est très disponible et apporté de façon pas toujours optimisée. En effet, l'homme est le responsable de l'augmentation de 100% des transferts de l'azote de l'atmosphère vers la terre depuis l'industrialisation du procédé Haber (Vitousek et al., 1997).

Les nitrates lessivés dans les cours d'eaux, combinés à une certaine acidité de l'eau et une disponibilité en phosphates, peuvent entraîner des phénomènes de prolifération d'organismes tolérants à ces conditions : l'eutrophisation. Dans les zones côtières, ce phénomène est grandement lié à des concentrations excessives en nitrates car l'azote est l'élément favorisant la prolifération de ces organismes. Les conséquences de la prolifération de ces organismes sont un blocage des rayons lumineux entraînant l'arrêt de la photosynthèse des plantes aquatiques et leur mort. Leur décomposition entraîne par la suite la diminution du taux d'oxygène et la mort des organismes aérobies. Au niveau continental, le lessivage des nitrates entraîne une pollution des eaux douces rendant impropres à la consommation certaines d'entre elles. En effet, la réglementation européenne impose une concentration limite de 50 mg/L de nitrates dans les eaux potables.

La volatilisation de l'ammoniac conduit à l'altération de la qualité de l'air. Il se combine dans l'atmosphère avec des NO_x et SO_x , issus majoritairement de la combustion, formant des particules de nitrate d'ammonium et sulfate d'ammonium. Ces particules peuvent retourner au sol par l'effet de la gravité ou dans les pluies. Ce retour à la terre peut avoir pour effet l'eutrophisation des écosystèmes terrestres oligotrophes avec des conséquences similaires à ce qui se trouve dans les cours d'eaux et une acidification des sols. Les fuites par volatilisation de l'ammoniac peuvent causer d'autres problèmes

d'ordres sanitaire et social. Les particules fines produites (PM_{2,5}) peuvent causer des irritations des voies respiratoires et l'ammoniac, très odorant, est la cause de conflit de voisinage entre agriculteurs et riverains (ADEME, 2012).

Les émissions de protoxyde d'azote sont issues en majorité de processus biologiques de dénitrification (Schreiber et al., 2012) et de la combustion. Ce gaz, au même titre que le méthane, est un très puissant gaz à effet de serre et participe au réchauffement climatique. De plus, à très haute atmosphère, le N₂O contribue à la dégradation de la couche d'ozone par des réactions photochimiques avec l'ozone (Ravishankara et al., 2009).

3. Les digestats comme substituts aux engrais minéraux azotés.

Le procédé de digestion anaérobie est un procédé biologique naturel transformant une partie de la matière organique en biogaz. Utilisé pour la valorisation de produits résiduels organiques, la méthanisation permet le captage de méthane contenu dans le biogaz, puissant gaz à effet de serre, et sa valorisation sous forme de chaleur et électricité. Le reste de la matière organique non transformée en biogaz se retrouve dans le digestat, le second résidu du procédé. Ce résidu est majoritairement valorisé par épandage. Composé des matières non biodégradées en digestion anaérobie, le digestat contient aussi l'azote total apporté par les substrats traités. L'azote contenu dans les digestats se retrouve sous deux formes (Möller and Müller, 2012):

- Une part importante sous une forme minéralisée : l'ammonium (NH_4^+)
- Le reste sous une forme complexe liée à des composés organiques comme des protéines ou acides aminées : l'azote organique.

Les matières organiques carbonées non biodégradées et l'azote retrouvé dans ces digestats participent respectivement au pouvoir amendant et fertilisant des digestats. Le pouvoir fertilisant est ainsi lié à la quantité d'ammonium, d'azote organique biodégradable dans les sols et au ratio carbone/azote du digestat.

Bien maîtrisé, ce pouvoir fertilisant peut avoir un effet à court ou long terme. En effet, le pouvoir fertilisant à court terme est lié à la quantité d'azote ammoniacal présent dans le digestat et celui à long terme est lié à la biodégradabilité de l'azote organique dans les sols. Cette biodégradabilité de l'azote organique est elle-même liée à la capacité des microorganismes du sol et à leurs enzymes d'accéder à l'azote organique. On parle alors de bioaccessibilité. Le ratio carbone/azote est lié à la fertilisation à court et long terme. Plus ce ratio est élevé, moins le pouvoir fertilisant du digestat sera efficace et vice-versa. Cet effet atténuant du pouvoir fertilisant sera modulé aussi par la bioaccessibilité de ce carbone ainsi que celle de l'azote organique. En effet, plus le carbone sera bioaccessible, plus le pouvoir fertilisant sera atténué par l'immobilisation de l'azote pour la croissance de la biomasse, qui décompose la matière organique du sol.

Comme énoncé plus haut, le digestat est généralement épandu et l'efficacité d'utilisation de l'azote par les cultures permet de quantifier le pouvoir fertilisant du digestat. Dans des conditions pédoclimatiques similaires et sur une même culture, l'efficacité d'utilisation de l'azote par la culture, décrite dans l'exemple de la figure 4a par le coefficient apparent d'utilisation (CAU) de l'azote, varie en fonction du type de digestat (figure 4a). Au regard des conditions opératoires, ces variabilités sont dues à la valeur fertilisante des digestats. En effet, les compositions variables des digestats utilisés peuvent expliquer que ceux-ci présentent des pouvoirs fertilisants très variables (figure 4b).

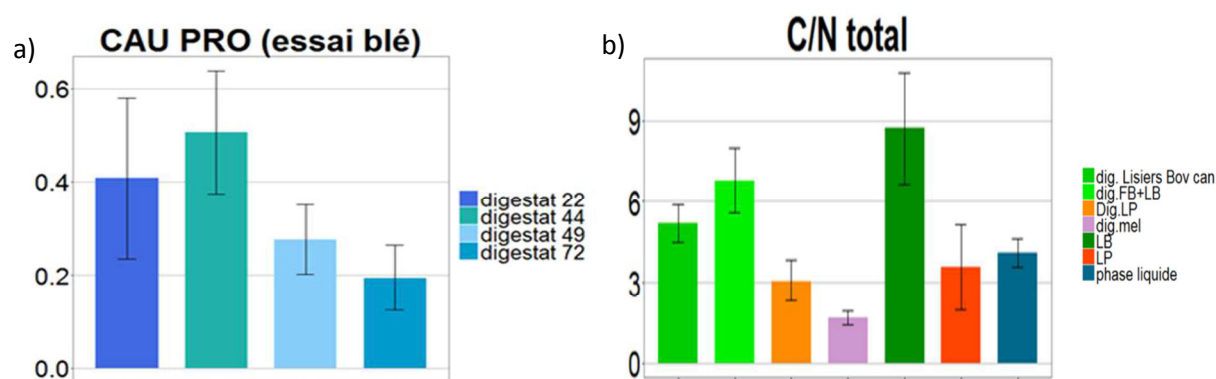


Figure 4 : Variabilité des CAU (a) de l'azote et des compositions (b) des digestats (Decoopman et al., 2017).

Cette variabilité de la qualité, notamment de la qualité azotée, des digestats et donc de leur valeur fertilisante a pu être reliée à la variabilité des substrats digérés générant les différents digestats (Wallrich et al., 2018).

Cependant, le pouvoir fertilisant des digestats peut également se voir limité en raison des fuites d'azote dans l'environnement lors de son utilisation (Quideau et al., 2013). Ainsi, de par la forte composition en azote ammoniacal des digestats, des pertes importantes d'azote peuvent être observées par volatilisation lors du stockage et de l'épandage ou encore par lixiviation après épandage (Möller, 2015) comme présenté figure 5. La capacité des digestats à se substituer aux engrais minéraux azotés dépend donc de la qualité intrinsèque des digestats ainsi que des modalités de gestion de ces derniers.

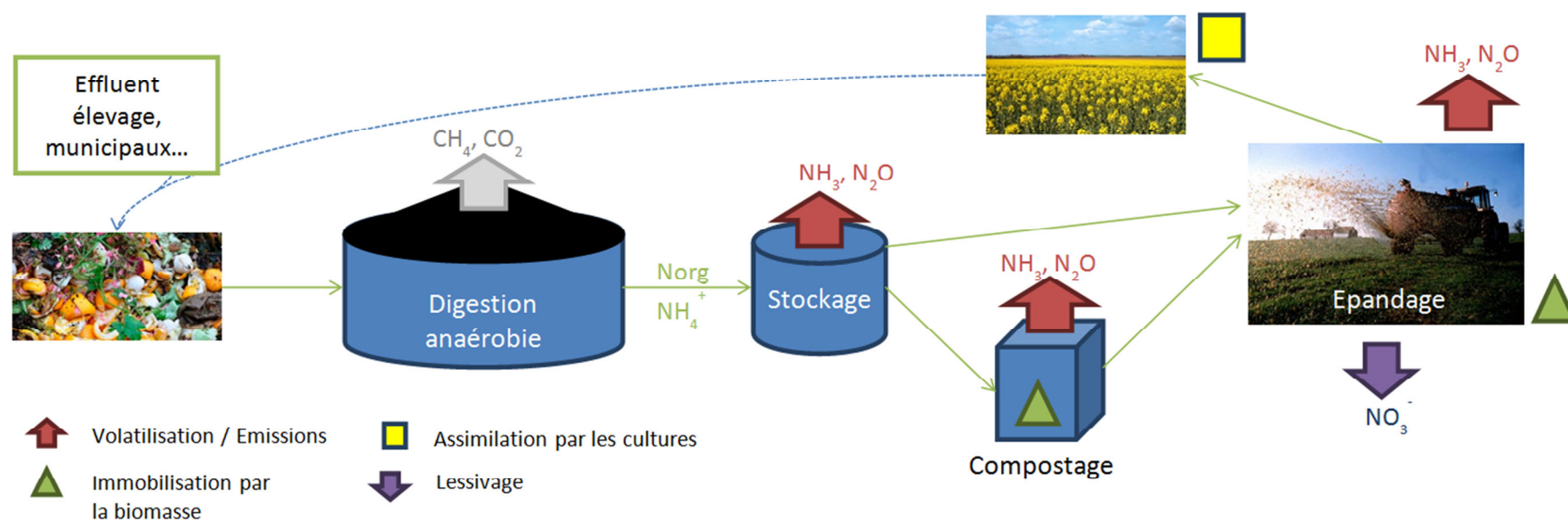


Figure 5: Fuites et immobilisation d'azote sur une filière de valorisation de produits résiduaux organiques comprenant une étape de digestion anaérobie en amont de la valorisation agronomique.

4. Objectif de la thèse

Au regard des éléments exposés ci-avant, la compréhension des transformations de l'azote en digestion anaérobie s'avère nécessaire pour déterminer la qualité azotée des digestats. Cette qualité impacte en effet toute la filière, du stockage jusqu'à l'utilisation de l'azote par les plantes. Considérer l'optimisation du procédé de digestion anaérobie dans un objectif de valorisation agronomique des digestats peut s'avérer une solution pour une autonomie en azote vis-à-vis des engrais de synthèse. Cependant, le pilotage des installations actuelles vise avant tout une production optimisée de biogaz avec une grande incertitude quant à la composition en azote du digestat. Face à cette problématique croissante de gestion et valorisation de l'azote en agriculture, un double pilotage du procédé en fonction de la composition azotée des digestats et de la production de biogaz contribuerait à améliorer l'autonomie en azote des exploitations.

L'objectif global de cette thèse est donc de comprendre les processus de transformation de l'azote au cours de la digestion anaérobie dans le but de développer un modèle qui permette la prédiction de la qualité azotée des digestats. De plus cette thèse contribue à un projet plus large ayant pour objectif d'optimiser les différentes stratégies territoriales de méthanisation au regard d'enjeux de substitution aux engrais minéraux, de réduction des impacts sur le changement climatique et des pollutions diffuses azotées ainsi que de l'amélioration de la qualité des sols. Le projet vise notamment à développer des outils d'aide à la décision pour le développement de la méthanisation en se basant sur une approche numérique intégrée de la filière. Cet outil numérique permettra de modéliser l'ensemble de la filière de traitement des produits résiduels organiques telle que décrite sur la figure 5 et de simuler les propriétés du digestat selon les scénarios développés. Le modèle de digestion anaérobie développé dans le cadre de la thèse aura ainsi à terme vocation à s'insérer dans l'outil numérique intégré de simulation de filières de valorisation de l'azote du stockage à l'utilisation de l'azote par les plantes.

Chapitre 1 : Etat de l'art et objectifs scientifiques

Avant-propos

L'objectif de l'état de l'art présenté ci-après est de faire un état des lieux des connaissances des transformations de l'azote en digestion anaérobie pour permettre d'explicitier les principales questions de recherche qui sous-tendent la suite des travaux de la thèse. Une première partie traite des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie. La seconde partie s'intéresse à la modélisation de ces processus lors de la digestion anaérobie. L'attention est portée en particulier sur les possibilités de modifications du modèle de référence ADM1 (Batstone et al., 2002).

Partie 1 : Transformation du carbone et de l'azote en digestion anaérobie

1. La digestion anaérobie

La digestion anaérobie est une voie de dégradation microbienne de la matière organique effectuée en absence d'oxygène. La matière organique est convertie en un biogaz composé principalement de méthane et de dioxyde de carbone. Ce mécanisme est constitué d'une chaîne réactionnelle faisant intervenir différents types de microorganismes spécifiques formant un réseau trophique. Cette chaîne réactionnelle (Figure 6) est composée de quatre étapes principales liées par différents processus de transformation.

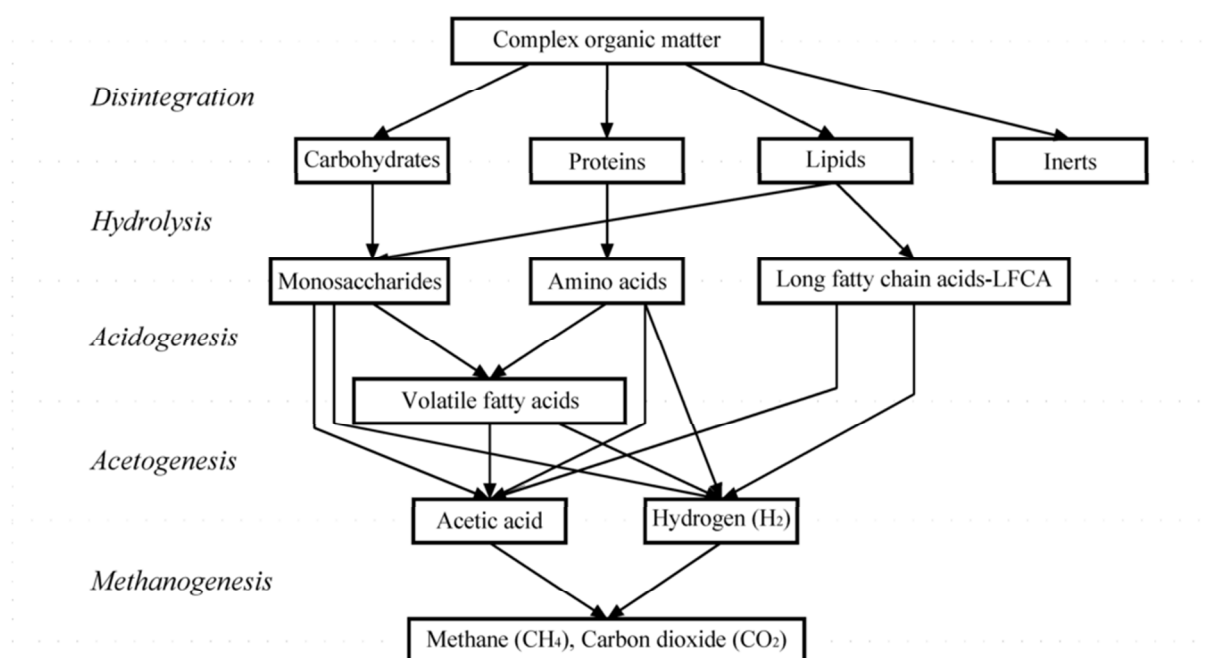


Figure 6: Chaîne réactionnelle de la digestion anaérobie. (adaptée de Batstone et al, 2002)

1.1. La désintégration

La désintégration est l'étape primordiale de la digestion anaérobie, elle permet de détacher les différents polymères agrégés entre eux dans la fraction composite du substrat. Cette étape non biologique, fait intervenir principalement des processus de solubilisation et de rupture physique. La fraction composite est alimentée pendant la méthanisation par le décès des microorganismes. Les

produits de la désintégration sont les polymères libérés ou rendus disponibles à l'hydrolyse. (Batstone et al., 2002).

1.2. L'hydrolyse

Les bactéries ne pouvant pas assimiler des molécules de masse molaire supérieure à 1000 Da (White et al., 2007), une hydrolyse de la matière organique à dégrader est nécessaire pour que les composés puissent passer la membrane plasmique. L'hydrolyse est extracellulaire et effectuée par un groupe phylogénétique hétérogène (McInerney et al., 1995) de type anaérobie facultative (Moletta, 2008). Les produits hydrolysables peuvent être séparés en 3 catégories :

- Les polysaccharides : Biopolymères les plus abondants du monde du vivant (Römling and Galperin, 2015), les polysaccharides sont des polymères de très haut poids moléculaire composés d'un enchainement de monomères dits monosaccharides. Ils peuvent se présenter sous formes d'homopolymères ou de copolymères. Le plus abondant de ces polysaccharides est la cellulose ; un homopolymère composé d'un enchainement de molécules de D-glucose liées par des liaisons B-1,4 glycosidiques. Il est suivi par l'hémicellulose qui représente 8% de la biomasse totale sur Terre. L'hémicellulose est un copolymère composé d'un enchainement de monosaccharides tels que le D-glucose, le D-mannose et le D-galactose. L'hydrolyse des polysaccharides est effectuée par des enzymes spécifiques à chaque type de liaison entre les monosaccharides comme les endo et exo-glucanases pour la cellulose (Mosier et al., 1999).
- Les lipides : Les lipides sont des composés qui sont constitués d'acides gras à longue chaîne (LCFA) liés à un glycérol, alcool ou d'autres groupes par une liaison ester ou éther. Faisant partie de cette famille, les graisses et huiles sont majoritairement retrouvées sous forme de triglycérides (Alves et al., 2009). L'hydrolyse de ces composés se fait par des enzymes extracellulaires nommées lipases sécrétées par les bactéries acidogènes en conditions anaérobies (Cirne et al., 2007). L'hydrolyse des glycérides conduit à la libération de LCFA et de glycérol. Ce processus augmente la solubilité des composés gras (Rasit et al., 2015) qui, par conséquent, deviennent plus facilement accessibles pour les bactéries.

- Les protéines : Molécules matérialisant l'expression du contenu génétique, les protéines sont des macromolécules de haut poids moléculaire composées d'un enchainement de sous unités appelées acides aminés. Les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques C-N et différentes interactions intra et extra-chaine peuvent prendre place donnant une structure non linéaire à la protéine ou formant un site réactionnel actif. On dénombre plus d'une vingtaine d'acides aminés composés d'une base similaire avec un groupe fonctionnel qui diffère. L'hydrolyse de ces molécules se fait par un jeu de protéases qui coupent les protéines en plusieurs acides aminés isolés pour une réutilisation ou une métabolisation.

D'autres composés subissent aussi une hydrolyse avant leur assimilation mais il s'agit le plus souvent d'un arrangement des trois catégories vues plus haut.

De par la complexité des composés à dégrader, les jeux d'hydrolases secrétées par les bactéries sont très variés d'un substrat à un autre. Cette étape est limitante dans la majorité des procédés, en aérobie (Henze et al., 2006) comme en anaérobie (Girault et al., 2012b). L'hydrolyse peut être affectée par la présence de produits non biodégradables qui peuvent rendre inaccessibles certains produits biologiquement dégradables. C'est notamment le cas de la lignine que l'on retrouve très largement dans le monde végétal et qui sert de barrière à la dégradation des molécules organiques par les microorganismes.

1.3. L'acidogénèse

L'acidogénèse est l'étape où les monomères issus de l'hydrolyse ou déjà présents sont transformés en acides gras volatils (AGV), alcools, acides organiques et en dihydrogène, dioxyde de carbone et ammoniac. La biomasse qui effectue cette transformation est la même que celle qui a participé au processus d'hydrolyse. L'acidogénèse est un phénomène intracellulaire qui a lieu après le transport des monomères à travers la membrane plasmique par un transporteur actif (DiRusso and Black, 2004; Leclerc et al., 1999). Les principaux composés concernés par cette étape sont les monosaccharides et les acides aminés. Pendant l'acidogénèse des monosaccharides, il peut y avoir formation d'un acide

organique, l'acide lactique (Skiadas et al., 2000), qui par son faible pKa diminue fortement le pH et entraîne un risque d'acidose dans le réacteur.

1.4. L'acétogénèse

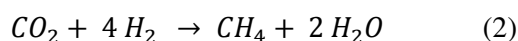
L'acétogénèse est l'étape qui permet la transformation des AGV, alcools et des LCFA en acétate, dihydrogène et dioxyde de carbone. Elle regroupe deux processus : l'acétogénèse hétérofermentaire et l'homoacétogénèse. L'acétogénèse hétérofermentaire est effectuée par des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (OPHA) qui produisent de l'acétate, du dihydrogène et du dioxyde de carbone. Les différents types d'acides gras sont convertis lors de cette étape. L'acétogénèse homoacétogène est exécutée par une population distincte de bactéries qui transforme le dioxyde de carbone et le dihydrogène en acétate.

1.5. La méthanogénèse

La méthanogénèse est l'étape finale du processus de digestion anaérobie. Les microorganismes impliqués dans cette étape sont des archées. Les transformations se font au travers de deux voies principales. La première voie métabolique est la méthanogénèse acétotrophe (1) qui représente plus de 70% du méthane produit dans des conditions opératoires optimales (Gujer and Zehnder, 1983). Le précurseur utilisé pour la transformation est l'acétate en présence d'eau.



La seconde voie de production de méthane est la méthanogénèse hydrogénotrophe (2). Les archées utilisent ici comme précurseurs de réaction le dioxyde de carbone qui est réduit par l'hydrogène en méthane. Cette réaction produit aussi de l'eau et représente moins de 30% du méthane produit dans des conditions opératoires optimales.



Comme souligné dans cette section 1, la digestion est une succession de réactions biologiques effectuées par une chaîne trophique en conditions anaérobies. Les processus sont bien décrits pour des éléments simples tels que les monosaccharides, acides aminés, AGV... Les phénomènes de

désintégration et d'hydrolyse restent très complexes dans leurs processus et sont décrits de manière très simple. La prochaine partie abordera la complexité des composés polymériques du point de vue de l'azote.

2. Transformations biochimiques des composés azotés en digestion anaérobie

2.1. La protéine

Source la plus importante d'azote organique, les protéines sont un enchainement d'acides aminés liés par des liaisons de types peptidiques C-N très énergétiques. Il existe plus d'une vingtaine d'acides aminés répertoriés qui présentent tous un groupement formé d'un amide et d'un carboxyle lié à un carbone substitué par un groupement latéral. Ces groupements latéraux portant des fonction chimiques peuvent interagir avec d'autres groupements latéraux pour former des liaisons faibles de type hydrogène, hydrophobe, électrostatiques ou des liaisons covalentes de type disulfure (Harper et al., 2002). A partir de ces interactions, la protéine pourra adopter plusieurs types de structures résumés sur la figure 7.

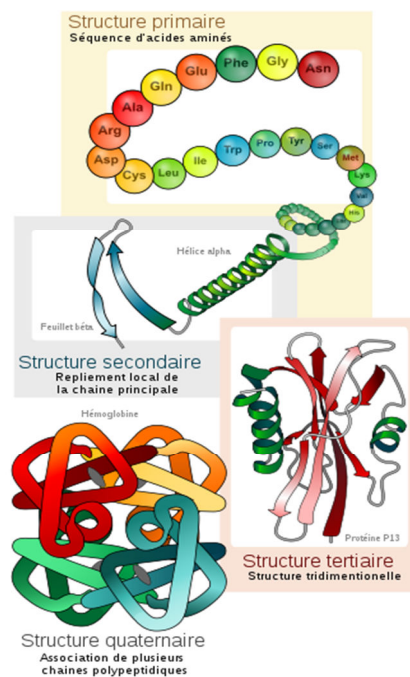


Figure 7: Structures des protéines. La structure secondaire est formée par les liaisons hydrogène. La structure tertiaire présente de nombreuses interactions entre chaînes latérales (Source : Mariana Ruiz, 2010).

Deux grandes classes de protéines se dégagent au niveau structurel en se basant sur leurs rapports axiaux (conformation dans l'espace). Une première forme est dite globulaire où des repliements formés par des feuillets β sont notés et témoignent d'interactions entre acides aminés éloignés liés par

des liaisons hydrogènes. Le rapport axial se situe en général en dessous de 10 (entre 3 et 4). Les protéines de ce groupe sont, sauf exceptions (forte teneur en soufre), solubles dans l'eau et aucun acide aminé ne prédomine largement dans la séquence peptidique. Notons comme exemple les albumines, globulines ainsi que plusieurs enzymes.

La seconde forme de protéine est dite fibreuse ou fibrilleuse. Ces protéines sont caractérisées par des hélices alpha intimement enroulées avec des ponts disulfures et des liaisons hydrogène. Elles présentent des rapports axiaux supérieurs à 10. Jouant un rôle structurant et moteur (Miroshnikov et al., 1998), les protéines fibreuses sont très rigides et leur solubilité dans l'eau est très faible. La kératine est l'exemple le plus représentatif d'une protéine fibreuse.

Ces différentes structures peuvent avoir un impact sur la biodégradabilité du substrat en l'occurrence sur l'étape d'hydrolyse. Il est admis que les protéines globulaires sont plus facilement hydrolysées que les protéines fibreuses (Kumar et al., 2007). Ceci est appuyé par les résultats de Girault (2011) sur les soies de porc et le sang de porc. Les soies de porc, substrat à forte teneur en protéines fibreuses, présentent une biodégradabilité très faible. Ces tissus sont généralement composés de cellules mortes qui sont incluses dans une matrice protéique composée en majorité de kératine. Le sang de porc est lui composé uniquement de protéines globulaires avec une part très majoritaire d'hémoglobine et présente une très bonne biodégradabilité.

2.2. Hydrolyse des protéines

L'hydrolyse est un processus permettant la décomposition d'un polymère impliquant une molécule d'eau (figure 8). Différents mécanismes incluent l'utilisation d'enzymes dans le but de catalyser cette réaction, ces dernières pouvant utiliser ou non l'eau pour briser les liaisons entre les monomères. Dans le cas de l'hydrolyse des protéines, les enzymes en charge de la décomposition sont les protéases. Elles permettent la rupture des liaisons peptidiques et la libération de peptides et d'acides aminés simples. Elles sont sécrétées par les bactéries anaérobies strictes ou facultatives (Moletta, 2008) et se classent en fonction de leurs sites d'attaque de la liaison peptidique et de leur mécanisme catalytique (Barrett et al., 2012).

Selon les sites d'attaque, on peut discriminer deux types de peptidases. Les exopeptidases sont des enzymes qui attaquent la liaison peptidique par les extrémités N-terminal (fonction amine) ou C-terminal (fonction acide carboxylique) de la protéine. Les carboxypeptidases peuvent libérer un acide aminé ou un dipeptide à l'extrémité C-terminal de la protéine. Les aminopeptidases hydrolysent la liaison peptidique en N-terminal libérant un acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide. A l'opposé, les endopeptidases vont hydrolyser des liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la protéine et de manière très spécifique. Selon la chaîne latérale de l'acide aminé, l'enzyme hydrolysera ou non la liaison peptidique en C-terminal ou N-terminal. Il en résulte la libération de deux peptides.

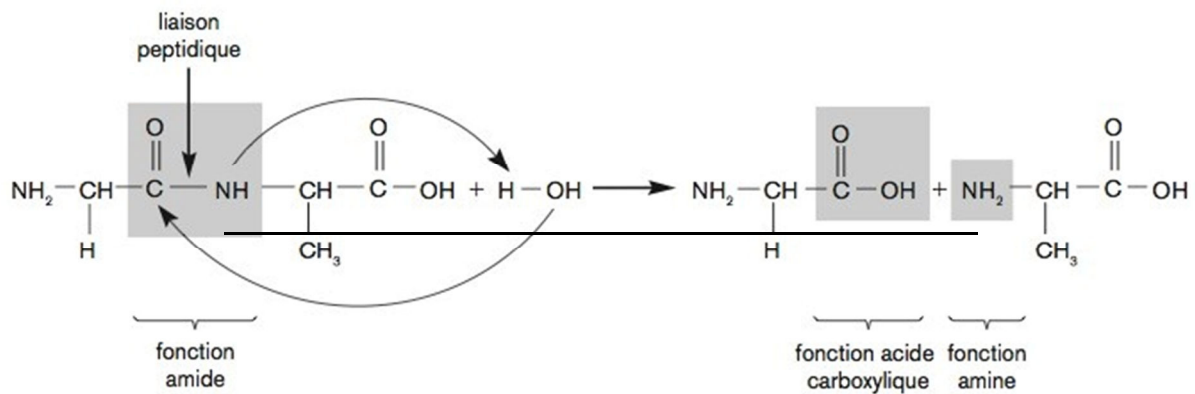


Figure 8: Hydrolyse d'une protéine. (Auteur : Martin Dion, Infoscan Colette)

Le processus d'hydrolyse est extracellulaire. Cependant, des protéases sont retrouvées dans la cellule lorsque les protéines sont assez petites pour traverser la membrane plasmique et pour la maintenance de la bactérie (Barrett et al., 2012). L'hydrolyse est en général admise comme étape limitante dans les procédés de digestion anaérobie (Coelho et al., 2011; Zhang et al., 2014) mais ce postulat est controversé (Shao et al., 2013; Tomei et al., 2008) et peut dépendre de la charge organique (Vavilin et al., 2008).

Le résultat de l'hydrolyse des protéines est la libération d'acides aminés. Ces molécules, décrites plus haut, ont différents rôles pour la bactérie. Elles peuvent intervenir dans le métabolisme de la cellule comme source d'énergie ou comme constituant de nouvelles protéines. Dans les prochaines parties, il

sera vu comment la bactérie utilise ces composés azotés ainsi que le devenir de l'azote pendant le métabolisme en conditions anaérobies.

2.3. Acidogenèse des acides aminés

En digestion anaérobie, les acides aminés sont des composés participant au catabolisme en produisant de l'ATP ainsi que d'autres sous-produits tels que des AGV et de l'ammonium. L'acidogenèse (ou fermentation) des aminoacides peut se faire selon deux voies : par la réaction de Stickland ou par désamination. C'est lors de cette étape que l'azote contenu dans les acides aminés subit une minéralisation passant d'une forme organique complexe à une forme simple et minérale.

2.3.1. Fermentation par voie de Stickland.

Cette voie de dégradation est une réaction d'oxydoréduction qui couple deux acides aminés. Un premier acide aminé est utilisé comme donneur d'électrons quand le second agit comme accepteur d'électrons. Durant la réaction, le donneur et l'accepteur d'électrons libéreront leur amine sous forme d'ammoniac. Une perte de dioxyde de carbone aura lieu sur le donneur, tandis que l'accepteur gardera le même nombre de carbone que l'acide aminé réduit comme montré figure 9.

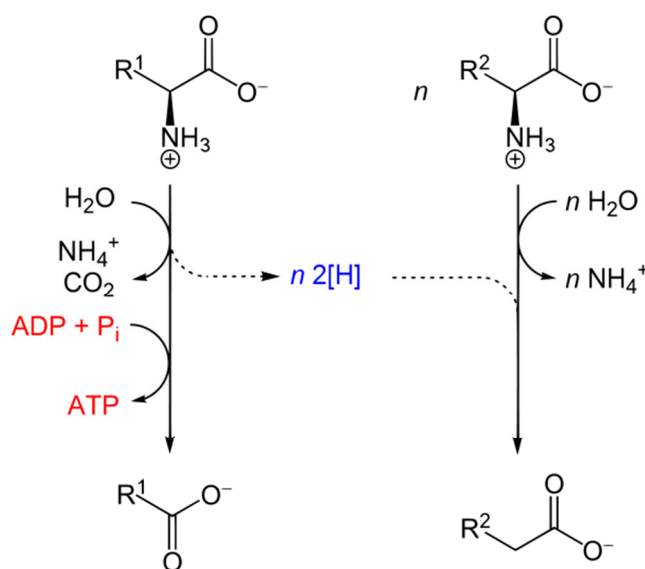


Figure 9: Réaction de Stickland couplée (Source : Wikicommons).

Au niveau de la production d'ATP, la réaction de Stickland produit 0.5 mol d'ATP pour une mole d'acide aminé dégradée (Andreesen et al., 1989) même si cela dépend de l'acide aminé considéré

(Ramsay, 1997). En effet, selon sa nature, l'acide aminé peut se comporter comme un accepteur ou un donneur d'électrons. Comme il est montré dans le tableau 1, chaque acide aminé produit différentes quantités d'AGV, dioxyde de carbone, ATP et ammoniac.

Tableau 1: Produits issus de la dégradation des acides aminés par couplage de Stickland (Ramsay, 1997).

Acide Aminé	Formule brute	Groupement	Donneur ou Accepteur ou non	AGV	NH ₃	ATP	CO ₂	H ₂
				mol/mol aminoacide				
Glycine	C ₂ H ₅ O ₂ N	Hydrogène	Accepteur	1	1	0	0	-1
Alanine	C ₃ H ₇ O ₂ N	Alkyl	Donneur	1	1	1	1	2
Valine	C ₅ H ₁₁ O ₂ N	Alkyl	Donneur	1	1	1	1	2
Leucine	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	Alkyl	Donneur/Accepteur	1	1	1	1	2
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	Alkyl	Donneur	1	1	1	1	2
Serine	C ₃ H ₇ O ₃ N	Alcool	Donneur	1	1	1	1	1
Thréonine	C ₄ H ₉ O ₃ N	Alcool	Donneur/Accepteur	1,5	1	1	0	-1
Cystéine	C ₃ H ₆ O ₂ NS	Sulfure	Donneur	1	1	1	1	0,5
Méthionine	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	Sulfure	Donneur	1	1	1	1	1
Proline	C ₅ H ₉ O ₂ N	Cycle aminé	Accepteur	1,5	1	0	0	-1
Phénylalanine	C ₉ H ₁₁ O ₂ N	Aromatique	Donneur/Accepteur	0	1	1	1	2
Tyrosine	C ₉ H ₁₁ O ₃ N	Aromatique	Donneur/Accepteur	1	1	1	1	1
Tryptophane	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ N	Aromatique	Donneur/Accepteur	0	1	1	1	2
Acide aspartique	C ₄ H ₇ O ₄ N	Carboxyle	Donneur	1	1	2	2	2
acide glutamique	C ₅ H ₉ O ₄ N	Carboxyle	Donneur	1,5	1	2	1	0
Lysine	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₂	Azote	Donneur	2	2	1	0	0
Arginine	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₄	Azote	Donneur	1,5	4	1	1	-1
Histidine	C ₆ H ₉ O ₂ N ₃	Azote	Non couplé	1,5	3	2	1	0

La réaction de Stickland est la voie de fermentation la plus commune dans les systèmes anaérobies. Elle représente plus de 90% du catabolisme des acides aminés (Nagase and Matsuo, 1982) et n'a été observée que chez les bactéries de type Clostridia en digestion anaérobie (Ramsay and Pullammanappallil, 2001).

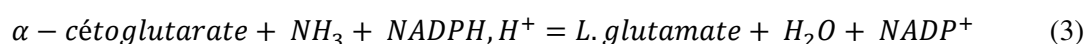
2.3.2. Désamination

Voie minoritaire de dégradation des acides aminés, cette réaction peut avoir lieu lorsque le milieu s'appauvrit en acides aminés accepteurs d'électrons (Nagase and Matsuo, 1982). Elle est plus lente que la réaction de Stickland (Barker, 1981) et résulte en la conversion de l'amine en ammoniac ainsi qu'en dioxyde de carbone et dihydrogène. De nombreuses espèces bactériennes sont capables

d'effectuer cette réaction. On retrouve principalement des bactéries sporulées de type *Clostridia* (Ramsay and Pullammanappallil, 2001).

2.4. Assimilation de l'azote en digestion anaérobie

Phénomène très peu étudié et souvent négligé en digestion anaérobie à cause de la libération importante d'azote ammoniacal, l'azote peut être assimilé par la bactérie pour des fonctions de maintenance et de croissance. En effet, cet élément fait partie des macroéléments essentiels constitutifs de la cellule et se retrouve en très grande quantité dans les protéines, les nucléotides et différents sucres peptidiques. Sans cet élément, la croissance bactérienne peut être inhibée (Procházka et al., 2012). Seul l'azote ammoniacal est assimilé par les bactéries pour la biosynthèse de molécules telles que les acides aminés ou les bases azotées. L'azote ammoniacal est incorporé sur des dérivés du glucose par des enzymes activés par l'ATP ou du NADPH, H⁺ comme présenté dans l'équation suivante (3) (Bertrand et al., 2011).



Glutamate déhydrogénase

Ces molécules, notamment le L. glutamate, sont des précurseurs pour la production de nouveaux acides aminés par modification de la structure moléculaire ou par des réactions de transamination. Les bactéries peuvent aussi directement prélever dans le milieu les acides aminés nécessaires à la biosynthèse de polymères. (Hobson et al., 1974).

Les mécanismes au cours de cette section 2 sont retrouvés dans des conditions optimales d'opération de l'unité. Cependant, le procédé est très fréquemment victime d'inhibitions pouvant impacter sur la production de biogaz. La prochaine partie traitera des inhibitions des mécanismes cellulaires réalisés par les microorganismes présents dans la chaîne trophique. Une grande attention sera portée à l'impact de ces phénomènes sur les transformations de l'azote.

3. Inhibitions en digestion anaérobie

En digestion anaérobie, la dégradation des matières organiques repose sur un équilibre sensible entre les différents groupes formant la chaîne trophique. C'est entre les biomasses acidogènes et méthanogènes que cet équilibre est le plus précaire (Demirel and Yenigün, 2002). L'inhibiteur aura un impact sur la croissance bactérienne de l'espèce ou du groupe de micro-organismes sensibles à l'inhibiteur qui pourra diminuer la production maximale de méthane, provoquer des accumulations d'intermédiaires réactionnels (Kroeker et al., 1979) et potentiellement impacter les transformations de l'azote. Les seuils d'inhibition sont très difficiles à fixer pour certaines substances car des processus comme l'adaptation de la biomasse à l'inhibiteur ou l'utilisation d'une autre voie de transformation de la chaîne trophique peuvent entrer en jeu. La conséquence sera une meilleure tolérance à l'inhibiteur et un retour à un état d'équilibre. Le pH, la température, les interactions entre les différents inhibiteurs ou encore la structure physique de la biomasse auront une influence positive ou négative sur l'effet de l'inhibition.

Il existe de nombreux composés qui inhibent une ou plusieurs étapes de la digestion anaérobie, les prochaines sections seront consacrées à la présentation de ces inhibiteurs et de leur influence sur les transformations de l'azote en digestion anaérobie notamment sur la minéralisation de l'azote organique en azote minéral. Notons que ces inhibiteurs ont démontré un effet délétère sur la production de méthane mais cela ne s'exprimera pas forcément négativement pour l'azote. Le terme inhibiteur sera gardé malgré tout. Il sera donc traité dans un premier temps des processus d'inhibition engendrés par les transformations de composés protéiques. Lors de la dégradation des protéines, des inhibiteurs sont libérés avec des impacts différents sur le bon fonctionnement du procédé tels que la perturbation des équilibres cellulaires. Dans un second temps, l'action d'inhibiteurs issus du milieu sur les transformations des composés azotés sera détaillée.

3.1. Inhibitions par l'azote ammoniacal

3.1.1. Spéciation de l'azote en digestion anaérobie

Dans le digesteur, l'azote se retrouve sous plusieurs formes. Il peut être sous forme minéralisé avec des espèces chimiques telles que l'ion ammonium, l'ammoniaque soluble ou l'ammoniac dans le nuage gazeux. Des formes plus complexes telles que les protéines et acides nucléiques sont apportées par la matière organique. L'ammonium, issu de la dégradation de protéines, d'acides nucléiques et/ou déjà présent dans le milieu, est en équilibre avec l'ammoniaque libre (FAN). Cet équilibre acido-basique dépend du pH et de la température comme présenté dans l'équation suivante (4):

$$FAN = TAN \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-\left(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)}\right)}} \right)^{-1} \text{ avec TAN pour azote ammoniacal total} \quad (4)$$

L'ammoniaque libre est aussi en équilibre avec l'ammoniac de l'atmosphère gazeuse selon la loi de Henry (5):

$$FAN = H_{FAN} * p_{FAN} \quad (5)$$

- FAN : Ammoniaque libre dissous dans le solvant,
- H_{FAN} : Constante d'Henry de l'ammoniaque libre,
- p_{FAN} : Pression partielle de l'ammoniaque libre dans la phase gaz.

Lors de la production de l'azote ammoniacal par la métabolisation d'acides aminés ou d'autres composés azotés, il peut se retrouver dans le milieu sous forme d'ammonium ou d'ammoniaque. Un fois hors de la cellule, il contribue au pouvoir tampon du milieu réactionnel. Si il y a libération très importante, le milieu se basifie et l'équilibre ammonium/ammoniaque est déplacé vers la formation de d'ammoniaque libre.

3.1.2. Inhibition par l'ammoniaque

Cause d'inhibition dans les digesteurs, l'azote ammoniacal possède plusieurs rôles antagonistes dépendant de sa concentration et de l'acclimatation des microorganismes. Nutriment essentiel, il peut engendrer l'arrêt de la croissance des microorganismes à très faible concentration et entraîner une

inhibition totale à une concentration très élevée par rapport à la tolérance des bactéries (Liu and Sung, 2002; Zhang et al., 2011). Dans les deux cas, cela se traduit par une baisse de la production de méthane et d'une accumulation d'AGV dans le milieu. L'accumulation d'AGV souvent observée montre une très grande sensibilité des archées méthanogènes lors d'une inhibition par l'ammoniaque (Hansen et al., 1998; Nielsen and Angelidaki, 2008).

Il a été admis dans la littérature que la forme inhibitrice est l'ammoniaque car il est le seul à pouvoir passer la membrane plasmique de manière passive et provoquer l'inhibition du procédé (Müller et al., 2006). Composée de toute cellule vivante, la membrane plasmique est généralement trouvée sous forme de bicouche lipidique. En plus de jouer un rôle protecteur pour le matériel contenu dans le cytosol, elle est aussi une interface entre le milieu extérieur et le cytosol. Des échanges passifs ou actifs peuvent avoir lieu, imposant un gradient de pression et de concentration entre le cytosol et le milieu extérieur.

Après la diffusion de l'ammoniaque dans la cellule, le pH du cytosol sera modifié. Cela a pour effet de reprotoner le FAN, ce qui modifie le pH intracellulaire. La cellule doit utiliser de l'énergie sous forme d'ATP pour activer une pompe à potassium ou à proton pour rétablir le pH (Wittmann et al., 1995). L'ATP utilisé n'est pas mis à contribution pour d'autres processus cellulaires nécessitant de l'énergie tels que la synthèse protéique, la synthèse d'ADN ou pour d'autres mécanismes de maintenance. Une trop forte concentration en ammoniaque a des impacts à plusieurs niveaux sur le réseau trophique qui permet la méthanisation et donc sur la minéralisation de l'azote organique. Il a été observé par Park and Kim, (2015) l'effet de l'ajout d'ammonium sur l'étape d'acidogenèse des acides aminés. Le suivi montre qu'une augmentation de 0 à 5000 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ induit une inhibition de la désamination des acides aminés baissant cette activité de 100% à 55%.

3.1.3. Stratégies d'adaptation aux fortes concentrations en azote ammoniacal.

Pour pallier le stress lié à des concentrations importantes en ammonium, diverses stratégies ont été développées par les microorganismes. La première observée est l'acclimatation des biomasses aux fortes teneurs en ammonium et ammoniaque comme largement montré dans la littérature (Rajagopal et al., 2013). Une autre stratégie a été observée dans des conditions inhibitrices. L'ammoniaque ayant un

fort impact négatif sur le fonctionnement des archées méthanoacétoclastes, la voie de transformation de l'acétate en dioxyde de carbone et hydrogène (l'oxydation syntrophique de l'acétate) est favorisée. Une croissance de bactéries SAO (syntrophic acetate oxidizers) et de méthanogènes hydrogénotrophes est aussi constatée témoignant une plus grande résistance de ces biomasses aux fortes concentrations en ammonium, généralement au-dessus de $3\text{gN-NH}_4^+/\text{L}$ qui est considéré comme seuil critique pour l'inhibition. (Hao et al., 2017; Lü et al., 2013; Schnürer and Nordberg, 2008; Westerholm et al., 2012, 2011).

3.2. Perturbations des transformations de l'azote par des composés ne résultant pas de la dégradation de molécules azotées.

3.2.1. Les acides gras longues chaîne (AGLC)

Certains déchets, d'origine carnée notamment, présentent de fortes teneurs en protéines et lipides. C'est le cas de beaucoup de déchets issus d'abattoirs dont la part de lipides représente 78% de la DCO et les protéines 21% (Girault, 2011). Les acides gras longues chaînes résultent de l'hydrolyse des lipides. Molécules hydrophobes composés d'une chaîne apolaire et d'une terminaison polaire, ils viendront perturber les échanges de la membrane plasmique par adsorption sur cette dernière (Rinzema et al., 1989). Ils peuvent se fixer directement sur les transporteurs ioniques actifs de la membrane, bloquant les échanges d'ions et induisant le gonflement de la cellule pouvant aller jusqu'à la rupture de la membrane plasmique (Sikkema et al., 1994). Dans certains cas, les AGLC peuvent aller jusqu'à encapsuler la cellule, lui empêchant tout échange passif et actif de composés hydrophiles (ions, acides aminés...) avec le milieu réactionnel et pouvant entraîner la lyse de la cellule (Pereira et al., 2005).

Les AGLC ont en particulier un effet sur les processus associés aux transformations de l'azote en digestion anaérobie. En effet, les bactéries étant toutes concernées par les mécanismes d'inhibition des AGLC, les enzymes hydrolytiques à la surface des bactéries n'ont plus aucun accès au substrat et les échanges sont bloqués. Il y a donc peu ou pas d'hydrolyse et de métabolisation des acides aminés. Dans le cas d'une co-digestion de boues secondaires avec des graisses industrielles, les travaux de

Girault et al. (2012a) montrent qu'au-dessus de 60%_{DCO} de graisses dans le substrat, le taux de destruction des protéines passe de 30% à 16%.

3.2.2. Macroéléments cationiques

Les macroéléments cationiques sont des éléments essentiels à la maintenance bactérienne. Porteurs de charges, ils permettent à la bactérie de maintenir un potentiel électrochimique à la membrane et de maintenir une pression osmotique en cas de stress osmotique. Ils ont aussi un rôle assez intéressant comme agent complexant d'autres inhibiteurs comme les AGLC ou l'ammonium (Hendriksen and Ahring, 1991; Pereira et al., 2005). On retrouve parmi ces éléments le Mg, le Ca, l'Al et le K. Lorsque ces éléments sont excès, on peut observer des signes d'inhibition essentiellement liés à des processus de déshydratation dus à des déséquilibres osmotiques (Yerkes et al., 1997).

3.2.3. Eléments traces métalliques

Les inhibiteurs présentés dans cette section sont des espèces chimiques qui ont un effet délétère sur le fonctionnement des enzymes. De nombreuses enzymes sont composées de sites actifs métalliques. En présence de certains métaux lourds, ce site actif peut être substitué par le métal lourd et modifier l'action de l'enzyme (Vallee and Ulmer, 1972). Une inhibition est observable notamment chez les méthanogènes. Sur les transformations de l'azote, il existe une très grande diversité de protéases dont une grande partie utilisant des sites actifs métalliques. Il serait donc très probable que l'hydrolyse soit affectée par ces métaux lourds.

Dans cette partie 3, les inhibitions pouvant avoir lieu lors de la digestion anaérobie ont été présentées ainsi que leur influence sur les transformations de l'azote. La description très précise de ces inhibitions montre que la connaissance du procédé au niveau biochimique est très fine en digestion anaérobie. Cependant, comme vu précédemment, l'étape de désintégration reste très peu décrite car très complexe de par sa composition biochimique et surtout par les modifications physiques de la matière organique qui sont mis en œuvre. La connaissance de ces limitations physiques reste le principal verrou à la compréhension de la biodégradation du carbone et de l'azote en digestion anaérobie.

4. Transformations physiques des composés azotés et non azotés en digestion anaérobie

La biodégradation en digestion anaérobie est très bien décrite au niveau biochimique au niveau de l'azote et du carbone, cependant, la biodégradation est principalement limitée par des phénomènes physiques dont la description reste très difficile à un niveau mécaniste. En effet, la matière organique est composée d'arrangements de molécules complexes qui peuvent former des barrières physiques récalcitrantes à la biodégradation limitant l'accès aux composés biodégradables. Ces composés emprisonnés sont dits non bioaccessibles. La bioaccessibilité se définit comme étant la quantité de la matière organique qui peut entrer physiquement en contact avec les microorganismes et leurs enzymes. Cette bioaccessibilité est limitée par la présence de matériaux lignocellulosiques, comme de la lignine ou de la cellulose cristalline très récalcitrants à la biodégradation formant une barrière autour de composés biodégradables (Monlau et al., 2012; Triolo et al., 2011) (Figure 10). Il peut exister plusieurs niveaux de bioaccessibilité en fonction du degré de complexité de la barrière qui rendra le composé emprisonné plus ou moins bioaccessible. Cette problématique de bioaccessibilité touche la partie composite à désintégrer qui agglomère tous les polymères biodégradables et non biodégradables.

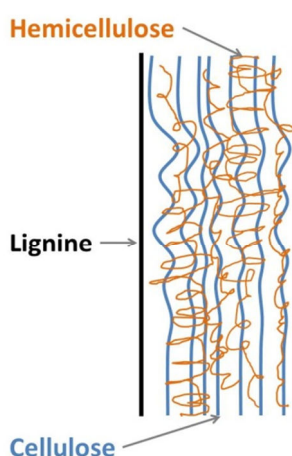


Figure 10: Structure de la lignocellulose

Il existe deux principales méthodes de détermination des degrés de bioaccessibilité des composés biodégradables dans la matière organique : les méthodes d'extraction Van Soest (Van Soest, 1963) et

EPS (Jimenez et al., 2015). Ces méthodes ont comme point commun l'utilisation d'un protocole d'extraction chimique séquentiel avec une augmentation de l'agressivité des solvants. Ces deux méthodes permettent de fractionner la matière organique en cinq compartiments de bioaccessibilité décroissante. Les solvants utilisés et compartiments obtenus par ces deux fractionnements sont présentés tableau 2.

Tableau 2: Solvants utilisés et molécules ciblées par les méthodes d'extraction Van Soest et EPS.

Solvants utilisés pour les extractions Van Soest (VS)	Solvants utilisés pour les extractions EPS	Molécules ciblées par l'extraction
Eau bouillante	CaCl ₂ 10 mM	Sucres, acides aminés, protéines solubles
Détergent neutre extraction (NDF)	NaOH, NaCl 10mM NaOH 0.1M	Protéines, EPS, lipides Protéines, acides humiques
Détergent acide (ADF)	H ₂ SO ₄ 72%	Hémicellulose
H ₂ SO ₄ 72%		Cellulose
Non-extractible	Non-extractible	Lignine

Deux grandes différences sont à noter entre ces deux fractionnements. Tout d'abord, les conditions d'extraction sont différentes. Toutes les extractions Van Soest sont effectuées en un seul cycle à 100°C à l'exception de l'extraction à l'acide sulfurique 72% qui s'effectue en trois cycles et à température ambiante. Les extractions EPS sont effectuées à une température de 30°C ce qui nécessite plus de cycles d'extractions (de 2 à 4 en fonction de l'extraction considérée). Ensuite, la nature des solvants diffère entre les deux méthodes. En effet, le protocole d'extraction Van Soest utilise les détergent NDF et ADF pour cibler des composés respectivement protéiques et hemicellulosiques. La particularité de ces solvants est leur mode d'action. Ainsi ils provoquent, notamment le NDF, la désintégration des cellules libérant le contenu cellulaire ce qui en fait une méthode agressive. Les solvants utilisés par la méthode d'extraction EPS présentent la particularité de remplacer le solvant NDF par des solvants basiques et ne considèrent pas d'extraction de l'hémicellulose, celle-ci est extraite avec la cellulose lors de l'étape à l'acide sulfurique 72%. La première extraction basique remplaçant le NDF permet de cibler les substances exo-polymériques, acides nucléiques et autres composés facilement extractibles

par l'action d'une solution de NaCl et NaOH. La seconde extraction basique au NaOH va solubiliser les substances exopolymériques (EPS) les plus réfractaires ainsi que d'autres composés difficilement solubles.

L'utilisation de ces deux méthodes sur différents types de substrats a pu mettre en évidence qu'elles permettaient de quantifier la bioaccessibilité de la matière organique. En effet, les extractions Van Soest sont utilisées en agronomie pour qualifier la digestibilité d'un fourrage (Van Soest et al., 1991) et notamment dans des modèles de minéralisation du carbone et de l'azote de résidus de culture dans les sols pour fractionner la matière organique (Chalhoub et al., 2013; Garnier et al., 2003; Molina, 1996). Chaque extraction est définie comme un compartiment du modèle avec une bioaccessibilité propre. Les extraits à l'eau bouillante sont considérés comme directement bioaccessibles et les résidus d'extraction à l'acide sulfurique 72% sont considérés comme très peu bioaccessibles. L'utilisation de cette méthode d'extraction en digestion anaérobie pour fractionner la matière organique selon la bioaccessibilité a montré des résultats très variables d'un substrat à un autre. En effet, des liens entre bioaccessibilité selon cette méthode et la production de méthane ont été démontrés avec de très bonnes corrélations sur de nombreux types de substrats issues de filières diverses (Bayard et al., 2015; Gunaseelan, 2007a; Liu et al., 2015). Cependant, Mottet et al. (2010) nuancent la pertinence de cette méthode d'extraction et de son lien avec la bioaccessibilité du carbone en digestion anaérobie en observant que les extractions sont trop agressives pour des substrats autres que des résidus de culture.

Les extractions EPS, utilisant des solvants moins agressifs, montrent des extractions moins poussées que pour la méthode Van Soest. Tout comme les extractions Van Soest, les extractions EPS ont été utilisées pour quantifier la bioaccessibilité. Les résultats obtenus par Jimenez et al. (2015) en complémentarité de mesures de fluorescence 3D ont permis de mettre en évidence la présence de composés très récalcitrants dans tous les extraits, qui participent à limiter la biodégradation des différents composés. Ces composés complexes expriment mieux la bioaccessibilité qui était mal déterminée par la méthode Van Soest. Cette meilleure prise en compte de la bioaccessibilité a permis de trouver de meilleures corrélations entre la bioaccessibilité déterminée par les extractions EPS et la biodégradabilité de nombreux substrats en digestion anaérobie (Jimenez et al., 2017).

Ces deux méthodes d'extraction, qui permettent de fractionner la matière organique selon la bioaccessibilité des substances qui la composent, se sont surtout focalisées sur la bioaccessibilité du carbone via la demande chimique en oxygène. Cependant, aucune recherche n'a été effectuée sur la bioaccessibilité de l'azote et son lien avec la biodégradabilité en digestion anaérobie. De plus, aucune information sur l'évolution de cette bioaccessibilité au cours de la digestion anaérobie n'est disponible. Cette dernière permettrait de mieux comprendre les transformations du carbone et de l'azote en digestion anaérobie ainsi que de connaître la bioaccessibilité du carbone et de l'azote dans les digestats en fonction de la conduite du digesteur (charge organique, temps de séjours hydraulique, cocktail de substrat...).

5. Conclusion de la partie 1

L'objectif de cette première partie était de faire l'état de l'art sur les processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie. D'après cette étude, l'azote est majoritairement retrouvé sous forme de protéines, acides aminés et d'ammonium dans les substrats. Les transformations de ces molécules sont très bien décrites dans la littérature ainsi que les effets des inhibitions sur leurs dynamiques de transformation. Cependant, cette connaissance n'est valable qu'à l'échelle moléculaire. En effet, la bioaccessibilité de ces composés n'a pas été étudiée en digestion anaérobie. Cet indicateur présente un intérêt non négligeable pour la compréhension des transformations de l'azote car la bioaccessibilité est le facteur limitant des transformations décrites dans la littérature. Par conséquent, l'étude de la bioaccessibilité et sa prise en compte lors de la modélisation des processus de transformations de l'azote pourraient permettre la prédiction de la qualité azotée des digestats.

Partie 2 : Modélisation de la digestion anaérobie

1. Principe du modèle

L'objectif de la modélisation du procédé de digestion anaérobie est de pouvoir prédire et optimiser la production de biogaz en fonction de la composition des substrats. L'Anaerobic Digestion Model n°1 (ADM1) (Batstone et al., 2002) est un modèle mécaniste développé par le groupe de travail pour la modélisation mathématique du procédé de digestion anaérobie de l'International Water Association. Synthèse de nombreux modèles existants, il a permis la mise en place d'une base commune. Le procédé étant initialement utilisé dans le traitement des boues de station d'épuration, le modèle a été mis au point pour faciliter les ponts avec les modèles de type ASM (Henze et al., 2006) notamment en normalisant les unités dans lesquelles les différentes fractions sont exprimées. Cependant, le couplage reste difficile et nécessite l'emploi d'une interface entre ces modèles (Rousseau et al., 2008). En effet, ADM1 est basé sur un fractionnement biochimique alors que les fractions sont déterminées de manière cinétique sur le modèle de boues activées (ASM). De plus, les cinétiques de transformation de l'azote sont couplées à celle du carbone dans ADM1 (pour les fractions biochimiques contenant de l'azote) tandis que dans ASM, les dynamiques de l'azote et du carbone sont découplées. Le procédé de digestion anaérobie étant très complexe et sujet à de nombreuses inhibitions, le modèle ADM1 prend en compte 19 processus biochimiques et 3 processus physico-chimiques. Les processus biochimiques, décrits figure 11, considère les quatre étapes décrites dans la première partie de cet état de l'art, à savoir :

- L'hydrolyse,
- L'acidogenèse,
- L'acétogenèse
- La méthanogenèse.

Une étape de désintégration a été ajoutée en amont de l'hydrolyse et sert de variable d'ajustement cinétique à l'hydrolyse (Batstone et al., 2015b). La croissance de la biomasse est différenciée selon les étapes citées, à l'exception des étapes de désintégration, d'hydrolyse et de désactivation. Une boucle

de mort régénération est incluse dans ces processus, la biomasse désactivée étant recyclée dans le compartiment complexe subissant une désintégration.

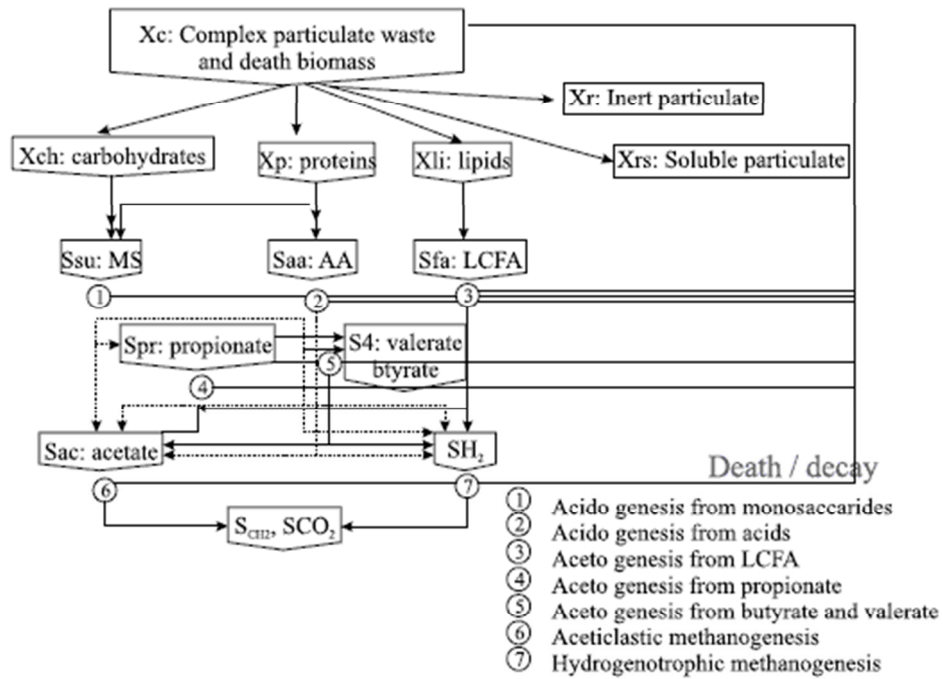


Figure 11: Processus d'ADM1 (Batstone et al., 2002).

2. Processus et données d'entrée : influence sur les dynamiques de transformation de l'azote.

2.1. Données d'entrée

ADM1 définit 24 variables d'état dynamiques (tableau 3) sans compter celles issues des équilibres physicochimiques. Parmi ces variables, un petit nombre d'entre elles présentent une teneur en azote. Notons la présence d'azote dans les composés composites X_C , inertes X_I & S_I , les protéines X_{pr} , acides aminés S_{aa} , l'azote inorganique S_{IN} et les microorganismes X_{su-h2} .

Tableau 3: Description des variables d'état du modèle ADM1.

Variables d'état	Description	Unité
X_i	Composants particuliers et biomasses	$\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$
S_i	Composants solubles	$\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$
S_{IC}	Carbone inorganique	$\text{kmoleC}.\text{m}^{-3}$
S_{IN}	Azote inorganique	$\text{kmoleN}.\text{m}^{-3}$

Des teneurs en carbone C_i et azote N_i sont aussi définies dans le modèle (tableau 4). Ces teneurs sont constantes tout au long du processus pour tous les composants. Le rendement catabolique correspond au coefficient stœchiométrique associé à la répartition du substrat dans les différents produits issus de la dégradation de celui-ci (tableau 5).

Tableau 4: Coefficients stœchiométriques.

Coefficients stœchiométriques	Description	Unité
C_i	Teneur en carbone du composant i	$\text{kmoleC}.\text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$
N_i	Teneur en azote du composant i	$\text{kmoleN}.\text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$
$v_{i,j}$	Coefficient stœchiométrique du composant i sur le processus j	$\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$
$f_{\text{produit,substrat}}$	Rendement catabolique du produit sur substrat	$\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$

Utilisées avec des valeurs par défaut ou calées avec des données expérimentales, les constantes cinétiques constituent le cœur des processus ρ_j dans le modèle. S'agissant de cinétiques de

premier ordre pour les processus d'hydrolyse et de type Monod pour les autres transformations, elles peuvent être associées à d'autres constantes propres au substrat (constante de demi-saturation K_S , $processus$) ou à la biomasse (rendement de croissance $Y_{substrat}$, constantes de croissance μ_{max} et $k_m, processus$) (Table 5).

Tableau 5: Constantes cinétiques.

Paramètres cinétiques	Description	Unité
k_{dec}	Constante de décès	d^{-1}
$I_{inhibiteur, processus}$	fonction d'inhibition	
$k_{processus}$	Constante du 1er ordre	d^{-1}
$k_m, processus$	Constante de croissance maximum de Monod (μ_{max}/Y)	$kg_{DCO}(S).kg_{DCO}(X)^{-1}.d^{-1}$
$K_S, processus$	constante de demi-saturation	$kg_{DCO}(S).m^{-3}$
ρ_j	Cinétique du procédé j	$kg_{DCO}(S).m^{-3}.d^{-1}$
$Y_{substrat}$	Rendement de croissance de la biomasse sur substrat	$kg_{DCO}(X).kg_{DCO}(S)^{-1}$
μ_{max}	Constante de croissance maximum de Monod	d^{-1}

2.2. Processus impliquant des transferts d'azote.

Les transferts de l'azote sont des processus n'impliquant pas le changement de nature de l'élément. Ils correspondent à un transfert de l'azote d'un compartiment à un autre. Les phénomènes peuvent être de nature biologique, physicochimique ou une combinaison des deux. Les processus physicochimiques ne seront pas traités dans cette partie mais il est important de noter qu'il existe un équilibre entre l'ammonium et l'ammoniaque. Les cinétiques de transfert suivent une cinétique d'ordre 1 dans le modèle ADM1. On retrouve des processus de désintégration des composites (6), hydrolyse des protéines (7) et décès des biomasses (8).

$$\rho_1 = k_{dis} X_C \quad (6)$$

ρ_1 : Cinétique du processus de désintégration ($kg_{DCO}(X_C).m^{-3}.d^{-1}$),

k_{dis} : Constante de désintégration du 1^{er} ordre (d^{-1}),

X_C : Variable d'état relative à la fraction composite ($kg_{DCO}.m^{-3}$).

$$\rho_3 = k_{hyd,pr} X_{pr} \quad (7)$$

ρ_3 : Cinétique du processus d'hydrolyse des protéines ($\text{kg}_{\text{DCO}}(X_{pr}).\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$),

$k_{hyd,pr}$: Constante de d'hydrolyse des protéines du 1^{er} ordre (d^{-1}),

X_{pr} : Variable d'état relative à la fraction protéique ($\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$).

$$\rho_{13-19} = k_{dec,Xsu-Xh2} X_{su-h2} \quad (8)$$

ρ_{13-19} : Cinétique du processus de décès de la biomasse ($\text{kg}_{\text{DCO}}(X_{su-h2}).\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$),

$k_{dec,Xsu-Xh2}$: Constante de décès de la biomasse du 1^{er} ordre (d^{-1}),

X_{su-h2} : Variable d'état relative à la biomasse ($\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$).

L'azote issu de la désintégration sera transféré dans trois fractions : les protéines X_{pr} , les composés inertes particuliers X_I et les composés inertes solubles S_I . La fraction protéique X_{pr} subit une hydrolyse enzymatique qui transfère tout l'azote des protéines vers les acides aminés S_{aa} . La biomasse inactive vient alimenter la fraction composite X_C et par la même occasion l'azote de ces composants sera transféré à cette fraction composite X_C .

2.3. Processus impliquant des transformations de l'azote

Deux types de transformation de l'azote ont lieu lors de la digestion anaérobie, il s'agit de la minéralisation et de l'organisation. Ces phénomènes ont lieu lors de deux processus distincts. Le premier permettant la minéralisation est l'acidogénèse des acides aminés. Comme vu précédemment, la fermentation des acides aminés utilise deux voies de dégradation dont une très majoritaire, le couplage de Stickland. Ce processus impliquant la croissance de la biomasse X_{aa} , la cinétique de dégradation des acides aminés utilisée est de type Monod (9).

$$\rho_6 = k_{m,aa} \frac{S_{aa}}{K_S + S_{aa}} X_{aa} \quad (9)$$

ρ_6 : Cinétique du processus de consommation des acides aminés ($\text{kg}_{\text{DCO}}(S_{aa}).\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$),

$k_{m,aa}$: Constante de croissance maximum de Monod sur les acides aminés ($\text{kg}_{\text{DCO}}(S_{aa}).\text{kg}_{\text{DCO}}(X_{aa})^{-1}.\text{d}^{-1}$),

K_S : Constante de demi saturation ($\text{kg}_{\text{DCO}}(S_{aa}).\text{m}^{-3}$),

X_{aa} : Variable d'état relative à la biomasse consommatrice d'acides aminés ($\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$),

S_{aa} : Variable d'état relative aux acides aminés ($\text{kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$).

Le processus s'exprime pour les acides aminés S_{aa} (10) et pour l'azote inorganique S_{IN} (11).

$$\frac{dS_{aa}}{dt} = -k_{m,aa} \frac{S_{aa}}{K_S + S_{aa}} X_{aa} \quad (10)$$

$$\frac{dS_{IN}}{dt} = (N_{aa} - Y_{aa}N_{bac}) k_{m,aa} \frac{S_{aa}}{K_S + S_{aa}} X_{aa} \quad (11)$$

Les acides aminés sont minéralisés mais une croissance de la biomasse utilisant ce substrat est aussi observable. Ce phénomène se traduit par l'assimilation d'azote inorganique en parallèle de la minéralisation comme il est visible dans l'équation (11). En effet, le coefficient stœchiométrique du processus d'acidogénèse des acides aminés sur la concentration d'azote inorganique est composé de deux membres : N_{aa} pour la minéralisation et $-Y_{aa}N_{bac}$ pour l'assimilation. Cette dernière expression est retrouvée comme coefficient stœchiométrique dans tous les autres processus de type Monod impliquant la consommation d'un composant en parallèle de la croissance d'une population bactérienne (12).

$$\frac{dS_{IN}}{dt} = -Y_{su-h2}N_{bac} (\rho_{5,7-12}) \quad (12)$$

Néanmoins, l'organisation reste faible par rapport à la minéralisation car $N_{aa} = 0.007 \text{ kmolN.kg}_{\text{DCO}}^{-1}$ et $Y_{aa} * N_{bac} = 0.0005 \text{ kmolN.kg}_{\text{DCO}}^{-1}$, ce qui suggère que la minéralisation est bien plus importante que la croissance (14 fois plus), bien que ce chiffre soit à relativiser par rapport au nombre de biomasses. Cependant avec la désintégration des biomasses désactivées, une partie se retrouve minéralisée ou remobilisée pour l'organisation.

3. Méthodes de détermination des données d'entrée, coefficients stœchiométriques et paramètres cinétiques.

Afin de simuler au mieux l'évolution des différentes variables d'état, une détermination des différentes fractions du système à étudier est nécessaire. Plusieurs stratégies de fractionnement de la matière organique ont été développées et seront présentées dans un premier paragraphe. De même, différentes méthodologies peuvent être employées pour l'ajustement des paramètres cinétiques du modèle et seront présentées dans un second paragraphe.

3.1. Stratégies de fractionnement des substrats pour ADM1.

Comme évoqué plus haut, le modèle ADM1 utilise 24 variables d'état. Les variables d'état relatives au substrat sont au nombre de 13 au total, et leur détermination est indispensable à la simulation de leur dégradation au cours du procédé. Les différentes stratégies de fractionnement employées dans la littérature sont présentées tableau 6.

Tableau 6: Synthèse des méthodes de fractionnement (adapté de Girault, (2011)).

Méthodes	Données obtenues	Données nécessaires	Impact sur la simulation de l'azote	Références
Analyses physicochimiques	Fractionnement de la matière organique directement compatible avec ADM1 ou nécessitant une étape de conversion.	Analyses physicochimiques	Bonne identification de l'azote. Faible prise en compte de la bioaccessibilité.	(Kleerebezem and Loosdrecht, 2006; Klimiuk et al., 2015; Lübken et al., 2015)
Analyses élémentaires		Composition CHONP		(Kleerebezem and Loosdrecht, 2006)
Analyses physicochimiques couplées avec calibration sur production biogaz	Fractionnement compatible avec ADM avec calage de paramètres cinétiques	Analyses physicochimiques de l'entrée et la sortie avec courbe de production de méthane	Bonne identification de l'azote. Nécessite un suivi cinétique de l'élément pour la prise en compte de la disponibilité.	(Girault et al., 2012b; Mottet et al., 2013)
Analyses physicochimiques couplées à la spectrométrie de fluorescence	Fractionnement compatible avec données entrées ADM1	Extractions successives avec analyse en spectroscopie de fluorescence.	Pas d'identification directe de l'azote.	(Jimenez et al., 2015)
Respirométrie anaérobie	Fractionnement en fonction des cinétiques de biodégradation	Courbes de vitesse de production de méthane obtenues à la suite d'un pulse de substrat dans un inoculum	Dynamiques de l'azote uniquement issues du modèle.	(Yasui et al., 2008)
Interface avec ASM1	Fractionnement de type ADM1 à partir de données de sorties converties d'ASM1	Données de sortie du modèle ASM1	Azote bien défini mais perte d'informations sur l'azote organique par l'interface.	(Rousseau et al., 2008; Wett et al., 2006)

3.2. Stratégies de calage

Malgré l'apport de valeurs par défaut par Batstone et al. (2002), certaines configurations peuvent nécessiter le calage de certains paramètres cinétiques comme la constante d'hydrolyse... Il existe plusieurs stratégies de calage et dépendent du processus des moyens expérimentaux à disposition. Le calage peut se faire sur des données statiques et dynamiques. Le calage des données se

fait principalement sur les données de production de méthane et d'évolution des concentrations en AGV.

Le calage sur des données statiques d'un digesteur continu simplifie la mise en œuvre de l'expérience car l'installation est déjà en fonctionnement et de manière stable (Lübken et al., 2007). Ceci permet une économie sur les interventions lors du fonctionnement. La limite de cette technique concerne le calage des paramètres. En effet, les variations du système sont très faibles et l'identifiabilité des paramètres est donc en général très faible (Batstone et al., 2009).

L'acquisition de données dynamiques est une autre stratégie pour le calage des paramètres cinétiques. Adopter cette démarche sur des installations fonctionnant en mode continu peut être très intéressant mais nécessite des variations importantes ou la possibilité de les provoquer pour avoir la meilleure identifiabilité des paramètres (Batstone et al., 2004, 2003; Kalfas et al., 2006). Travailler sur des batchs peut permettre d'avoir de meilleures variations et acquérir plus de données différentes en fonction du besoin de paramétrage (Girault, 2011; Yasui et al., 2008). Il reste cependant très important de bien définir l'état initial.

3.3. Paramètres calés liés à l'azote

Les stratégies de calage touchant l'azote ont surtout porté sur l'hydrolyse des protéines et la désintégration des composites. L'hydrolyse étant considérée comme étape limitante (Vavilin et al., 2008), la détermination des constantes associées à l'hydrolyse sont un verrou important à lever pour la bonne modélisation du procédé. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées dont une spécifique qui consiste en l'utilisation de protéines pures avec le suivi expérimental de la production de biogaz et de la minéralisation de l'azote (Flotats et al., 2006).

4. Principales limites du modèle et modifications

4.1. Un modèle complexe et ciblé.

Cela fait plus de 15 ans qu'ADM1 a vu le jour. Il reste toujours d'actualité et est considéré comme un modèle complet en termes de description de processus biochimiques Ce modèle se revendique, dans sa configuration et avec ses valeurs par défaut, du traitement des eaux (Batstone et al., 2015b) et son

application sur des configurations avec des substrats d'origine agricole nécessite une modification systématique du modèle ou un réajustement paramétrique (Galí et al., 2009 ; Mata-Alvarez et al., 2014). Cependant, le modèle a été construit pour permettre une modification simple et plus de 175 articles définis par les termes « modified ADM1 » ont été publiés depuis 2004 (Science Direct, 2018). Le modèle ADM1 a pu subir des modifications à plusieurs échelles mais qui généralement touchent la même étape : la désintégration et l'hydrolyse. Ces étapes sont les moins mécanistes de tout le schéma réactionnel et causent le plus de problèmes notamment lors de la simulation de la biodégradation de substrats atypiques et du couplage avec d'autres modèles (Nopens et al. 2009). Les prochains paragraphes traiteront des stratégies de modification de cette étape de désintégration et d'hydrolyse.

4.2. Modification de la cinétique de désintégration et d'hydrolyse : l'ordre Contois

Les cinétiques de désintégration et d'hydrolyse sont décrites dans ADM1 par une cinétique d'ordre 1 comme montré précédemment dans la section 2.2.2. Cependant, selon Vavilin et al. (2008), l'utilisation d'une cinétique d'ordre 1 peut montrer des limites surtout dans des systèmes où la biomasse est limitante et où des phénomènes d'affinité entre biomasse et substrat deviennent limitants. Afin de remédier à cette limitation, de nombreux auteurs ont remplacé cette cinétique d'ordre 1 par une cinétique d'ordre Contois sur les processus de désintégration et d'hydrolyse (Mairet et al., 2012; Polizzi et al., 2017; Ramirez et al., 2009). La particularité de cet ordre Contois (équation 13) est que la concentration de biomasse est prise en compte et que deux constantes sont à considérer plutôt qu'une.

$$\rho_{process} = k_{m,process} \frac{S/X}{K_{S,process} + S/X} \quad (13)$$

$\rho_{process}$: Cinétique du processus d'hydrolyse/désintégration ($\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$)

$k_{m,process}$: constante maximum spécifique d'hydrolyse/désintégration (j^{-1})

X : concentration de biomasse ($\text{kg}_{\text{DCO}}(X) \cdot \text{m}^{-3}$)

S : concentration du composé particulaire à hydrolyser/désintégrer ($\text{kg}_{\text{DCO}}(S) \cdot \text{m}^{-3}$)

$K_{S,process}$: coefficient de demi-saturation du ratio S/X (-)

La première est la constante maximale de désintégration/hydrolyse de la fraction composite $k_{m,process}$, qui est la vitesse maximale que peut atteindre la biodégradation des composites/polymères quand la

concentration en substrat S est très grande. La seconde est la constante de demi-saturation pour la biomasse, qui permet de quantifier le niveau d'affinité entre la biomasse et le substrat. Cet ordre est généralement traduit comme une manière de prendre en compte l'effet limitant de la surface disponible à la désintégration/hydrolyse (Mottet et al., 2013) et ceci se montre très pertinent dans le cas de la biodégradation d'un substrat pauvre en biomasse initiale tel que les résidus de culture.

L'utilisation de l'ordre Contois sur le processus de désintégration a été testée par Polizzi et al (2017) sur la biodégradation de boues activées de teinturerie et n'a montré aucune différence significative avec l'utilisation d'une cinétique d'ordre 1. Cette étude montre que l'utilisation de ce type de cinétique n'est pas pertinente sur l'étape de désintégration et notamment sur des substrats avec une biomasse initiale non négligeable. L'utilisation de ce type de cinétique montre tout son intérêt lorsqu'elle est appliquée à l'hydrolyse. En effet, Mairet et al. (2012) et Ramirez et al. (2009) ont montré des résultats beaucoup plus proches des données expérimentales par rapport à l'utilisation d'ADM1 avec une cinétique d'hydrolyse d'ordre 1. La modification de la cinétique d'hydrolyse a permis une amélioration du modèle lorsque l'on considère des substrats de type résidu de culture. Cependant, en fonction du substrat et du fractionnement de la matière organique utilisé, la cinétique d'ordre Contois peut donner des résultats similaires à ceux obtenus avec une cinétique d'ordre 1 ou ne pas être suffisante pour décrire l'évolution de la fraction. Lorsque le dernier cas de figure est constaté, la modification du fractionnement de la matière organique dans le modèle se présente comme une solution.

4.3. Modification du fractionnement.

4.3.1. Fractionnement basé sur la cinétique de biodégradation

La production de biogaz peut présenter plusieurs profils de production avec plusieurs cycles rapides ou lents (Siegrist et al., 2002). De nombreux auteurs ont donc, en se basant sur ces observations sur certains substrats, re-fractionné la matière organique selon la vitesse de biodégradation des fractions (Girault et al., 2012b; Kouas et al., 2015; Mottet et al., 2013; Poggio et al., 2016). Ces modifications ont surtout porté sur la fraction composite X_C du modèle ADM1 qui est subdivisée en deux fractions :

une première avec une vitesse de biodégradation rapide et une seconde avec une vitesse de biodégradation lente. La détermination de ces fractions peut se faire en utilisant des techniques de respirométrie anaérobie qui permettent l'identification rapide des fractions lentement et rapidement biodégradables (Girault et al., 2012b; Mottet et al., 2013). L'utilisation de cette modification du fractionnement sur des bases cinétiques a montré des résultats très robustes. Cependant, l'utilisation de cette méthode ne donne pas d'information sur la bioaccessibilité de la matière.

4.3.2. Fractionnement basé sur la bioaccessibilité

La bioaccessibilité se définit comme étant la quantité de la matière organique qui peut entrer physiquement en contact avec les microorganismes et leurs enzymes. Elle est la base du fractionnement des modèles de minéralisation du carbone et de l'azote dans les sols. Généralement, cette bioaccessibilité est déterminée via des extractions chimiques séquentielles de plus en plus agressives. L'implémentation de ces fractionnements dans ADM1 reste cependant très marginale dans la littérature. En effet, le fractionnement Van Soest est surtout utilisé pour déterminer les variables complexes du type polysaccharides dans le modèle ADM1 (Klimiuk et al., 2015). De plus, ce fractionnement a montré des liens peu robustes avec le potentiel bio-méthanogène (Jimenez et al., 2015; Mottet et al., 2010) ce qui en fait une méthode de fractionnement à considérer avec précaution pour la digestion anaérobie.

En revanche, les extractions EPS ont été utilisées pour modifier le fractionnement du modèle ADM1 (Jimenez et al., 2016). En effet, ce fractionnement de la matière organique a permis d'améliorer la simulation de la biodégradation de substrats allant de la paille à la pomme. Le modèle ADM1 modifié (figure 12) montre ainsi que les fractions déterminées (X_{RC} , X_{MC} et X_{SC}) ont remplacé la fraction composite X_C . Ces fractions sont directement hydrolysées et transférées dans les fractions solubles et inertes selon leur bioaccessibilité, X_{RC} étant le rapidement bioaccessible, X_{MC} le moyennement bioaccessible et X_{SC} le lentement bioaccessible. La biomasse est quant à elle localisée dans toutes les fractions complexes X_{RC} , X_{MC} et X_{SC} .

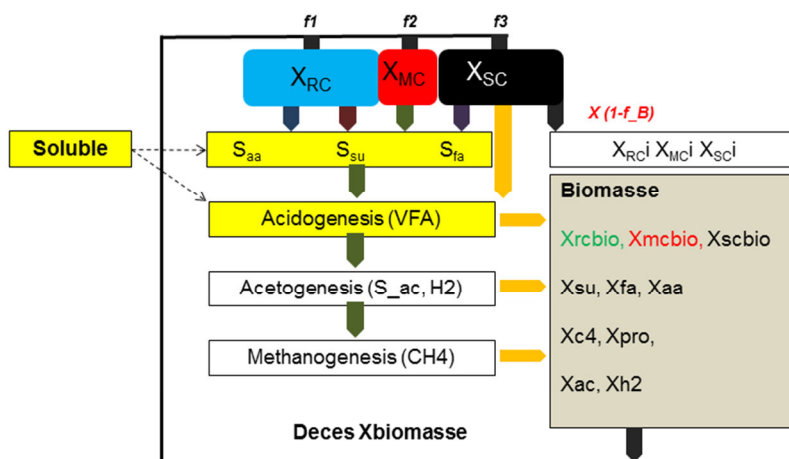


Figure 12: Modèle ADM1 modifié par Jimenez et al. (2016) prenant en compte la bioaccessibilité des espèces chimiques.

5. Conclusion de la partie 2

Le modèle ADM1 est indéniablement le modèle le plus complet en termes de processus pour décrire la digestion anaérobie et reste d'actualité car il s'efforce de représenter le plus réellement possible les phénomènes observés lors du procédé. Développé pour simuler la production de biogaz via la digestion anaérobie des boues, le modèle commence à montrer ses limites lors de l'utilisation de substrats d'origine agricole à la composition éloignée de celle des boues. La calibration du modèle, qui couple les dynamiques de transfert et transformation du carbone et de l'azote, sur la seule production de biogaz entraîne une perte d'informations vis-à-vis de l'azote. Par ailleurs, la mesure unique de l'azote organique du substrat peut entraîner une surestimation de la fraction protéique biodégradable en négligeant la bioaccessibilité des protéines. De plus, le modèle ADM1 fait l'hypothèse d'un C/N constant sur les différentes fractions considérées, cependant cela reste à vérifier, particulièrement sur la fraction composite où le modèle est vite limité par cette constance. Le découplage des dynamiques de l'azote de celle du carbone au sein du modèle de digestion anaérobie pourrait être une solution pour simuler au mieux les transformations et transferts de cet élément au cours du procédé.

Partie 3 : Questions de recherche spécifiques à la thèse et proposition d'approche méthodologique.

L'objectif de cette thèse est de comprendre les transformations de l'azote dans le but de développer un modèle qui permette à terme la prédiction de la qualité azotée des digestats. L'état de l'art a permis de constater le niveau poussé de connaissance théorique des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie. Cependant, la notion de bioaccessibilité en est absente alors qu'elle est déterminante pour comprendre la biodégradabilité de l'azote organique. De façon logique, l'état de l'art a également montré l'absence de cette notion de bioaccessibilité de l'azote organique dans la modélisation de la digestion anaérobie. Cet indicateur pourrait améliorer la simulation de l'azote et ainsi permettre la prédiction de la qualité azotée des digestats. Par conséquent, deux problématiques se dégagent de cette étude de la littérature à savoir : (i) Quelle est la bioaccessibilité de l'azote organique des substrats et son évolution au cours de la digestion anaérobie, et (ii) comment intégrer cet indicateur à un modèle de digestion anaérobie de type ADM1. De ces constats, découlent quatre verrous scientifiques à lever au cours de la thèse afin de comprendre et permettre la prédiction la qualité azotée des digestats :

- Evaluer la bioaccessibilité de l'azote des substrats ainsi que son lien avec la biodégradabilité de l'azote organique,

La biodégradabilité d'un substrat est généralement traduite au travers d'une proposition de fractionnement de sa matière organique. Pour exprimer la bioaccessibilité de l'azote organique il convient donc de proposer un fractionnement adéquat qui, au-delà de la seule biodégradabilité, intègre cette notion d'accessibilité physique. Afin d'aboutir à cela il sera nécessaire d'évaluer la biodégradabilité de l'azote organique sur un large panel de substrats, de la comparer à celle du carbone organique puis d'évaluer la bioaccessibilité de l'azote organique selon les méthodes Van Soest et EPS. Les liens entre ces différentes notions/approches seront étudiés à l'aide d'outils statistiques en vue de construire des modèles prédictifs. Ces travaux, présentés dans le chapitre 3, permettront de retenir un fractionnement de la matière pour le développement d'un modèle biocinétique.

- Comprendre les évolutions de la bioaccessibilité de l'azote en digestion anaérobie en vue d'une modification du modèle ADM1,

Afin de développer un modèle permettant à terme de prédire la qualité azotée des digestats, il est nécessaire de comprendre les dynamiques d'évolution de la bioaccessibilité de l'azote, selon le fractionnement choisi, au cours de la digestion anaérobie. Pour cela, le chapitre 4 propose de suivre l'évolution du fractionnement en réacteur batch sur un panel réduit de substrats. A partir de ces observations, le fractionnement de la bioaccessibilité de la matière organique, basé sur la méthode d'extraction retenue précédemment, sera adapté à celui du modèle biocinétique ADM1. Un schéma des processus de transformations sera construit sur la base du nouveau fractionnement ainsi que des hypothèses formulées à partir des observations de l'évolution de la bioaccessibilité en réacteur batch. Le modèle obtenu sera calibré et la sensibilité des nouveaux paramètres implémentés analysée afin de cibler les paramètres importants à estimer. La capacité prédictive du modèle développé sera finalement évaluée.

- Evaluer les effets des paramètres opératoires de la digestion anaérobie sur la qualité azotée des digestats.

Lorsque l'on passe d'un procédé batch à un procédé continu, de nouveaux paramètres peuvent venir influencer la dynamique d'évolution de la bioaccessibilité de l'azote comme le temps de séjour. La dernière question de la thèse concernera donc la détermination des constantes cinétiques associées à ces évolutions en conditions réelles. Pour cela, un suivi sur trois réacteurs pilotes à alimentation séquentielle traitant trois intrants à deux temps de séjour différents sera présenté dans le chapitre 5. Les suivis expérimentaux permettront d'affiner les processus biochimiques du modèle développé lors du chapitre précédent, de calibrer ce modèle et de valider son identifiabilité et sa possible généralisation à différentes configurations de digestion anaérobie mésophile en voie liquide.

- Disposer de méthodes adaptées pour répondre au besoin d'évaluation de la qualité azotée et de compréhension de sa dynamique d'évolution

Afin de pouvoir répondre aux questions/verrous précédemment exposés et de suivre les évolutions des différentes formes d'azote organique et inorganique, des dispositifs expérimentaux de digestion anaérobie, spécifiques à la thèse, doivent être développés. En effet, les différents dispositifs expérimentaux utilisés en digestion anaérobie pour déterminer le pouvoir méthanogène et le suivi de la biodégradation de la matière organique tels que le BMP (Vedrenne et al., 2008a) sont optimisés essentiellement pour le suivi de la production de biogaz. Avant d'aborder l'étude de la bioaccessibilité de l'azote organique et sa modélisation, le chapitre 2 de cette thèse présentera donc une optimisation de dispositifs expérimentaux pour le suivi spécifique de l'azote en digestion anaérobie.

Chapitre 2 : Développements méthodologiques préliminaires

1. Introduction

Les méthodes de caractérisation expérimentale de la digestion anaérobie sont principalement basées sur la détermination des productions de biogaz et de méthane. Elles sont optimisées pour différencier au maximum la production liée à la biodégradation du substrat de celle de l'inoculum. Cette optimisation est établie afin de minimiser l'impact des erreurs de mesure. Plusieurs types de méthodes existent en fonction de l'objectif en vue. Trois types d'informations sont généralement recherchés :

- Mesurer la biodégradabilité totale d'un substrat,
- Identifier les processus de biodégradation des substrats étudiés à une échelle laboratoire.
- Déterminer et évaluer les cinétiques de biodégradation des processus identifiés.

Ces trois informations sont complémentaires pour mieux comprendre la biodégradation d'un ou plusieurs substrats en digestion anaérobie. Afin de pouvoir déterminer ces informations, plusieurs types de méthodes basées sur l'incubation de ces substrats sont disponibles et sont présentés ci-dessous.

- La détermination de la biodégradabilité totale et du potentiel bio-méthanogène par la méthode « BMP »

La « méthode BMP » est utilisée pour déterminer la biodégradabilité totale et le potentiel bio-méthanogène d'un substrat en digestion anaérobie. Cette « méthode BMP » permet de mesurer la quantité maximum de biogaz et de méthane que l'on peut produire en biodégradant un substrat dans des conditions non limitantes en biomasse. Pour ce faire, le substrat à dégrader est mis en contact avec un inoculum composé du consortium de bactéries et archées permettant la production de méthane. Le ratio entre substrat et inoculum est fixé entre 0.5 et 1 $\text{gMV}_{\text{substrat}} \cdot \text{gMV}_{\text{inoculum}}^{-1}$ (Raposo et al., 2011). Ce ratio, élevé par rapport aux installations réelles, permet de ne pas mettre l'essai en limitation de substrat lors de l'incubation et de mieux distinguer la biodégradation du substrat par rapport à celle endogène de l'inoculum. Ce mélange est placé dans un réacteur fermé (ou batch) à une température comprise en 35 et 38°C. Le temps d'incubation du mélange peut varier de 40 à 150 jours (Bareha et al., 2018; Vedrenne et al., 2008b; Yoon et al., 2014) sous agitation continue ou alternée. Le suivi du

biogaz est manométrique et la qualité de ce biogaz est suivie par chromatographie en phase gazeuse. Cette « méthode BMP » n'est pas normalisée et les conditions opératoires peuvent légèrement changer. Cependant, un consensus existe sur les bonnes pratiques de mise en place de cet essai (Cresson et al., 2015).

- Observation de l'évolution d'indicateurs spécifiques en fonction du temps dans un objectif de compréhension des processus de dégradation

Afin de suivre les évolutions et transformations d'indicateurs d'intérêt comme des composés chimiques particuliers, une solution simple est le suivi sur réacteur fermé (ou batch). Le protocole expérimental est proche de celui de la « méthode BMP » même si les conditions opératoires diffèrent. En effet, une plus grande liberté quant aux conditions opératoires est offerte comme la modification du ratio substrat/inoculum. Un ratio très bas est utilisé pour des essais batch types respirométriques (Girault et al., 2011) qui tentent de reproduire des conditions réelles de digestion. L'augmentation du ratio substrat/inoculum est moins répandue mais pourrait permettre de visualiser avec plus de précision des évolutions significatives propres au substrat. Les conditions de température sont similaires à celles de la « méthode BMP » mais la durée d'incubation peut varier plus fortement en comparaison de celles de la « méthode BMP ». L'acquisition de la production de biogaz peut se faire selon plusieurs méthodes, manométriquement ou via un compteur à biogaz. La qualité du biogaz est analysée par chromatographie en phase gaz. La modification du design des réacteurs batch par rapport à ceux utilisés dans la « méthode BMP » permet de faire un suivi plus simple de différents indicateurs et espèces chimiques.

- Observation de l'évolution d'indicateurs spécifiques en conditions réelles de biodégradation.

L'utilisation de réacteurs batch présentés précédemment permet un suivi fin de la biodégradabilité. Néanmoins, la limite de ces dispositifs réside dans leurs différences fondamentales avec la réalité des digesteurs sur le terrain. En effet, les réacteurs utilisés à échelle industrielle sont très majoritairement alimentés de façon continue ou séquentielle. La particularité de ce type de réacteur est que l'apport continu de substrat augmente considérablement la quantité de biomasse présente dans le digesteur. De

plus, cette biomasse s'acclimate aux substrats qui l'alimentent. Par conséquent, en conditions normales de fonctionnement, la biodégradation est limitée par le substrat et non par la quantité de biomasse présente. Effectuer un suivi, changer le temps de séjour hydraulique, de charge organique d'alimentation ou introduire des inhibitions en conditions réelles est très contraignant et coûteux pour l'installation qui perd en rentabilité. Afin de pouvoir expérimenter plusieurs conditions opératoires et expérimentales, le développement de digesteurs pilotes présentent un fort intérêt car ils permettent de mimer les digesteurs industriels tout en s'affranchissant des contraintes du terrain.

Ces méthodes de suivi de la digestion ont été déjà largement éprouvées dans le cadre de travaux portant sur la biodégradation du carbone et la production de biogaz. Cependant, les conditions expérimentales classiquement employées montrent leurs limites quant au suivi d'autres espèces chimiques et particulièrement de l'azote et de ces différentes formes. En effet, les inocula utilisés sont riches en azote inorganique et organique apportant un bruit de fond azoté très important qui limite la visualisation de la biodégradation de l'azote organique et de la production d'azote ammoniacal.

Afin de pallier les limites exprimées ci-avant et de répondre aux questions de la thèse, trois dispositifs ont été développés, qui seront détaillés dans ce chapitre. Un premier dispositif similaire à la « méthode BMP » permet de déterminer le potentiel de minéralisation ultime de l'azote organique en digestion anaérobie. Le second dispositif est un dispositif en batch permettant le suivi de l'évolution des différentes formes d'azote organique au cours de la dégradation d'un substrat. Enfin, le troisième dispositif est un pilote de digestion anaérobie alimenté séquentiellement et adapté au suivi des cinétiques de transformation de l'azote en conditions réelles. Les incertitudes de mesure associées à la détermination du potentiel de minéralisation de l'azote organique ainsi que celles associées à la détermination de la bioaccessibilité de l'azote organique seront étudiées. Ces incertitudes de mesure permettront d'évaluer précisément la significativité des signaux à améliorer et d'adapter les protocoles expérimentaux.

2. Dispositif de détermination du potentiel de minéralisation de l'azote organique en digestion anaérobie : la « méthode ANMP » (Apparent Nitrogen Mineralized Potential)

2.1. Principe

La « méthode ANMP » présente beaucoup de similarités avec la « méthode BMP ». En effet, elle a pour principe d'incuber une quantité connue de substrat mis en présence d'une quantité connue de micro-organismes anaérobies (inoculum) en réacteur fermé (batch). Le ratio substrat sur biomasse est similaire à celui utilisé par la « méthode BMP » (1 gMV.gMV^{-1}) et les incubations sont effectuées en condition mésophile pendant une durée de 40 jours. Durant la période d'incubation, un suivi de la production de biogaz est effectué de la même manière que la « méthode BMP », par suivi manométrique, et la qualité de ce biogaz est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

La nouveauté de la « méthode ANMP », par rapport à la « méthode BMP », est la possibilité de déterminer un potentiel de minéralisation de l'azote organique par détermination des concentrations initiales et finales en NTK et ammonium. En effet, la « méthode BMP » est optimisée, de par le ratio substrat/biomasse, pour la détermination du potentiel de production de biogaz et méthane. Or, malgré ce ratio en faveur de l'acquisition du signal de biodégradation du substrat, l'importante concentration en ammonium apportée par l'inoculum peut entraîner un risque de perturbation du signal de minéralisation de l'azote organique du substrat. Par conséquent, un prétraitement de l'inoculum a été nécessaire pour réduire ce bruit de fond important de l'ammonium apporté par l'inoculum.

Par la suite, les points suivants seront donc abordés : le protocole de préparation de l'inoculum, l'impact de cette préparation sur la biodégradation du substrat, l'estimation des erreurs ainsi que la part de l'ammonium minéralisé issu du substrat immobilisé par l'inoculum.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est issu d'un digesteur pilote continu de 87 L de volume utile alimenté par du lisier porcin et de l'aliment pour chevaux. La charge organique est de $3.9 \text{ kgDCO.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ et le temps de séjour est de

27 jours. Les caractéristiques de l'inoculum, issu du digestat, et de l'inoculum prétraité par centrifugation sont présentées tableau 7.

Tableau 7: Caractéristiques azotées de l'inoculum non centrifugé et centrifugé.

Echantillon	MS (g _{MS} .kg ⁻¹)	MV (g _{MV} .kg ⁻¹)	NTK (gN.kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (gN.kg ⁻¹)	pH
Inoculum	24.7	13.9	2.5	1.7	7.7
Inoculum centrifugé	22.8	15.7	1.2	0.4	8.3

L'inoculum non prétraité possède une teneur en matière volatile de 13.9 gMV.kg⁻¹ ainsi qu'une teneur en azote ammoniacal de 1.7 gN-NH₄⁺.kg⁻¹ et une teneur en NTK de 2.5 gN-NTK.kg⁻¹. L'inoculum prétraité, utilisé dans la « méthode ANMP », a été préparé par centrifugation à 10000g pendant 20 min à température ambiante. Le surnageant, contenant l'azote ammoniacal, a été retiré et le culot a été remis en suspension dans une solution de KHCO₂ et NaHCO₂ de 10g.L⁻¹ de volume égal à celui du surnageant. L'ajout de cette solution tampon a permis de rétablir un pouvoir tampon afin d'éviter tout phénomène d'acidification pouvant inhiber le processus de méthanisation. Ses quantités ont été calculées en respectant les limites d'inhibition dues au sodium et au potassium (Chen et al., 2008). Le rendement de réduction de la teneur en azote ammoniacal est de 80% environ. La masse volatile ainsi que la teneur en azote organique sont très peu affectées par le prétraitement ce qui indique que la centrifugation dans ces conditions permet un bon taux de capture des MV et donc de la biomasse contenue dans l'inoculum.

2.2.2. Substrats testés

Vingt substrats issus d'installations différentes et présentant des caractéristiques différentes ont été utilisés pour l'évaluation de la méthode. Les caractéristiques des substrats sont présentées table 8.

Tableau 8: Caractéristiques chimiques des substrats utilisés pour le développement méthodologique.

Classe	Echantillons	MS (g _{MS} .kg ⁻¹)	MV (g _{MV} .kg ⁻¹)	NTK (gN.kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (gN .kg ⁻¹)	COT (gC.kg ⁻¹)	C/N (gC/gN)
Résidus de culture	Fèverole	140.2	125.6	6.4	0	72.4	11.3
	Vesce	174.5	158.6	8.4	0	86.5	10.3
	Phacélie	216.6	197.7	2.8	0	49.9	17.8
	Moutarde	178.1	158.7	5.2	0	89.2	17.3
	Avoine	157.1	141.1	4.8	0	106.7	22.2
	Seigle	207.6	195.6	3.6	0	128.9	35.8
	Orge	246.5	221.3	4.0	0	149.1	36.8
	Ensilage de maïs	298.2	275.6	6.2	0.3	133.4	21.4
	Ensilage d'herbe	267.4	234.0	7.7	0.7	138.8	18.0
	Ensilage d'avoine	161.9	134.0	4.2	1.9	85.6	20.5
Effluents d'élevage	Fumier bovin	133.7	103.8	4.3	1.3	71.0	16.5
	Lisier porcin	50.3	37.1	3.2	2.3	25.1	7.7
	Lisier bovin	92.4	73.4	2.4	0.9	48.3	19.7
	Fumier de volaille	328.1	252.2	13.8	5.5	148.4	10.7
Déchets d'industries agroalimentaires et de collectivités	Refus de dégrillage d'abattoir	294.1	282.7	7.8	0.2	165.4	21.1
	Tontes	261.4	213.3	8.1	0.4	112.0	13.8
	Déchets d'aliment pour bétail	698.1	628.1	34.0	3.4	321.9	9.4
	Déchets de cuisine	259.1	206.2	11.5	0.1	139.7	12.1
	Déchets de production de levures	587.7	465.0	43.9	4.9	251.3	5.7
	Déchets alimentaires de supermarché	107.4	95.7	2.7	0.7	62.6	23.1

La teneur en azote organique varie de 28 à 100% avec des ratios C/N de 5.7 à 39.1 traduisant la diversité de composition azotée des substrats. Tous les substrats ont été broyés à l'aide d'un broyeur rotatif (R15 V.V., Robotcoupe®) et stockés à -20°C. Les concentrations en MS, MV, NTK et ammonium ont été déterminées selon la méthode standard (APHA, 2005). Le carbone total et le carbone inorganique ont été déterminés par analyse élémentaire selon les instructions du constructeur (Thermoflash 2000, Thermoscientific®). Le carbone organique a été déterminé en soustrayant le carbone inorganique au carbone total. La détermination du BMP s'est faite selon la « méthode BMP » utilisée par Vedrenne et al. (2008).

2.2.3. Protocole expérimental

Dans un flacon de 572 mL, le substrat et l'inoculum prétraité sont insérés. Le ratio entre substrat et inoculum est fixé à 1 gMV.gMV⁻¹. Le volume réactionnel est atteint en complétant avec de l'eau tamponnée jusqu'à un volume de 135 mL. L'espace de tête du flacon est purgé à l'azote gazeux à un débit de 1.5 L.min⁻¹ pendant 7 minutes. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, avec la même quantité d'inoculum que celle ajoutée dans le mélange. Les flacons sont incubés à 38°C avec une agitation manuelle journalière. Le suivi biogaz se fait de la même manière que sur la « méthode BMP » comme évoqué dans la section 1. Après incubation pendant 40 jours, les contenus des flacons sont analysés en NTK et azote ammoniacal afin de déterminer le potentiel de minéralisation de l'azote organique selon l'équation (13):

$$AMNP = \frac{NH_4^+_{-substrat} - NH_4^+_{-blanc}}{m_{substrat}} - [NH_4^+_{-substrat initial}] \quad (13)$$

Where:

- AMNP : Potentiel de minéralisation de l'azote organique du substrat (gN-NH₄⁺.kg⁻¹)
- $NH_4^+_{-substrat}$: Quantité totale d'ammonium dans le flacon après incubation (gN-NH₄⁺)
- $NH_4^+_{-blanc}$: Quantité totale d'ammonium dans le blanc après incubation (gN-NH₄⁺)
- $m_{substrat}$: Masse de substrat ajouté dans le flacon (kg)
- $[NH_4^+_{-substrat initial}]$: Concentration d'ammonium du substrat avant incubation (gN-NH₄⁺.kg⁻¹).

Chaque substrat ainsi que le blanc est analysé en triplicat afin de déterminer l'incertitude liée à la répétabilité de la mesure. Chaque analyse physicochimique sur les contenus des flacons a été également effectuée en triplicat afin d'estimer les erreurs liées aux méthodes analytiques.

2.2.4. Estimation des incertitudes

L'incertitude de mesure sur la détermination du potentiel de minéralisation de l'azote organique a été estimée en utilisant le GUM (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement) (Hennebelle and Coorevits, 2013) avec une approche Monte Carlo. Le GUM est un guide décrivant les différentes méthodes possibles pour l'estimation des incertitudes de mesure d'un mesurande (grandeur à mesurer

en prenant en compte les autres mesures qui la définissent) sur une chaîne de mesure. Le mesurande est ici le potentiel de minéralisation de l'azote organique (ANMP) qui est calculé par l'équation (13). Les analyses dont les incertitudes de mesure ont été prises en compte sont les mesures des masses pesées, le NTK et le NH_4^+ . L'incertitude de mesure sur la « méthode ANMP » a été effectuée par la méthode Monte Carlo. Cette méthode considère que chaque analyse suit une loi normale dont la moyenne et les écart-types sont estimés à partir d'essai de répétabilité (triplicats). Mille calculs d'ANMP ont ensuite été effectués en tirant au sort les données d'analyses au sein de ces distributions et la valeur moyenne de l'ANMP ainsi que son incertitude a été calculée en moyennant les valeurs sauvegardées et en calculant l'écart-type entre ces valeurs.

2.3. Résultats

2.3.1. Evaluation de la capacité à déterminer le BMP par la « méthode ANMP »

La figure 13 présente les écarts obtenus entre la « méthode BMP » selon Vedrenne et al. (2007) et la « méthode ANMP ». Les résultats montrent que les potentiels bio-méthanogènes sont très similaires avec des écarts de maximum 20%. Cet écart de 20% est proche de l'écart maximum retrouvé sur la valeur BMP lors d'essais inter-laboratoires (Cresson et al., 2015).

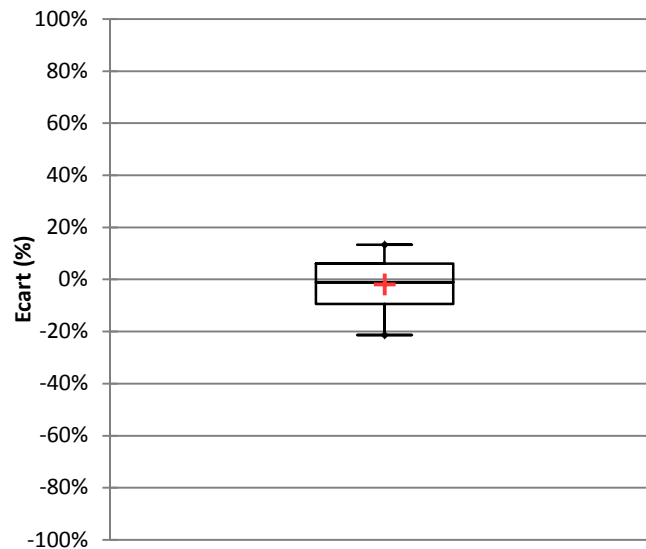


Figure 13: Ecart dans la détermination du BMP entre la « méthode BMP » selon Vedrenne et al. (2008) et la « méthode ANMP » (Bareha et al., 2018).

Un autre aspect affecté par la « méthode ANMP » est la cinétique de production de méthane. En effet, comme il est observé sur un essai sur le déchet d'aliment pour bétail (figure 14), les vitesses de production de méthane sont significativement affectées par le prétraitement de l'inoculum. En effet, le pic de production est atteint le premier jour en utilisant la « méthode BMP » avec une vitesse de production de $0.86 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{j}^{-1}$. La vitesse maximum est atteinte le deuxième jour avec une valeur deux fois inférieure en utilisant la « méthode ANMP ». Selon Batstone et al. (2015), la centrifugation affecte l'activité de la biomasse méthanogène causant une déstabilisation de l'équilibre de la chaîne trophique. Par conséquent, le nécessaire rétablissement de l'équilibre de la chaîne trophique entraîne un temps de latence dans la production de méthane qui est visible les premiers jours.

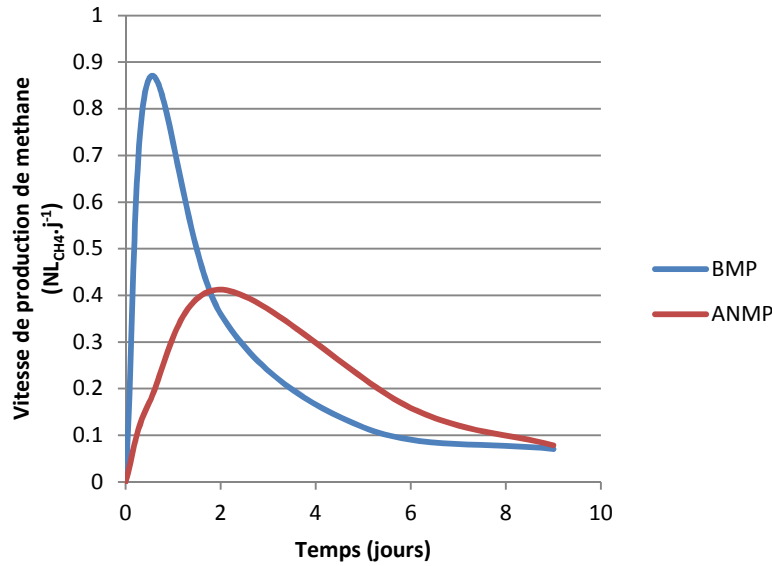


Figure 14: Vitesse de production de méthane les 10 premiers jours avec la « méthode BMP » (bleu) et avec la « méthode ANMP » (rouge).

2.3.2. Evaluation de l'impact de l'adaptation du protocole de mesure sur les incertitudes de mesures

La réduction de la quantité d'azote ammoniacal de l'inoculum, dû au prétraitement par centrifugation de l'inoculum, a pour objectif d'augmenter la part de l'azote organique du substrat dans le mélange substrat/inoculum. La part de l'azote organique du substrat dans le mélange et la part de l'azote ammoniacal dans les mélanges substrat/inoculum selon les « méthodes ANMP et BMP » sont présentées figure 15.

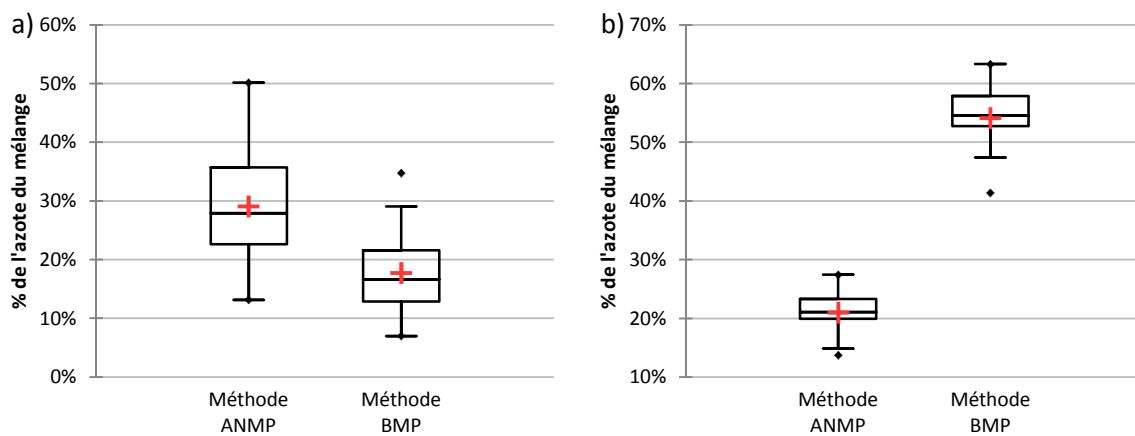


Figure 15: Part de l'azote organique du substrat par rapport à l'azote total selon la méthode ANMP et BMP (a) ainsi que la part d'azote ammoniacal issu de l'inoculum par rapport à l'azote total (b).

L'azote ammoniacal représentait 54% de l'azote total avec la « méthode BMP » et passe à 21% de l'azote total du mélange avec la « méthode ANMP ». La « méthode ANMP » permet une réduction de la quantité d'azote ammoniacal issue de l'inoculum de 60% par rapport à la « méthode BMP ». Cette réduction de la quantité d'azote ammoniacal issue de l'inoculum dans le mélange permet à la part de l'azote organique du substrat dans le mélange d'augmenter de 67% dans la « méthode ANMP » par rapport à la « méthode BMP ». En effet, la part d'azote organique issu du substrat représente 17% dans la « méthode BMP » contre 28% dans la « méthode ANMP ». Le prétraitement par centrifugation simple sans lavage, utilisé dans la « méthode ANMP », permet donc d'augmenter la part d'azote total issu du substrat. Par conséquent, la minéralisation de l'azote organique du substrat sera 2 fois plus significative que sans prétraitement.

Concernant l'incertitude sur la mesure de l'ANMP, celle-ci est aussi affectée par le prétraitement de la biomasse. Comme présenté figure 16 l'incertitude sur la mesure de l'ANMP par la « méthode BMP » est en moyenne de 25% alors que cette incertitude est de 13% en moyenne par la « méthode ANMP ». L'incertitude de mesure avec une biomasse non centrifugée est donc deux fois plus importante qu'avec une biomasse centrifugée. Cette différence est en majeure partie portée par les substrats à faible minéralisation qui sont estimés avec une incertitude sur la mesure très élevée.

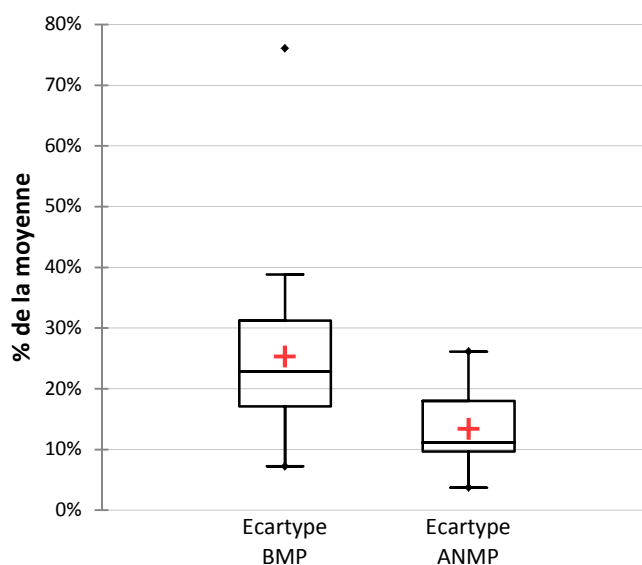


Figure 16: Distribution des écart-types de mesure calculée par la méthode Monte Carlo sur des essais avec la « méthode BMP » et la « méthode ANMP ».

2.3.3. Evaluation de la minéralisation de l'azote organique

Les résultats des tests de minéralisation sur le panel de substrats sont présentés figure 17. Les taux de minéralisation de l'azote organique vont de -6% à 82%. Les minéralisations positives sont synonymes de minéralisation apparente de l'azote organique issu du substrat tandis que des taux de minéralisation négatifs témoignent d'une assimilation de l'azote ammoniacal issu de sa minéralisation et/ou apporté par le milieu réactionnel.

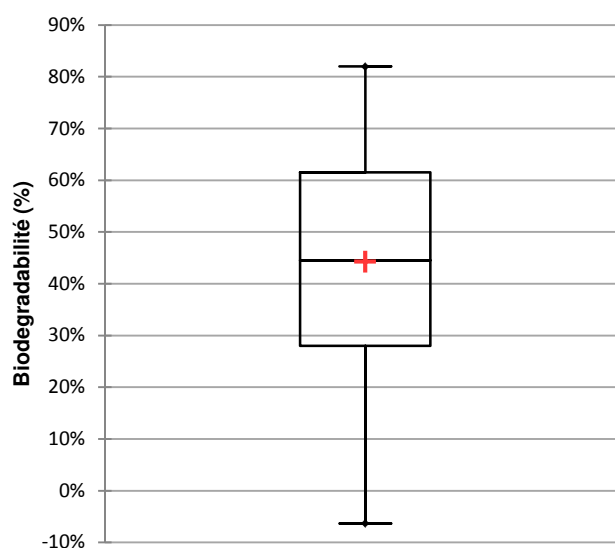


Figure 17: Biodégradabilité de l'azote organique des substrats testés.

Les transformations de l'azote sont d'ordre physico-chimique et biologique. Les phénomènes physico-chimiques tels que la précipitation sous forme de struvite et la volatilisation de l'ammoniac ne sont pas pris en compte selon cette méthode car les bilans azote sont équilibrés et l'analyse de l'ammonium solubilise la struvite. La minéralisation par désamination de l'azote organique ainsi que l'assimilation de l'azote ammoniacal sont effectuées par les bactéries et ces processus sont confondus avec l'utilisation de la « méthode ANMP ». Par conséquent, les potentiels obtenus sont des potentiels apparents. Néanmoins, l'estimation de l'assimilation d'azote ammoniacal par la biomasse est possible en utilisant des substrats spécifiques.

2.3.4. Assimilation d'azote minéral par la biomasse

L'assimilation d'azote ammoniacal par l'inoculum a pu être quantifiée sur la durée du test de 40 jours. Une solution d'acides gras volatils de 2 gDCO.L^{-1} a été utilisée. L'intérêt de cette solution est qu'elle est composée de molécules totalement biodégradables et sans apport d'azote organique ni minéral. Plusieurs tests utilisant la « méthode ANMP » avec des inocula centrifugés mais issus de différents prélèvements sur le même réacteur ont pu montrer que la part d'azote ammoniacal prélevée par la croissance de la biomasse était la même. Le BMP était de $382 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}.\text{gDCO}^{-1}$ et l'ANMP égal à -6%. Le BMP montre que le carbone apporté est bien biodégradé à 100% car le BMP théorique est de $350 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}.\text{gDCO}^{-1}$. D'après les résultats, la quantité d'azote ammoniacal consommée par quantité de carbone dégradée est égale à $0.006 \text{ gN-NH}_4^+.\text{gC}^{-1}$ sur 40 jours. Ce résultat est au-dessous des rendements de croissance sur l'azote donnés dans la littérature qui sont de 0.017 à $0.009 \text{ gN-NH}_4^+.\text{gC}^{-1}$ (Batstone et al., 2002; Ramsay and Pullammanappallil, 2001). Cette valeur faible par rapport à la littérature est due au temps d'incubation du test. En effet, le rendement de croissance obtenu avec la « méthode ANMP » a été acquis sur une longue période d'incubation qui comprend la croissance et la désintégration de la biomasse. Ce rendement mesuré est donc un rendement global. Par conséquent, l'assimilation de la biomasse est une donnée qui peut avoir une influence sur le taux de minéralisation de l'azote organique du substrat incubé.

2.4. Bilan

La « méthode ANMP » a montré sa robustesse quant à la détermination du potentiel de minéralisation de l'azote organique (ANMP) et du potentiel bio-méthanogène (BMP). Cependant, cette méthode ne permet pas en soit de comprendre les mécanismes de transformation de l'azote en digestion anaérobie mais seulement d'estimer le bilan des transformations en terme de minéralisation. La bioaccessibilité étant un paramètre d'intérêt pour comprendre l'évolution de l'azote et du carbone, un dispositif maximisant plus encore le signal azote organique du substrat est nécessaire.

3. Dispositif de suivi des transformations de l'azote apporté par le substrat en réacteurs batch : Nitrobatch

Proche de la « méthode ANMP », le protocole Nitrobatch est un essai permettant de mieux visualiser les évolutions du carbone et de l'azote organique du substrat pendant la digestion anaérobie. Le niveau d'augmentation des signaux carbone et azote liés au substrat permet un suivi plus précis de l'évolution des fractions biochimiques lors de la biodégradation de ce dernier. En effet, le ratio substrat/inoculum est augmenté afin d'observer au mieux la biodégradation du substrat. Cependant, une augmentation trop importante de ce ratio peut mettre en exergue des inhibitions et impacter les mesures de BMP et d'ANMP. Dans cette partie, il sera présenté dans un premier temps le protocole « Nitrobatch » mis au point dans le cadre de cette thèse. Dans un second temps, les performances de ce protocole notamment vis-à-vis de l'obtention des potentiel BMP/ANMP (absence d'inhibition) et des niveaux de visualisation des indicateurs de bioaccessibilité du carbone et de l'azote (fractions déterminées par les méthodes Van Soest et EPS) seront évaluées.

3.1. Pilote expérimental

Le dispositif Nitrobatch est présenté en figure 18. Il s'agit d'un pilote constitué de 20 flacons d'un litre placés dans une armoire thermostatée à la température de 38°C afin d'effectuer les incubations en conditions mésophiles. Chaque test est composé de quatre flacons dont deux sont reliés à des compteurs de gaz à auget afin de suivre la quantité de biogaz produite. Des points de piquages sont situés au niveau des bouchons de tous les flacons afin de prélever directement le biogaz produit dans l'espace de tête du flacon afin de déterminer sa composition.

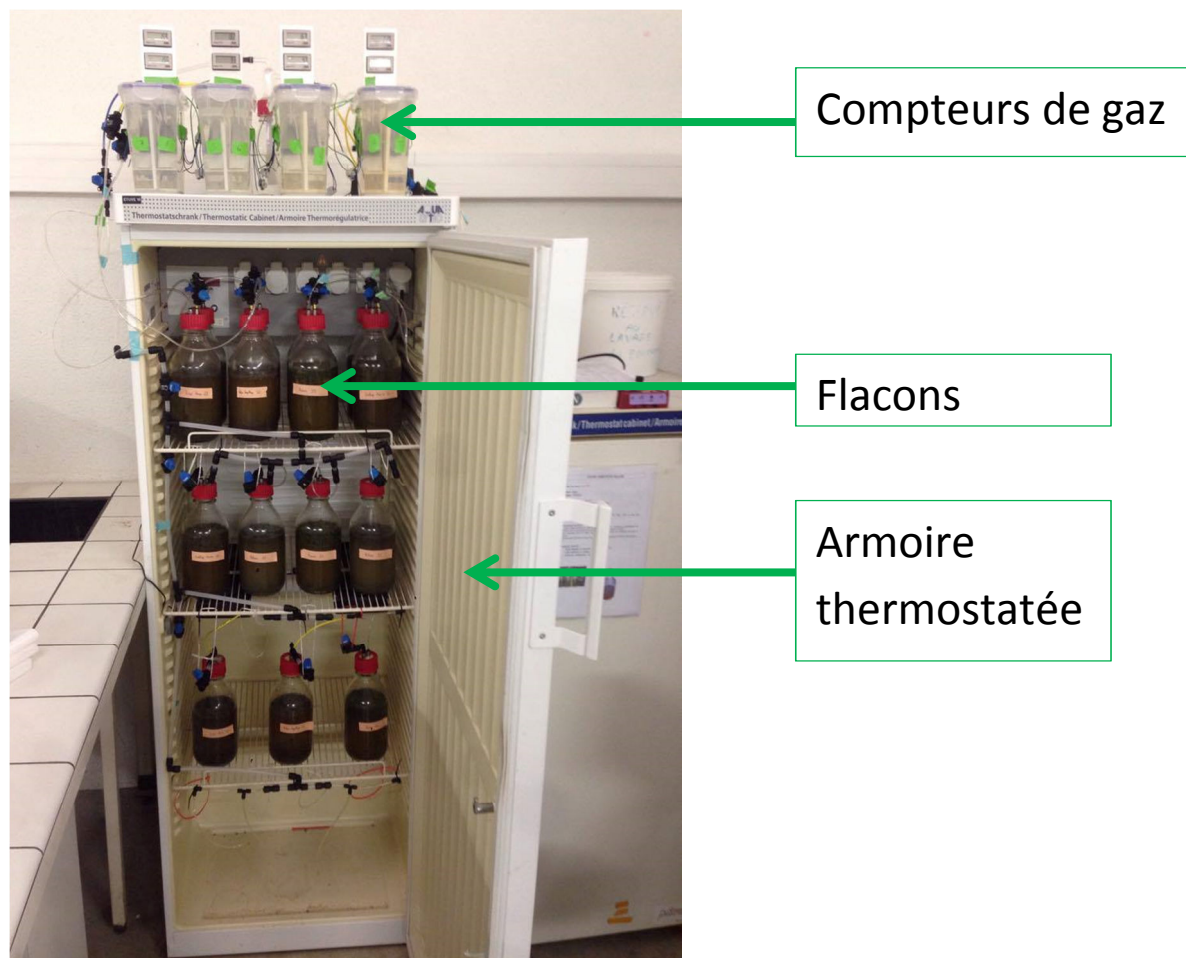


Figure 18: Schéma du dispositif Nitrobatch.

3.2. Protocole expérimental

Les échantillons à incuber sont broyés grossièrement à l'aide d'un broyeur à couteaux (Robotcoupe). Les essais ont été effectués sur les substrats et l'inoculum centrifugé présentés dans la section 2.2.1 de ce chapitre. Le mélange substrat et inoculum centrifugé est calculé de manière à atteindre un ratio substrat/inoculum de 2.5 gMV.gMV^{-1} avec une quantité d'inoculum fixée à 60 gMB (soit 3.6 gMV). Le mélange est complété à 750 g avec de l'eau tamponnée à 15g.L^{-1} de $\text{NaHCO}_2 + \text{KHCO}_2$ afin de rétablir un pouvoir tampon et de limiter les inhibitions dues à la baisse de pH. L'espace de tête est ensuite purgé à l'azote à un débit de 1.5 L.min^{-1} pendant 10 minutes. Quatre flacons sont préparés pour chaque substrat et sont ensuite placés dans l'armoire thermostatée. Quatre autres flacons sont préparés dans les mêmes conditions avec l'inoculum seulement et sont également placés dans l'enceinte thermostatée. Ces blancs servent à déterminer les potentiels BMP et ANMP des mélanges ainsi qu'à

suivre la biodégradation des fractions de l'azote organique de l'inoculum seul. Les flacons avec et sans substrat sont arrêtés un par un les 7, 14, 25 et 50^{ème} jours, les derniers flacons arrêtés étant ceux reliés aux compteurs. Des prélèvements de biogaz sont effectués avec une fréquence journalière la première semaine puis avec une fréquence de deux prélèvements par semaine jusqu'au 50^{ème} jour. La qualité du biogaz est analysée par chromatographie phase gazeuse.

3.3. Analyses effectuées sur les digestats.

3.3.1. Analyses physicochimiques

Les masses sèches/masses volatiles, les teneurs en azote total et les teneurs en azote ammoniacal du mélange initial ainsi que des digestats obtenus après 7, 14, 25 et 50 jours ont été mesurées selon les méthodes standards. Le carbone total et l'azote total ont été mesurés par analyse élémentaire selon les spécifications du constructeur (Thermoflash 2000, Thermoscientific®). Le carbone organique a été déterminé en soustrayant le carbone inorganique, mesuré sur les cendres obtenues à 480°C, au carbone total.

3.3.2. Fractionnements utilisés

Les indicateurs de bioaccessibilité du carbone et de l'azote organique ont été caractérisés par des méthodes d'extractions chimiques séquentielles sur les échantillons bruts. Deux méthodes ont été utilisées qui fractionnent le carbone et l'azote organique en quatre fractions : la méthode Van Soest et la méthode EPS.

3.3.2.1. Le fractionnement Van Soest

La méthode Van Soest se base sur des extractions avec une acidité croissante couplée à des détergents. Les quatre fractions s'obtiennent selon les extractions suivantes :

- SOL_VS : Cette fraction est extraite sous agitation avec de l'eau à la température de 20°C pendant une heure.
- PROT_VS : Cette fraction est déterminée par solubilisation du carbone et azote extractible au NDF pendant une heure à 100°C sur le résidu d'extraction à l'eau. (NDF: 1.86% disodium ethylene diamine tetraacetate, 3% solution aqueuse de sodium dodecyl sulfate,

0.68% decahydrate sodium tetraborate, 0.45% disodium hydrogène phosphate and 1.0% triethylene glycol; Carlo Erba®).

- HOLO_VS : Cette fraction est le résultat de deux extractions successives du protocole Van Soest: (1) une première extraction avec une solution ADF (2.6% acide sulfurique and 2.0% cetrimonium bromide; Carlo Erba®) bouillante pendant une heure suivie d'une extraction (2) à l'acide sulfurique 72% (w/w) pendant trois heures à température ambiante. Les extractions se font sur le résidu d'extraction du PROT_VS.
- LIGN_VS : Cette fraction est le résidu final après les différentes extractions successives.

Les résidus d'extraction ont été analysés par analyse élémentaire afin de mesurer leurs teneurs en carbone et en azote. Le carbone et l'azote associé à chaque fraction est calculé par différence entre les résidus d'extractions.

3.3.2.2. *Le fractionnement EPS*

La méthode EPS se base sur des extractions avec une alcalinité croissante se terminant avec une extraction à l'acide fort. Le carbone et l'azote sont aussi fractionnés en quatre selon les étapes suivantes :

- SOL_EPS : La première étape consiste en deux extractions successives avec 30 mL d'une solution saline de CaCl_2 10mM à 30°C sous agitation à 300rpm pendant une heure. Le solvant est retiré par centrifugation pendant 20 min à 12100 g.
- PROT_EPS : Le résidu de la précédente extraction est rincé quatre fois avec 30 mL d'une solution basique de NaOH + NaCl 10mM à 30°C pendant 15 minutes sous agitation (300 rpm). Cette extraction est suivie de 4 extractions avec 30 mL soude NaOH 0,1M à 30°C pendant 1 heure sous agitation (300 rpm).

- HOLO_EPS : Le résidu d'extraction de la précédente extraction est rincé trois fois avec 25mL d'une solution d'acide sulfurique 72% (w/w) à 30°C pendant 3 heures sous agitation (300rpm).
- LIGN_EPS : Cette fraction est composée des matériaux non-extraits lors des précédentes étapes.

Les teneurs en carbone organique et en azote total de chaque fraction ont été déterminées dans chaque extrait liquide par analyse élémentaire liquide (TOC-L, Shimadzu®). La quantité de carbone et d'azote restant dans la fraction LIGN_EPS a été déterminée par calcul en soustrayant le total extrait aux teneurs en carbone et azote de l'échantillon brut.

3.4. Résultats

3.4.1. Détermination des potentiels BMP et ANMP

Le dispositif utilisant de forts ratios substrat/biomasse, des risques d'inhibition par la forte production d'AGV apparaissent. De plus, la réduction de la concentration en azote ammoniacal entraîne un risque de limitation de la croissance de la biomasse par l'azote ammoniacal. La figure 19 montre l'évolution des AGV (a), de l'ammonium (b) et du pH (c) pendant la biodégradation du déchet d'aliment pour bétail et du lisier bovin.

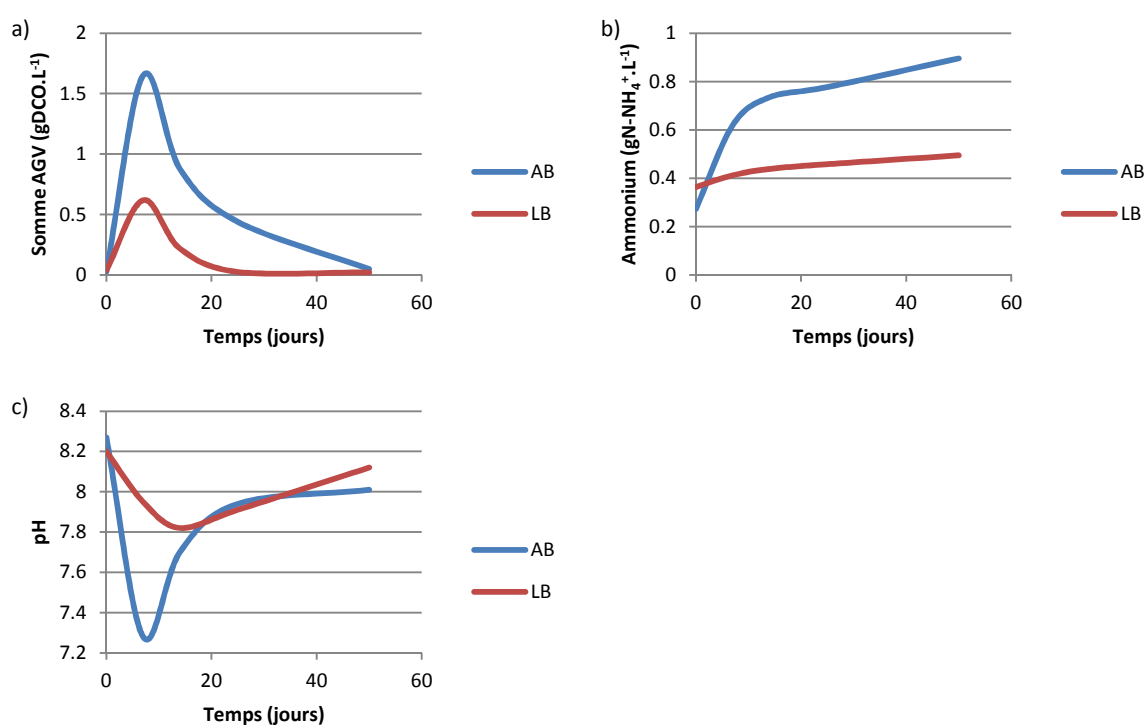


Figure 19: Evolution des concentrations en AGV (a), en ammonium (b) et du pH (c) au cours des essais Nitrobatch sur le déchet d'aliment pour bétail (bleu) et le lisier bovin (bleu).

Le suivi AGV sur les essais montre que les concentrations n'ont pas atteint des niveaux provoquant l'inhibition du processus (Chen et al., 2008). Des accumulations transitoires sont néanmoins visibles le 5^{ème} jour de digestion notamment sur l'acétate avec des concentrations de 1.65 et 0.6 gDCO.kg⁻¹ pour AB et FB. Ces concentrations diminuent rapidement les jours suivants jusqu'à être totalement consommées le dernier jour. De plus, les pH mesurés étaient compris entre 8.3 et 7.3, ce qui témoigne du fait que les essais n'ont pas subi d'inhibition par la production importante d'AGV.

L'évolution de la concentration en azote ammoniacal montre une forte production d'azote ammoniacal les 5 premiers jours pour les deux substrats jusqu'à stabilisation. Cette production témoigne du bilan positif entre minéralisation de l'azote organique et assimilation pour la croissance. Par conséquent, aucune limitation par l'azote ammoniacal n'est à déplorer. Néanmoins, l'utilisation de substrats immobilisant l'azote avec des C/N très fort pourrait amener à un appauvrissement du milieu en azote ammoniacal limitant la croissance.

Les écarts entre les BMP mesurés en Nitrobatch et mesurés par la « méthode BMP » sont représentés figure 20 de même que les écarts entre ANMP mesuré en Nitrobatch et mesuré par la « méthode ANMP ». Les résultats montrent que les productions de méthane et d'ammonium obtenues par le protocole Nitrobatch sont similaires à celles obtenues par les « méthodes BMP et ANMP ». Le BMP est atteint avec une erreur de -1% en moyenne et l'ANMP est atteint avec en moyenne -2%. Les écarts maximum retrouvés sont égaux à -10% et 7% pour le BMP ainsi -14% et 14% pour l'ANMP. Il convient d'ajouter que les temps d'incubation ont augmenté, passant de 40 jours à 50 jours en raison de l'augmentation du ratio substrat/inoculum qui a ralenti les cinétiques de biodégradation.

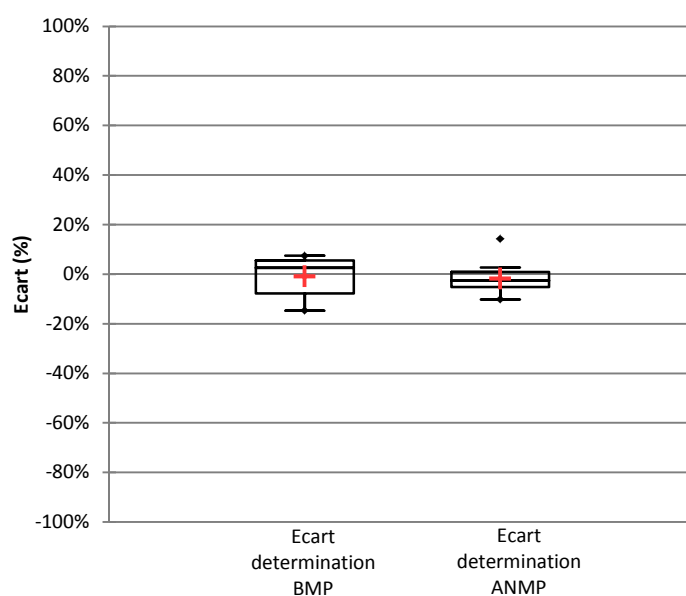


Figure 20: Ecarts de valeurs observés avec la méthode Nitrobatch sur la mesure du BMP et de l'ANMP.

De par l'obtention des taux de minéralisation maximum, l'absence d'inhibition et la non-limitation de la croissance bactérienne par l'azote, la méthode est validée sur des substrats n'immobilisant pas plus d'azote que celui apporté par l'inoculum.

3.4.2. Amélioration du signal carbone et azote des fractions

La méthode Monte Carlo a été appliquée, selon les préconisations du GUM (Hennebelle and Coorevits, 2013), sur un essai en triplicat de digestion de fumier de volaille par la méthode Nitrobatch. Les incertitudes de mesure sur les fractions de l'azote organique selon les fractionnements Van Soest et EPS ont pu être déterminées. Les fractions de l'azote organique selon le fractionnement Van Soest et EPS déterminées pour le mélange initial ainsi que les incertitudes de mesure associées sont présentées figure 21. La part de l'azote organique issu du fumier de volaille dans chaque fraction est aussi reportée.

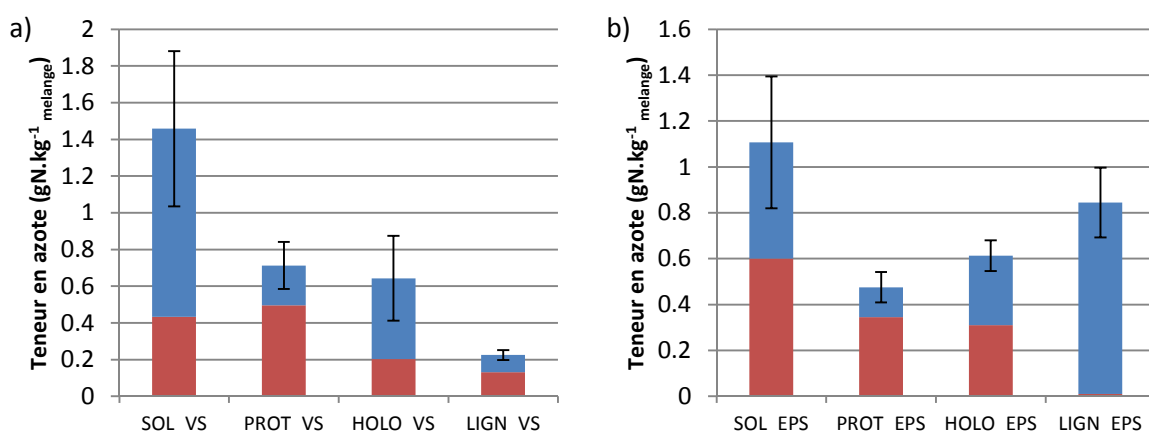


Figure 21: Part de l'azote organique issue du fumier de volaille (bleu) ainsi que la part d'azote organique issue de l'inoculum dans le mélange (rouge) selon le fractionnement Van Soest (a) et le fractionnement EPS (b). Les incertitudes de mesures sont déterminées sur la fraction du mélange soit l'addition de contributions azotées du substrat et de l'inoculum.

Les incertitudes de mesure sont de 29%, 18%, 36%, et 12% sur les fractions SOL_VS, PROT_VS, HOLO_VS et LIGN_VS (figure 21a). Ces incertitudes sont de 26%, 14%, 11% et 18% pour les fractions SOL_EPS, PROT_EPS, HOLO_EPS et LIGN_EPS (figure 21b). Les résultats montrent que les incertitudes de mesures sur les fractions sont inférieures à la part de l'azote organique issu du fumier de volaille. Par conséquent, la part de l'azote organique issu du fumier de volaille est bien significative par rapport à l'incertitude de mesure ce qui rend possible le suivi de sa biodégradation.

Cependant, le niveau de ces incertitudes nécessite de travailler sur un suivi des mélange substrat/inoculum et pas sur les substrats spécifiquement. En effet, dans un tel cas, les incertitudes seraient trop importantes du fait des cumuls de celles mesurées sur le mélange et le témoin (inoculum seul).

3.5. Bilan

L'objectif du développement de ce pilote de digestion anaérobie était de pouvoir suivre de manière optimale l'évolution des fractions biochimiques de l'azote organique. Les résultats ont montré qu'aucune inhibition irréversible n'a été observée et que les potentiels de minéralisation de l'azote organique ainsi que les potentiels biométhanogènes étaient bien atteints. La teneur en azote organique des fractions biochimiques à l'état initial et final a permis d'évaluer le gain en terme de signal azoté lié au substrat. Ces résultats ont permis de valider la méthode dans le cadre du suivi de l'évolution de l'azote organique en digestion anaérobie. Cependant, ces conditions sont très éloignées de celle retrouvées sur un dispositif industriel de digestion anaérobie. Par conséquent, un pilote de type semi industriel a été construit afin de :

- valider les observations effectuées en batch en terme de processus de transformation
- déterminer des cinétiques de dégradation des différentes fractions d'azote représentatives de celles observées à une échelle industrielle.

4. Pilote semi-industriel de digestion anaérobie : Nitrominator.

Les installations de méthanisation à la ferme sont des réacteurs alimentés de manière semi-continue avec un cocktail de substrats pouvant varier d'une installation à une autre. Les cocktails d'intrants et le dimensionnement du réacteur impactent la production de méthane et la qualité du digestat (Massé et al., 2007). La mise en place d'un pilote semi-industriel de méthanisation a été effectuée. Le bilan de fonctionnement des digesteurs composant ce pilote sera présenté dans cette partie. L'objectif est d'utiliser ces digesteurs afin d'évaluer l'impact des cocktails d'intrants et du temps de séjours sur la production de méthane, d'ammonium et la bioaccessibilité de l'azote et du carbone organique du digestat. Pour cela, la stabilité des réacteurs en termes de production de méthane et d'ammonium ainsi qu'en termes de composition du digestat sera évaluée. Ensuite, les incertitudes de mesure sur le fractionnement EPS seront mesurées afin de déterminer la significativité d'un suivi cinétique de l'évolution des fractions EPS sur ce type de pilote.

4.1. Description des pilotes

Le pilote Nitrominator est composé de trois cuves (I1, I2 et I3) de 150 L total munies d'une agitation mécanique pour assurer l'homogénéité dans le réacteur. L'alimentation avec le cocktail de substrats s'effectue manuellement par une trémie d'alimentation située au-dessus de la cuve. Le biogaz issu de la transformation du cocktail de substrat est évacué vers un compteur à biogaz. Des points de prélèvements pour le digestat sont situés à différents niveaux correspondant à 25 L, 50 L et 75 L de volume utile. Une autre vanne en bas de cuve permet une vidange totale du réacteur. Les cuves sont munies de doubles parois pour la régulation thermique (figure 22).

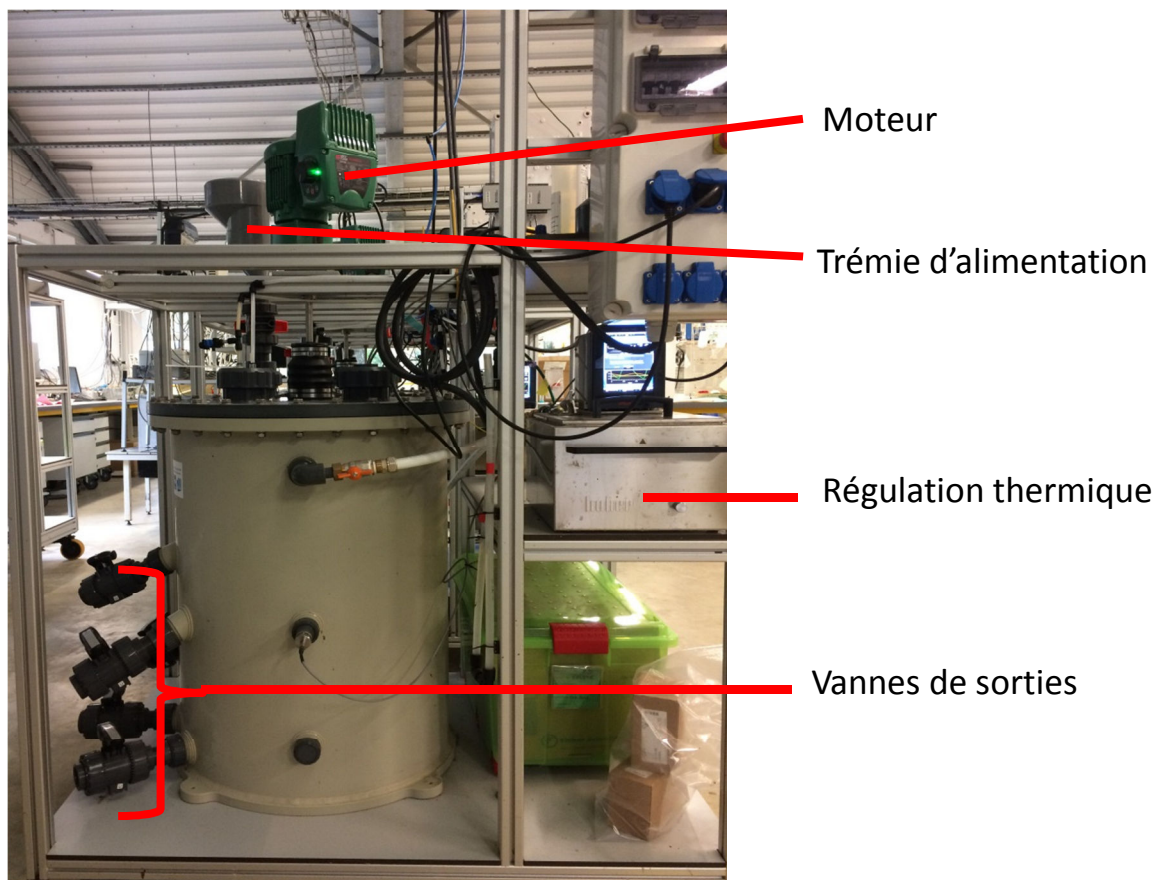
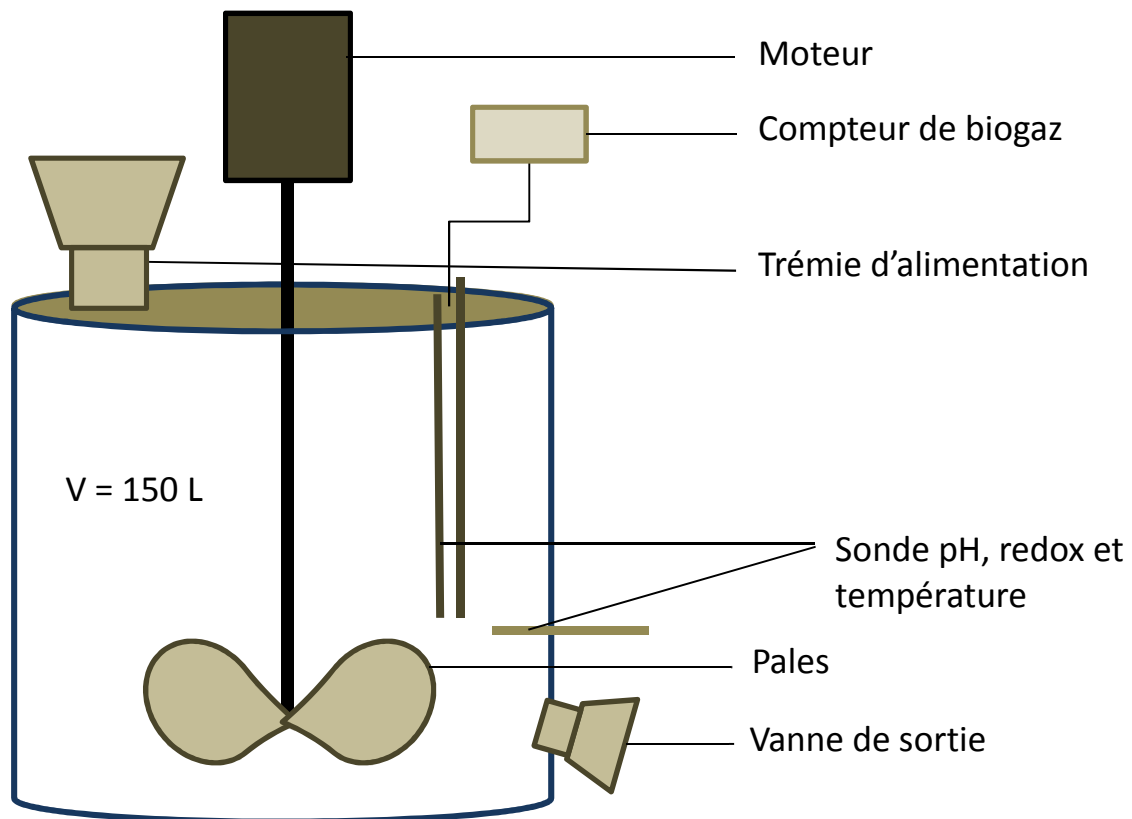


Figure 22: Schéma et photo d'un réacteur de digestion anaérobie du pilote Nitrominator

Plusieurs capteurs sont intégrés au pilote afin d'acquérir en ligne plusieurs paramètres. Dans chaque cuve, une sonde pH, une sonde redox ainsi qu'une sonde de température sont immergées dans le mélange réactionnel. L'acquisition de ces données ainsi que de la production de biogaz issue du compteur à gaz est effectuée par un programme LabVIEW. L'acquisition du pH permet de vérifier que le pH n'atteint pas des niveaux inhibiteurs. Le potentiel oxydo-réducteur permet de s'assurer qu'aucune infiltration importante d'oxygène n'a lieu pendant la durée de la digestion (conditions anaérobies maintenues avec un potentiel redox avoisinant les -500 mV). Le suivi de température, couplé à la régulation thermique, permet de maintenir les réacteurs dans des conditions mésophiles (37°C).

4.2. Intrants utilisés

Trois intrants (I1, I2 et I3) ont été constitués sur lesquels les suivis de biodégradation ont été effectués. Ces intrants ont une base commune constituée de lisier porcin auquel a été ajouté un co-substrat. Les co-substrats sont du déchet d'aliment pour bétail, de l'ensilage de maïs et du fumier de génisses. Les caractéristiques des co-substrats et des intrants associés sont présentées tableau 9

Tableau 9: Caractéristiques des substrats constituant les intrants.

Echantillons	MS (g _{MS} .kg ⁻¹)	MV (g _{MV} .kg ⁻¹)	TOC (gC.kg ⁻¹)	TKN (gN.kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (gN.kg ⁻¹)	C/N (gC/gN)	BMP (NmL.kg ⁻¹)	ANMP (gN.kg ⁻¹)
Déchets d'aliment pour bétail (AB)	800.9	751.9	365.1	21.6	0.8	16.9	300.4	15.5
Ensilage de maïs (EM)	298.8	289.8	123.7	3.2	0.3	39.1	118.5	-0.2
Fumier de génisse (FG)	189.2	155.0	65.8	4.0	0.7	16.6	36.1	1.0
Lisier porcin (LP)	9.1	4.3	2.6	1.8	1.5	1.5	0.4	0.2
I1 (AB + LP)	70.0	61.8	28.7	3.4	1.6	8.4	23.5	1.4
I2 (EM + LP)	67.1	61.4	30.8	2.3	1.3	13.2	24.0	0.1
I3 (FG + LP)	78.4	62.2	34.7	3.2	1.1	10.7	14.1	0.5

Les mélanges co-substrats/lisier ont été homogénéisés par mixage à l'aide d'un mixer plongeant Robocoupe MP-450 (Robocoupe®). Les concentrations en masses sèches, masses volatiles, azote total et azote ammoniacal des intrants ainsi que de leurs digestats respectifs ont été mesurées selon les méthodes standards. Le carbone total et l'azote total ont été mesurés par analyse élémentaire selon les spécifications du constructeur. Le carbone organique a été déterminé en soustrayant le carbone

inorganique, mesuré sur les cendres obtenues à 480°C, au carbone total. Le fractionnement EPS décrit section 3.1.3 a été appliqué aux intrants et aux digestats pour caractériser leur bioaccessibilité.

4.3. Conditions opératoires

Deux conditions opératoires faisant varier le temps de séjour hydraulique ont été testées sur les pilotes. Ces conditions opératoires sont présentées dans le tableau 10. Les deux temps de séjours testés sont à 28 jours et 48 jours avec des charges différentes mais un ratio co-substrat/lisier constant. Un apport est effectué toutes les semaines, de 26 kg à TSH 28 jours et de 13 kg à TSH 48 jours. La stabilisation des réacteurs a été évaluée sur le plus long temps de séjour soit 48 jours. Les réacteurs sont considérés comme stabilisés après 3 temps de séjours hydrauliques de fonctionnement au régime permanent. Les résultats présentés dans l'exploitation seront ceux effectués à un temps de séjour de 48 jours.

Tableau 10 : Conditions opératoires expérimentées.

Temps de séjour (j)	Charge organique (kgMV.m ⁻³ .j ⁻¹)	Température (°C)	Volume réactionnel (m ³)	Débit (kg.semaine ⁻¹)
28	2.3	38	0.100	26
48	1.3	38	0.088	13

4.4. Détermination des incertitudes de mesure.

L'incertitude de mesure sur la concentration en ammonium a été déterminée par le calcul de l'écart-type des mesures effectuées en triplicat. L'incertitude de mesure de la production de méthane a été déterminée en calculant l'écart-type des relevés de biogaz et la qualité du biogaz à chaque cycle d'alimentation. Enfin, les incertitudes de mesure des teneurs en azote de la fraction EPS ont été effectuées selon la méthode Monte Carlo comme décrite dans le GUM. Les incertitudes ont été mesurées sur les digestats sur sept cycles d'alimentation.

4.5. Résultats

4.5.1. Stabilisation des réacteurs

Le suivi de la production de méthane et d'ammonium a été effectué sur une période de 48 jours, consécutive à trois temps de séjours de stabilisation. Les résultats de ces suivis sont présentés figure 23.

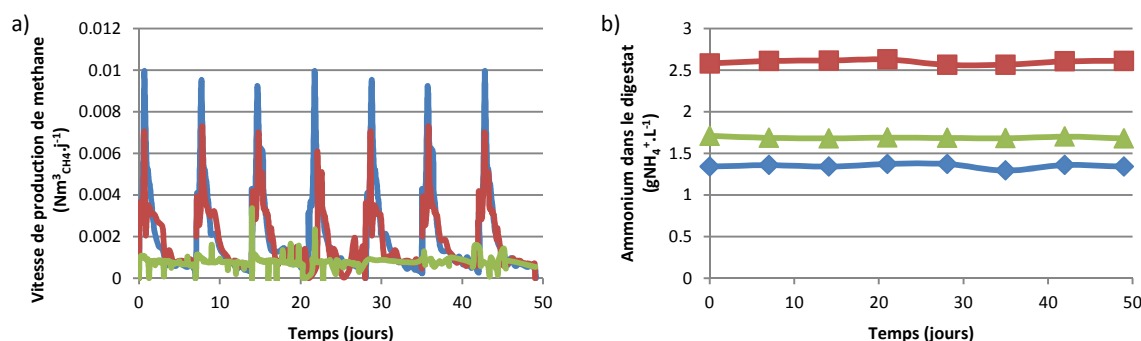


Figure 23 : Evolution de la vitesse de production de méthane (a) et de la concentration en ammonium (b) du digestat pendant 48 jours sur les trois pilotes.

Les productions de méthane et d'ammonium sont les résultantes de la transformation des composés carbonés et azotés de l'intrant. Les résultats montrent que les biodégradations du carbone et de l'azote sont stables avec une production de méthane journalière moyenne de 2.8, 2.9 et 1.2 Nm³ CH₄.kgMV⁻¹.j⁻¹ et une production d'ammonium journalière de 105.2, -0.2 et 52.2 gNH₄⁺.kgMV⁻¹.j⁻¹ pour respectivement l'intrant I1, I2 et I3. Cette stabilisation a aussi été obtenue au temps de séjour 28 jours avec des différences significatives de productions journalières de méthane et d'ammonium (2.7, 2.8 et 1.2 Nm³ CH₄.kgMV⁻¹.j⁻¹ et 127.2, 8.9 et 56.6 gNH₄⁺.kgMV⁻¹.j⁻¹ pour respectivement I1, I2 et I3). Les coefficients de variation sur les mesures étaient tous inférieurs à 5%.

La stabilité du procédé a aussi été observée sur la qualité des digestats. En effet, les teneurs en carbone et azote moyennes des fractions EPS, présentées figure 24, ont montré une stabilité suite à la période de stabilisation de trois fois le temps de séjour.

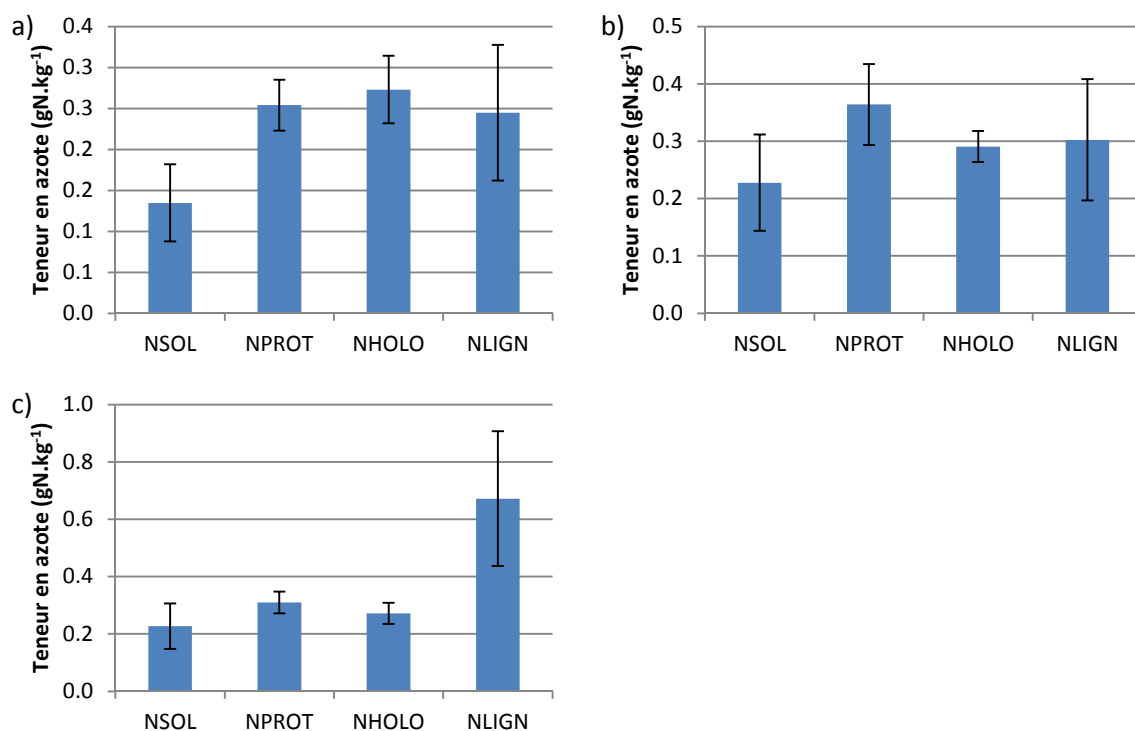


Figure 24: Stabilité des teneurs en azote des fractions EPS des digestats au temps de séjour 48 jours sur les réacteurs I1 (a), I2 (b) et I3 (c).

4.5.2. Significativité de la part de l'intrant pour la détermination des cinétiques de transformation de l'azote organique.

Les essais en réacteur à alimentation semi-continu montrent des ratios co-substrat/inoculum variant entre 0.25 et 0.84 gMV.gMV⁻¹ soit largement inférieurs aux méthodes développées précédemment. De plus, la concentration d'azote ammoniacal issu du digestat représente de 45 à 66% de l'azote total du mélange initial intrant + digestat. Dans ces conditions, les variations seront plus difficiles à visualiser en conditions d'alimentation normale comme en témoigne la figure 24. En effet, la part de l'azote organique issue du co-substrat représente de 3 à 32% de l'azote organique en fonction de la fraction.

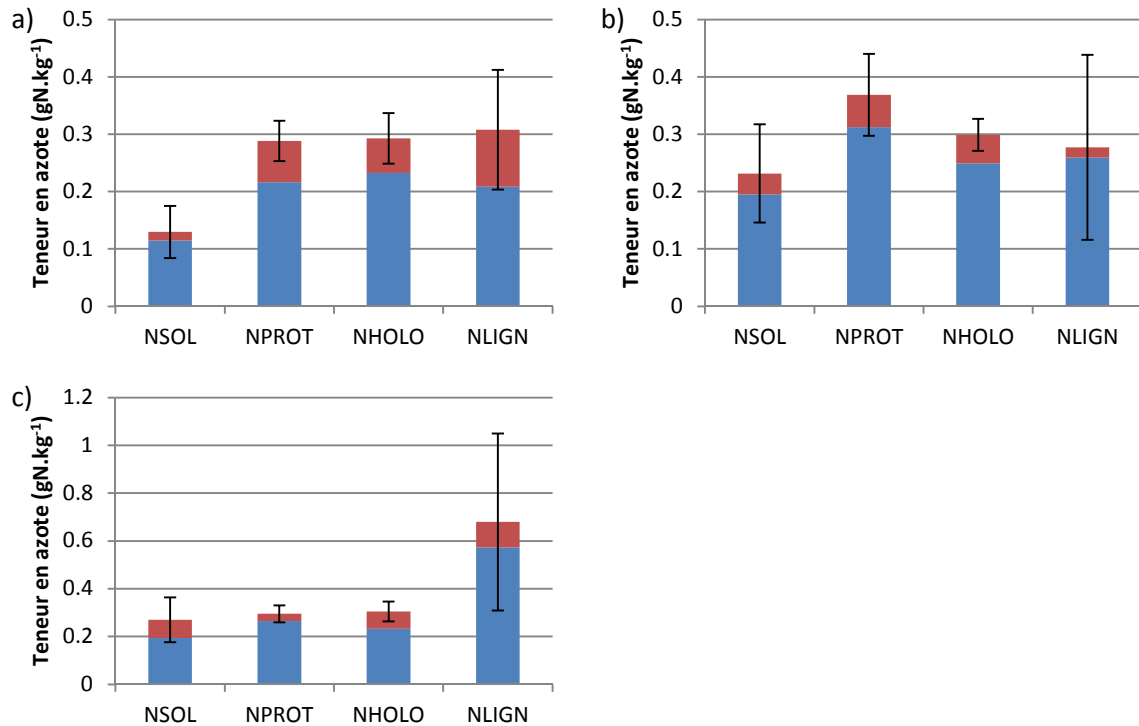


Figure 25: Répartition de l'azote selon le fractionnement EPS dans le mélange initial de l'intrant avec le digestat avec une simple alimentation pour les essais avec les intrants I1 (a), I2 (b) et I3 (c). La part de l'azote apporté par l'intrant est représentée en rouge et celle du digestat en bleu.

Les incertitudes de mesure déterminées sur le mélange sont largement au-dessus de la part d'azote organique moyenne apportée par le substrat. En effet, seules les fractions PROT de l'intrant I1 et les fractions HOLO sur tous les intrants sont significatives par rapport à l'incertitude de mesure. Par conséquent, le suivi cinétique sur ces fractions sera difficilement exploitable par la biodégradation des fractions azotées issues du substrat.

Afin de pallier ce manque de significativité de l'intrant par rapport à l'incertitude de mesure de la teneur en azote des fractions du mélange, un pulse d'alimentation plus important a été effectué. En effet, l'alimentation des réacteurs est passée de 13 kg par alimentation à 26 kg d'intrant par alimentation, tout en respectant le temps de séjour de 48 jours. Cette discontinuité de fonctionnement n'a pas affecté le bon fonctionnement des digesteurs. Le pH durant ces discontinuités était compris entre 7 - 7.8 et les productions de méthane, ammonium ainsi que la répartition de l'azote dans les fractions EPS étaient similaires aux résultats obtenus précédemment. L'effet de cette double alimentation sur la part de l'azote issu de l'intrant est présenté figure 26.

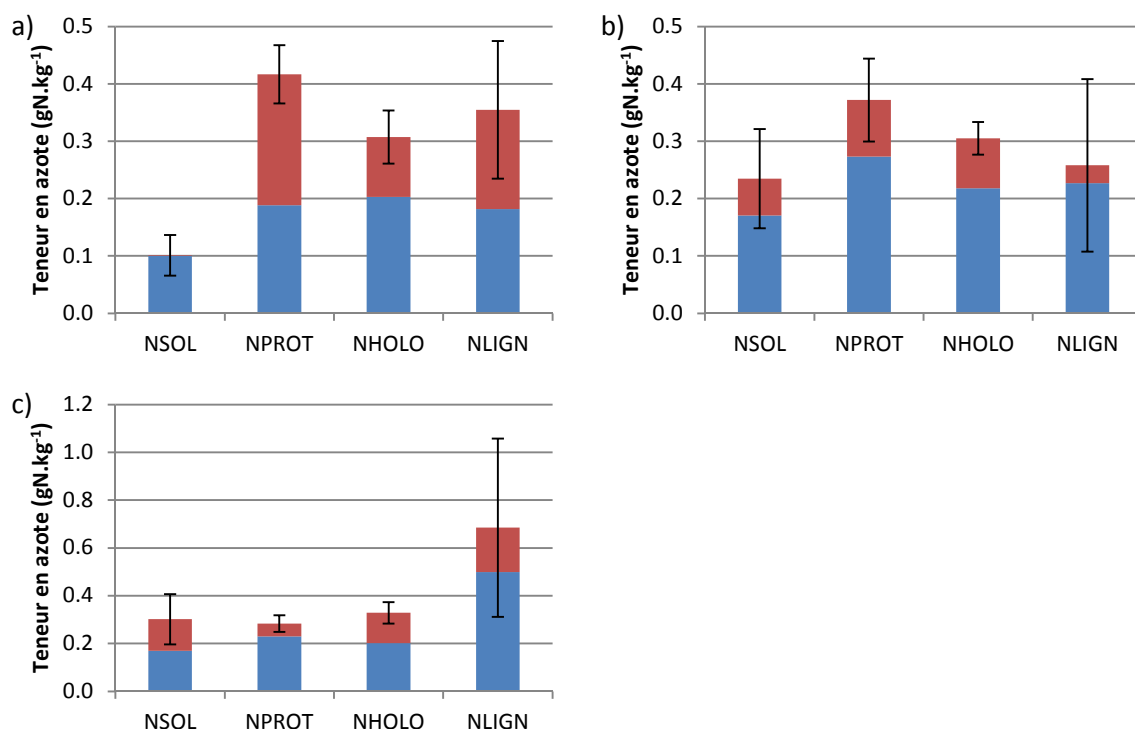


Figure 26: Répartition de l'azote selon le fractionnement EPS dans le mélange initial de l'intrant avec le digestat avec une double alimentation pour les essais avec les intrants I1 (a), I2 (b) et I3 (c). La part de l'azote apporté par l'intrant est représentée en rouge et celle du digestat en bleu.

La double alimentation a pour effet immédiat d'augmenter la part d'azote organique issu de l'intrant dans les fractions du mélange initial intrant/digestat. Ces augmentations permettent à la part de l'azote organique du substrat de devenir significative. En effet, les fractions PROT issues des intrants deviennent significatives pour les trois intrants, représentant 55%, 27% et 19% pour respectivement I1, I2 et I3. La fraction HOLO issue des intrants dans le mélange reste significative et augmente par rapport aux résultats obtenus avec une simple alimentation. Cette augmentation permet à l'azote organique issu des intrants de représenter 34%, 29% et 38% de la fraction HOLO du mélange pour I1, I2 et I3 au lieu de 21%, 17% et 24%. Sur les fractions SOL et LIGN, le doublement de l'alimentation profite seulement à l'intrant I3 pour la fraction SOL ainsi qu'à l'intrant I1 pour la fraction LIGN. Cela permet augmentation de la part de l'azote organique de ces intrants dans ces fractions de respectivement 44% (pour I3 dans SOL) et 49% (pour I1 dans LIGN).

Avec la mise en place de la double alimentation, le suivi cinétique est amélioré : il permet de voir des variations issues de la biodégradation de l'intrant plus significatives. Cependant, au vu de

l'impossibilité d'observer des variations significatives de l'azote organique des fractions SOL et LIGN, le suivi des cinétiques se fera sur les mélanges intrant/digestats afin de pouvoir visualiser plus de variations significatives. Ces variations significatives observées seront à relativiser avec la contribution non négligeable du digestat dans la cinétique de biodégradation.

4.6. Bilan

L'objectif de l'utilisation de ce pilote Nitrominator est de pouvoir évaluer l'impact des cocktails d'intrants et du temps de séjour en conditions réelles. De plus, l'intérêt de ce pilote est de pouvoir effectuer les suivis cinétiques de production de méthane et d'ammonium ainsi que de la biodégradation des fractions selon leur bioaccessibilité. Les résultats ont pu montrer la stabilité du procédé aux temps de séjours 28 et 48 jours pour les trois cocktails d'intrants. La concentration d'azote ammoniacal étant élevée dans le digestat, les teneurs en azote organique des fractions ont été très faibles et la part de l'azote organique issue des intrants a été difficile à discerner de l'incertitude de mesure. Ainsi, l'intérêt et la validité de la mise en place d'une double alimentation pour le suivi cinétique des transformations de l'azote organique et des modifications de sa bioaccessibilité a permis d'améliorer la significativité des variations potentiellement observables.

5. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de présenter et évaluer les performances des différents dispositifs développés pour le suivi de l'azote organique issue des substrats sur les dispositifs ANMP, Nitrobatch et Nitrominator. En particulier les dispositifs en batch (ANMP et Nitrobatch) ont montré leur capacité à déterminer le BMP et parallèlement le potentiel de minéralisation de l'azote organique. De plus, aucune inhibition irréversible n'a eu lieu durant les essais sur ces deux dispositifs. La double alimentation, après la période de stabilisation, sur le dispositif Nitrominator n'a pas non plus montré d'inhibition. Cette double alimentation a permis d'augmenter la part d'azote organique issue du substrat dans le digestat et de mieux visualiser sa répartition dans les fractions EPS. Ces résultats permettent de valider l'utilisation de ces dispositifs en considérant les incertitudes quantifiées dans ce chapitre. Le suivi de la bioaccessibilité et la détermination des potentiels de minéralisation de l'azote organique ont donc été améliorés en augmentant la significativité du signal « substrat » par rapport à celui de l'inoculum par augmentation du ratio substrat/inoculum.

Chapitre 3 : Caractérisation et prédiction de la biodégradabilité de l'azote organique

Avant-propos

Très peu investiguées, la bioaccessibilité et la biodegradabilité de l'azote organique sont des paramètres importants pour estimer la qualité azotée des digestats. Dans ce chapitre propose donc en premier lieu d'investiguer la variabilité de la biodégradabilité de l'azote. Par la suite, son lien avec avec deux autres critères sera étudié :

- la biodégradabilité du carbone organique
- la bioaccessibilité de l'azote organique

Pour ce faire, une analyse statistique sera menée afin de déterminer dans quelle mesure la biodégradabilité de l'azote organique peut être prédite sans incubations longues et coûteuses, à l'aide de modèles statistiques.

Ces résultats ont été valorisés sous forme de présentation orale lors des journées recherche innovation (JRI2017) de Beauvais, France, lors de la 17ème conférence internationale RAMIRAN à Wexford, Irlande et sous forme de poster au 4ème séminaire du réseau « Matières organiques » à Trégastel, France. Ces travaux ont aussi fait l'objet d'un article publié dans la revue Bioressource Technology présenté ci-après.

Characterization and prediction of organic nitrogen biodegradability during anaerobic digestion: a bioaccessibility approach.

Y. Bareha^{1,2,3}, R. Girault^{1,3}, J. Jimenez⁴ and A. Trémier^{1,3}

¹ Irstea, UR OPAALE, 17 av. de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France

(E-mail : romain.girault@irstea.fr)

² Université Rennes 1, 2 rue du Thabor, CS 46510, 35065 Rennes Cedex, France

³ Université Bretagne Loire, France

⁴ INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, F-11100 Narbonne, France

Abstract

Prediction of organic nitrogen mineralization into ammonium during anaerobic digestion is required for optimizing substitution of mineral fertilizer by digestates. The aim of this study was to understand organic nitrogen biodegradability and to investigate how it can be predicted from carbon biodegradability, and nitrogen bioaccessibility, respectively. Bioaccessibility was assessed using fractionation methods based on sequential extractions. Results showed that organic nitrogen was present in fractions whose bioaccessibility levels differed. Organic nitrogen and carbon biodegradability were also determined and compared. Results highlighted two groups of substrates: the first with an initial $\text{NH}_4^+/\text{TKN} < 30\%$, whose carbon and nitrogen biodegradability are similar; the second with an initial $\text{NH}_4^+/\text{TKN} > 30\%$, whose carbon and nitrogen biodegradability differ significantly. To enable prediction on all substrates, partial least square (PLS) regressions were carried out to link organic nitrogen bioaccessibility indicators to biodegradability. The models successfully predicted organic nitrogen biodegradability with a maximum prediction error of 10%.

Keywords : anaerobic digestion, nitrogen, ammonium, biodegradability, bioaccessibility

1. Introduction

Anaerobic digestion is currently attracting considerable interest for the management of agricultural waste. The main objectives are reducing greenhouse gas emissions, procuring additional income for farmers and autonomy regarding nutrients. But the expansion of anaerobic digestion plants creates new challenges concerning the management of the digestate. Indeed, residues from anaerobic digestion are rich in nutrients, particularly in nitrogen and are therefore of agronomic interest for their value as fertilizer and amendment (Alburquerque et al., 2012; Tambone et al., 2009). Digestates from agricultural plants are mostly spread on fields after storage or post-processing (phase separation, composting, etc.) with the aim of replacing mineral fertilizers. Indeed, anaerobic digestion results in the mineralization of part of the organic nitrogen into ammonium (Möller and Müller, 2012), enabling short term uptake of nitrogen by crops combined with long term mineralization of slowly biodegradable organic compounds (Fouda et al., 2013) in the soil. However, the digestate management chain is subject to nitrogen leakages in the form of ammonia emissions during storage (Sommer, 1997) and after spreading on the land, or through nitrate leaching (Möller, 2015). In addition to their environmental impacts, nitrogen losses after digestion reduce the fertilizing value of the digestates and negatively impact the goal of replacing mineral fertilizers. Hence, to mitigate environmental impacts and to optimize nitrogen uptake by crops, the anaerobic digestion process has to be designed taking the characteristics of the digestate into account, i.e. ammonia content and organic nitrogen content, together with short or long-term mineralization kinetics in soils. To this end, a detailed understanding of the nitrogen composition of digestates and anaerobic biodegradability of the organic nitrogen in the substrates is required.

Nitrogen is present in substrates in two main forms: mineralized (e.g. ammonium, nitrates, etc.) and organic. Anaerobic digestion results in the degradation of part of the organic nitrogen into ammonium, a reduced form (González-Fernández and García-Encina, 2009). In the substrates, the organic nitrogen is mainly contained in proteins and requires hydrolysis to be converted into monomers. In most cases, the amino acids that result from this transformation are then metabolized through acidogenesis to

produce volatile fatty acids and ammonium via Stickland or single amino acid fermentation (Ramsay and Pullammanappallil, 2001). However, some authors studied organic nitrogen biodegradation and showed that degradation of the organic nitrogen was not complete during anaerobic digestion, but rather ranged from 18% to 77% depending on the substrate and the hydraulic retention time (HRT), as reported in the different studies (Kobayashi et al., 2012, 2014; Massé et al., 2007; Yang et al., 2015). These results highlight the fact that protein biodegradation is strongly constrained by the bioaccessibility of organic nitrogen.

Accessible organic matter refers to the compounds in the substrate that microorganisms can access for intra or extra-cellular degradation. A number of bioaccessibility indicators have been developed using chemical extraction or particle size distribution (Dulekgurgen et al., 2006; Karahan et al., 2008) to fractionate organic matter according to its degree of bioaccessibility. Better characterization of the bioaccessibility of organic nitrogen in substrates will enable a better understanding of the variability of its anaerobic biodegradability. Methods using successive chemical extractions such as the Van Soest method, or more advanced methods can be used for this purpose.

The Van Soest fractionation method (Van Soest, 1963) is widely used to fractionate wastes including vegetables, sludges, and plants. It uses different solvents to extract soluble and lignocellulosic compounds. The acidity of the solvents is increased at each step by using hot water, neutral detergent, acid detergent and finally strong acid extraction. The different extraction steps target soluble, protein-like, hemicellulose-like and cellulose-like compounds, respectively. The residual organic matter is considered as lignin-like compounds. Many studies have explored the correlations between the Van Soest composition of organic matter and its biodegradability (Gunaseelan, 2007b; Liu et al., 2015; Mottet et al., 2010). Gunaseelan (2007) demonstrated an inverse relationship between the lignin+cellulose-like content and biodegradability of fruit and vegetables in anaerobic conditions. Despite these promising results, Mottet et al., (2010) pointed out that this fractionation method is too aggressive to be representative of biological disintegration that occurs during anaerobic digestion, which limits its use for the prediction of biodegradability. Jimenez et al., (2015) then developed a less

aggressive fractionation method based on the protocol of Muller et al., (2014) that targeted extracellular polymeric substances. This protocol, named EPS protocol, uses increasing alkaline solutions, and targets protein-like substances; it ends with strong acid extraction targeting holocellulosic-like products. This fractionation, combined with 3D-fluorescence to assess the complexity of each fraction, successfully predicted the bio-methanogenic potential (BMP) and carbon biodegradability of various substrates using partial least square (PLS) regressions (Jimenez et al., 2017). Hence, EPS fractionation combined with PLS regression enables the fast determination of the BMP value and carbon biodegradability by decreasing the time for analysis from 40-50 days (for a BMP) to 3 days (for EPS fractionation). However, all these studies focused on the biodegradability of volatile solids or carbon compounds. Consequently, no data are available concerning the ability of these accessibility indicators, determined from EPS or Van Soest fractionation, to predict organic nitrogen biodegradability during anaerobic digestion.

The aim of this study was thus (i) to investigate the biodegradability of organic nitrogen in mesophilic anaerobic codigestion and (ii) to develop predictive models using carbon biodegradability and organic nitrogen bioaccessibility as variables, respectively. To this end, we first investigated the bioaccessibility of organic nitrogen on various substrates and compared it with carbon bioaccessibility using two fractionation methods. Next we compared the anaerobic biodegradability of nitrogen and carbon on the same panel of substrates. Finally, we performed PLS regressions to identify possible correlations between organic nitrogen biodegradability and bioaccessibility indicators provided by the two fractionation methods to determine which fractionation method better describes organic nitrogen biodegradability.

2. Material and methods

2.1. Substrates

Twenty different substrates were collected in France as representative of the diversity of organic wastes used in agricultural anaerobic digestion plants. They included livestock wastes, wastes from agri-industry and municipalities and agriculture residues. Table 11 lists the substrates sampled and their characteristics. Substrate panel was selected to cover a large range of protein content and C/N ratio. Hence, protein content in this panel ranges from 12 to 67%_{org-C} and C/N ratio from 5.7 to 36.

Table 11 : Characterization of the panel of substrates.

Class	Sample	TS (g _{TS} .kg ⁻¹)	VS (g _{VS} .kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (gN .kg ⁻¹)	TKN (gN.kg ⁻¹)	TOC (gC.kg ⁻¹)	Proteins (% _{org-C})	C/N (gC/gN)
Crop residues	Faba beans	140.2	125.6	0	6.4	72.4	38%	11.3
	Vetch	174.5	158.6	0	8.4	86.5	42%	10.3
	Phacelia	216.6	197.7	0	2.8	49.9	24%	17.8
	Mustard	178.1	158.7	0	5.2	89.2	25%	17.3
	Oat	157.1	141.1	0	4.8	106.7	20%	22.2
	Rye	207.6	195.6	0	3.6	128.9	30%	35.8
	Barley	246.5	221.3	0	4.0	149.1	12%	36.8
	Corn silage	298.2	275.6	0.3	6.2	133.4	19%	21.4
	Grass silage	267.4	234.0	0.7	7.7	138.8	22%	18.0
	Oat silage	161.9	134.0	1.9	4.2	85.6	12%	20.5
Livestock manure	Cattle manure	133.7	103.8	1.3	4.3	71.0	18%	16.5
	Pig slurry	50.3	37.1	2.3	3.2	25.1	17%	7.7
	Cattle slurry	92.4	73.4	0.9	2.4	48.3	14%	19.7
	Poultry manure	328.1	252.2	5.5	13.8	148.4	24%	10.7
Wastes from agroindustry and municipalities	Screening refusal from slaughterhouse (SRS)	294.1	282.7	0.2	7.8	165.4	20%	21.1
	Grass clippings (GC)	261.4	213.3	0.4	8.1	112.0	30%	13.8
	Cattle feed waste (CF)	698.1	628.1	3.4	34.0	321.9	41%	9.4
	Kitchen Waste (KW)	259.1	206.2	0.1	11.5	139.7	36%	12.1
	Waste from yeast production (ELVI)	587.7	465.0	4.9	43.9	251.3	67%	5.7
	Supermarket vegetable waste (SVW)	107.4	95.7	0.7	2.7	62.6	14%	23.1

All the samples were ground in a knife mill (R15 V.V., Robotcoupe®) and stored at -20 °C. Samples for elemental analysis were ground in a ball mill (Dangoumill®, PROLABO®).

2.2. Physico-chemical characterization

Total solids (TS), volatile solids (VS), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and total ammonia nitrogen were measured using standard methods (APHA, 2005). TKN and ammonia concentrations were determined by distillation (TKN after mineralization). Total carbon and total nitrogen were measured in finely ground raw samples by elemental analysis according to the manufacturer's instructions (Thermoflash 2000, Thermoscientific®). Inorganic carbon in the raw samples was determined by calcination at 480 °C and elemental analysis of the ashes. Total organic carbon (TOC) was determined by subtracting inorganic carbon (IC) from total carbon (TC). Protein content in organic carbon was calculated using the following the equation (14):

$$\text{Protein} = ((\text{TKN} - \text{NH}_4^+) * \text{C}/\text{N}_{\text{protein}}) / \text{TOC} \quad (14)$$

Where:

- Protein: protein content (%_{org-C}).
- C/N_{protein}: carbon/nitrogen ratio equal to 3.72 gC.gN⁻¹ based on Ramsay and Pullammanappallil (2001).

2.3. Organic matter fractionation

The fractionation methods used in this study to characterize organic matter were based on sequential chemical extractions. The successive steps of the two fractionation methods, derived from EPS (Jimenez et al., 2015) and Van Soest (Van Soest, 1963), are described below. Four fractions were extracted with each method and presented similarities in terms of molecules targeted by the extracting solvents as presented in table 12, which made it possible to compare the two methods. Uncertainty on fractionation results was estimated for each extraction method using a Monte Carlo method in order to take error propagation into account.

Table 12 : Fractions and extractions steps for modified Van Soest and EPS methods.

Fraction name	Modified Van Soest (VS) method	Modified EPS method	Main molecules targeted*
SOL	Water extraction	CaCl ₂ extraction	Soluble proteins, sugars, aminoacid
PROT	Neutral Detergent extraction (NDF)	NaOH, NaCl 10mM + NaOH 0.1M extractions	Proteins, Exopolymers (EPS), nucleic acids, lipids.
HOLO	Acid detergent (ADF) + H ₂ SO ₄ 72% extraction	H ₂ SO ₄ 72% extraction	Holocellulose
LIGN	Non extractible	Non extractible	Lignin

* In addition to targeted molecules, other compounds are also liberated by accessibility modification.

** If N prefix is added prior to the fraction name, organic nitrogen content in the fraction is considered, otherwise, organic carbon content is considered.

2.3.1. Modified Van Soest fractionation

The modified Van Soest fractionation is based on successive extractions with neutral and acid detergents and ending with a strong acid extraction. Organic matter was separated into four fractions:

- SOL_VS: This fraction is extracted in water at a temperature of 20 °C for 1 h. The extraction temperature is different from that described in the extraction protocol for the French standard XPU 44-162 (AFNOR) where extraction is performed at 100 °C.
- PROT_VS : This fraction is extracted with boiling commercial neutral detergent (NDF: 1.86% disodium ethylene diamine tetraacetate, 3% aqueous solution of sodium dodecyl sulfate, 0.68% decahydrate sodium tetraborate, 0.45% disodium hydrogen phosphate and 1.0% triethylene glycol; Carlo Erba®) for 1 h from the pellet obtained after the SOL_VS step.
- HOLO_VS: This fraction results from the two successive extractions of the Van Soest protocol: (1) extraction with boiling commercial acid detergent ADF (2.6% sulfuric acid and 2.0% cetrimonium bromide; Carlo Erba®) for 1 h, followed by (2) extraction with 72% sulfuric acid (w/w) at ambient temperature for 3 h. This step used the pellet remaining from the PROT_VS step.
- LIGN_VS: This fraction contained the remaining materials not extracted during the previous extractions.

After the first extraction, the mix was centrifuged at 12100 g for 20 minutes. The supernatant containing the soluble fraction of organic matter was removed and the remaining pellet was then dried at 40°C and then ground to 1 mm. Detergent and strong acid extraction (PROT_VS and HOLO_VS steps) were performed on 1 gram of the dried-ground sample sealed in filter bags (F57 Filter Bags, Ankom Technologies®). Detergent and acid extractions were performed using an automated fiber analyzer (Ankom 2000, Ankom Technologies®). After each extraction step, the content of one bag was used to analyze total organic carbon and total remaining nitrogen using an elemental analyzer (ThermoFlash 2000, ThermoScientific®). The organic carbon and nitrogen content in each fraction were determined by the difference between the organic carbon and nitrogen content in the filter bags before and after each extraction.

2.3.2. Modified “EPS” fractionation

EPS fractionation (Jimenez et al., 2015) is based on successive alkaline extractions ending with strong acid extraction. This fractionation method is similar to the Van Soest method including the use of strong acid extraction at the end. Sequential extractions were performed on raw samples (0.5 gram of dry matter) using the method described by Jimenez et al. (2017). This method separates the organic matter into four fractions:

- SOL_EPS: The first step of the protocol consists of two successive extractions of the sample with 30 mL of a saline solution of CaCl_2 10mM at 30 °C under stirring (300 rpm) for one hour.
- PROT_EPS: The pellet remaining from the first step is washed four times with 30 mL of a basic solution of NaOH 10mM + NaCl 10mM at 30 °C and under stirring (300 rpm) for 15 minutes. The remaining pellet is washed four times with 30 mL of a strong basic solution of NaOH 0.1M at 30 °C and under stirring (300 rpm), for one hour.
- HOLO_EPS: The pellet remaining from the previous step is washed three times with 25 ml of a strong acid solution of H_2SO_4 72% (w/w) at 30 °C under stirring at 300 rpm for three hours.

This step is equivalent to the final extractions carried out in Van Soest protocol used to extract holocellulose materials,

- LIGN_EPS: This fraction contains the most recalcitrant material and is calculated by subtracting the total mass extracted from the original mass of the sample.

The organic carbon and total nitrogen content in each fraction (except LIGN_EPS fraction) were measured in the extracts using a TOC-L analyzer (Shimadzu®) and by carbon and nitrogen balance for LIGN_EPS fraction between the raw sample and the sum of the extractible fractions. All extractions and measurements on extracts were performed in triplicate.

2.4. Organic carbon and nitrogen biodegradability

Anaerobic biodegradability of organic carbon and nitrogen were analyzed on each substrate studied. The substrate was prepared in the same way as the one used before the extraction protocol (described in section 2.1). The inoculum used for both experiments was obtained from a continuous mesophilic anaerobic digester that is used to process pig slurry and horse feed. Carbon biodegradability was assessed in processing biochemical methanogenic potential (BMP) experiments according to Vedrenne et al., (2008). These batch biodegradability experiments were performed in triplicate with an inoculum:substrate ratio of 1 gVS.gVS⁻¹ and were incubated at 38 °C for 40 days. TC and biogas production were used to determine carbon mass balance continuity during the monitoring. Whatever the test, mass balance error is between -8 and 10%.

ANMP (Apparent nitrogen mineralized potential) tests were carried out to determine the maximum apparent organic nitrogen mineralized during anaerobic digestion. This method allows the determination of the organic nitrogen part of the substrate converted into soluble ammonium which is the result of organic nitrogen mineralization from substrate, biomass growth and biomass decay. The experimental conditions were similar to the BMP experiments and the ammonium concentration was monitored during the test. However, the inoculum used for ANMP tests was previously centrifuged at 12100 g for 20 minutes at ambient temperature and the supernatant was removed in order to reduce the initial ammonium concentration in the batch reactors. The remaining pellet was suspended in a

KHCO_3 10 g.L⁻¹ + NaHCO_3 10 g.L⁻¹ solution to preserve sufficient buffering capacity in the batch and to prevent inhibitions due to acidification during incubation. A blank experiment was performed without the addition of substrate to assess the apparent organic nitrogen mineralization due to the inoculum. The AMNP of each substrate was determined by difference between apparent mineralization in the batch experiment with a substrate and the control experiment, as described by equation (15).

$$AMNP = \frac{NH_4^+_{\text{substrate}} - NH_4^+_{\text{blank}}}{TS_{\text{substrate}}} - NH_4^+_{\text{Initial substrate}} \quad (15)$$

Where:

- AMNP : Apparent Nitrogen Mineralized Potential of the substrate (gN-NH₄⁺.kgTS_{substrate}⁻¹)
- $NH_4^+_{\text{substrate}}$: total mass of ammonium into the batch experiment with substrate after incubation (gN-NH₄⁺)
- $NH_4^+_{\text{blank}}$: total mass of ammonium into the blank batch experiment without substrate after incubation (gN-NH₄⁺)
- $MV_{\text{substrate-added}}$: total mass of the volatile matter of the substrate added to the batch experiment (kgTS_{substrate})
- $NH_4^+_{\text{Initial substrate}}$: Ammonium concentration in the substrate before incubation (gN-NH₄⁺.kgTS_{substrate}⁻¹).

Ammonium and TKN contents were measured before and after each incubation test using the distillation method to check nitrogen mass balance. The ammonium distillation method is aggressive enough to solubilize ammonium precipitates such as struvite and these ammonium forms are included in total ammonium. Hence, ANMP value considers organic nitrogen mineralization into ammonium which can be soluble or precipitated in the digestate. Whatever the test, difference between initial and final total nitrogen content is between -4% and 5%.

ANMP is an apparent mineralization potential which considers organic nitrogen from substrate mineralization and ammonium immobilization for biomass growth. To quantify the impact of

ammonium immobilization for biomass growth on ANMP value, a control batch experiment was performed following the ANMP protocol with a volatile fatty acid solution as substrate. This experiment highlights an immobilization rate of $0.006 \text{ gN-NH}_4^+_{\text{immobilized}} \cdot \text{gC}_{\text{degraded}}^{-1}$. This value is lower than the references found in the literature that range from 0.017 to $0.009 \text{ gN-NH}_4^+_{\text{immobilized}} \cdot \text{gC}_{\text{degraded}}^{-1}$ (Batstone et al., 2002; Ramsay and Pullammanappallil, 2001). However, these constants only consider growth, while in this study, the constant is the result of both growth and partial decay during 40 days. This constant was applied to the panel of substrate. Hence, $6 \pm 3\%$ of the TKN brought by the substrate can be immobilized for biomass growth after 40 days of incubation.

All the biodegradability tests were performed in triplicate to determine uncertainties due to the operator and the measuring equipment.

2.5. Statistical analysis

In order to sort substrates according to their biodegradation rate and investigate the relationship between organic nitrogen biodegradability and organic nitrogen bioaccessibility, hierarchical cluster analysis (HCA) and partial least square (PLS) regressions were performed on the data set using Xlstat® for Excel®. Substrates were sorted depending on their organic carbon and organic nitrogen biodegradability by using HCA.

Models based on fractionation methods were developed to describe and predict organic nitrogen biodegradability using PLS regression. PLS regression is an extended multiple linear regression that include principal component analysis principles in the regression structure. This technique build model to link one dependent variable to different explanatory variables by minimizing their covariance. Here, the dependent variable (data to predict) was organic nitrogen biodegradability ($\text{gN-NH}_4^+ \cdot \text{kgTS}^{-1}$) and the explanatory variables (predictor variables) were the organic nitrogen content in each fraction for, in one case modified Van Soest fractionation (expressed in $\text{gN} \cdot \text{kgTS}^{-1}$), and in another case, modified EPS fractionation (expressed in $\text{gN} \cdot \text{kgTS}^{-1}$). In this study, model robustness was investigated using the following quality parameters:

- The coefficient of determination R^2 , which is the proportion of the dependent variable variance that can be explained by the explanatory variable set and varies between 0 and 1. Based on previous studies using PLS for biodegradability prediction (Jimenez et al., 2017), a coefficient of determination superior to 0.8 is required to ensure a good fitting of the experimental data.
- The cross validated coefficient of determination Q^2 , which is the variation rate of the dependent variable predicted by the model by cross validation. Q^2 makes it possible to judge the quality of the fit between the predicted and measured output variables and the ability of the model to predict new data. This coefficient varies between $-\infty$ and 1. A Q^2 value above 0.5 indicates good predictability of the model (Jimenez et al., 2014). Cross-validation was done using the jackknife method by excluding 1 out of 4 values in the data set chosen at random.

External model validation was done by applying the models to another set of data covering a wide range of biodegradability and substrate origin. The predicted organic nitrogen biodegradability was compared with the measured values.

3. Results and discussion

3.1. Organic carbon and nitrogen distribution in bioaccessibility based fractionation.

Modified Van Soest and modified EPS fractionation were compared on 20 substrates representing the diversity of feedstock in agricultural anaerobic digestion plants. Figure 27 shows the results of Van Soest and EPS fractionations for carbon content (27a) and organic nitrogen content (27b).

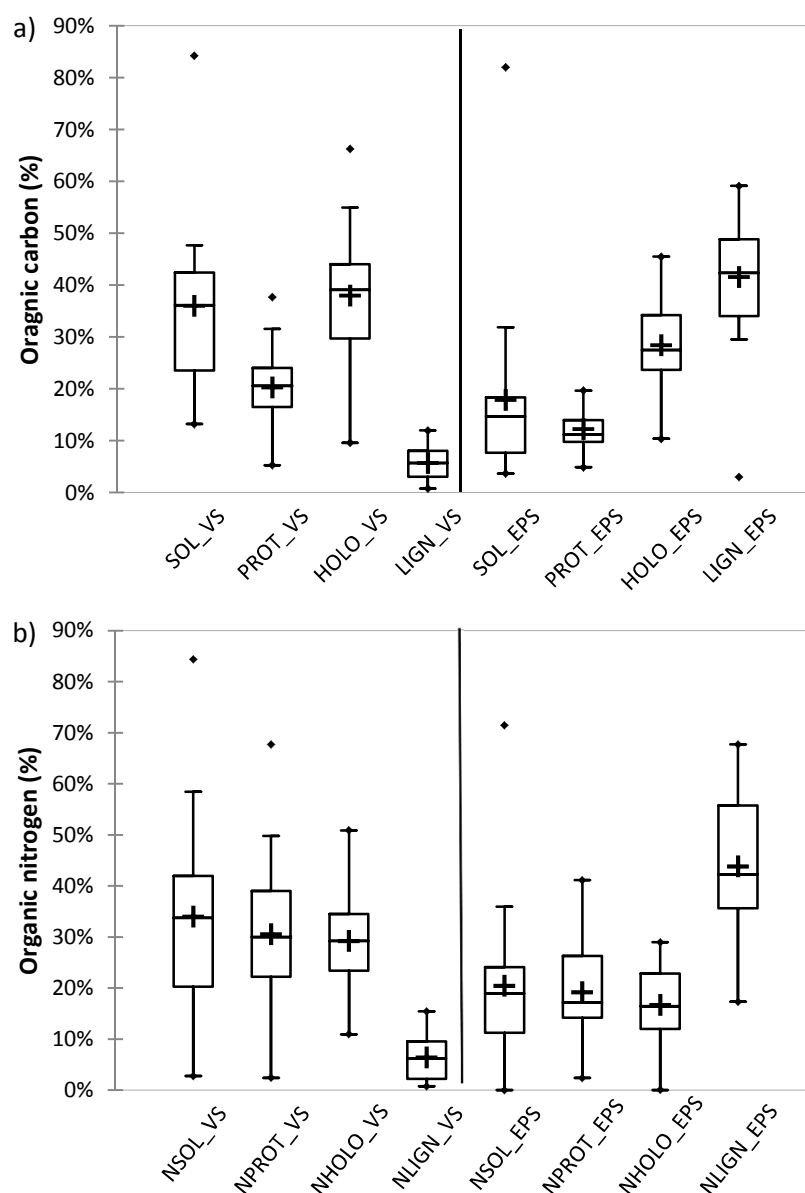


Figure 27: Organic carbon (a) and organic nitrogen (b) distribution according to Van Soest and EPS fractionation (Fraction abbreviations are explained table 12).

3.1.1. Fractionation using the modified Van Soest method

Figure 27a shows that the distribution of organic carbon in modified Van Soest fractions differed considerably from one substrate to another, with SOL_VS ranging from 13%_{TOC} to 48%_{TOC}, PROT_VS from 5%_{TOC} to 37%_{TOC} and HOLO_VS from 9%_{TOC} to 66%_{TOC}. Only LIGN_VS showed limited distribution, ranging from 1%_{TOC} to 11%_{TOC}. The wide range of values shows that the carbon distribution obtained with this fractionation method is strongly substrate dependent. In figure 27b, organic nitrogen distribution shows that nitrogen was present in all fractions and, like carbon, is strongly substrate dependent. Indeed, the ranges of nitrogen contents were wide in each fraction. On average, only about 30%_{org-N} was contained in the NPROT_VS fraction. The remaining organic nitrogen was mainly split between the NSOL_VS (35%_{org-N} on average) and NHOLO_VS fractions (30%_{org-N} on average). The range of nitrogen contents was wide in all fractions except NLIGN_VS. Only a small proportion of organic nitrogen (between 1 and 15%_{org-N}) was contained in LIGN_VS. Other authors have reported the presence of nitrogen in all the fractions, even in those that are hard to extract like HOLO_VS and LIGN_VS, using the Van Soest method for organic matter characterization before composting (Denes et al., 2015) or soil mineralization of organic waste (Chalhoub et al., 2013; Garnier et al., 2003).

3.1.2. Fractionation using the modified EPS method

Figures 27a and 27b show that variability of the carbon and nitrogen content of all EPS fractions was also wide. Extractible fractions SOL_EPS, PROT_EPS and HOLO_EPS ranged from 2 to 31%_{TOC}, 3 to 20%_{TOC} and 10 to 45%_{TOC}, respectively, for organic carbon. Non-extractible LIGN_EPS ranged from 29 to 59%_{TOC}. The distribution of organic nitrogen ranged from 2 to 36%_{org-N} for NSOL_EPS, 3 to 41%_{org-N} for NPROT_EPS, 3 to 29%_{org-N} for NHOLO_EPS and from 17 to 67%_{org-N} for NLIGN_EPS. The wide range of variability obtained shows that the carbon distribution in the EPS fractions is strongly substrate dependent. In addition, organic carbon and nitrogen are largely present in the non-extractible fraction LIGN_EPS and NLIGN_EPS reflecting that the extraction method uses soft extractants to target organic compounds. These soft extractants are supposed to solubilize specific molecules in organic matter, but organic nitrogen, which is mainly present in protein, was also

detected in HOLO_EPS and a large proportion in the LIGN_EPS fraction. According to Jimenez et al. (2015), HOLO_EPS and LIGN_EPS are mainly composed of lignocellulosic materials and other materials entrapped by them. Lignocellulosic materials are hardly biodegradable and biodegradable molecules which are entrapped by them are hardly biodegradable as well (Monlau et al., 2012). Thus, the organic nitrogen contained in HOLO_EPS and LIGN_EPS fractions is the result of the organic nitrogen entrapment by lignocellulosic materials that are not disintegrated by alkali solvents. Consequently, this fractionation method not only takes into account the nature of the extracted molecules, but also their bioaccessibility due to physical structure.

3.1.3. Comparison of carbon and nitrogen distribution obtained with the modified Van Soest and modified EPS fractionation methods

The distributions of organic carbon and nitrogen obtained with modified EPS and modified Van Soest fractionation methods differed significantly. Indeed, the percentage of organic carbon contained in extractible fractions was higher using modified Van Soest fractionation than the modified EPS fractionation: HOLO_VS was 36%_{TOC} higher than HOLO_EPS and PROT_VS was 66%_{TOC} higher than PROT_EPS. In contrast, the non-accessible fraction was noticeably higher with the modified EPS method than with the modified Van Soest method. The LIGN_EPS fraction reached 41%_{TOC} on average while LIGN_VS represented only 6%_{TOC}. The same kinds of results were obtained for organic nitrogen fractionation even if the trend of distribution between extractible fractions differed significantly. These observations show that a significant part of the organic carbon and nitrogen extracted with the Van Soest method solvents was not extracted by EPS solvents but remained in the non-extractible fraction LIGN_EPS.

To explain these results, the composition of solvents used for each fractionation method has to be considered. In particular, as stated by Jimenez et al. (2015) and Muller et al. (2014), EPS fractionation aims to describe the bioaccessibility of organic matter considering the impact of its chemical composition and physical structure. However, Van Soest fractionation only considers the impact of chemical composition on bioaccessibility (the ability of exoenzymes to reach active sites on organic

compounds considering its chemical complexity but with no limitation caused by the physical structure of the organic matter). Indeed, as observed by Jimenez et al. (2015), Van Soest solvents are more aggressive than EPS solvents. In particular, the NDF solvent used for the second step of the Van Soest fractionation is a detergent and results in strong disintegration of complex structures composed by lignin and holocellulose. Thus, this extraction step allows the extraction of physically inaccessible organic matter at this and subsequent steps. As a consequence, few carbon and nitrogenous compounds were present in LIGN_VS. On the other hand, the alkaline solvents used for EPS fractionation did not disintegrate the organic matter and extracted only the physically and chemically accessible compounds. These results indicate that, on average, 38%_{org-N} of the organic nitrogen and 35%_{TOC} of the organic carbon (estimated by difference between non-extractible fractions obtained for EPS and Van Soest fractionation respectively) are contained inside complex physical structures containing lignocellulose compounds which strongly limits its bioaccessibility.

3.2. Organic carbon and nitrogen biodegradability under anaerobic conditions

3.2.1. Influence of substrate origin on biodegradability

Organic nitrogen biodegradability and carbon biodegradability were determined using the AMNP test and the BMP test. The results are presented in table 13.

Table 13: Results of carbon and nitrogen biodegradability

Class	Sample	BMP (Nm ³ .kgTS ⁻¹)	%CH ₄	Organic carbon biodegradability		AMNP	
				gC.kgTS ⁻¹	% _{org} -C	gN-NH ₄ ⁺ .kgTS ⁻¹	% _{org} -N
Agricultural residues	Faba beans	267.9	53%	291.6	54%	21.3	65%
	Vetch	297.8	56%	289.1	58%	36.3	71%
	Phacelia	167.8	54%	171.0	74%	11.7	62%
	Mustard	241.7	45%	321.8	61%	19.7	65%
	Oat	325.2	52%	360.0	51%	19.1	63%
	Rye	301.0	44%	271.8	45%	5.4	44%
	Barley	272.5	44%	262.1	43%	4.4	31%
	Corn silage	220.9	45%	225.9	56%	3.1	21%
	Grass silage	320.5	46%	310.3	58%	13.3	61%
	Oat silage	365.9	60%	323.0	63%	2.2	15%
Livestock waste	Cattle manure	212.0	56%	196.4	36%	6.8	33%
	Pig slurry	235.3	70%	182.8	36%	3.4	27%
	Cattle slurry	251.9	64%	242.7	41%	3.7	27%
	Poultry manure	221.2	65%	182.8	41%	13.1	45%
Wastes from agroindustry and municipalities	Screenings refusal from slaughterhouse (SRS)	299.2	60%	249.8	40%	6.0	25%
	Grass clippings (GC)	270.6	54%	230.4	54%	17.1	58%
	Cattle feed waste (CF)	396.6	65%	329.8	72%	35.7	82%
	Kitchen waste (KW)	220.9	54%	391.0	72%	20.4	57%
	Waste from yeast production (ELVI)	320.5	55%	248.1	58%	31.0	58%
	Supermarket vegetable waste (SVW)	365.9	41%	384.9	70%	7.6	43%

Organic nitrogen biodegradability is strongly substrate dependent, ranging from 14%_{org-N} of degradation to 82%_{org-N} in the substrate panel, with an average value of 48%_{org-N}. In comparison, organic carbon biodegradability varied less, from 36 to 74%_{TOC}, with a mean value of 54%. Biodegradability of organic nitrogen and carbon was shown to be partial, which is in accordance with the results previously obtained with the EPS fractionation method, which showed that a significant part of the organic nitrogen and carbon is not bioaccessible. Indeed, the EPS method showed that, on average, 41%_{TOC} and 43%_{org-N} cannot be extracted.

To further investigate the variability of organic nitrogen and carbon biodegradability, substrate categories can be defined using a statistical method. To this end, three indicators were used that include the biodegradation rate for carbon and nitrogen, respectively, along with the NH_4^+/TKN ratio in the raw substrate. Hierarchical cluster analysis was performed on these variables for all substrates. The dendrogram (fig. 28a) highlights two groups of substrates based on the variables.

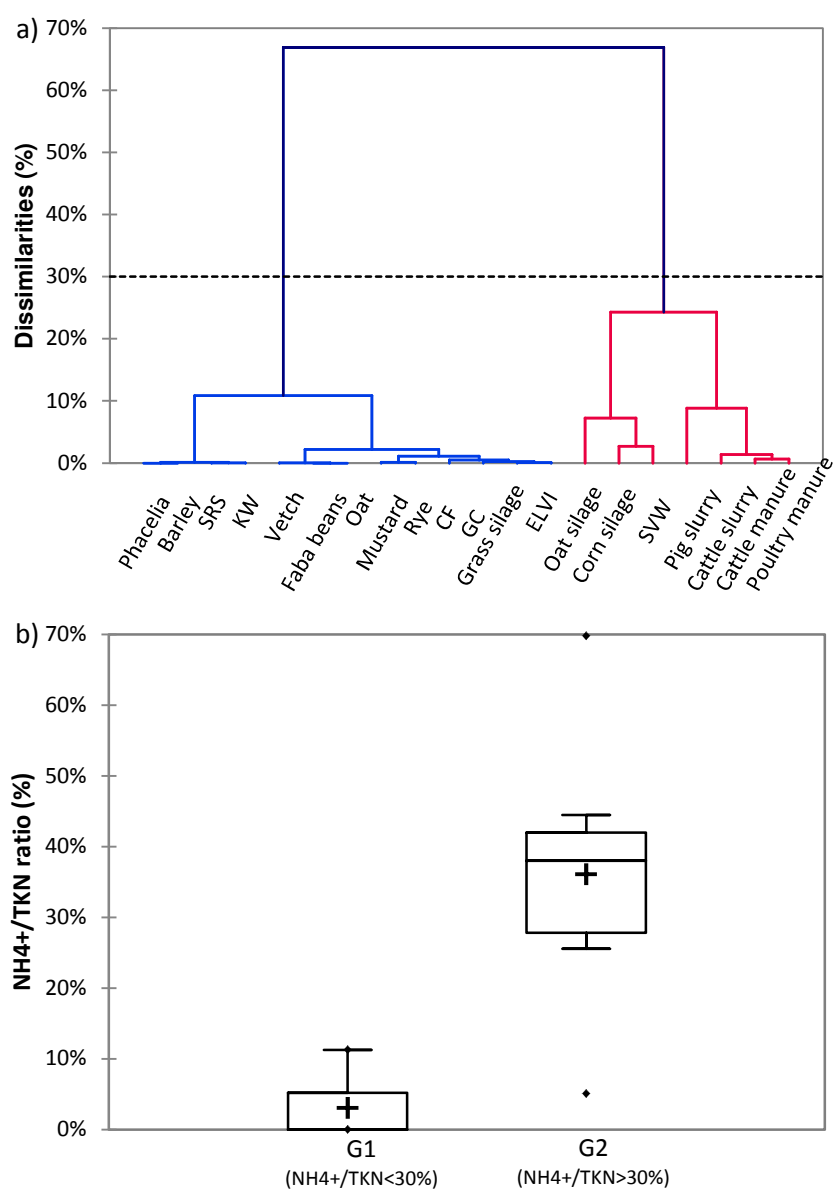


Figure 28: Hierarchical Cluster Analysis of the panel of substrates (a) and (b) the distribution of the ratio NH_4^+/TKN according to the substrate typology (Substrate abbreviations are explained in table 12).

3.2.2. Comparison between organic carbon biodegradability and organic nitrogen biodegradability.

As highlighted in figure 29a, the first group G1 is mainly composed of substrates that present a slight difference between organic carbon biodegradation and organic nitrogen biodegradation with high biodegradability (57% on average for organic carbon and nitrogen). Figure 28b shows that G1 is also composed by substrates with a low NH_4^+/TKN ratio ($< 30\%$) and includes all crop residues, non-stored agro-industrial wastes and one silage sample out of three. As the biodegradability values for organic carbon and nitrogen are very close for these kinds of substrates, which contain less than 30% of mineralized organic nitrogen (fig.29a), predicting organic nitrogen biodegradation from organic carbon mineralization is possible with a mean absolute error of 12%. Indeed, some exceptions remain, like supermarket vegetable wastes as well as drain screenings from slaughterhouses with a percentage difference 39% and 37%, respectively between organic carbon and nitrogen biodegradability.

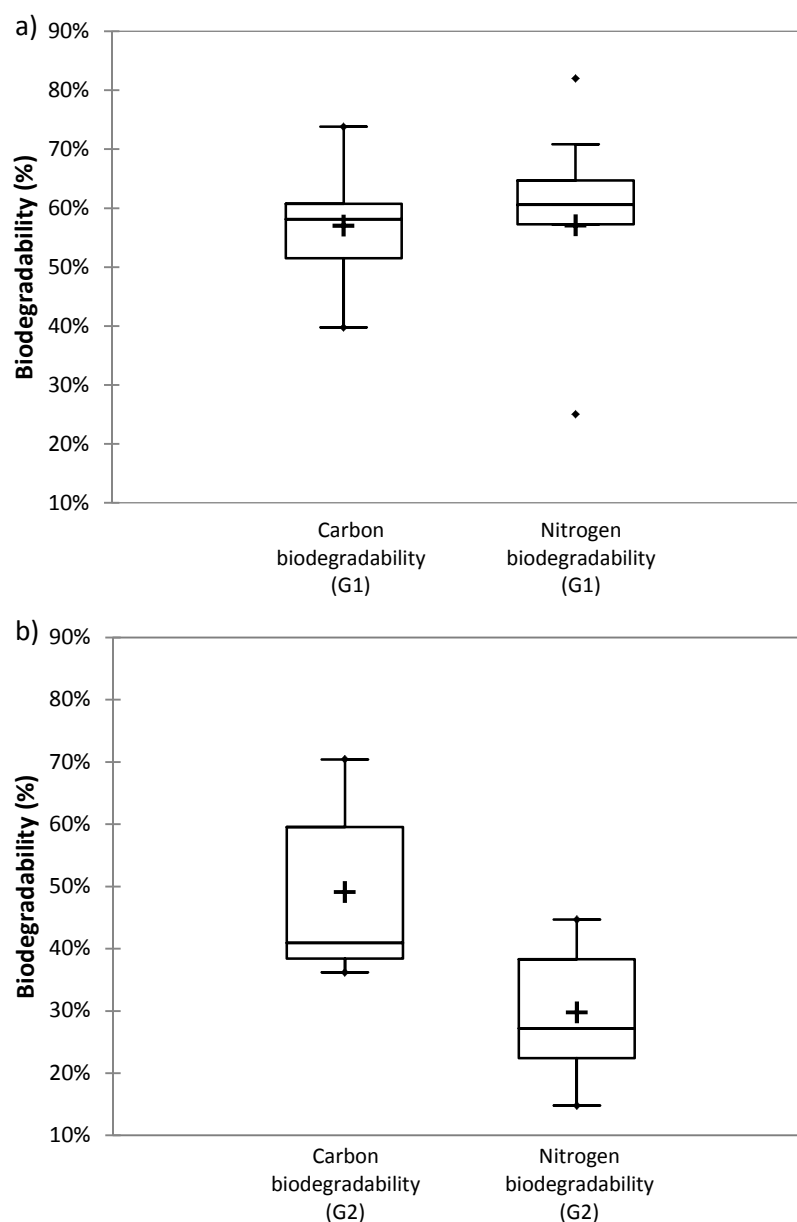


Figure 29: Box plots of the distribution of organic carbon and nitrogen biodegradability for G1 (a) and G2 (b).

As shown in figures 28a, 28b and 29b, the second group, G2, is the opposite and is composed of substrates with a marked difference in the biodegradability of organic carbon and nitrogen, and with a high NH_4^+/TKN ratio ($> 30\%$). Livestock manure is the most representative of this group but silage and stored agro-industrial waste show the same behavior. The biodegradation levels of these substrates containing large amounts of nitrogen in mineralized form are lower than for G1, with average carbon and nitrogen biodegradability of 43% and 30%, respectively. In addition, the biodegradability of

organic carbon and nitrogen are not correlated in this type of substrate, making it impossible to accurately predict organic nitrogen biodegradability from the value obtained for organic carbon.

The NH_4^+/TKN ratio indicates if organic nitrogen mineralization occurs before anaerobic digestion or not. As highlighted by the results, these transformations can occur during long storage (supermarket vegetable waste), animal digestion (livestock manures) or silage fermentation process (crop silage samples). During these processes, carbon and nitrogen mineralization can differ. As an example, during crop silaging, fermentation produces organic acids. These organic acids such as lactic acid lead to a pH decrease and an inhibition of methanogenic activity (Palmisano and Barlaz, 1996). Hence, transformations of organic carbon (partial hydrolysis and acidogenesis) occur but without significantly reaching mineralization and most of the BMP is preserved. However, as highlighted by Teixeira Franco et al. (2016), the proteolytic activity can continue and a large amount of ammonia can be produced indicating a significant organic nitrogen mineralization. This process can significantly impact AMNP value. Hence, the impact of silage fermentation process on BMP and ANMP values can significantly differ. Even if processes differ, animal digestion and spontaneous transformations during storage can have a differential impact on BMP and ANMP values. Therefore, the prediction of organic nitrogen biodegradability from the value obtained for organic carbon (derived from BMP values) is not relevant for most of the substrates belonging to the second group G2. Hence, depending on transformations that can occur before anaerobic digestion, a substrate can move from G1 (fresh substrates) to G2. In the results, this phenomenon is observed for oat that belongs to G1 after harvest and to G2 after silage fermentation process.

The links between substrate typology and substrate characteristics (protein content, C/N ratio, organic nitrogen fractionation following modified Van Soest and EPS methods) were investigated. C/N ratio, protein content and organic nitrogen fractionation following modified Van Soest method are not significantly different for G1 and G2 (data not shown). However, as presented in figure 4, significant differences are observed on EPS fractionation obtained for G1 and G2. Indeed, carbon fractionation results are close for both groups (fig.30a), but, organic nitrogen fractionation shows significant

differences between substrates belonging to G1 and G2, respectively (fig.30b). Hence, NSOL_EPS fraction for G2 (7%_{org-N} in average) is significantly inferior to the average value obtained for G1 (27%_{org-N}). In addition, the relative part of NLIGN_EPS for G2 (51%_{org-N} in average) is higher than for G1 (39%_{org-N} in average). Differences between G1 and G2 are less significant for NPROT_EPS and NHOLO_EPS fractions. These results highlight that for substrates belonging to G2, transformations prior to anaerobic digestion (silage fermentation, storage or animal digestion) led to the mineralization of most of the bioaccessible organic nitrogen (NSOL_EPS fraction). Resulting substrates contain more hardly bioaccessible organic nitrogen (NLIGN_EPS fraction). These changes in bioaccessibility of organic nitrogen explain why average ANMP for G2 is significantly inferior to the average value obtained for G1. In addition, results highlight that the impact of transformations taking place before anaerobic digestion (silage fermentation, storage or animal digestion) impact differently organic carbon and nitrogen bioaccessibility, which can explain why prediction of organic nitrogen biodegradability from the value obtained for carbon is impossible for G2. These results highlight that the modified EPS fractionation allowed the determination of accessibility indicators which can explain biodegradability variations for organic nitrogen. Thus, using a fractionation method and especially modified EPS fractionation could help predict organic nitrogen biodegradability.

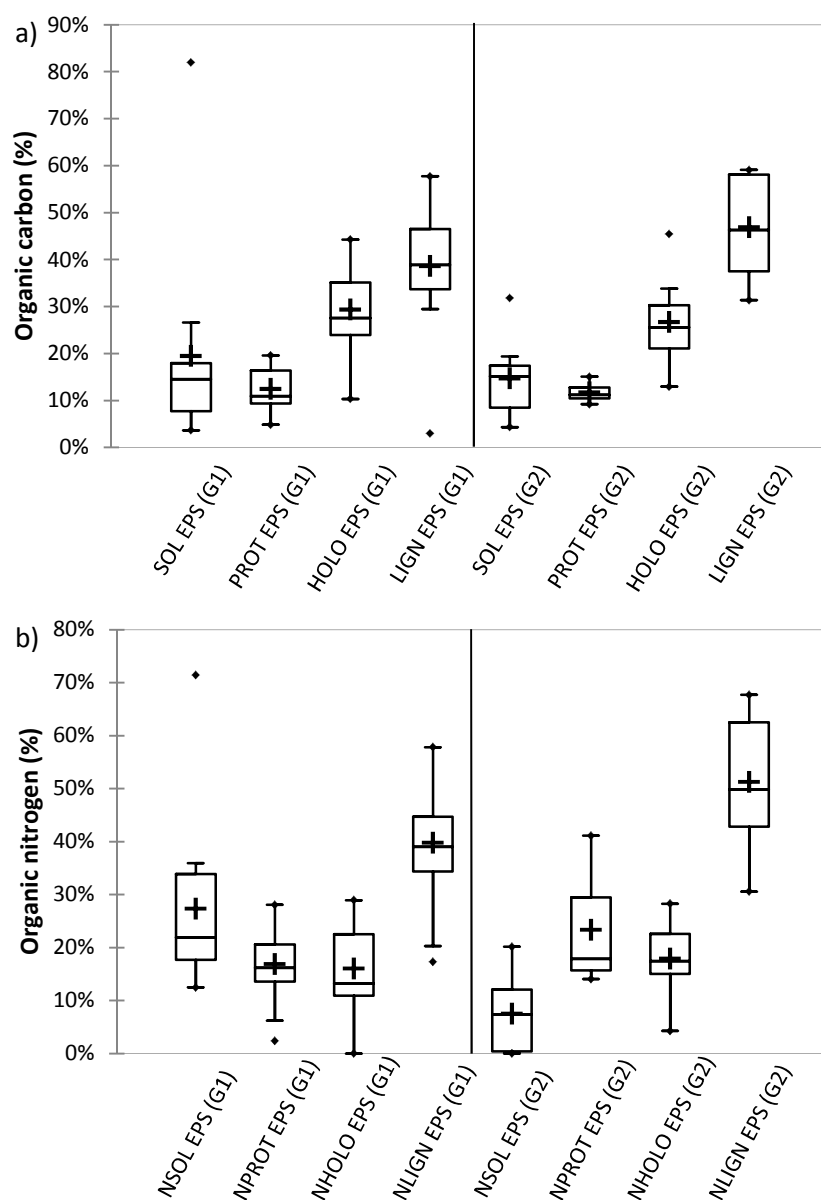


Figure 30: Organic carbon (a) and organic nitrogen (b) content for G1 and G2 substrates according to modified EPS fractionation (Fraction abbreviations are explained table 12).

3.3. Prediction of organic nitrogen biodegradability from bioaccessibility indicators

3.3.1. Partial least squares (PLS) regression for the prediction of organic nitrogen biodegradability

PLS analysis was first carried out on the whole set of substrates. Secondly, the same analysis was performed on previously determined substrate groups (G1 and G2, see section 3.2 in this chapter), respectively.

3.3.1.1. Development of the statistical model considering the whole substrate set

Two PLS analysis were carried out to investigate correlations between organic nitrogen biodegradability and the bioaccessibility indicators obtained with the modified Van Soest and modified EPS fractionations, respectively, considering the whole set of substrates. Two statistical models were obtained (see Table 14): Model N_{EPS} , which considers modified EPS fractions of organic nitrogen as explanatory variables, and model N_{VS} , which considers modified Van Soest ones as explanatory variables. Both models show good model structure according to the cross validated coefficient of determination Q^2 ($Q^2 > 0.5$) with $Q^2(N_{EPS}) = 0.736$ and $Q^2(N_{VS}) = 0.571$. However, the proportion of the organic nitrogen biodegradability variance that can be explained by the bioaccessibility indicators is higher with the N_{EPS} model ($R^2 = 0.789$) than with the N_{VS} model ($R^2 = 0.640$). The N_{EPS} model using modified EPS fractionation thus enables better simulation of the variation in nitrogen biodegradability, but R^2 is inferior of 0.8 so taking into account the typology determined in section 3.2 in this chapter. could improve the predictability of the models.

Table 14: Statistical models for the prediction of organic nitrogen biodegradability considering the whole set of substrates and associated quality parameters.

Model	Fractionation method	Explanatory variables	Biodegradability (BD) equation	Model quality parameters	
				Q ²	R ²
N _{EPS}	Modified EPS	NSOL_EPS, NPROT_EPS, NHOLO_EPS, NLIGN_EPS	$BD(orgN_{N_{EPS}}) = -5.14 + 1.48*NSOL_EPS + 0.07*NPROT_EPS + 1.76*NHOLO_EPS + 0.12*NLIGN_EPS$	0.736	0.789
N _{VS}	Modified Van Soest	NSOL_VS, NPROT_VS, NHOLO_VS, NLIGN_VS	$BD(orgN_{N_{VS}}) = -1.91 + 0.80*NSOL_VS + 0.72*NPROT_VS + 0.44*NHOLO_VS - 0.178*NLIGN_VS$	0.571	0.640

Table 15: Statistical models for the prediction of organic nitrogen biodegradability considering substrate group G1 and G2 and associated quality parameters.

Model	Fractionation method	Group considered	Biodegradability (BD) equation	Model quality parameters	
				Q ²	R ²
N _{EPS_G1}	Modified EPS	G1	$BD(orgN_{N_{EPS_G1}}) = -4.22 + 1.43*NSOL_EPS + 0.84*NPROT_EPS + 1.22*NHOLO_EPS + 0.03*NLIGN_EPS$	0.802	0.843
N _{VS_G1}	Modified Van Soest		$BD(orgN_{N_{VS_G1}}) = -1.94 + 0.89*NSOL_VS + 0.81*NPROT_VS + 0.24*NHOLO_VS - 0.59*NLIGN_VS$	0.551	0.668
N _{EPS_G2}	Modified EPS	G2	$BD(orgN_{N_{EPS_G2}}) = -2.78 + 1.29*NSOL_EPS - 0.07*NPROT_EPS + 1.14*NHOLO_EPS + 0.19*NLIGN_EPS$	0.771	0.943
N _{VS_G2}	Modified Van Soest		$BD(orgN_{N_{VS_G2}}) = -3.32 + 0.56*NSOL_VS + 0.28*NPROT_VS + 0.63*NHOLO_VS + 0.27*NLIGN_VS$	0.057	0.455

3.3.1.2. Statistical models for the prediction of organic nitrogen biodegradability considering the set of substrates and associated quality parameters considering substrate group G1 and G2

As mentioned in section 3.2., the substrates can be divided into two groups, G1 (ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NTK} < 30\%$) and G2 (ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NTK} > 30\%$) whose organic nitrogen mineralization patterns differ. PLS analyses were thus performed to take them into account. Models considering modified EPS fractions as explanatory variables are $N_{\text{EPS_G1}}$ for G1 and $N_{\text{EPS_G2}}$ for G2 and are detailed in Table 15. Quality parameters shows that the models considering the two typologies are better than for the model N_{EPS} ($Q^2 = 0.736$ and $R^2 = 0.789$). Hence, model $N_{\text{EPS_G1}}$ describing the biodegradability of the organic nitrogen for G1 shows $Q^2 = 0.802$ and $R^2 = 0.843$. Model $N_{\text{EPS_G2}}$ which considers substrates from G2 shows $Q^2 = 0.771$ and $R^2 = 0.943$. Considering models found in literature developed using PLS regression, $N_{\text{EPS_G1}}$ and $N_{\text{EPS_G2}}$ models have satisfying R^2 values (0.818 for Jimenez et al. (2017), 0.88 for Monlau et al. (2012) and 0.925 for Wold et al. (2001)). These results reveal that substrate typology enables better accuracy and predictability with models using EPS fractionation as explanatory variables.

Models considering modified Van Soest fractions as explanatory variables ($N_{\text{VS_G1}}$ for G1 and $N_{\text{VS_G2}}$ for G2, see Table 15) present no real improvement of the R^2 with 0.668 and 0.455 for respectively $N_{\text{VS_G1}}$ and $N_{\text{VS_G2}}$. These results showed that the variance of organic nitrogen biodegradability is not well described considering the typology of substrate by models using modified Van Soest variables. Also, the cross-validation parameter Q^2 obtained for $N_{\text{VS_G1}}$ (0.551) and for $N_{\text{VS_G2}}$ (0.057) were below the value obtained for model N_{VS} (0.571) which took the whole set of substrates into account. These results indicate that the substrate typology does not improve the robustness of statistical models considering Van Soest variables. Consequently, prediction of organic nitrogen biodegradability with models using the modified Van Soest fractionation as explanatory variables is not accurate. This result is due to the lack of information about the physical structure of substrates even though this data strongly impacts bioaccessibility. This statement is mainly due to the use of detergents during

extractions that lead to the complete disintegration of the physical structure of the organic matter as stated by Mottet et al. (2010).

3.3.1.3. *External model validation on models considering modified EPS variables*

For external model validation, the ability of each model developed to predict organic nitrogen biodegradability of four substrates not used for model development was investigated. Predicted organic nitrogen biodegradability and prediction errors were only determined for models that showed satisfying robustness in the previous sections (N_{EPS} , N_{EPS_G1} , N_{EPS_G2}). Results are presented in Table 16.

Regarding the prediction of organic nitrogen biodegradability by models using modified EPS fractions as explanatory variables, the prediction errors of the N_{EPS} model that considers the whole set of substrates, range from 5% to 37%. These results are better than those obtained with models using modified Van Soest fractions as explanatory variables but nevertheless underline the poor predictability of the N_{EPS} model. However, models that were specifically designed for each group of substrates, G1 and G2, produced much better results. The N_{EPS_G1} and N_{EPS_G2} models that predict organic nitrogen biodegradability for substrates belonging to the groupe G1 and G2 respectively, produced very accurate predictions with a maximum prediction error of 2% and 10%, respectively. Hence, to accurately estimate organic nitrogen biodegradability, models have to consider modified EPS fractions as explanatory variables and G1 and G2 as validity domains.

The EPS fractionation method has been used to develop accurate models for BMP prediction on various substrates (Jimenez et al., 2017). These models were completed with complexity variables acquired with 3D fluorescence spectrometry and reach a R^2 of 0.818 and a $Q^2 = 0.689$. The performance of the models developed in this study were similar without considering complexity, which can be explained by sampling before extraction and the type of substrate considered. Indeed, the preparation of the sample by Jimenez et al. (2017) (freeze-drying + grinding to 1 mm) modifies the physical structure and complexity, but using 3D fluorescence spectrometry makes it possible to track the recalcitrant materials released in the different fractions. The samples in the present study were used

raw with only light pretreatment as described in section 2.3.1 of this chapter which saved the structure of organic matter, and only bioaccessible materials were released during the different extraction steps. These results highlight the fact that EPS fractionation allows the determination of bioaccessibility indicators that take the impact of physical structure of the substrate organic matter into account in its biodegradability.

Table 16: Comparison of organic nitrogen biodegradability values obtained from experiments and models.

Model used	Livestock feed waste (G1)				Oat (G1)		Cattle slurry (G2)		Oat silage (G2)	
	Q ²	R ²	Prediction (g/kgTS ⁻¹)	Prediction error (%)	Prediction (g/kgTS ⁻¹)	Prediction error (%)	Prediction (g/kgTS ⁻¹)	Prediction error (%)	Prediction (g/kgTS ⁻¹)	Prediction error (%)
N _{EPS}	0.736	0.789	34.1	5%	15.2	20%	2.4	37%	1.8	19%
N _{EPS_G1}	0.802	0.843	35.7	2%	18.7	2%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
N _{EPS_G2}	0.771	0.943	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	3.9	5%	2.0	10%

n.t.: not tested

3.3.1.4. Analysis of the impact of bioaccessibility indicators on nitrogen biodegradability

The normalized coefficient of each variable of the model can be determined from the correlation between the explanatory variable and the dependant variable, hence, based on these coefficients, the contribution of each fraction to biodegradability was investigated. As model N_{VS} was not validated in the previous section, only normalized coefficients associated with models N_{EPS_G1} and for N_{EPS_G2} are considered in this section and are presented in Figure 31.

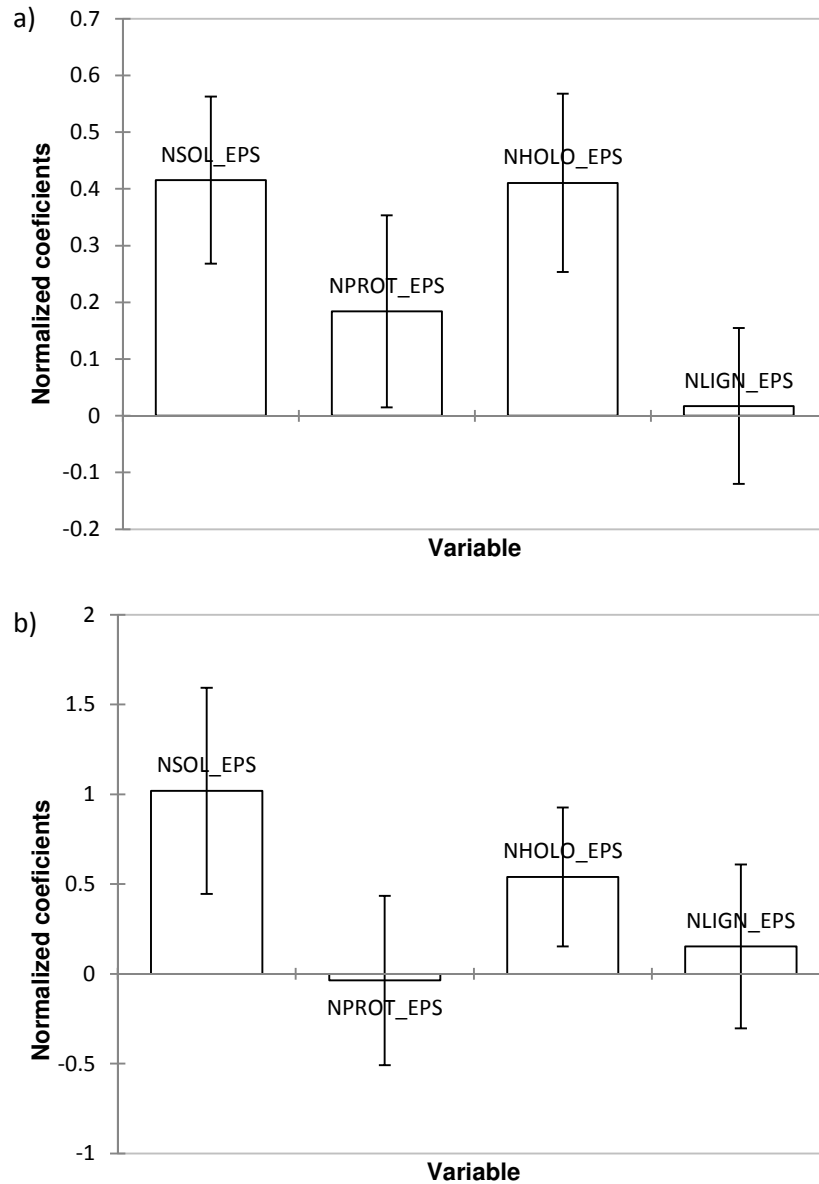


Figure 31: Normalized coefficient for model N_{EPS_G1} (a) and N_{EPS_G2} (b) explaining organic nitrogen biodegradation on G1 and on G2 (Fraction abbreviations are explained table 2).

Errors bars associated to the normalized coefficients in figure 31 are from uncertainty estimation considering 95 % confidence interval. The impact of each fraction is considered significant if the obtained confidence interval does not contain 0. For both models, the fractions that had the most significant impact on nitrogen biodegradability were NSOL_EPS and NHOLO_EPS. This result is in agreement with the organic fractions targeted by this fractionation method. Indeed, PROT_EPS targets the protein present in extrapolymeric substances (Jimenez et al., 2015) which are recalcitrant to biodegradation. Neither does NLIGN_EPS contribute significantly, due to the strongly limited

bioaccessibility of the compounds contained in this fraction. In comparison with a similar study investigating the link between EPS fractionation and carbon biodegradability, our results corroborate the observation made by Jimenez et al. (2017) concerning the contribution of the non-extractible fraction (LIGN_EPS). Indeed, LIGN_EPS on carbon did not contribute to the model like NLIGN_EPS to nitrogen based models. However, the extractible fractions of organic nitrogen (NSOL_EPS, NPROT_EPS and NHOLO_EPS) do not contribute at the same level as organic carbon, which is explained by the difference in the distribution of organic nitrogen and carbon discussed in section 3.1.2 of this chapter.

The main difference between N_{EPS_G1} and N_{EPS_G2} is the contribution of NPROT_EPS to nitrogen biodegradability. Indeed, for G1 (substrates with $NH_4^+/NTK < 30\%$), this explanatory variable contributes moderately to organic nitrogen biodegradability, but has no significant effect for G2 (substrates with $NH_4^+/NTK > 30\%$). This difference explains the difference in biodegradability of organic nitrogen in the two groups of substrate by showing that for substrates that have a NH_4^+/NTK ratio of less than 30%, part of the organic nitrogen contained in NPROT_EPS fraction is biodegradable. However, for substrates with NH_4^+/NTK ratio greater than 30%, biodegradable organic nitrogen contained in NPROT_EPS fraction was degraded before anaerobic digestion, i.e. during fermentation which occurs during silageing, during animal digestion in the case of livestock manure or during aerobic or anaerobic degradation processes that spontaneously occur during substrate storage. Hence, for that substrate group, the organic nitrogen contained in the PROT_EPS fraction is not significantly biodegradable under anaerobic digestion.

4. Conclusion

Our results highlight the fact that the organic nitrogen in substrates is contained in fractions with different bioaccessibility ranging from highly accessible to inaccessible. The distribution of organic nitrogen depends to a great extent on the substrate. Therefore, like for carbon, organic nitrogen biodegradability strongly depends on the substrate and can be predicted using statistical models that use bioaccessibility indicators as variables. These models enable the fast determination of ammonium and organic nitrogen in the digestate and help to optimize anaerobic digestion plants aimed at advancing the substitution of mineral fertilizers by digestates and preventing ammonia inhibition.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was part of the MéthaPolSol and Concept-dig projects which are supported by the French Environment and Energy Agency (ADEME).

Chapitre 4 :

Modélisation des transformations de l'azote organique : développement d'un modèle basé sur la bioaccessibilité

Avant-propos

Les travaux précédents ont permis de mettre en évidence un lien entre la bioaccessibilité obtenue selon le fractionnement EPS et la biodegradabilité de l'azote organique. Néanmoins, cette approche globale ne permet pas la compréhension de toutes les transformations de l'azote organique. L'objectif de ce chapitre est de comprendre les modifications de bioaccessibilité de l'azote organique avec une attention particulière à celle du carbone. Pour cela, deux approches complémentaires ont été utilisées. La première est une approche d'observation des évolutions de la bioaccessibilité de l'azote organique au cours de la digestion des substrats. Pour cela, un suivi des teneurs en azote et carbone des fractions issues de la méthode de fractionnement EPS a été effectué sur des réacteurs batch. Ce suivi a été effectué sur un panel réduit de huit substrats représentant la diversité des substrats utilisés en méthanisation agricole. La seconde approche se base sur les observations effectuées sur les suivis du fractionnement EPS. Des hypothèses sur ces bases ont été formulées et ont permis la modification du modèle ADM1 pour la prise en compte de la bioaccessibilité. Ce nouveau modèle, nommé ADMacc, a été calibré et évalué sur le panel des substrats et a permis de formuler et valider les hypothèses suite aux observations.

Ces travaux ont en partie fait l'objet d'une valorisation lors de la 7ème conférence internationale WasteEng à Prague, République Tchèque. Ces travaux font l'objet d'un article actuellement en soumission à la revue Water Research, présenté ci-après.

Modeling the fate of organic nitrogen during anaerobic digestion: development of a bioaccessibility based ADM1

Y. Bareha^{1,2,3}, S. Guezal¹, J. Chaker¹, R. Girault^{1,3} and A. Trémier^{1,3}

¹ Irstea, UR OPAALE, 17 av. de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France

(E-mail : romain.girault@irstea.fr)

² Université Rennes 1, 2 rue du Thabor, CS 46510, 35065 Rennes Cedex, France

³ Université Bretagne Loire, France

Abstract:

Simulating the fate of nitrogen during anaerobic digestion is required to predict the characteristics of digestates and to improve their exploitation for agricultural uses. The aim of this study was to develop a modified ADM1 model that includes bioaccessibility-based fractionation to accurately simulate the fate of nitrogen during anaerobic digestion. To this end, two complementary approaches were used: (i) changes in the bioaccessibility of protein and non-protein compounds were assessed on eight substrates during anaerobic digestion in batch experiments using the EPS fractionation method; (ii) experimental results were used to develop a bio-kinetic model based on anaerobic digestion model n°1. This new model incorporates bioaccessibility-based fractionation in its input state variables. The model was successfully calibrated and model evaluation showed that predicted methane production, ammonium production and changes in protein and non-protein bioaccessibility during anaerobic digestion were accurate.

Highlights:

- NH_4^+ production is strongly limited by the bioaccessibility of complex compounds
- A bioaccessibility-based fractionation is included in ADM1 input state variables
- Model calibration accurately simulated CH_4 and NH_4^+ production
- Bioaccessibility of protein and non-protein compounds in digestate accurately predicted
- No substrate-specific calibration is required to obtain accurate predictions

Keywords: anaerobic digestion, nitrogen, modeling, ADM1, bioaccessibility

Abbreviations

ADM1: anaerobic digestion model n°1

ADMacc: anaerobic digestion model based on bioaccessibility

TS: total solids

VS: volatile solids

COD: chemical oxygen demand

TKN: total Kjeldhal nitrogen

TOC: total organic carbon

BMP: biomethane potential

ANMP: anaerobic nitrogen mineralization potential

VFA: volatile fatty acids

SOL_{COD}: COD extracted by SOL (gCOD.kg⁻¹)

PROT_{COD}: COD extracted by PROT (gCOD.kg⁻¹)

HOLO_{COD}: COD extracted by HOLO (gCOD.kg⁻¹)

LIGN_{COD}: COD remaining in LIGN (gCOD.kg⁻¹)

HOLO_{COD_50}: COD extracted by HOLO after 50 days of biodegradation (gCOD.kg⁻¹)

LIGN_{COD_50}: COD remaining in LIGN after 50 days of biodegradation (gCOD.kg⁻¹)

SOL_N: organic nitrogen extracted by SOL (gN.kg⁻¹)

PROT_N: organic nitrogen extracted by PROT (gN.kg⁻¹)

HOLO_N: Organic nitrogen extracted by HOLO (gN.kg⁻¹)

LIGN_N: organic nitrogen remaining in LIGN (gN.kg⁻¹)

HOLO_{N_50}: organic nitrogen extracted by HOLO after 50 days of biodegradation (gN.kg⁻¹)

LIGN_{N_50}: organic nitrogen remaining in LIGN after 50 days of biodegradation (gN.kg⁻¹)

SOL_C: non-protein content of SOL fraction (gCOD.L⁻¹)

PROT_C: non-protein content of PROT fraction (gCOD.L⁻¹)

HOLO_C: non-protein content of HOLO fraction (gCOD.L⁻¹)

LIGN_C: non-protein content of LIGN fraction (gCOD.L⁻¹)

SOL_P: protein content of SOL fraction (gCOD.L⁻¹)

PROT_P: protein content of PROT fraction (gCOD.L^{-1})

HOLO_P: protein content of HOLO fraction (gCOD.L^{-1})

LIGN_P: protein content of LIGN fraction (gCOD.L^{-1})

N_{PROTEIN}: Nitrogen content in protein ($10.2 \text{ gN.gCOD}^{-1}$)

X_{SU-H2}: State variable relative to biomass concentration (gCOD.L^{-1})

X_C: Composite fraction of organic matter (gCOD.L^{-1})

X_{LIGN_P}: State variable relative to protein content of LIGN (gCOD.L^{-1})

X_{HOLO_P}: State variable relative to protein content of HOLO (gCOD.L^{-1})

X_{PROT_P}: State variable relative to protein content of PROT (gCOD.L^{-1})

X_{LIGN_C}: State variable relative to non-protein content of LIGN (gCOD.L^{-1})

X_{HOLO_C}: State variable relative to non-protein content of HOLO (gCOD.L^{-1})

X_{PROT_C}: State variable relative to non-protein content of PROT (gCOD.L^{-1})

X_{I_LIGN_P}: State variable relative to inert protein content of LIGN (gCOD.L^{-1})

X_{I_HOLO_P}: State variable relative to inert protein content of LIGN (gCOD.L^{-1})

X_{I_PROT_P}: State variable relative to inert protein content of PROT (gCOD.L^{-1})

X_{I_LIGN_C}: State variable relative to inert non-protein content of LIGN (gCOD.L^{-1})

X_{I_HOLO_C}: State variable relative to inert non-protein content of HOLO (gCOD.L^{-1})

X_{I_PROT_C}: State variable relative to inert non-protein content of PROT (gCOD.L^{-1})

S_{I_SOL_P}: State variable relative to inert soluble nitrogen compounds (gCOD.L^{-1})

S_{I_SOL_C}: State variable relative to inert soluble carbon compounds concentration (gCOD.L^{-1})

S_{I_BIO}: State variable relative to inert produce by biomass concentration (gCOD.L^{-1})

S_{AA}: State variable relative to amino-acid concentration (gCOD.L^{-1})

S_{SU}: State variable relative to sugars concentration (gCOD.L^{-1})

S_{FA}: State variable relative to fatty acid concentration (gCOD.L^{-1})

S_{VA}: State variable relative to valerate concentration (gCOD.L^{-1})

S_{BU}: State variable relative to butyrate concentration (gCOD.L^{-1})

S_{PRO}: State variable relative to propionate concentration (gCOD.L^{-1})

S_{AC}: State variable relative to acetate concentration (gCOD.L^{-1})

G1 substrates: substrate with a NH_4^+/TKN ratio below 30%

G2 substrates: substrates with a NH_4^+/TKN ratio above 30%

1. Introduction

Anaerobic digestion has attracted a lot of interest for the treatment of agricultural and agroindustrial waste. The process enables the production of biogas, which can be converted into electric and calorific energy. Anaerobic digestion also produces a residue, called digestate composed of materials that have not been converted into biogas and is generally spread on fields to improve soil fertility. Thanks to the high nitrogen content of the digestate, it can advantageously replace mineral fertilizers and when farms perform their own anaerobic digestion, it helps them to become autonomous in nitrogen inputs (Albuquerque et al., 2012; Mekki et al., 2017; Müller-Stöver et al., 2016). Nitrogen is mainly found in two forms in this organic fertilizer: inorganic nitrogen, mainly composed of ammonium, and organic nitrogen, mainly composed of protein. However, due to its high nitrogen content, digestate can result in nitrogen leaks such as nitrate lixiviation and ammonia volatilization that reduce the efficiency of digestate as a replacement for mineral fertilizer (Möller, 2015; Sommer, 1997). To optimize agricultural exploitation of digestates, better knowledge of nitrogen transformations that take place during anaerobic digestion is required to be able to control nitrogen characteristics of digestates for specific agricultural needs. Indeed, the composition of the influent and design criteria vary from one anaerobic digestion unit to another and can strongly impact the nitrogen characteristics of the digestate (Bareha et al., 2018). To allow the efficient agricultural exploitation of digestates, predicting the nitrogen composition of the digestate starting from the composition of the influent and the operating and design parameters of the digester is consequently important.

Various models have been developed to monitor and predict biogas production during anaerobic digestion and, in addition, to assess the inorganic nitrogen content of the digestate (Angelidaki et al., 1999, 1993; Pavlostathis and Gossett, 1986). The best known and most frequently cited is the IWA Anaerobic Digestion Model n°1 (Batstone et al., 2002), a mechanistic model that simulates the main processes that occur during anaerobic digestion. The model includes five steps: disintegration, hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. The model, which was originally developed for the anaerobic digestion of wastewater sludge, showed limitations when the influent contained solid organic waste (Vavilin et al., 2008) since in this case, hydrolysis is strongly limited by

the physical structure of the organic matter. The model was then considerably modified to enable simulation of the biodegradability of specific wastes such as manures and lignocellulosic residues. The modifications were mainly made in the disintegration and hydrolysis steps as these are considered to be the limiting steps in anaerobic digestion (Vavilin et al., 2008). Modifications to the disintegration step involved considering several pools of composite organic matter with different disintegration kinetics. Several authors (Kouas et al., 2015; Mottet et al., 2013; Poggio et al., 2016) used this strategy to simulate methane production in agricultural anaerobic digestion units. Other limitations concerned the simulation of the fate of nitrogen during anaerobic digestion. Wett et al. (2006) pointed out that using substrates with different C/N ratios disrupts the death-regeneration process. In ADM1, the decayed biomass is transferred to the composite fraction and pooled with the fraction originally contributed by the substrate. As the C/N ratio of the biomass and the composite fraction of the substrate usually differ, the nitrogen balance is no longer respected. To address this problem, the authors added another composite fraction specific to biomass degradation during which the death-regeneration process took place. This modification allowed better simulation of the production of methane and inorganic nitrogen. However, to improve the modeling of organic nitrogen mineralization during anaerobic digestion in the case of substrates in which hydrolysis is strongly limited by their physical structure, more detailed investigation is required of the disintegration and hydrolysis processes of complex compounds that contain nitrogen and of their integration in anaerobic digestion models.

The hydrolysis of complex compounds is strongly limited by their bioaccessibility. Bioaccessible organic matter refers to the compounds in the substrates that microorganisms can access for intra or extracellular biodegradation. A modified EPS fractionation was developed to assess the bioaccessibility of complex compounds (Bareha et al., 2018; Jimenez et al., 2015). This method uses successive chemical extractions with increasingly alkaline solvents as extractants and ends with a strong acid extraction. It results in the fractionation of the organic matter in the substrate into fractions with different bioaccessibility. The modified EPS fractionation has been successfully used to predict organic carbon and nitrogen biodegradability during anaerobic digestion (Bareha et al., 2018; Jimenez

et al., 2017). Jimenez et al. (2016, 2014) used this fractionation method to determine the input variables of the ADM1 model to successfully predict methane production in batch experiments. The method has also been used to determine aerobic biodegradability of various wastes during composting, and produced accurate results (Maynaud et al., 2017). In addition, using these bioaccessibility indicators, Bareha et al. (2018) developed statistical models that successfully predict maximal organic nitrogen mineralization during anaerobic digestion. However, the fractionation method has never been implemented in ADM1 for the prediction of the nitrogen characteristics of the digestate (ammonium concentration, organic nitrogen properties) as a function of the characteristics of the substrates and of the design and operating parameters.

The aim of this study was to develop a modified ADM1 model that accounts for a bioaccessibility-based set of state variables to accurately simulate the fate of nitrogen during anaerobic digestion, without losing the ability to accurately simulate methane and ammonium production and without requiring individual calibration for each different substrate. The nitrogen properties of the digestate that need to be predicted are ammonium and organic nitrogen contents and their bioaccessibility. To this end, the anaerobic biodegradation of two substrates representative of the substrate typology of Bareha et al. (2018), were monitored to investigate the changes in each fraction determined by the modified EPS fractionation method. Based on these results, transformation processes for these fractions were determined and implemented in ADM1. The modified ADM1, renamed ADMacc, was then calibrated on the two substrates and a sensitivity analysis was performed of the added kinetic parameters. Finally, ADMacc was evaluated by comparing the results obtained on a set of substrates not used to develop the model. This validation step allowed the quantification of the quality of the predictions obtained with the improved model without individual calibration for each specific substrate.

2. Material and method

2.1. Substrates

Eight different substrates were collected from agricultural anaerobic digestion plants in Brittany, France. The substrates collected were representative of the typologies based on the NH_4^+/TKN ratio highlighted by Bareha et al. (2018) ($\text{NH}_4^+/\text{TKN} < 30\%$ and $\text{NH}_4^+/\text{TKN} > 30\%$). These authors showed that this criterion has to be taken into account to predict organic nitrogen biodegradability based on the modified EPS fractionation. Substrates with a low NH_4^+/TKN (hereafter G1 substrates) showed high protein biodegradability and conversely, substrates with a high NH_4^+/TKN ratio (hereafter G2 substrates) showed low protein biodegradability. The sampled substrates and their characteristics are listed in table 17.

Table 17: Physical and chemical characteristics of the substrates

Class	Sample	TS (g _{TS} .kg ⁻¹)	VS (g _{VS} .kg ⁻¹)	COD (gO ₂ .kg ⁻¹)	TOC (gC.kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (gN-NH ₄ ⁺ .kg ⁻¹)	TKN (gN.kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ /NTK (%)	C/N (gC/gN)	Proteins (% _{org-C})	BMP (NmLCH ₄ .kgVS ⁻¹)	ANMP (gN-NH ₄ ⁺ .kgVS ⁻¹)
Crop residues	Faba beans (FB)	140.2	125.6	295.6	72.4	0	6.4	0%	11.3	33%	298.9	38.9
	Oats (O)	157.1	141.1	299.7	106.7	0	4.8	0%	22.2	17%	362.1	21.5
	Grass silage (GS)	267.4	234.0	403.3	138.8	0.7	7.7	9%	18.0	19%	371.1	15.8
	Oat silage (OS)	161.9	134.0	312.6	85.6	1.9	4.2	45%	20.5	10%	435.7	2.5
Livestock manure	Bovine manure (BM)	133.7	103.8	202.0	71.0	1.3	4.3	30%	16.5	16%	273.1	7.4
	Pig slurry (PS)	50.3	37.1	85.1	25.1	2.3	3.2	70%	7.7	15%	319.2	5.1
	Bovine slurry (BS)	92.4	73.4	134.0	48.3	0.9	2.4	38%	19.7	12%	317.0	3.6
Wastes from agroindustry and municipalities	Cattle feed waste (CF)	698.1	628.1	1047.8	321.9	3.4	34.0	10%	9.4	35%	440.8	39.9

All the samples were ground in a knife mill (R15 V.V., Robotcoupe®) and stored at -20 °C. Samples for elemental analysis were ground in a ball mill (Dangoumill®, PROLABO®)

2.2. Physical-chemical characterization

Total solids (TS), volatile solids (VS), total chemical oxygen demand (COD), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and total ammonia nitrogen were measured using standard methods (APHA, 2005). TKN and ammonia concentrations were determined by distillation (after a mineralization step for TKN). Total carbon and total nitrogen were measured by elemental analysis according to the manufacturer's instructions (Thermoflash 2000, Thermoscientific®). Inorganic carbon in the raw samples was determined by calcination at 480 °C and elemental analysis of the ashes. Total organic carbon (TOC) was determined by subtracting inorganic carbon (IC) from total carbon (TC). BMP and ANMP were monitored according to Vedrenne et al. (2008) and Bareha et al. (2018). These batch biodegradability experiments were performed in triplicate at 38 °C with an inoculum:substrate ratio of 1 gVS·gVS⁻¹. The incubation tests lasted for 40 days. TC, TKN, NH₄⁺ and biogas production were used to determine carbon and nitrogen mass balance continuity during monitoring. Mass balance errors were between -8 and 10% for both BMP and ANMP tests.

2.3. Organic matter fractionation: modified "EPS" fractionation

Modified EPS fractionation is based on successive alkaline extractions ending with strong acid extraction. It allows the split the organic matter in the substrate into four fractions with different bioaccessibility. This fractionation based on the EPS fractionation developed by Jimenez et al. (2017). Extractions were performed on 0.5g of raw sample. This method separates the organic matter into four fractions described below:

- SOL: The first step of the protocol consisted in two successive extractions of the sample with 30 mL of a saline solution of CaCl₂ 10mM at 30 °C under stirring (300 rpm) for one hour. This fraction contains soluble molecules such as sugars, amino acids and small proteins that are easily bioaccessible.

- **PROT:** The pellet remaining from the first step was washed four times with 30 mL of a basic solution of NaOH 10mM + NaCl 10mM at 30 °C and under stirring (300 rpm) for 15 minutes. The remaining pellet was washed four times with 30 mL of a strong basic solution of NaOH 0.1M at 30 °C under stirring (300 rpm) for one hour. The molecules extracted during this step are mostly proteins, exopolymeric substances (EPS) and nucleic acids. The bioaccessibility of these materials is not limited by the lignocellulosic structure of the organic matter.

- **HOLO:** The pellet remaining from the previous step was washed three times with 25 ml of a strong acid solution of H₂SO₄ 72% (w/w) at 30 °C under stirring at 300 rpm for three hours. This step is equivalent to the final extractions carried out in the Van Soest protocol used to extract holocellulose materials. Due to the properties of the modified EPS fractionation, non-holocellulosic materials physically entrapped in holocellulose (proteins, lipids) are also extracted during this step. Hence, this fraction contains slightly bioaccessible materials whose bioaccessibility is limited by the holocellulose structure of the organic matter.

- **LIGN:** This fraction contains the most recalcitrant material and is calculated by subtracting the total mass extracted from the original mass of the sample. Non-lignin material such as holocellulose and proteins are also present in this fraction due to the physical lignin barrier surrounding these molecules. This fraction contains very poorly bioaccessible materials.

The organic carbon and total nitrogen content in each fraction (except LIGN_EPS fraction) were measured in the extracts using a TOC-L analyzer (Shimadzu®) and by carbon and nitrogen balance for LIGN_EPS fraction between the raw sample and the sum of the extractible fractions. Protein and non-protein COD content in the fractions were determined using Girault et al. (2012) equation (16) & (17).

$$\text{Protein}_{\text{fraction}} (\text{gCOD} \cdot \text{kg}^{-1}) = 10.2 \text{ gO}_2/\text{gN} * (\text{TKN}_{\text{fraction}} - \text{NH}_4^+_{\text{fraction}}) \quad (16)$$

$$\text{Non-protein}_{\text{fraction}} (\text{gCOD} \cdot \text{kg}^{-1}) = \text{COD}_{\text{fraction}} - \text{Protein}_{\text{fraction}} \quad (17)$$

All extractions and measurements on extracts were performed in triplicate.

2.4. Experimental set up

Batch experiments were designed to investigate carbon and nitrogen transformations in the substrate during anaerobic digestion. Five 1 L bottles were filled with the centrifuged inoculum and the substrate. The inoculum used for this test was sampled in a continuously stirred 93 L tank reactor at 38 °C with a hydraulic retention time of 30 days. This reactor was used for codigestion of pig slurry and horse feed with an organic loading rate of $2.5 \text{ gVS.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. The sampled inoculum was centrifuged at 12100g at ambient temperature for 20 minutes and the supernatant was removed to reduce the initial ammonium concentration. The remaining pellet was suspended in a $\text{KHCO}_3 \text{ } 10\text{g.L}^{-1} + \text{NaHCO}_3 \text{ } 10\text{g.L}^{-1}$ solution to preserve sufficient buffering capacity in the batch and to prevent inhibition due to acidification during incubation. Substrates were ground in a knife mill (R15 V.V., Robotcoupe®). An inoculum:substrate ratio of 0.4 gVS.gVS^{-1} was used. Each sample was incubated in five different bottles at 38 °C and, during the experiment, bottles were stopped at different times until methane production reached the BMP of the substrate. Biogas production was monitored with a volumetric gas counter and the biogas composition was analyzed by gas chromatography (Agilent®). VFA (Volatile Fatty Acids) production was monitored by high-performance liquid chromatography with UV spectroscopy and an evaporation light scattering detector (ELSD). Physical-chemical characterizations, as detailed in section 2.2 section, were monitored at each stop time to check mass balances on COT and TKN. The bioaccessibility of the organic carbon and nitrogen was monitored using the modified EPS fractionation method.

2.5. Modeling batch experiments

2.5.1. Model construction

The model was developed following a structured method. The model developed was based on ADM1 and bioaccessibility considerations were added in the definition of the input state variables by including modified EPS fractions in the organic matter fractionation. The developed model was renamed ADMacc. The methodology was divided into four steps:

- Step 1: Determination of carbon and nitrogen transformation in batch tests.

Two batch tests, incubating CF and BS, were used to investigate the fate of the fractions resulting from EPS fractionation during anaerobic digestion. The choice of these substrates was based on the typologies determined by Bareha et al. (2018). These authors reported that biodegradability and bioaccessibility were linked differently depending on the substrate typology (G1 for $\text{NH}_4^+/\text{TKN} < 30\%$; G2 for $\text{NH}_4^+/\text{TKN} > 30\%$). Changes in non-protein and protein content in the fractions presented in section 2.3 enabled assumptions to be made concerning the transformations of these compounds. If there was no accumulation of these molecules in the fraction, it was considered as a simple hydrolysis. However, the accumulations in the fraction revealed the presence of more complex processes. Hence, this kind of fraction was considered as an intermediate fraction produced by the degradation of one or several other fractions and then consumed (except for inert accumulations).

- Step 2: New variables added to the model.

New variables were defined based on the observations made in step 1. These variables were defined from the modified EPS fractionation and new processes were associated with the variables. Kinetic models associated with the processes were determined according to the results of the batch tests. These variables were added to the ADM1 model to obtain a new state variable set including bioaccessibility considerations to be used as inputs.

- Step 3: Calibration of ADMacc on the results from batch tests.

The new model, ADMacc, was manually calibrated on a substrate set representing the two types of substrates used by Bareha et al. (2018): cattle feed waste (CF) and bovine slurry (BS). New kinetic rates associated with the new variables were calibrated along with the stoichiometry of inert production. Calibration was evaluated and if the experimental results were accurately simulated, the model proceeded to the next step.

- Step 4: Model evaluation.

The calibrated model was then evaluated on a validation set of substrates that contained substrates representing the two typologies used by Bareha et al. (2018): grass silage (GS), oats (O) and faba beans (FB) as G1 substrates, oat silage (OS), pig slurry (PS) and bovine manure (BM) as G2 substrates. This step enabled validation of the processes and of the stoichiometry associated with the new variables implemented. The calibrated kinetic rates obtained in step 3 were also validated during this step.

The model was implemented in Scilab5.5.2® and solved using ordinary differential equation (ODE) solver.

2.5.2. Proposed modifications to the ADM1 input state-variable set.

The model used to simulate the batch experiments (ADMacc) is a modified ADM1 with major modifications to the disintegration step. The complex compartment X_C was replaced by variables that take the bioaccessibility of protein and non-protein compounds into account. Figure 32 illustrates the main modifications made to the ADM1 input state variable set for ADMacc.

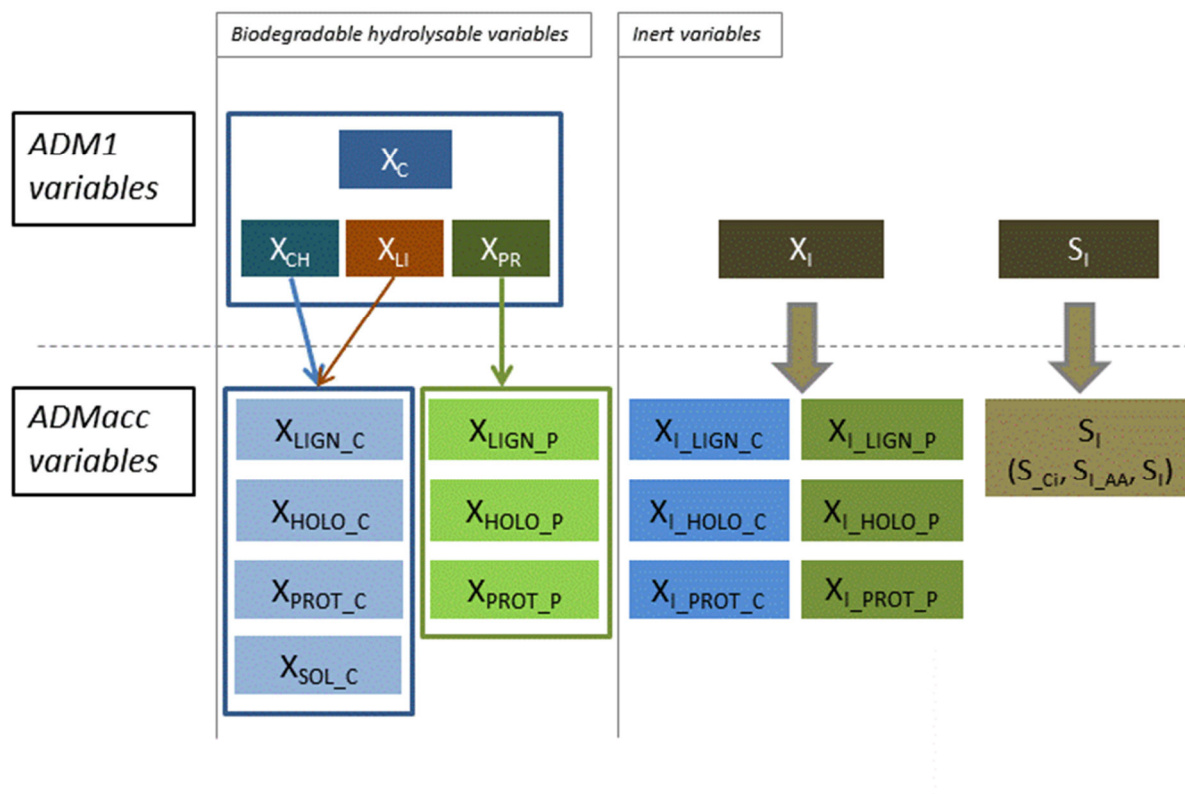


Figure 32: Modifications to ADM1 fractionation.

Composite fraction X_C , polymer fractions (carbohydrates X_{ch} , lipids X_{li} and proteins X_{pr}) and particulate inerts X_I were removed and replaced by bioaccessibility based fractionation. Particulate organic matter was divided into protein and non-protein hydrolysable fractions. Protein and non-protein hydrolysable fractions were qualified according to their different degrees of bioaccessibility according to modified EPS fractionation, which led to seven particulate hydrolysable fractions. For each fraction, a biodegradable and an inert fraction were considered. Particulate inert organic matter (X_I) was also divided into protein and non-protein inert fractions with different degrees of bioaccessibility according to modified EPS fractionation. The detailed modeling of bioaccessibility of inert fractions is not required to simulate biogas production and organic nitrogen mineralization during anaerobic digestion. However, it enables the detailed prediction of the bioaccessibility of residual organic carbon and nitrogen in the digestate, which may be useful when combining ADMacc with other agronomic or composting models.

Acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis processes were considered in ADMacc following ADM1 and the associated variables were also kept in the new model. Soluble inert was broken down into three compartments: biomass decay, production of inert amino acids and inert non-protein compounds.

2.5.3. Model initialization

Table 18 details the method used to determine the initial value of each state variable for each substrate based on the results of EPS fractionation, the biodegradability determined in the batch experiments and the results of the physical-chemical analyses.

Table 18: Methods of determination of the initial state variables used to initialize the ADMacc model

State	Variable ADMacc (gCOD.L ⁻¹)	Type	Method of determination
Particulate	X _{SU-H2}	Biomass	Calibration of the model on continuous stirred reactor
	X _{LIGN_P}	Hydrolysable protein	$X_{LIGN_P} = (LIGN_N - LIGN_{N_{50}}) * 10.2$
	X _{HOLO_P}		$X_{HOLO_P} = (HOLO_N - HOLO_{N_{50}}) * 10.2$
	X _{PROT_P}		$X_{PROT_P} = (PROT_N * 10.2) - X_{SU-H2}$
	X _{LIGN_C}	Hydrolysable carbon	$X_{LIGN_C} = LIGN_{COD} - X_{LIGN_P} - LIGN_{COD_{50}}$
	X _{HOLO_C}		$X_{HOLO_C} = HOLO_{COD} - X_{HOLO_P} - HOLO_{COD_{50}}$
	X _{PROT_C}		$X_{PROT_C} = PROT_{COD} - X_{PROT_P} - X_{SU-H2}$
	X _{SOL_C}		$X_{SOL_C} = SOL_{COD} - (S_{SU} + S_{FA} + S_{AA} + S_{VA} + S_{BU} + S_{PRO} + S_{AC})$
	X _{LIGN_P}	Inert protein	$X_{LIGN_P} = LIGN_{N_{50}} * 10.2$
	X _{HOLO_P}		$X_{HOLO_P} = LIGN_{N_{50}} * 10.2$
	X _{LIGN_C}	Inert carbon	Model calibration
	X _{HOLO_C}		$X_{LIGN_C} = LIGN_{COD_{50}} - X_{LIGN_P}$
	X _{PROT_C}		$X_{HOLO_C} = HOLO_{COD_{50}} - X_{HOLO_P}$
	X _{I_PROT_C}		Model calibration
Soluble	S _{L_SOL_P}	Inert soluble	Model calibration
	S _{L_SOL_C}		Model calibration
	S _{L_BIO}		Model calibration
	S _{AA}	Transformed soluble	$S_{AA} = SOL_N * 10.2$
	S _{SU}		$S_{SU} = f_{SOL_SSU} * (SOL_{COD} - S_{AA})$
	S _{FA}		$S_{FA} = (1 - f_{SOL_SSU}) * (SOL_{COD} - S_{AA})$
	S _{VA}		Monitoring by HPLC
	S _{BU}		
	S _{PRO}		
	S _{AC}		

Particulate inert X_{LIGN_P} and X_{LIGN_C} were estimated using batch tests on the remaining PROT COD after 50 days of incubation. Soluble inert S_{L_SOL_P}, S_{L_SOL_C} and S_I were also determined by referring to the remaining SOL COD after 50 days of incubation.

Inert non-protein and inert proteins for X_{LIGN_C}, X_{HOLO_C}, X_{LIGN_P} and X_{HOLO_P} variables were also determined in batch tests by measuring the COD remaining in LIGN and HOLO after 50 days of incubation. Biodegradable protein content for variables X_{LIGN_P}, X_{HOLO_P} and X_{PROT_P} were determined by subtracting inert protein content in the respectively PROT, HOLO and LIGN fractions of the mix and expressed in gCOD.L⁻¹. Biodegradable non-protein compounds in X_{LIGN_C}, X_{HOLO_C} and X_{PROT_C}

were determined by subtracting the concentrations of inert non-protein compounds in respectively, the PROT, HOLO and LIGN fractions and expressed in gCOD.L^{-1} . $X_{\text{PROT_C}}$ and $X_{\text{PROT_P}}$ were determined by subtracting biomass COD from the PROT fraction.

The S_{AA} variable was calculated from TN concentration in SOL considering a COD/N ratio of $0.007 \text{ molN.gCOD}^{-1}$ (Batstone et al., 2002). S_{VA} , S_{BU} , S_{PRO} and S_{AC} were measured by HPLC in the SOL fraction. LCFA, a S_{FA} variable, was taken from a database (Fisgativa et al., 2018) and assumed to be part of the SOL fraction. Monosaccharides, a S_{SU} variable, were assumed to be negligible. The soluble particulate non-protein compound, $X_{\text{SOL_C}}$, was determined by difference between COD of SOL fraction and COD of S_{AA} , S_{FA} , S_{SU} , S_{VA} , S_{BU} , S_{PRO} and S_{AC} .

Active biomass ($X_{\text{su-h2}}$) was determined by simulating the reactor in which the inoculum was sampled using ADM1acc under the operating conditions reported in section 2.4 of this chapter. The reactor was simulated for a period of 1,000 days to ensure a stabilization period of more than three times its HRT. The final biomass concentrations were considered as the biomass concentrations in the raw inoculum and are presented in figure 33. The quantity of each active biomass in the batch tests was calculated considering a centrifugation capture rate equal to that observed for total COD. To interpret the modeling results according to the fractionation method, active biomass was considered part of the PROT fraction and not as biodegradable or inert materials.

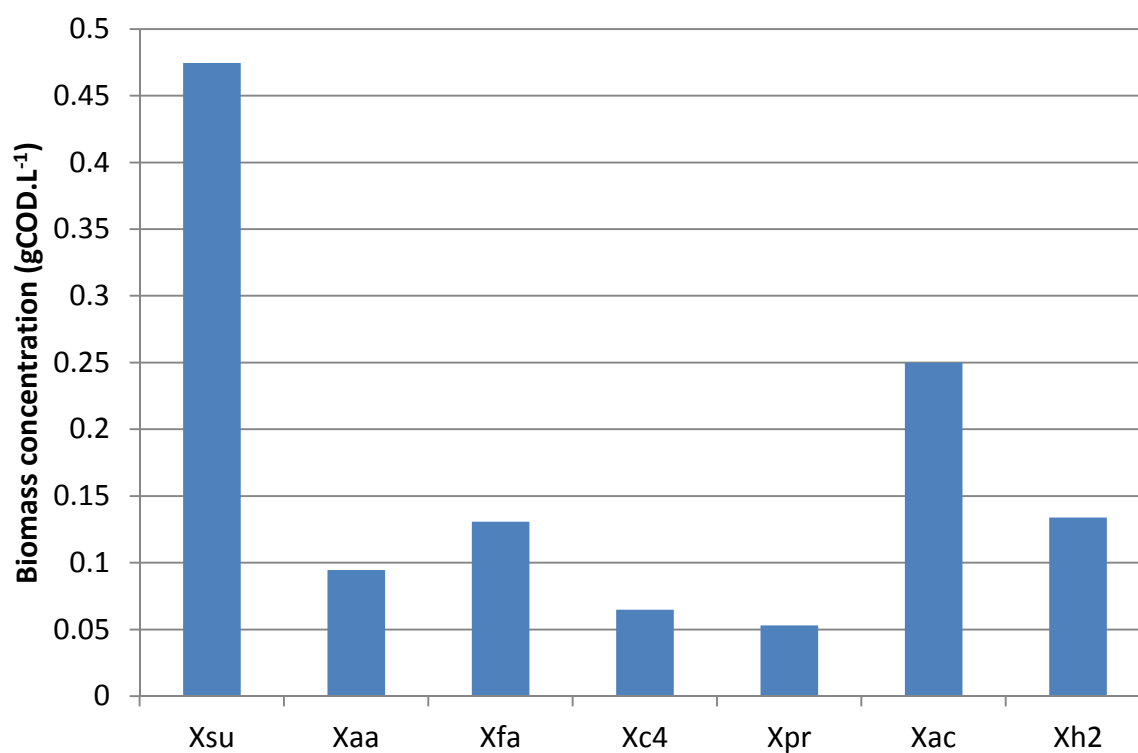


Figure 33: Biomass of active biomass and its distribution in the inoculum used for the biodegradation tests.

2.5.4. Model calibration

Hydrolysis/decay stoichiometry and the kinetics of the ADMacc model were calibrated manually on a calibration dataset composed of two substrates: cattle feed waste (CF) and bovine slurry (BS). The stoichiometry and kinetic parameters newly added to the model are listed in table 19.

Table 19: Stoichiometry and kinetic parameters added to the ADMacc model and the method of calculating the parameters.

Type of parameter	Name of the parameter	Abbreviation	Unit
Stoichiometric parameters	Inert easily accessible proteins from biomass	$f_{XL_PROT_P, XSU-H2}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Amino acid from biomass	$f_{SAA, XSU-H2}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Monosaccharides from biomass	$f_{SSU, XSU-H2}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	LCFA from biomass	$f_{SFA, XSU-H2}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Inert soluble materials from biomass	$f_{SL_C, XSU-H2}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Inert soluble materials from biomass	$f_{SL_BIO, XSU-H2}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Inert soluble amino acid from accessible protein	$f_{SL_SOL_P, XPROT_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Slowly accessible proteins from poorly accessible proteins	$f_{XHOLO_P, XLIGN_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Easily accessible proteins from poorly accessible proteins	$f_{XPROT_P, XLIGN_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Amino acid from poorly accessible proteins	$f_{SAA, XLIGN_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Easily accessible proteins from slowly accessible proteins	$f_{XPROT_P, XHOLO_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Amino acid from slowly accessible proteins	$f_{SAA, XHOLO_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Amino acid from easily accessible protein	$f_{SAA, XPROT_P}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Slowly accessible carbon from poorly accessible carbon	$f_{XHOLO_C, XLIGN_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Easily accessible carbon from poorly accessible carbon	$f_{XPROT_C, XLIGN_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Soluble particulate carbon from poorly accessible carbon	$f_{XSOL_C, XLIGN_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Monosaccharides from poorly accessible carbon	$f_{SSU, XLIGN_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	LCFA from poorly accessible carbon	$f_{SFA, XLIGN_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Easily accessible carbon from slowly accessible carbon	$f_{XPROT_C, XHOLO_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Soluble particulate carbon from slowly accessible carbon	$f_{XSOL_C, XHOLO_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Monosaccharides from slowly accessible carbon	$f_{SSU, XHOLO_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	LCFA from slowly accessible carbon	$f_{SFA, XHOLO_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Soluble particulate carbon from easily accessible carbon	$f_{XSOL_C, XPROT_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Monosaccharides from easily accessible carbon	$f_{SSU, XPROT_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	LCFA from easily accessible carbon	$f_{SFA, XPROT_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Inert soluble carbon from easily accessible carbon	$f_{SL_SOL_C, XPROT_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	Monosaccharides from soluble particulate carbon	$f_{SSU, XSOL_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	LCFA from Soluble particulate carbon	$f_{SFA, XSOL_C}$	kgCOD.kgCOD ⁻¹
Kinetic parameters	First order parameter for hydrolysis of poorly accessible protein	$k_{hyd_XLIGN_P}$	d ⁻¹
	First order parameter for hydrolysis of poorly accessible carbon	$k_{hyd_XLIGN_C}$	d ⁻¹
	First order parameter for hydrolysis of slowly accessible protein	$k_{hyd_XHOLO_P}$	d ⁻¹
	First order parameter for hydrolysis of slowly accessible carbon	$k_{hyd_XHOLO_C}$	d ⁻¹
	First order parameter for hydrolysis of easily accessible protein	$k_{hyd_XPROT_P}$	d ⁻¹
	First order parameter for hydrolysis of easily accessible carbon	$k_{hyd_XPROT_C}$	d ⁻¹
	Contois maximum specific uptake rate on soluble particulate carbon	$k_m, XSOL_C$	d ⁻¹
	Contois half-saturation coefficient for the ratio X_{SOL_C}/X_{SU}	$K_S, XSOL_C$	-

All first order parameters (k), Monod/Contois maximum specific uptake rates (k_m), half saturation coefficients (K_S), were calibrated on the pattern of each associated compound monitored during the

batch test, except for decay rates, which were set to 0.04 d^{-1} according to Girault et al. (2011). Stoichiometric parameters for hydrolysis ($f_{product,substrate}$) and decay processes and carbon (C_i) and nitrogen (N_i) content for S_i and particulate variables (X_{LIGN_C} , X_{HOLO_C} , X_{PROT_C}) were also calibrated on the same batch tests using DCO/TOC measured on the non-protein content in the fractions. Stoichiometric parameters concerning acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis were implemented according to Batstone et al. (2002) and Ramsay and Pullammanappallil (2001). The method used to manually calibrate the previously cited parameters was sequential. Hence, kinetic parameters associated with hydrolysis were calibrated first, followed by Monod maximum specific uptake rates and half saturation values, which were calibrated from acidogenesis to methanogenesis. Calibration quality was determined using determination coefficient R^2 between simulated and experimental data.

2.5.5. Sensitivity analysis

A sensitivity analysis was performed to assess the influence of the parameters implemented in ADMacc. Objective functions (simulation results used to evaluate model sensitivity) were defined to investigate the sensitivity of the added variables and associated stoichiometric parameters (k_{hyd} , k_{dec} , k_m , K_S , f_{Si} and $f_{Si_SOL_P}$). The objective functions chosen were average ammonium production rate during the first 10 days (V_{NH4_10}), ammonium production rate during the last 20 days (V_{NH4_20}), total ammonium production (T_{NH4}), cumulated methane at 15 days (T_{CH4_15}) and total cumulated methane production (T_{CH4}). Variations of $\pm 50\%$ in the above mentioned parameters were applied to the reference values determined by calibrating the model on the calibration set composed of CF and BM. The sensitivity index was then calculated using equation (18):

$$\delta_{ij} = \frac{p_i}{OF_j(p_i)} * \frac{OF_j(p_i + \Delta p_i) - OF_j(p_i)}{\Delta p_i} * 100 \quad (18)$$

where:

- δ_{ij} is the sensitivity index for the objective function OF_j using parameter p_i ,
- $OF_j(p_i)$ is the objective function OF_j calculated for parameter p_i at the reference
- $OF_j(p_i + \Delta p_i)$ is the objective function OF_j calculated for the parameter p_i with a variation from the reference Δp_i .

In this study, the authors decided that if absolute value of the sensitivity index was above 30%, then the parameter tested has a significant impact on the model results and is consequently significantly sensitive.

2.5.6. Model evaluation

The model was validated using a validation set based on grass silage (GS), oat silage (OS), bovine manure (BM), pig slurry (PS), oats (O) and faba beans (FB). Calibrated models were applied with no modification depending on the type of substrate considered. Coefficient of correlation R^2 was used to determine the correlation between observed and simulated values and the predictability of the model.

3. Results

3.1. The fate of nitrogen considering modified EPS fractionation: batch reactor monitoring

The aim of this part of the study was to understand the fate of bioaccessibility-based fractions during anaerobic digestion in order to propose modifications of the ADM1 general process scheme. Two substrates, CF and BS, were used for this purpose.

Protein and non-protein compounds were considered separately in each fraction due to the variations in the C/N ratio during incubation. Figure 34 shows changes in the C/N ratio in CF (fig 34.a) and BS (fig 34.b). Depending on the substrate and on the fractions, the C/N ratio ranged from 3.14 to 39. In addition, the C/N ratio varied significantly in most of the fractions during anaerobic digestion. Consequently, proteins were distinguished from the other compounds to be able to simulate these variations in C/N during incubation.

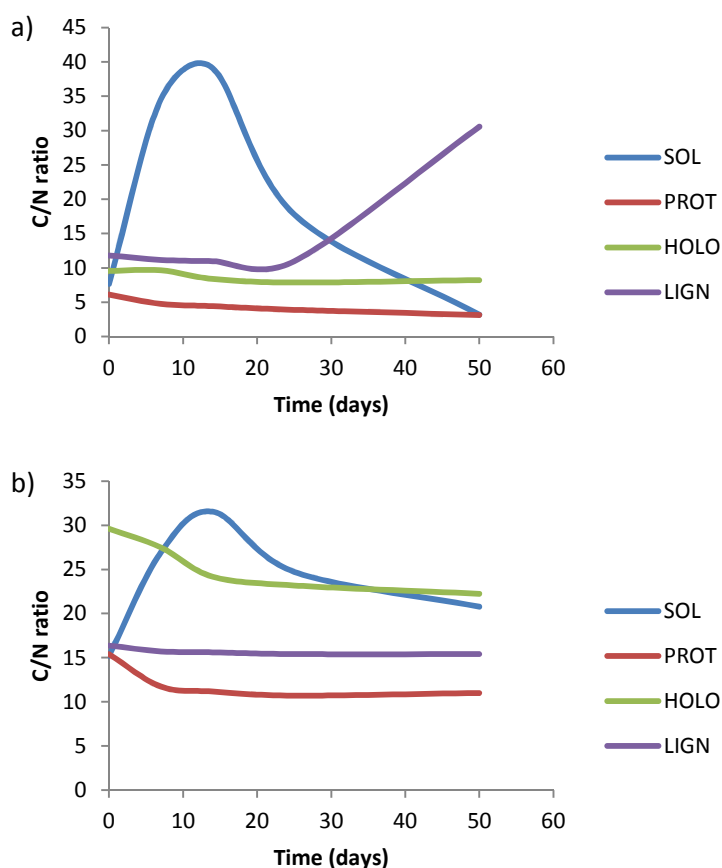


Figure 34: Changes in C/N during the incubation in CF (a) and BS (b).

3.1.1. Transformation of particulate material

Figure 35 shows the changes in protein and non-protein content of the LIGN, HOLO and PROT fractions of CF and BS. In CF, the protein content of LIGN and HOLO decreased by respectively, 94%_{COD} (fig. 35a) and by 38%_{COD} (fig. 35c), before leveling off. In BS, the protein content of LIGN remained stable at 4.5 gCOD.L⁻¹ (fig. 35b). However, the protein content of HOLO decreased by 43%_{COD}, like in CF (fig.35d). Changes in non-protein content in the LIGN (fig. 35a) and HOLO (fig. 35b) fractions also revealed a decrease followed by stabilization with respectively, 78%_{COD} and 37%_{COD} drops in CF and 6%_{COD} and 54%_{COD} drops respectively in BS.

No accumulation of protein and non-protein compounds was observed in the LIGN and HOLO fractions during incubation. Depending on the substrate typology, protein and non-protein content in fractions varied significantly before leveling off, or remained stable throughout the incubation period. These results revealed that the LIGN and HOLO fractions were mostly composed of inert compounds that were already present in the raw substrate and were not produced during anaerobic digestion. Indeed, the LIGN and HOLO fractions contained compounds entrapped in lignocellulosic and holocellulose materials that are reported to be the most recalcitrant fractions during anaerobic digestion (Tian et al., 2017) due to their poor bioaccessibility.

In addition, the results showed lower biodegradability of the LIGN fraction in BS than in CF. This observation was linked to the type of substrate. All G1 substrates also showed a decreasing trend in LIGN protein and non-protein content whereas G2 substrates showed less significant changes in these compounds in this fraction (data not shown). In G1 substrates, the breakdown of part of the lignocellulosic structures during anaerobic digestion rendered the biodegradable compounds present in large quantities in G1 substrates, bioaccessible. In G2 substrates, no significant breakdown of lignocellulose was observed during anaerobic digestion due to the biological transformations that happened prior to incubation (Bareha et al., 2018) and, consequently, only non-bioaccessible compounds remained in the LIGN fraction.

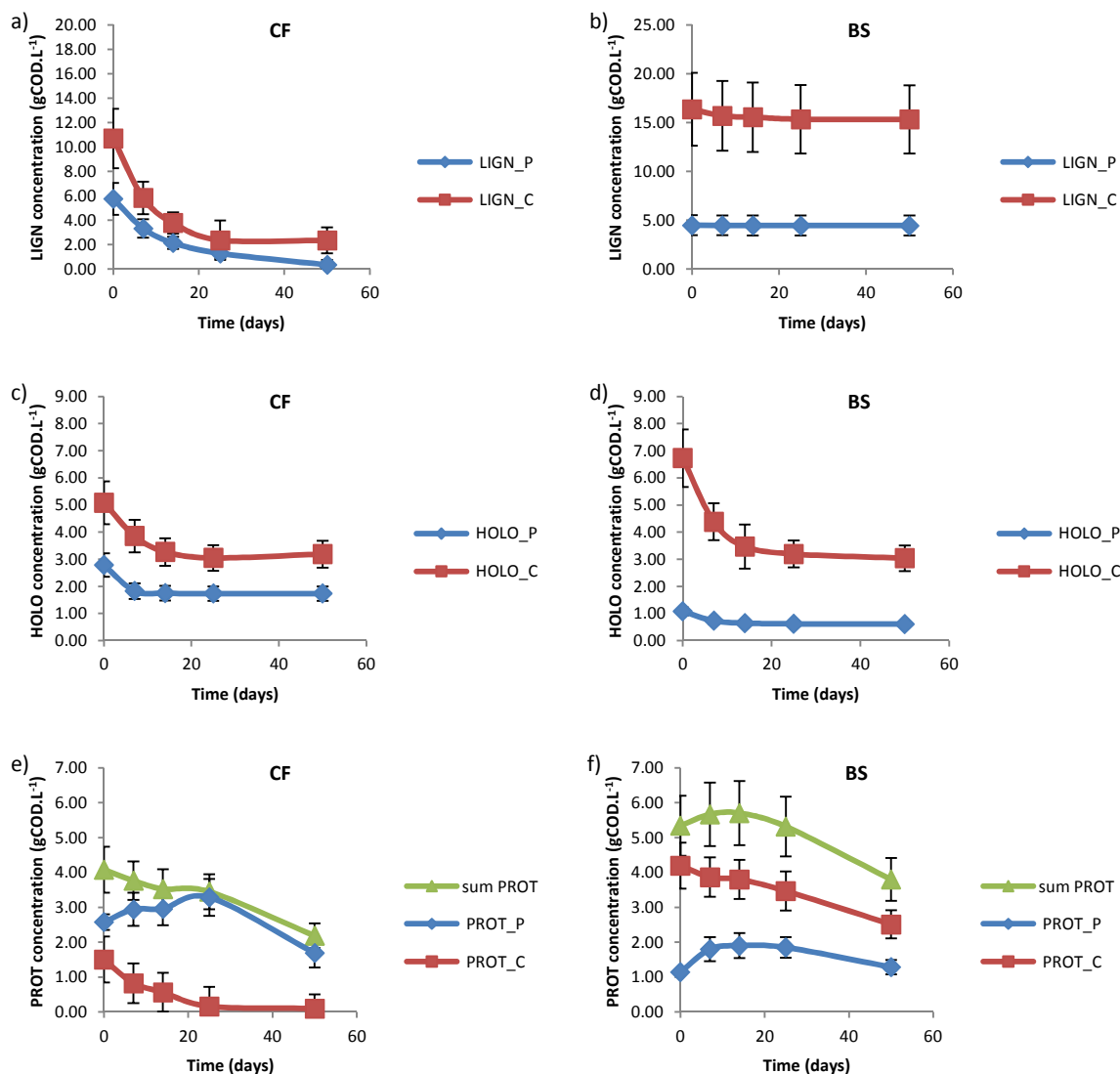


Figure 35: Changes in protein and non-protein contents in the LIGN (a and b), HOLO (c and d) and PROT (e and f) fractions in the CF and BS biodegradation tests. (the blue curve represents the protein content in the fraction; the red curve the non-protein content in the fraction; the green curve the sum of protein and non-protein contents in the fraction).

For the PROT fraction, figures 35e and 35f show an almost 100% decrease in non-protein concentration in CF and a 39% decrease in BS. This decrease is the result of the transformation of non-protein compounds by hydrolysis, but despite this decrease, visible accumulation of protein compounds occurred in both substrates at approximately the same rate (1 gCOD.L⁻¹) during the first 20 days. After this peak, the protein concentration in PROT fraction decreased to reach a final value of 2.6 gCOD.L⁻¹ in CF and of 1.3 gCOD.L⁻¹ in BS. As PROT extraction targets bacteria and associated EPS using alkali solution (Muller et al., 2014; Prasad Maharjan and Ferenci, 2003), the hypothesis

retained to explain this transient accumulation was an increase in biomass. The decrease in protein content in the PROT fraction at the end of the incubation periods (fig. 35) was consequently attributed to biomass decay combined with degradation of the compounds supplied by the substrate.

Monitoring of protein and non-protein concentration in LIGN, HOLO and PROT enabled their transformation processes to be identified. These transformation processes were added to the ADMacc model and are presented in figure 37. Except for the accumulation of biomass in the PROT fraction, no transient accumulation of protein or non-protein compounds was observed in LIGN (X_{LIGN_C} , X_{LIGN_N}), HOLO (X_{HOLO_C} , X_{HOLO_N}) or PROT (X_{PROT_C}). Hence, the only transformation that has to be taken into account is hydrolysis, and the products are directly transferred to the SOL fraction (X_{SOL_C} and X_{SOL_N}). Nor does any transfer between the above-mentioned fractions need to be considered. As these compounds are specific, all the hydrolysis processes described in this section are extracellular processes that not induce direct biomass growth (Batstone et al., 2002; Jain et al., 1992; Vavilin et al., 2008, 1996). Hydrolysis is assumed to follow first order kinetics as the process is mainly limited by the bioaccessibility of the compounds rather than by biomass growth. .

3.1.2. Transformations of soluble material

The SOL fraction was considered as the fraction that contains soluble materials including carbohydrate monomers, lipids, amino acids, and VFAs. Figure 36 shows changes in the SOL_C and N fractions in addition to changes in the propionate, acetate concentrations in the SOL fraction, and cumulated methane and ammonium production. In CF, accumulation of soluble materials in the the SOL_C fraction was observed during the first 20 days followed by a decrease until a stable value was reached (fig. 36a). In BS (fig.36b), the accumulation was smaller even though a lag-phase was observed during the first days of incubation that could be due to the equilibrium between the production and degradation of the SOL_C fraction. The slight accumulation of VFAs that occurred during this period contributed only slightly to the accumulation of COD in the SOL_C fraction. Indeed, VFAs reached maximum concentrations: (i) of 0.6 gCOD.L⁻¹ propionate and of 1 gCOD.L⁻¹ acetate in CF, (ii) 0.17 gCOD.L⁻¹ propionate and 0.45 gCOD.L⁻¹ acetate in BS, (fig. 36c & 36d). Hence, accumulation of SOL_C was mainly due to the transient accumulation of other soluble compounds (6.6 gCOD.L⁻¹ on

the 7th day in CF) from the hydrolysis of less bioaccessible materials (LIGN, HOLO and PROT fractions). Thus, for modeling, it is assumed that these compounds need hydrolysis to produce monomers (sugar and LCFAs). Consequently, it was assumed that all the products of the hydrolysis of X_{LIGN_C} , X_{HOLO_C} and X_{PROT_C} are transferred to the soluble non-protein polymer fraction (X_{SOL_C}). As the materials contained in X_{SOL_C} are soluble, they can be considered as easily bioaccessible and their biodegradation is assumed to be limited by biomass growth. In addition, as X_{SOL_C} mainly contains polymers, its degradation pathway is assumed to be mainly via extracellular hydrolysis, which is more sensitive to biomass colonization (Vavilin et al., 2008). Thus, Contois kinetics was assumed for the hydrolysis of X_{SOL_C} , in which case, its kinetics is limited by the sum of monosaccharides and LCFA acidogenic biomass. This reaction leads to the production of monomers without nitrogen: sugars (S_{su}) and LCFAs (S_{fa}).

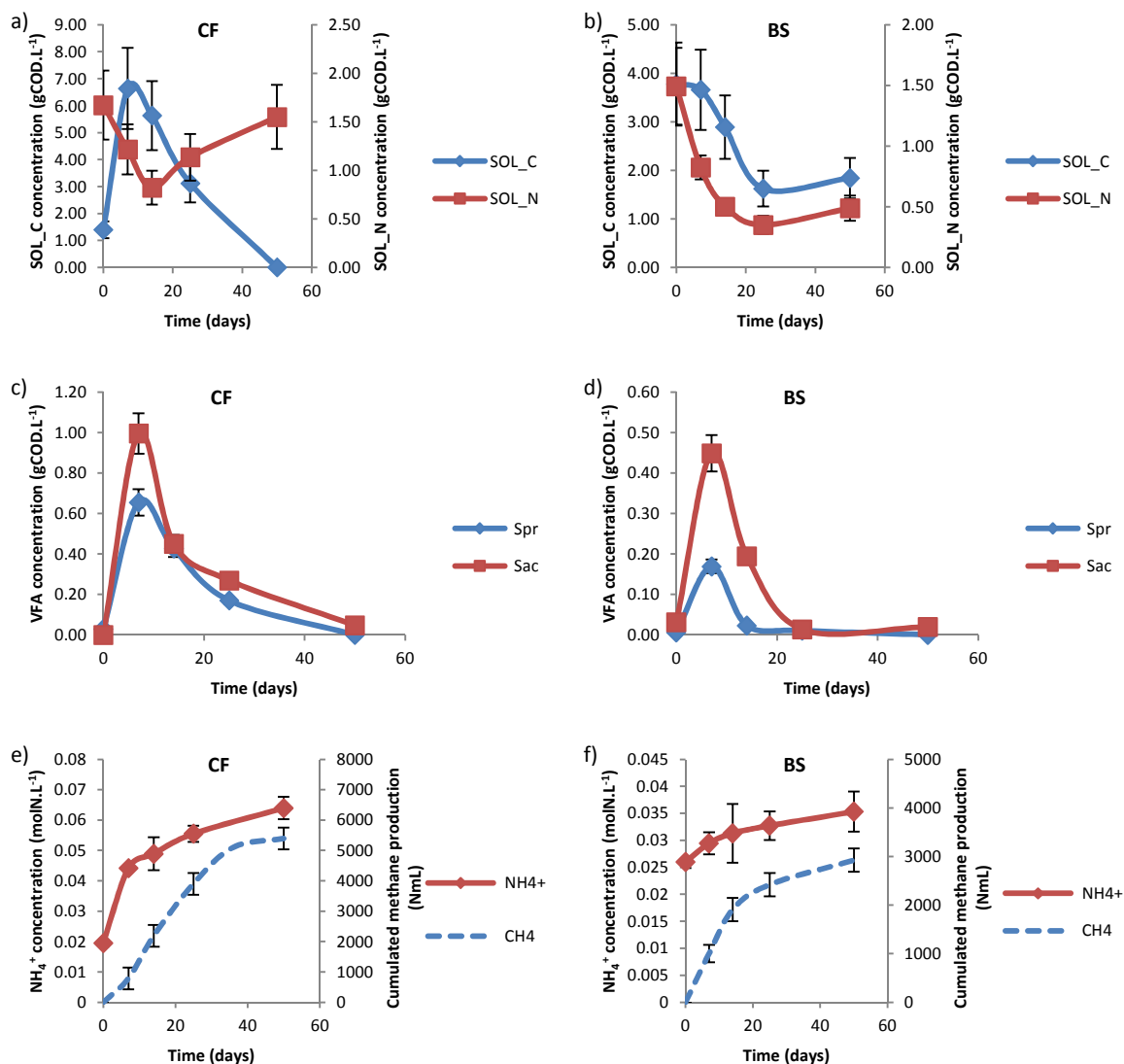


Figure 36: Changes in soluble carbon and nitrogen compounds (a and b), propionate and acetate (c and d), and ammonium and methane production (e and f) in CF and BS biodegradability tests.

Biodegradation in SOL_N during the first days (fig. 36a & 36b) was, as expected, visually correlated with ammonium production (fig. 36e & 36f) expressing the deamination phenomena that occur during acidogenesis of amino acids as described in ADM1 and in the literature (Ramsay and Pullammanappallil, 2001). In addition, no transient accumulation of SOL_N was observed. Hence, in contrast to non-protein compounds, the products of the hydrolysis of X_{LIGN_P} , X_{HOLO_P} and X_{PROT_P} were directly transformed into amino-acids and transferred to the S_{aa} fraction. Consequently, mineralization of organic nitrogen is assumed to be mainly limited by hydrolysis of the upstream fractions (X_{LIGN_P} , X_{HOLO_P} and X_{PROT_P}).

Transformations of soluble materials (acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis) were considered as intracellular transformations following Monod kinetics as described in ADM1.

3.1.3. Inert production

Figure 36a & b show the accumulation of non-biodegradable SOL_N compounds at the end of incubation. The same kind of phenomenon was observed for SOL_C in BS, although to a lesser extent. This can be explained by the production of inert soluble materials during anaerobic digestion that can result from degradation of non-soluble materials in the substrates and decayed biomass.

According to ADM1, disintegration of decayed biomass is assumed to lead to the production of particulate and soluble inert materials in addition to biodegradable ones. As it is assumed that decay is the rate limiting step in the biodegradation of biomass fractions, decayed biomasses were assumed to be directly transferred to soluble biodegradable monomers (S_{SU} , S_{AA} and S_{FA}) and inert materials ($S_{I_SOL_C}$, $S_{I_SOL_N}$, $X_{I_PROT_P}$ and $X_{I_PROT_C}$).

In addition, inert production by the PROT fraction may be the result of the degradation of organic matter from the substrates (particularly G2 substrates such as livestock manure or silage). Indeed, the specificity of PROT extraction is the alkaline solvent used. According to Jimenez et al. (2015), this extraction targets complex protein, humic and fulvic acid-like compounds. These acids are highly recalcitrant. According to their physical-chemical properties, humic and fulvic acids are also partially water soluble (MacCarthy, 1976). The results obtained for soluble nitrogen and carbonated compounds revealed accumulation of these molecules after the 10th day (fig. 36a & b). The hypothesis retained to explain this accumulation of soluble nitrogen and carbonated molecules is that humic and fulvic acids like compounds in PROT fraction are solubilized during digestion. Hence, partial production of soluble inerts was assumed for X_{PROT_C} and X_{PROT_P} ($S_{I_SOL_C}$ and $S_{I_SOL_N}$, respectively).

The impact of this hypothesis on inert production will be evaluated during model validation below.

The kinetic model of biomass decay in ADM1 was retained, and followed first order kinetics (Batstone et al., 2002).

To summarize the previous sections, modifications to the ADM1 general scheme are depicted in figure 37 and the associated Petersen matrix is presented in table 20.

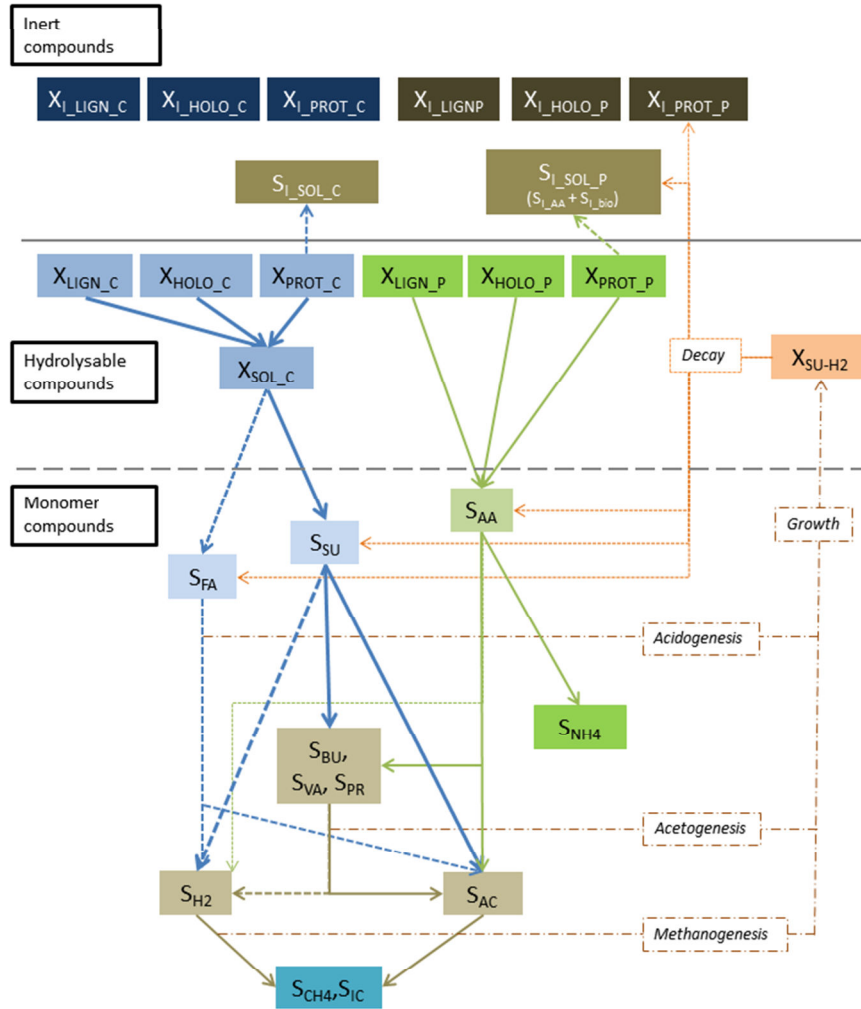


Figure 37: General scheme of ADMacc processes.

Based on all these experimental results and the general process inferred, the ADMacc model was calibrated on the biodegradability tests described in the previous section.

Table 20: ADM1 Petersen matrix modified with biochemical rate coefficients and kinetic rate equations for soluble compounds ($i=8-21, j=8-15$) and for particulate compounds ($i=1-7, 22-29, j=1-7, 16-22$)

Component →	i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Rate (ρ , gCOD.L ⁻¹)
j Process ↓		X_{LIGN_P}	X_{LIGN_C}	X_{HOLO_P}	X_{HOLO_C}	X_{PROT_P}	X_{PROT_C}	X_{SOL_C}	S_{SU}	S_{AA}	S_{FA}	S_{VA}	S_{BU}	S_{PR}	S_{AC}	
Hydrolysis of X_{LIGN_P}		-1		$f_{XHOLO_P,XLIGN_P}$		$f_{XPROT_P,XLIGN_P}$				$f_{Saa,XLIGN_P}$						$k_{hyd,XLIGN_P} X_{LIGN_P}$
Hydrolysis X_{LIGN_C}			-1		$f_{XHOLO_C,XLIGN_C}$		$f_{XPROT_C,XLIGN_C}$	$f_{XSOL_C,XLIGN_C}$	$f_{Ssu,XLIGN_C}$		$f_{Sta,XLIGN_C}$					$k_{hyd,XLIGN_C} X_{LIGN_C}$
Hydrolysis of X_{HOLO_P}				-1		$f_{XPROT_P,XHOLO_P}$				$f_{Saa,XHOLO_P}$						$k_{hyd,XHOLO_P} X_{HOLO_P}$
Hydrolysis of X_{HOLO_C}					-1		$f_{XPROT_C,XHOLO_C}$	$f_{XSOL_C,XHOLO_C}$	$f_{Ssu,XHOLO_C}$		$f_{Sta,XHOLO_C}$					$k_{hyd,XHOLO_C} X_{HOLO_C}$
Hydrolysis of X_{PROT_P}						-1				$f_{Saa,XPROT_P}$						$k_{hyd,XPROT_P} X_{PROT_P}$
Hydrolysis of X_{PROT_C}							-1		$f_{Ssu,XPROT_C}$		$f_{Sta,XPROT_C}$					$k_{hyd,XPROT_C} X_{PROT_C}$
Hydrolysis of X_{SOL_C}								-1	$f_{Ssu,XSOL_C}$		$f_{Sta,XSOL_C}$					$k_{hyd,XSOL_C} \frac{X_{SOL_C}}{K_{S,XSOL_C} X_{SU} + X_{SOL_C}} X_{SU}$
Uptake of sugar									-1				$(1-Y_{SU})f_{Sbu,Ssu}$	$(1-Y_{SU})f_{Spr,Ssu}$	$(1-Y_{SU})f_{Sac,Ssu}$	$k_{m,Ssu} \frac{S_{SU}}{K_{S,Ssu} + S_{SU}} X_{SU}$
Uptake of amino acid										-1		$(1-Y_{AA})f_{Sva,Saa}$	$(1-Y_{AA})f_{Sbu,Saa}$	$(1-Y_{AA})f_{Spr,Saa}$	$(1-Y_{AA})f_{Sac,Saa}$	$k_{m,Saa} \frac{S_{AA}}{K_{S,Saa} + S_{AA}} X_{AA}$
Uptake of LCFA											-1				$(1-Y_{FA})f_{Sac,Sta}$	$k_{m,Sfa} \frac{S_{FA}}{K_{S,Sfa} + S_{FA}} X_{FA}$
Uptake of valerate												-1		$(1-Y_{C4})f_{Spr,Sva}$	$(1-Y_{C4})f_{Sac,Sva}$	$k_{m,Sva} \frac{S_{VA}}{K_{S,Sva} + S_{VA}} X_{VA}$
Uptake of butyrate													-1		$(1-Y_{C4})f_{Sac,Sbu}$	$k_{m,Sbu} \frac{S_{BU}}{K_{S,Sbu} + S_{BU}} X_{BU}$
Uptake of propionate														-1	$(1-Y_{PR})f_{Sac,Spr}$	$k_{m,Spr} \frac{S_{PR}}{K_{S,Spr} + S_{PR}} X_{PR}$
Uptake of acetate															-1	$k_{m,Sac} \frac{S_{AC}}{K_{S,Sac} + S_{AC}} X_{AC}$
Uptake of hydrogen																$k_{m,SH2} \frac{S_{H2}}{K_{S,SH2} + S_{H2}} X_{H2}$
Decay of Xsu						$f_{XPROT_P,Xsu}$			$f_{Ssu,Xsu}$	$f_{Saa,Xsu}$	$f_{Sta,Xsu}$					$k_{dec,Xsu} X_{SU}$
Decay of Xaa						$f_{XPROT_P,Xaa}$			$f_{Ssu,Xaa}$	$f_{Saa,Xaa}$	$f_{Sta,Xaa}$					$k_{dec,Xaa} X_{AA}$
Decay of Xfa						$f_{XPROT_P,Xfa}$			$f_{Ssu,Xfa}$	$f_{Saa,Xfa}$	$f_{Sta,Xfa}$					$k_{dec,Xfa} X_{FA}$
Decay of Xc4						$f_{XPROT_P,Xc4}$			$f_{Ssu,Xc4}$	$f_{Saa,Xc4}$	$f_{Sta,Xc4}$					$k_{dec,Xc4} X_{C4}$
Decay of Xpro						$f_{XPROT_P,Xpr}$			$f_{Ssu,Xpr}$	$f_{Saa,Xpr}$	$f_{Sta,Xpr}$					$k_{dec,Xpr} X_{PR}$
Decay of Xac						$f_{XPROT_P,Xac}$			$f_{Ssu,Xac}$	$f_{Saa,Xac}$	$f_{Sta,Xac}$					$k_{dec,Xac} X_{AC}$
Decay of Xh2						$f_{XPROT_P,Xh2}$			$f_{Ssu,Xh2}$	$f_{Saa,Xh2}$	$f_{Sta,Xh2}$					$k_{dec,Xh2} X_{H2}$
		Poorly bioaccessible particulate proteins (kgCOD·m ⁻³)	Poorly bioaccessible particulate carbon (kgCOD·m ⁻³)	Slowly bioaccessible particulate proteins (kgCOD·m ⁻³)	Slowly bioaccessible particulate carbon (kgCOD·m ⁻³)	Easily bioaccessible particulate proteins (kgCOD·m ⁻³)	Easily bioaccessible particulate carbon (kgCOD·m ⁻³)	Soluble carbon (kgCOD·m ⁻³)	Monosaccharides (kgCOD·m ⁻³)	Amino acids (kgCOD·m ⁻³)	Long chain fatty acids (kgCOD·m ⁻³)	Total valerate (kgCOD·m ⁻³)	Total butyrate (kgCOD·m ⁻³)	Total propionate (kgCOD·m ⁻³)	Total acetate (kgCOD·m ⁻³)	

Component →		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	Rate (ρ, gCOD.L ⁻¹)
<i>i</i>	Process ↓	S_{H2}	S_{CH4}	S_{NH4}	S_C	S_{I_BIO}	S_{I_AA}	S_{I_C}	X_{SU}	X_{AA}	X_{FA}	X_{C4}	X_{PR}	X_{AC}	X_{H2}	$X_{I_PROT_P}$	
	Hydrolysis of X_{LIGN_P}																$k_{hyd,XLIGN_P} X_{LIGN_P}$
	Hydrolysis X_{LIGN_C}																$k_{hyd,XLIGN_C} X_{LIGN_C}$
	Hydrolysis of X_{HOLO_P}																$k_{hyd,XHOLO_P} X_{HOLO_P}$
	Hydrolysis of X_{HOLO_C}																$k_{hyd,XHOLO_C} X_{HOLO_C}$
	Hydrolysis of X_{PROT_P}						$f_{SI_aa,XPROT_P}$										$k_{hyd,XPROT_P} X_{PROT_P}$
	Hydrolysis of X_{PROT_C}							$f_{SI_C,XPROT_C}$									$k_{hyd,XPROT_C} X_{PROT_C}$
	Hydrolysis of X_{SOL_C}																$k_{hyd,XSOL_C} \frac{X_{SOL_C}}{K_{S,XSOL_C} X_{SU} + X_{SOL_C}} X_{SU}$
	Uptake of sugar	$(1-Y_{SU})f_{Sh2,Ssu}$		$-(Y_{SU})N_{Xsu}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{I,i}$				Y_{SU}								$k_{m,Ssu} \frac{S_{SU}}{K_{S,Ssu} + S_{SU}} X_{SU}$
	Uptake of amino acid	$(1-Y_{AA})f_{Sh2,Saa}$		$N_{Saa} - (Y_{AA})N_{Saa}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{I,i}$					Y_{AA}							$k_{m,Saa} \frac{S_{AA}}{K_{S,Saa} + S_{AA}} X_{AA}$
	Uptake of LCFA	$(1-Y_{FA})f_{Sh2,Sfa}$		$-(Y_{FA})N_{Xfa}$							Y_{FA}						$k_{m,Sfa} \frac{S_{FA}}{K_{S,Sfa} + S_{FA}} X_{FA}$
	Uptake of valerate	$(1-Y_{C4})f_{Sh2,Sva}$		$-(Y_{C4})N_{Xc4}$								Y_{C4}					$k_{m,Sva} \frac{S_{VA}}{K_{S,Sva} + S_{VA}} X_{VA}$
	Uptake of butyrate	$(1-Y_{C4})f_{Sh2,Sbu}$		$-(Y_{C4})N_{Xc4}$								Y_{C4}					$k_{m,Sbu} \frac{S_{BU}}{K_{S,Sbu} + S_{BU}} X_{BU}$
	Uptake of propionate	$(1-Y_{PR})f_{Sh2,Spr}$		$-(Y_{PR})N_{Xpr}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{I,i}$								Y_{PR}				$k_{m,Spr} \frac{S_{PR}}{K_{S,Spr} + S_{PR}} X_{PR}$
	Uptake of acetate		$(1-Y_{AC})$	$-(Y_{AC})N_{Xac}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{I,i}$									Y_{AC}			$k_{m,Sac} \frac{S_{AC}}{K_{S,Sac} + S_{AC}} X_{AC}$
	Uptake of hydrogen	-1	$(1-Y_{H2})$	$-(Y_{H2})N_{Xh2}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{I,i}$										Y_{H2}		$k_{m,Sh2} \frac{S_{H2}}{K_{S,Sh2} + S_{H2}} X_{H2}$
	Decay of X_{su}					$f_{SI_BIO,Xsu}$			-1							$f_{XI_PROT_P,Xsu}$	$k_{dec,Xsu} X_{SU}$
	Decay of X_{aa}					$f_{SI_BIO,Xaa}$				-1						$f_{XI_PROT_P,Xaa}$	$k_{dec,Xaa} X_{AA}$
	Decay of X_{fa}					$f_{SI_BIO,Xfa}$					-1					$f_{XI_PROT_P,Xfa}$	$k_{dec,Xfa} X_{FA}$
	Decay of X_{c4}					$f_{SI_BIO,Xc4}$						-1				$f_{XI_PROT_P,Xc4}$	$k_{dec,Xc4} X_{C4}$
	Decay of X_{pro}					$f_{SI_BIO,Xpr}$							-1			$f_{XI_PROT_P,Xpr}$	$k_{dec,Xpr} X_{PR}$
	Decay of X_{ac}					$f_{SI_BIO,Xac}$								-1		$f_{XI_PROT_P,Xac}$	$k_{dec,Xac} X_{AC}$
	Decay of X_{h2}					$f_{SI_BIO,Xh2}$									-1	$f_{XI_PROT_P,Xh2}$	$k_{dec,Xh2} X_{H2}$
	Hydrogen gas (kgCOD.m ⁻³)																
	Methane gas (kgCOD.m ⁻³)																
	Inorganic nitrogen (kgCOD.m ⁻³)																
	Inorganic carbon (kgCOD.m ⁻³)																
	Inerts produced by biomass (kgCOD.m ⁻³)																
	Inert amino acids (kgCOD.m ⁻³)																
	Inert soluble carbon (kgCOD.m ⁻³)																
	Sugar degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	Amino acid degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	LCFA degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	Valerate and butyrate degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	Propionate degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	Acetate degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	Hydrogen degraders (kgCOD.m ⁻³)																
	Particulate inerts (kgCOD.m ⁻³)																

3.2. Model calibration

ADMacc was calibrated on CF and BS batch tests. Figure 38 show simulation results for cumulated ammonium and methane production. Detailed simulation results for protein and non-protein contents of the LIGN, HOLO, PROT and SOL fractions are shown in figures 39 and 40. R^2 correlation coefficients are presented for each figure and showed good calibration for ammonium and methane production in both substrates. The protein and non-protein contents in each fraction also calibrated well with R^2 values, which ranged from 0.95 to 0.99.

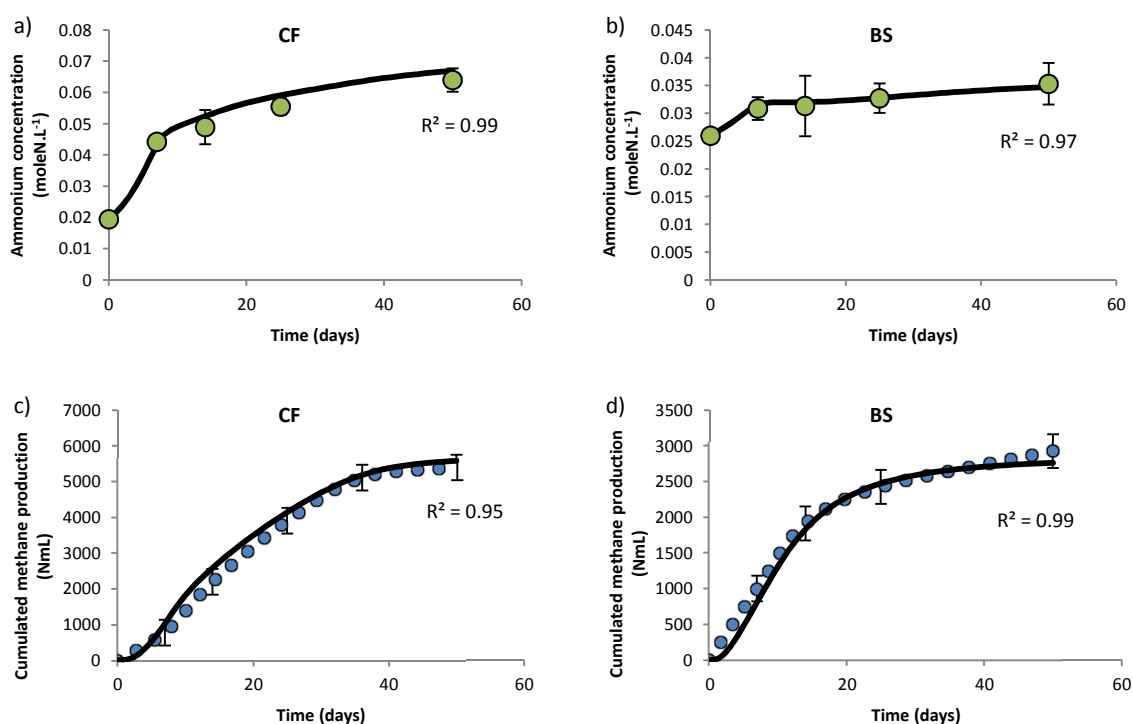


Figure 38: Simulation of ammonium (a and b) and methane production (c and d) using ADMacc calibrated on CF and BS biodegradability tests. (Blue dots represent measured values and the black line represents simulated values)

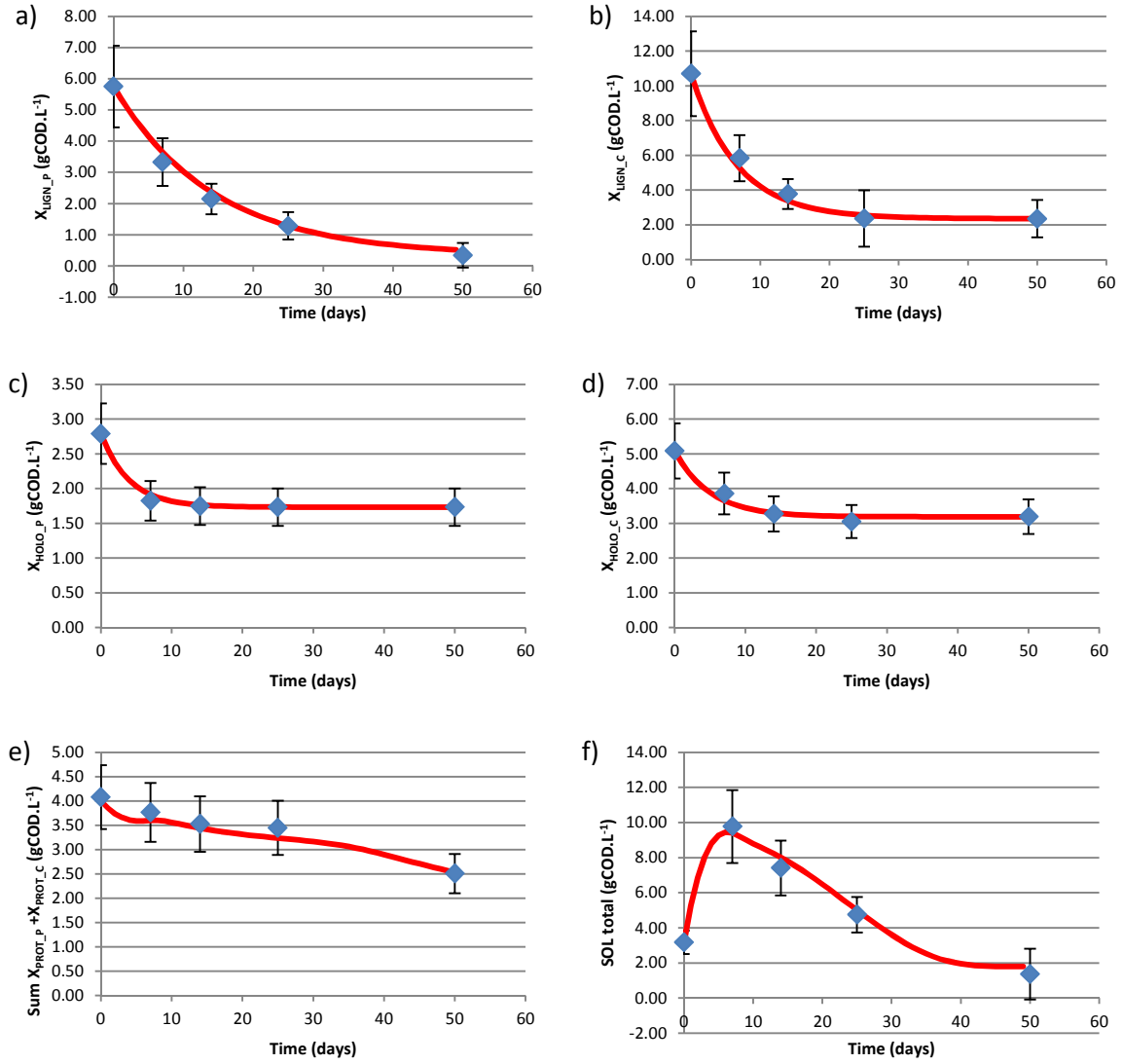


Figure 39: Calibration performance on X_{LIGN_P} (a), X_{LIGN_C} (b), X_{HOLO_P} (c), X_{HOLO_C} (d), the sum of $X_{PROT_P} + X_{PROT_C}$ (e) and the sum of soluble materials SOL (f) on the CF biodegradation test.

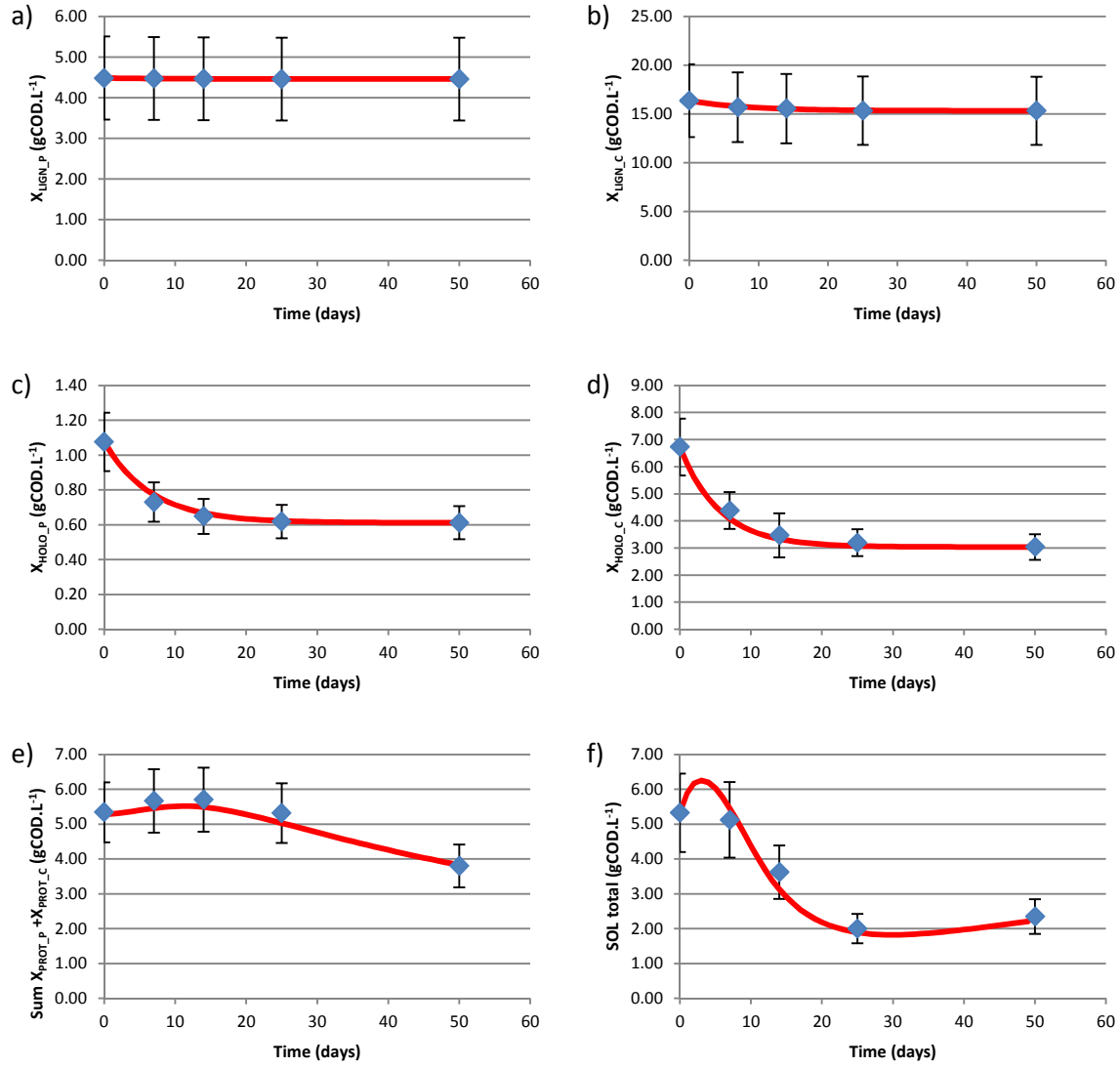


Figure 40: Calibration performance on X_{LIGN_P} (a), X_{LIGN_C} (b), X_{HOLO_P} (c), X_{HOLO_C} (d), the sum of $X_{PROT_P} + X_{PROT_C}$ (e) and the sum of soluble materials SOL (f) on the BS biodegradation test.

Table 21: Calibrated stoichiometric parameters used in ADMacc for CF and BS.

Process	Abbreviation of stoichiometric parameter	CF value	BS value	Unit
Biomass decay	$f_{XI_PROT_P,XSU-H2}$	0.3	0.3	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SAA,XSU-H2}$	0.27	0.27	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SSU,XSU-H2}$	0.13	0.13	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SFA,XSU-H2}$	0.1	0.1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SI_BIO,XSU-H2}$	0.2	0.2	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X _{LIGN_P} hydrolysis	$f_{SAA,XLIGN_P}$	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X _{HOLO_P} hydrolysis	$f_{SAA,XHOLO_P}$	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X _{PROT_P} hydrolysis	$f_{SI_AA,XPROT_P}$	0.8	0.8	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SAA,XPROT_P}$	0.2	0.2	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X _{LIGN_C} hydrolysis	$f_{SSU,XLIGN_C}$	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X _{HOLO_C} hydrolysis	$f_{SSU,XHOLO_C}$	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X _{PROT_C} hydrolysis	$f_{SSU,XPROT_C}$	0.45	0	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SFA,XPROT_C}$	0.55	0	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SI_C,XPROT_C}$	0	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹

3.2.1. Calibration of stoichiometry parameters

Table 21 lists the stoichiometric and parameter values used for calibration. Stoichiometric parameters for the hydrolysis of X_{PROT_P}, the hydrolysis of X_{PROT_C} and biomass decay were calibrated for CF and BS. Calibration of X_{PROT_P} stoichiometry showed that for the CF substrate, $f_{SAA,XPROT_P}$ was 0.2, meaning that only 20% of the fraction was biodegradable and converted into S_{AA}. The remainder (80% of X_{PROT_P}) was transferred to the inert fraction of PROT, X_{I_PROT_P}. These stoichiometric parameters were similar for the BS substrate. This similarity highlights the fact that non-biodegradable proteins are not substrate dependent but inoculum dependent: the amount of inoculum added to the biodegradability test was the same in each test. Consequently, the nitrogen soluble inert molecules produced during anaerobic digestion with both substrates were humic acid like substances solubilized from the biomass.

Regarding X_{PROT_C} hydrolysis, the stoichiometry differed between CF and BS substrates. In the CF substrate, $f_{XSOL_C,XPROT_C}$ and $f_{SI_C,XPROT_C}$ were respectively 1 and 0, meaning that all X_{PROT_C} fractions are biodegradable. Conversely, in the BS substrate, all non-protein compounds were directly transferred to the soluble inert carbon ($f_{SI_C,XPROT_C} = 1$). This stoichiometric parameter was the only

difference between the two substrates representing G1 substrates in CF and G2 substrates in BS. This result can be explained by the transformations that occurred before sampling. CF was used fresh whereas BS had been stored for several weeks in a slurry tank with no aeration system. Biodegradation takes place during storage (Møller et al., 2004). Consequently, in BS, non-protein biodegradable compounds contained in the PROT fraction were previously transformed during storage. The remaining materials were recalcitrant materials transferred to $S_{I_SOL_C}$.

Biomass disintegration stoichiometry was similar in the two substrates with 50% of the disintegration products transferred to the inert compartment (20% in soluble S_I and 30% in particulate $X_{I_PROT_P}$). The rest of the disintegrated materials resulting from biomass decay were distributed in S_{AA} , S_{FA} and S_{SU} with the same distribution as with ADM1. Inert production was 15% higher than that found with ADM1, however as reported by Batstone et al. (2002), in ADM1, this parameter is estimated for activated sludge and can thus vary widely depending on the type of biomass.

3.2.2. Calibration of the kinetic parameters

The calibration of parameters relative to transformation of particulate and soluble compounds are listed in table 22 and compared with the default values in ADM1 (Batstone et al., 2002).

- Constant calibration of first order hydrolysis kinetics

Tableau 22: Kinetic parameters calibrated on CF and BS used in ADMacc

Parameter	Products	Abbreviation	Unit	CF	BS	ADM1
First order parameters	X_{LIGN_P}	$k_{hyd_XLIGN_P}$	d^{-1}	0.07	0.1	-
	X_{LIGN_C}	$k_{hyd_XLIGN_C}$	d^{-1}	0.15	0.12	-
	X_{HOLO_P}	$k_{hyd_XHOLO_P}$	d^{-1}	0.25	0.15	-
	X_{HOLO_C}	$k_{hyd_XHOLO_C}$	d^{-1}	0.2	0.18	-
	X_{PROT_P}	$k_{hyd_XPROT_P}$	d^{-1}	0.08	0.01	-
	X_{PROT_C}	$k_{hyd_XPROT_C}$	d^{-1}	0.08	0.01	-
Contois order parameters	X_{SOL_C}	$k_{m,XSOL_C}$	d^{-1}	0.55	4.2	-
		$K_{S,XSOL_C}$	-	1.35	26	-
Monod specific uptake rate	Monosaccharides	$k_{m,SU}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	11	30	30
	Amino acid	$k_{m,AA}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	3.45	2.2	50
	LCFA	$k_{m,FA}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	1.1	1.1	6
	C4	$k_{m,C4}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	15	18	20
	Propionate	$k_{m,PRO}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	9	7.9	13
	Acetate	$k_{m,AC}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	6	3	8
	Hydrogen	$k_{m,H2}$	$kgCOD_S.kgCOD_X^{-1}.d^{-1}$	35*	35*	35
Half saturation value	Monosaccharides	$K_{S,SU}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	0.5	0.5	0.5
	Amino acid	$K_{S,AA}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	0.5	0.9	0.3
	LCFA	$K_{S,FA}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	0.4	0.4	0.4
	Valerate	$K_{S,VA}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	0.6	0.4	0.2
	Butyrate	$K_{S,BU}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	0.6	0.4	0.2
	Propionate	$K_{S,PR}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	2.1	0.4	0.1
	Acetate	$K_{S,AC}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	2.5	0.5	0.15
	Hydrogen	$K_{S,H2}$	$kgCOD_S.L^{-1}$	5.10^{-5*}	5.10^{-5*}	5.10^{-5}

* non-calibrated parameter

Calibration of first order hydrolysis kinetics considering hydrolysable protein and carbon content resulted in lower values for the LIGN fraction than for the HOLO fraction. In CF, the first order kinetic rate for X_{LIGN_P} was $0.07 d^{-1}$ while for X_{HOLO_P} it was $0.25 d^{-1}$. In BS, the first order kinetic rate for X_{LIGN_P} was $0.10 d^{-1}$ and for X_{HOLO_P} it was $0.15 d^{-1}$. The same trend was observed for the difference between $k_{hyd_XLIGN_C}$ and $k_{hyd_XHOLO_C}$. These results revealed a significant difference in bioaccessibility between the HOLO fraction and the LIGN fraction, since the LIGN fraction is the least bioaccessible part of organic matter defined by modified EPS fractionation (Jimenez et al., 2015) leading to low hydrolysis kinetics. Proteins contained in LIGN (X_{LIGN_P}) and HOLO (X_{HOLO_P}) were not hydrolyzed at the same rate as non-protein compounds (X_{LIGN_C} and X_{LIGN_C}). Due to the poor

bioaccessibility of lignin and cellulose compounds, proteins encapsulated in these structures only become available via disintegration of the lignocellulosic structure. Hence, hydrolysis of cellulose needs to take place prior to protein hydrolysis, which may explain the low or equal hydrolysis kinetic rates for X_{LIGN_P} and X_{HOLO_P} .

Conversely, the constant hydrolysis rates for X_{PROT_P} and X_{PROT_C} were similar depending on the substrate incubated. The constant hydrolysis rate was 0.08 d^{-1} for CF and 0.01 d^{-1} for BS. These hydrolysis constants are the lowest constants obtained for the hydrolysis of biodegradable materials. These constants also highlight the difference between group G1 and G2 substrates. According to Bareha et al. (2018), the difference in biodegradability between these two types of substrate depends on the PROT fraction, in particular. These authors showed that the PROT fraction did not significantly contribute to biodegradation in G2 substrates, in agreement with the very low values we obtained for $k_{hyd_XPROT_P}$ and C .

According to Bareha et al. (2018) and Jimenez et al. (2015), modified EPS fractionation allows quantification of bioaccessibility. The fractions SOL, PROT, HOLO and LIGN represent different degrees of bioaccessibility ranked from easily bioaccessible to poorly bioaccessible. However, according to these results, this hierarchy was not respected. The PROT fraction, which, according to the modified EPS fractionation, is the second most bioaccessible fraction, had a low hydrolysis constant for protein and non-protein compounds, similar to LIGN. The slow hydrolysis of the PROT fraction that upset the hierarchy based on bioaccessibility was due to the nature of the molecules extracted. As mentioned in section 3.2.1. of this chapter, Muller et al. (2014) showed that molecules extracted using alkali solvents (PROT extraction) are EPS-like and fulvic/humic-like compounds, and that these molecules can be extremely complex. Thus, these molecules are poorly biodegradable, which explains the low hydrolysis constant rates of the PROT fraction, their biodegradation being limited by their chemical composition rather than by their bioaccessibility.

- Contois parameters for hydrolysis of $X_{\text{SOL_C}}$

Contois maximum uptake values were very low in comparison to the maximum Monod uptake rates associated with downstream transformations while the Contois half saturation value was high for both substrates. Hence, $X_{\text{SOL_C}}$ hydrolysis is more limiting than acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis.

These results differed significantly in the two substrates used for calibration. In CF, the $k_{m,X_{\text{SOL_C}}}$ and $K_{S,X_{\text{SOL_C}}}$ were low (0.55 d^{-1} and 1.35 respectively). These values show that the $X_{\text{SOL_C}}$ hydrolysis is a slow process limited by the biomass concentration (Vavilin et al., 2008) leading to the observed transient accumulation (see figure 36). Conversely, in BS no significant accumulation was observed during incubation and the Contois parameters found were the opposite of the one calibrated for CF (4.2 d^{-1} for $k_{m,X_{\text{SOL_C}}}$, 26 for $K_{S,X_{\text{SOL_C}}}$). The high value of $K_{S,X_{\text{SOL_C}}}$ reduced the equation to first order kinetics. Thus, for BS, the reaction was not limited by biomass growth but by the complexity of the polymers in $X_{\text{SOL_C}}$.

- Monod parameters for acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis

The Monod maximum specific uptake rates $k_{m_substrate}$ obtained for acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis were below the values generally found in the literature (Batstone et al., 2002; Girault et al., 2011). The opposite is true of the half saturation values, which were high compared with default values (Batstone et al., 2002). The non-acclimated inoculum and the experimental design may explain these differences from default values.

Indeed, in previous batch experiments, the inoculum was centrifuged, and Batstone et al. (2015) showed that this step can reduce methanogen activity. The loss of activity can lead to low k_m values for methanogens and this could extend to other biomasses that form the trophic chain. In addition, the inoculum was not specifically acclimated to the substrates studied here.

The high values found for half saturation coefficient K_S can be explained by the experimental design: the bottles were not continuously stirred during the incubation but for one minute twice a day. The

lack of stirring reduces the probability that the biomasses harvested their substrate in the medium, which can lead to high K_S values. The same phenomenon was previously observed by Girault et al. (2011) in batch experiments without continuous stirring.

3.3. Sensitivity analysis

Kinetic parameters relative to particulate biodegradable hydrolysis and acidogenesis were considered in this sensitivity analysis. Results of the sensitivity analysis are listed in table 23 but only for significantly sensitive parameters. As most of the parameter had similar sensitivity indexes for variations of -50% and +50%, average sensitivity index values are provided. Specific sensitivity index values are mentioned when they differed significantly.

Table 23: Sensitivity indexes of the most effective parameters on the objectives functions.

Parameters	Variations	CF		BS	
		V_{NH4_10}	V_{NH4_20}	V_{NH4_10}	V_{NH4_20}
$k_{hyd,XLIGN_P}$	±50%	38	-100	n.s.	n.s.
$k_{hyd,XHOLO_C}$	±50%	n.s.	n.s.	n.s.	41 (-50% : 41 ; +50% n.s.)
$k_{m,XSOL_C}$	±50%	n.s.	58	-65	129 (-50% : 129 ; +50% : n.s.)
$K_{S,XSOL_C}$	±50%	n.s.	-43	53	-49 (-50% : n.s. ; +50% = -49)
$k_{m,AA}$	±50%	110 (-50% : 110 ; +50% : n.s.)	n.s.	158	-267 (-50% : -267 ; +50% : n.s.)
$K_{S,AA}$	±50%	n.s.	n.s.	-83.25	n.s.

n.s.: not sensitive

The most sensitive parameters that impact the ammonium production rate are $k_{hyd,XLIGN_P}$ (only for CF) ; $k_{m,XSOL_C}$ and $K_{S,XSOL_C}$; $k_{m,AA}$ and $K_{S,AA}$ (mainly for BS); $k_{hyd,XHOLO_C}$ (only for BS).

Hence, for CF, an increase in $k_{hyd,XLIGN_P}$ significantly increased the short term ammonium production rate (V_{NH4_10}), and even more significantly reduced the long term ammonium production rate (V_{NH4_20}). This result revealed that X_{LIGN_P} hydrolysis is one of the main limiting steps of organic nitrogen mineralization. However, the sensitivity of this parameter depends to a great extent on the type of substrate. For BS, due to the low biodegradability of the X_{LIGN_P} fraction (0% for BS in comparison to 94% for CF) this parameter is not sensitive. Hence, this parameter is only significantly sensitive in G1 substrates.

The sensitivity of $k_{m,AA}$ and $K_{S,AA}$ differed in CF and BS. In CF, the variation in $k_{m,AA}$ significantly impacted the short term ammonium production rate (V_{NH4_10}), only while decreasing the parameter, and $K_{S,AA}$ was not identified as being significantly sensitive in the CF substrate. In BS, $k_{m,AA}$

significantly impacted both short and long term ammonium production rates ($V_{\text{NH}_4^+_{-10}}$ and $V_{\text{NH}_4^+_{-20}}$) whereas $K_{\text{S,AA}}$ only significantly impacted short term ammonium production. Hence, an increase in S_{aa} acidogenesis kinetics (an increase in $k_{\text{m,AA}}$ or a decrease in $K_{\text{S,AA}}$) led to a significant increase in the short term ammonium production rate. As ammonium production is quicker without modifying organic nitrogen biodegradability, the long term ammonium production rate decreases. These results highlight the fact that amino-acid acidogenesis is a rate-limiting step in batch experiments for organic nitrogen mineralization. Due to the proportion of S_{aa} in the substrate, the associated kinetic parameters can be very sensitive, mainly in G2 substrates.

These results emphasize that the kinetic parameters associated with the hydrolysis of X_{SOL_C} fraction have a significant impact on the short term (only in BS) and long term ammonium production rate, even if this fraction contains no organic nitrogen. This phenomenon is due to the increase in biomass associated with the degradation of the X_{SOL_C} fraction, which leads to the consumption of ammonium in the early stages of incubation. Hence, there is an apparent decrease in the short term ammonium production rate. Then, thanks to biomass decay, this nitrogen is partially mineralized at the end of incubation leading to an apparent increase in the long term ammonium production rate.

These results also underline the fact that model sensitivity is significantly dependent on the type of substrate. Indeed, G1 and G2 substrates differed in the amount of biodegradable protein they contained as well as in their bioaccessibility (Bareha et al., 2018). Proteins in G2 substrates, like BS, are already mineralized and the remaining ones are poorly biodegradable proteins and amino acids due to their limited bioaccessibility and structure. These limitations are highlighted by the sensitivity of short and long term ammonium production rates linked to amino acid-like acidogenesis kinetics. In addition, as the biodegradability of organic nitrogen is poor in G2 substrates, the impact of ammonium uptake due to biomass growth is significant in the apparent ammonium production rate. In contrast, in G1 substrates, a large proportion of organic nitrogen is present in the poorly bioaccessible fraction. Thus, its mineralization is limited by the disintegration of these fractions and the associated hydrolysis constant ($k_{\text{hyd,XLIGN}_P}$) is very sensitive.

3.4. Model evaluation

The developed and calibrated models were applied to a validation dataset composed of six batch biodegradation experiments. The G1 substrates chosen for model validation were grass silage (GS), oats (O) and faba beans (FB). G2 substrates were bovine manure (BM), pig slurry (PS) and oat silage (OS). The models developed and calibrated on CF and BS were applied without any modifications to model anaerobic digestion of the substrates in their respective groups. Figure 41 compares measured and simulated ammonium and methane production rates during incubation for the validation set of substrates.

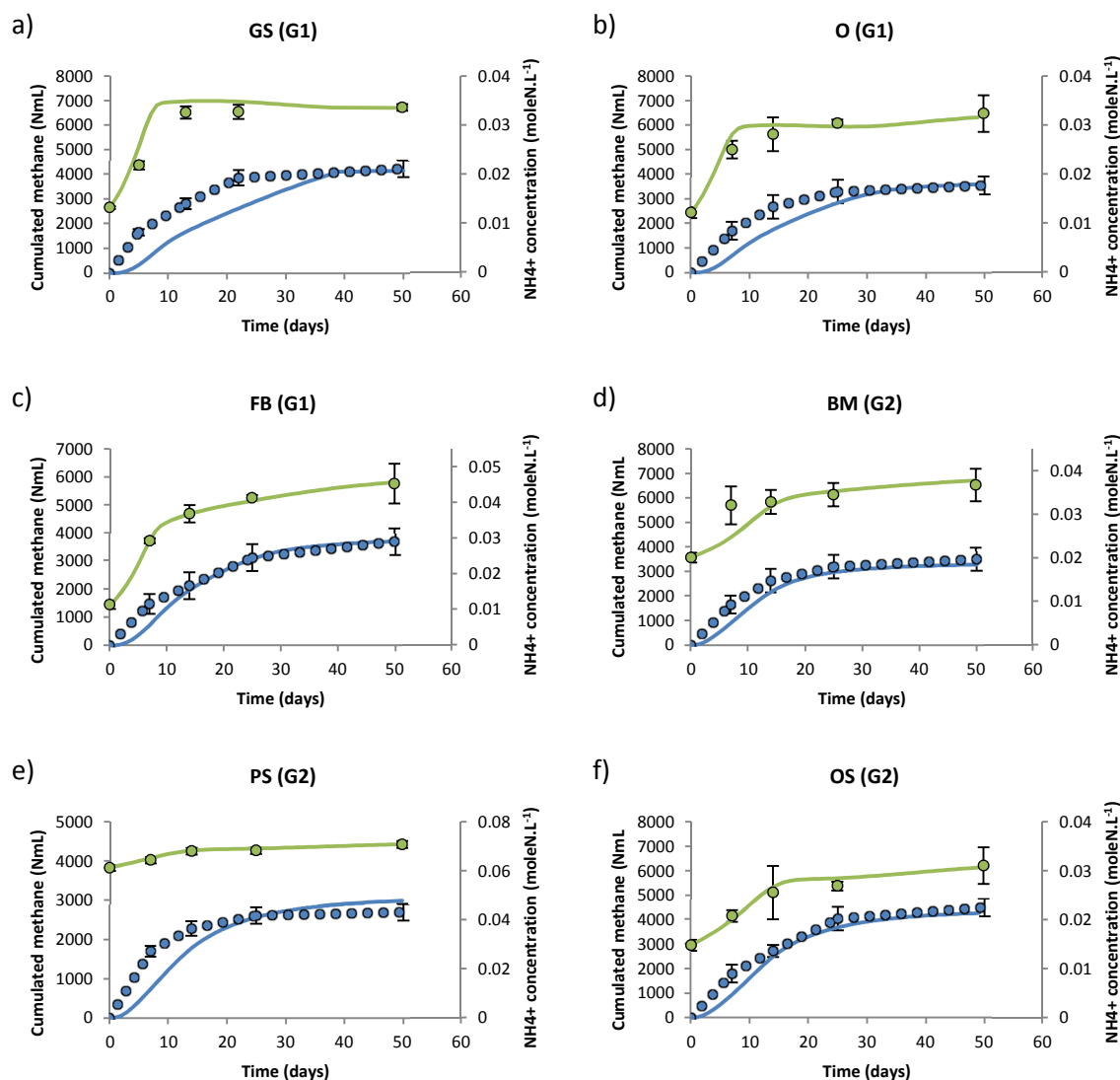


Figure 41: Comparison of measured methane (blue dotted line) and ammonium (green dots) production rates with simulated methane (plain blue line) and ammonium (plain green line) production rates. The dataset is composed of GS (a), O (b), FB (c), BM (d), PS (e), OS (f).

3.4.1. Prediction of ammonium and methane production

The results showed that the ADMacc model can accurately predict the maximum ammonium concentration in all the incubation tests. The simulated changes in concentration were also accurate for most of the substrates, except for incubation of bovine manure. For this substrate, the concentration at 7 days was poorly simulated by the model. The simulation showed a time lag, as it took 14 days to reach the value measured on the 7th day. According to the results of the sensitivity analysis, in G1 substrates including bovine manure, short term ammonium production is highly sensitive to S_{aa} acidogenesis. In the experiment, S_{aa} apparent biodegradation rate in the 7th first days was 0.22

$\text{gCOD.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ while the simulated apparent S_{aa} biodegradation rate was $0.004 \text{ gCOD.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Consequently, for bovine manure, S_{aa} acidogenesis is not fast enough, resulting in erroneous predictions.

Simulations of methane production also accurately predicted cumulated methane production. Small simulation inaccuracies were observed in first seven days due to a lag phase that was observed for all the substrates in the simulations. According to the sensitivity analysis, methane production is strongly limited by X_{SOL_C} hydrolysis. Thus, the discrepancy between predicted and experimental values was mainly due to X_{SOL_C} hydrolysis parameters that were not optimized for each individual substrate.

The calibrated ADMacc successfully modeled simulated ammonium and methane production trends during anaerobic digestion without substrate-specific calibration. Nevertheless, as the objective of this model is to simulate the characteristics of the digestate, prediction of the COD/C/N contents in the bioaccessibility fractions needs to be evaluated to validate the model assumptions.

3.4.2. Prediction of the fate of bioaccessibility fractions during anaerobic digestion.

The ability of the ADMacc model to predict changes in the bioaccessibility fractions was investigated on the evaluation dataset. Predictions and measurements of the protein and non-protein content of each fraction were compared in all the substrates (G1 and G2 substrates) and R^2 coefficients were determined. Results of the comparison are presented in figure 42.

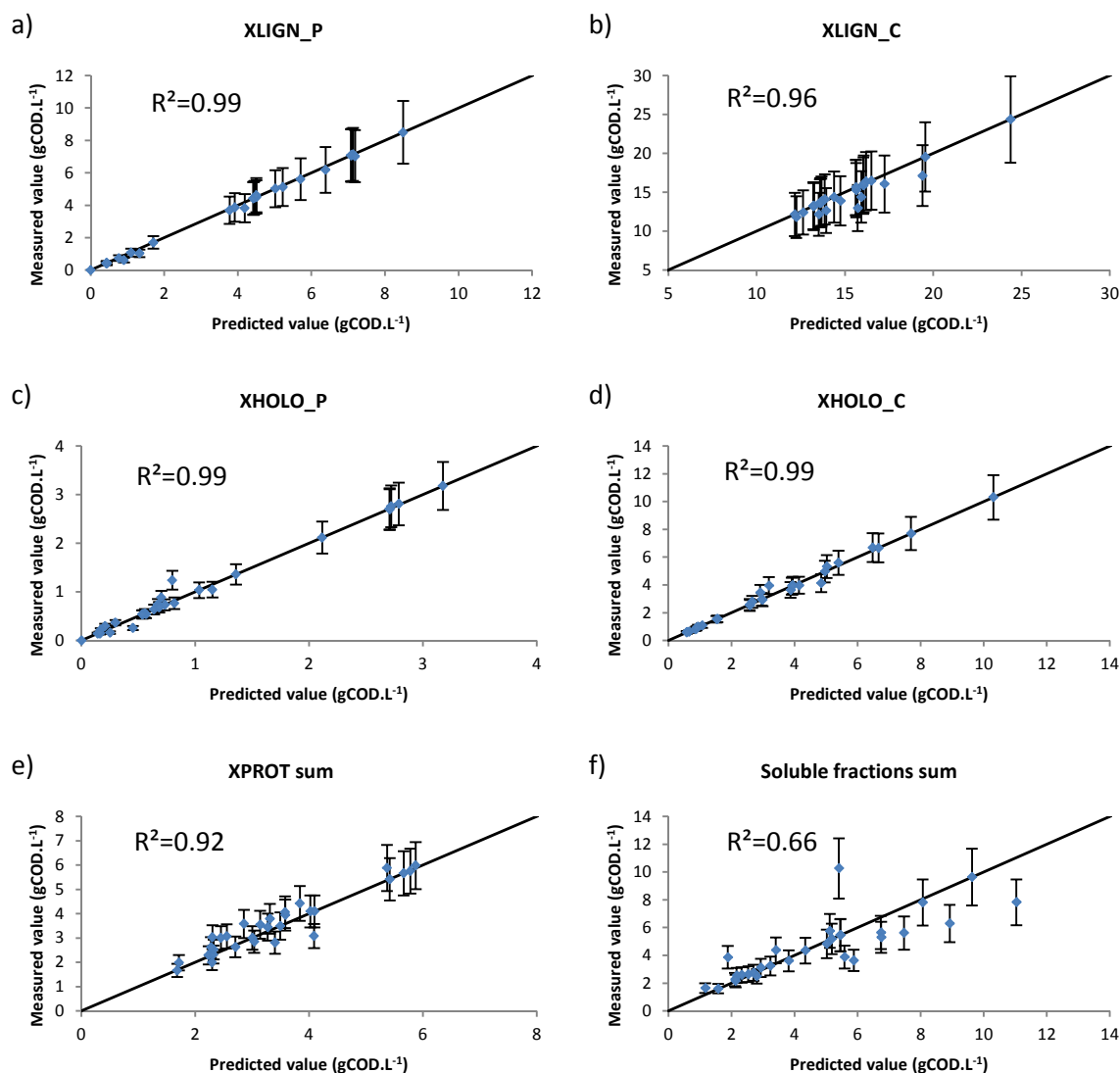


Figure 42: Predicted versus measured values in fractions X_{LIGN_P} (a), X_{LIGN_C} (b), X_{HOLO_P} (c), X_{HOLO_C} (d), sum of $X_{PROT_P} + X_{PROT_C}$ (e) and sum of the soluble fractions (f)

The predicted values showed good correlations with measured values in X_{LIGN_P} , X_{LIGN_C} , X_{HOLO_P} and X_{HOLO_C} with respective coefficients of determination of 0.99, 0.96, 0.99 and 0.99. All the measured values are projected on, or very close to the predicted values described by the line (fig.42). ADMacc thus allows very accurate prediction of the fate of organic nitrogen and carbon in these fractions during anaerobic digestion (final and intermediary values). Nevertheless, the fractionation method requires that total biodegradability of these fractions is previously determined by measuring the materials remaining in the fraction after incubation, which limits the predictability of the model. On the contrary, the method for the determination of the remaining materials in PROT and SOL was only

based on model prediction. Indeed, these fractions are subject to more complex processes than hydrolysis, e.g. complex material solubilization, biomass growth, biomass decay in the PROT fraction and soluble compounds. Hence, the biodegradation tests monitored here did not enable determination of the final inert contents in these fractions. Stoichiometric parameters for inert production associated with these fractions determined by calibration for CF and BS were applied to the substrates in their respective groups. Figure 42e shows that the predicted values are very close to the experimental ones for PROT fraction with a determination coefficient of 0.92. This R^2 is slightly lower than the one found previously due to delayed biomass growth correlated with the lag phase apparent in the methane production curves (fig. 41). The complexity of the process and of the compounds contained in this fraction was evaluated and results support the hypothesis concerning the complexity of this fraction based on observations made by Jimenez et al. (2015). Nevertheless, ADMacc is able to very accurately predict the biodegradability and the evolution kinetics of the PROT fraction during anaerobic digestion.

Regarding the SOL fraction, figure 42f reveals more differences between the predicted and measured values ($R^2 = 0.71$). The inaccurate predictions are mainly due to the lag phase in methane production observed in some incubation tests that is not accurately simulated by the model. In addition, as mentioned in section 2.1 of this chapter, in CF, there is visible accumulation of soluble particulate compounds (X_{SOL_C}) during incubation and the kinetic parameters associated with their transformation are the most sensitive for the prediction of short term methane production. Consequently, inaccuracies in the prediction of changes in the X_{SOL_C} fraction led to slight errors in the prediction of the short-term methane production kinetics, as can be seen in figure 41. Nevertheless, the use of Contois order, as recommended by Vavilin et al. (1996), is justified by the fact that X_{SOL_C} hydrolysis depends on the design of the experimental set up and the concentration of the original biomass.

The evaluation of the ability of ADMacc to predict trends in the bioaccessibility fraction during anaerobic digestion showed that predictions were good for almost all fractions, thereby validating most of the hypotheses in the ADMacc model. Characterization of the inert content in $X_{LIGN_C\&P}$ and

$X_{\text{HOLO_C\&P}}$ is the next step in consolidating ADMacc to improve its predictivity without the need for batch experiments. The use of spectrophotometry could help determine these inert fractions in a limited time as done by Jimenez et al. (2015, 2017).

4. Conclusion

The aim of this study was to develop a predictive model able to estimate methane and ammonium production plus accurate prediction of the bioaccessibility-based fractionation of the digestates. Results were successful for ammonium production and bioaccessibility of the digestate. Simulated methane production was correct and depended on $X_{\text{SOL_C}}$ transformations. The use of Contois kinetics was appropriate to describe these transformations and made it possible to simulate a larger number of biodegradation patterns. To improve the predictability of ADMacc, characterization of the complexity of the X_{LIGN} and X_{HOLO} fractions could enable implementation of the model without inert estimation using incubation tests.

Chapitre 5 : Evaluation expérimentale et numérique de l'impact du temps de séjour de la digestion anaérobie sur la qualité azotée des digestats

Avant-propos

Les suivis de la bioaccessibilité, de la production d'ammonium et de méthane sur le large panel de substrats en batch a permis de mieux comprendre l'impact des caractéristiques azotées des substrats sur leur biodégradation. Les hypothèses proposées, sur la base de ces observations, ont permis de simuler et prédire la qualité azotée des digestats. Cependant, si ces hypothèses sont vraies en condition batch, leur transposition en réacteur continu reste à vérifier. En effet, en conditions réelles, l'acclimatation de la biomasse peut avoir une influence sur les cinétiques de biodégradation du carbone et de l'azote. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'impact du temps de séjour sur la qualité azotée des digestat et d'évaluer les hypothèses utilisées dans le modèle ADMacc en conditions réelles. Les évolutions de la bioaccessibilité du carbone et de l'azote ainsi que la production d'ammonium et de méthane ont été suivies à deux temps de séjours : 28 jours et 48 jours. Ces suivis ont été effectués sur des essais de digestion de 3 mélanges de lisier+ cosubstrat : lisier + déchet d'aliment pour bétail, lisier + ensilage de maïs et lisier + fumier de génisse. Les données expérimentales obtenues ont été utilisées pour ajuster et faire évoluer le modèle précédemment développé.

Ces travaux font l'objet d'un article en cours de soumission à la revue Bioresource Technology, présenté ci-après.

Dynamic modelling of organic nitrogen degradation into anaerobic digestion process: application to the prediction of the effect of HRT.

Y. Bareha^{1,2,3}, J. Chaker¹, M. Dourlens¹, M. Gabaji¹, L. Awhangbo^{1,3}, R. Girault^{1,3} and A. Trémier^{1,3}

¹ Irstea, UR OPAALE, 17 av. de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France

(E-mail : romain.girault@irstea.fr)

² Université Rennes 1, 2 rue du Thabor, CS 46510, 35065 Rennes Cedex, France

³ Université Bretagne Loire, France

Abstract:

Digestate use as fertilizer substitute gain interest as a sustainable use of this anaerobic digestion residue. Its high content of mineralized nitrogen and organic nitrogen, found under the form of ammonium and protein respectively, give it a strong fertilizing value. The aim of this study is to determine the impact of the operating conditions on protein bioaccessibility into the digestates and ammonium production during anaerobic digestion. Hopefully, it will enable the prediction of these parameters using a modified ADM1 that take into account protein and non-protein content bioaccessibility (ADMacc). Experiments were carried out on three continuous stirred reactors treating three influents at two hydraulic retention times: 28 days and 48 days. Results showed higher ammonium concentration and more bioaccessible protein in the digestate at 48 days. ADMacc was successfully calibrated on assays at 48 days of hydraulic retention time. Predictions made on 28 days hydraulic retention time showed good result on ammonium production and protein bioaccessibility.

Highlights:

- Ammonium concentration increased with increasing hydraulic retention time.
- Protein bioaccessibility significantly increased with high hydraulic retention time.
- Kinetic of hydrolysis processes were dependent of substrate initial biodegradation.
- Methane production and non-protein bioaccessibility were decently predicted.
- Ammonium concentration and protein bioaccessibility were successfully predicted.

Keywords: anaerobic digestion, hydraulic retention time, modelling, modified ADM1, bioaccessibility

Abbreviations

ADM1: anaerobic digestion model n°1

ADMacc: anaerobic digestion model based on bioaccessibility

TS: total solids

VS: volatile solids

COD: chemical oxygen demand

TKN: total Kjeldhal nitrogen

TOC: total organic carbon

BMP: biomethane potential

ANMP: anaerobic nitrogen mineralization potential

VFA: volatile fatty acids

SOL_{COD}: COD extracted by SOL (gCOD.kg⁻¹)

PROT_{COD}: COD extracted by PROT (gCOD.kg⁻¹)

HOLO_{COD}: COD extracted by HOLO (gCOD.kg⁻¹)

LIGN_{COD}: COD remaining in LIGN (gCOD.kg⁻¹)

SOL_N: organic nitrogen extracted by SOL (gN.kg⁻¹)

PROT_N: organic nitrogen extracted by PROT (gN.kg⁻¹)

HOLO_N: organic nitrogen extracted by HOLO (gN.kg⁻¹)

LIGN_N: organic nitrogen remaining in LIGN (gN.kg⁻¹)

SOL_C: non-protein content of SOL fraction (kgCOD.m⁻³)

PROT_C: non-protein content of PROT fraction (kgCOD.m⁻³)

HOLO_C: non-protein content of HOLO fraction (kgCOD.m⁻³)

LIGN_C: non-protein content of LIGN fraction (kgCOD.m⁻³)

SOL_P: protein content of SOL fraction (kgCOD.m⁻³)

PROT_P: protein content of PROT fraction (kgCOD.m⁻³)

HOLO_P: protein content of HOLO fraction (kgCOD.m⁻³)

LIGN_P: protein content of LIGN fraction (kgCOD.m⁻³)

N_{PROTEIN}: Nitrogen content in protein (10.2 gN.gCOD⁻¹)

- X_{SU-H2} : State variable relative to biomass concentration (kgCOD.m^{-3})
- X_C : Composite fraction of organic matter (kgCOD.m^{-3})
- X_{LIGN_P} : State variable relative to protein content of LIGN fraction (kgCOD.m^{-3})
- X_{HOLO_P} : State variable relative to protein content of HOLO fraction (kgCOD.m^{-3})
- X_{PROT_P} : State variable relative to protein content of PROT fraction (kgCOD.m^{-3})
- X_{LIGN_C} : State variable relative to non-protein content of LIGN fraction (kgCOD.m^{-3})
- X_{HOLO_C} : State variable relative to non-protein content of HOLO fraction (kgCOD.m^{-3})
- X_{PROT_C} : State variable relative to non-protein content of PROT fraction (kgCOD.m^{-3})
- $X_{I_LIGN_P}$: State variable relative to inert protein content of LIGN fraction (kgCOD.m^{-3})
- $X_{I_HOLO_P}$: State variable relative to inert protein content of LIGN fraction (kgCOD.m^{-3})
- $X_{I_PROT_P}$: State variable relative to inert protein content of PROT fraction (kgCOD.m^{-3})
- $X_{I_LIGN_C}$: State variable relative to inert non-protein content of LIGN fraction (kgCOD.m^{-3})
- $X_{I_HOLO_C}$: State variable relative to inert non-protein content of HOLO fraction (kgCOD.m^{-3})
- $X_{I_PROT_C}$: State variable relative to inert non-protein content of PROT fraction (gCOD.L^{-1})
- $S_{I_SOL_P}$: State variable relative to inert soluble nitrogen compounds (kgCOD.m^{-3})
- $S_{I_SOL_C}$: State variable relative to inert soluble carbon compounds concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{I_BIO} : State variable relative to inert produce by biomass concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{AA} : State variable relative to amino-acid concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{SU} : State variable relative to sugars concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{FA} : State variable relative to fatty acid concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{VA} : State variable relative to valerate concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{BU} : State variable relative to butyrate concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{PRO} : State variable relative to propionate concentration (kgCOD.m^{-3})
- S_{AC} : State variable relative to acetate concentration (kgCOD.m^{-3})
- G1 substrates: substrate with a NH_4^+/TKN ratio below 30%
- G2 substrates: substrates with a NH_4^+/TKN ratio above 30%

1. Introduction

Agro-industrial and agricultural waste treatment via anaerobic digestion for energy production has strongly increased. The treatment of this waste generates a biogas that is used for energy production and a digestate. The digestate is the residue after waste digestion and it is used for organic fertilization by spreading on fields. High concentrations of available nitrogen, whether under mineral or organic form, are present in digestates. Due to the high fertilizing properties brought by nitrogen, digestates are good candidates to replace mineral fertilizers for crop fertilization and reach autonomy in terms of nitrogen input for farms (Alburquerque et al., 2012; Mekki et al., 2017; Müller-Stöver et al., 2016). However, the high concentration of ammonium in digestates disables a proper mineral fertilizer substitution due to various potential leaks such as nitrate lixiviation and ammonia volatilization (Möller, 2015; Möller and Müller, 2012). Better understanding of nitrogen transformations during anaerobic digestion is compulsory to enhance mineral fertilizers replacement by optimizing nitrogen composition of the digestate.

During anaerobic digestion of substrates, organic nitrogen, mainly represented by proteins, is hydrolyzed into aminoacid and desaminated during acidogenesis to produce ammonium and volatile fatty acids (Ramsay and Pullammanappallil, 2001). The balance sheet of these transformations is observed by the produced ammonium remaining and depends on the substrate. Indeed, Bareha et al. (2018) showed that when a biological treatment is applied to the substrate prior to the anaerobic digestion, the substrate's organic nitrogen is less biodegradable resulting in a weak ammonium production. In addition Bareha et al. (n.d.) highlight that organic nitrogen mineralization is strongly limited by disintegration and hydrolysis of complex compounds that contain nitrogen. Biodegradation of these compounds can be impacted by the hydraulic retention time of the digester even if few data the effect of this parameter on nitrogen mineralization are available. The only available data concern a very specific substrate, sea-weeds, for which Kobayashi et al. (2014) showed that ammonium biodegradation varies significantly with HRT which impact digestate fertilizing value. In addition, no data are available to investigate the impact of HRT on the characteristic of organic nitrogen linked with its availability for crops, such as its bioaccessibility. Bioaccessibility is described as the

substrate's compound that microorganisms can access for biodegradation (Bareha et al. 2018). Bioaccessibility of organic nitrogen and its evolution during anaerobic digestion was monitored by Bareha et al. (n.d.) but the effect of HRT of the digester on these characteristics was not studied. These studies help understand organic nitrogen transformations, but the lack of knowledge regarding organic nitrogen transformation in Continuously Stirred Tank anaerobic Reactor (CSTR) does not allow the optimization of the digester design (HRT in particular) according to the digestate fertilizing value. Indeed, to allow this optimization, the prediction of digestate nitrogen properties (ammonium concentration, organic nitrogen concentration and bioaccessibility) is necessary. The use of the modelling tool for monitoring and predicting digestate quality during anaerobic digestion can address to this objective.

Various models describing anaerobic digestion are available and the most used is ADM1 (Batstone et al., 2002). This model is commonly modified to simulate methane production on various types of substrates (Galí et al., 2009; Mottet et al., 2013; Polizzi et al., 2017; Rousseau et al., 2008). However, this model doesn't allow simulation of digestate bioaccessibility as it was developed for simulation of methane production (Jimenez et al., 2016). Hence, an ADM1 based model, ADMacc, was developed (i) to take into account the impact of bioaccessibility of protein and non-protein compounds in the substrates on degradation kinetic patterns and (ii) to allow a combined simulation of methane, ammonium and bioaccessibility of protein and non-protein compounds in the digestate (Bareha et al., n.d.). This model, based on the EPS fractionation developed by Jimenez et al. (2015) showed good prediction abilities on various substrates under batch experiments but was not calibrated and evaluated on continuous stirred tank reactors and on different HRT. Yet, the use of this model could help better optimize digestate composition within operating parameters of the digester.

The objective of this study is to understand and simulate, using ADMacc, the impact of the hydraulic retention time on the ammonium production and organic nitrogen bioaccessibility. To this purpose, the HRT impact on ammonium and bioaccessibility of organic compounds in the digestate was investigated using three CSTR processing three different influents representing the substrate diversity

according to Bareha et al. (2018) and operated at two different HRT. Then, ADMacc was calibrated on the higher HRT for kinetic and stoichiometric parameters determination. The calibrated ADMacc was finally evaluated on the same influents but at a lower HRT to validate its ability for digestate composition prediction according to operating conditions.

2. Material and methods

2.1. Influent composition

The influents used during this study were made of pig slurry mixed with a co-substrate. Pig slurry was collected in a pig breeding farm in Brittany, France, after on-site centrifugation. Co-substrates were collected in two different sites located in Brittany, France. Cattle feed waste (CF) and maize silage (MS) were collected in an anaerobic digestion plant. Heifer manure (HM) was collected in a dairy farm. Co-substrates were selected to represent the diversity of substrates found on agricultural anaerobic plants with crop residues, manures and agro-industrial waste. Pig slurry was stored at 4°C and co-substrates were stored at -20°C. Three influents, constituted by a mix of pig slurry with each co-substrate, were made and their composition remained stable during the experiments. The mixing proportions of pig slurry and co-substrate were calculated to reach a volatile solid concentration target of 60 gVS.kg⁻¹ and the mix was homogenized using a Robotcoupe® MP-450 mixer prior to feeding the reactors. Characteristics of the co-substrates and the influents are presented table 24.

Table 24: Physicochemical characteristics of the substrates and influents used.

Sample	TS (g _{TS} .kg ⁻¹)	VS (g _{VS} .kg ⁻¹)	COD (gO ₂ .kg ⁻¹)	TOC (gC.kg ⁻¹)	TKN (gN.kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (gN.kg ⁻¹)	Proteins (%C)	C/N (gC/gN)	BMP (NmL.kg ⁻¹)	ANMP (gN.kg ⁻¹)
Cattle feed waste (CF)	800.9 ± 11.8	751.9 ± 0.7	1206.2 ± 26.0	365.1 ± 7.9	21.6 ± 1.8	0.8 ± 0.0	21% ± 4%	16.9 ± 3.0	300.4 ± 2.81	13.98 ± 9.04
Maize silage (MS)	298.8 ± 16.2	289.8 ± 5.3	368.7 ± 16.6	123.7 ± 5.6	3.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	9% ± 1%	39.1 ± 2.6	118.5 ± 0.24	-0.18 ± 0.06
Heifer manure (HM)	189.2 ± 9.5	155.0 ± 4.0	225.1 ± 3.4	65.8 ± 1.0	4.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	19% ± 1%	16.6 ± 1.0	36.1 ± 0.16	1.00 ± 0.64
Pig slurry (PS)	9.1 ± 0.0	4.3 ± 0.2	12.4 ± 0.3	2.6 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.5 ± 0.0	32% ± 1%	1.5 ± 0.1	0.4 ± 0.01	0.20 ± 0.09
I1 (CF + PS)	70.0 ± 0.6	61.8 ± 1.5	90.7 ± 6.7	28.7 ± 1.7	3.4 ± 0.3	1.6 ± 0.1	23% ± 4%	8.4 ± 3.8	23.5 ± 0.22	1.26 ± 0.78
I2 (MS + PS)	67.1 ± 1.0	61.4 ± 1.3	95.0 ± 8.2	30.8 ± 2.3	2.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	13% ± 2%	13.2 ± 5.6	24.0 ± 0.05	0.12 ± 0.09
I3 (BM + PS)	78.4 ± 2.2	62.2 ± 2.9	108.2 ± 20.5	34.7 ± 1.9	3.2 ± 0.3	1.1 ± 0.1	23% ± 3%	10.7 ± 4.7	14.1 ± 0.06	0.51 ± 0.30

2.2. Physico-chemical analysis

Total solids (TS), volatile solids (VS), total chemical oxygen demand (COD), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and total ammonia nitrogen were measured according to standard methods (APHA, 2005). TKN and ammonia concentrations were determined by distillation method (after mineralization step for TKN). Total carbon, inorganic carbon on the substrates ashes and total nitrogen were measured by elemental analysis according to the manufacturer's instructions (Thermoflash 2000, Thermoscientific®). Total organic carbon (TOC) was determined by subtracting inorganic carbon (IC) from total carbon (TC). Volatile fatty acids (VFAs) were measured on soluble extracted using high-performance liquid chromatography using UV spectroscopy and evaporation light scattering detector (ELSD).

BMP and ANMP were monitored according to Vedrenne et al. (2008) and Bareha et al. (2018), respectively. These biodegradability tests were performed using 572 ml bottles in triplicate at 38 °C with an substrate:inoculum ratio of 1 gVS.gVS⁻¹. The incubations tests lasted for 40 days. TC, TKN, NH₄⁺ and biogas production were measured before and after incubations to determine carbon and nitrogen mass balance continuity during the monitoring. Methane and carbon dioxide were measured in the biogas using gas chromatography (Varian®). Whatever the tests, mass balances errors were between -8 and 10% for both BMP and ANMP tests.

2.3. Bioaccessibility characterization.

Bioaccessibility was determined using the modified EPS fractionation method inspired by (Jimenez et al., 2017, 2015) and adapted by Bareha et al. (2018). This method consists of four sequential chemical extractions using solvent with an increasing alkalinity ending with a strong acid extraction. Extractions were performed on 0.5 gTS equivalent of raw sample mixed using a Philips® mixer *on smoothie mode*. Four fractions were determined:

SOL: Raw sample is washed 4 times with 30ml of CaCl₂ 10mM solution during 1 hour at 30°C.

The mix is stirred at 300rpm then centrifuged to recover the supernatant and the remaining pellet.

PROT: The remaining pellet is washed 4 times with 30 ml of NaCl + NaOH solution during 15 minutes at 30°C and the remaining is then washed 4 times with 30ml of NaOH solution during one hour at 30°C. The mixes are also stirred at 300rpm and centrifuged at 12100g to recover the supernatant and the remaining pellet.

HOLO: The remaining pellet from the previous extraction is washed 3 times with 25ml of H₂SO₄ acid (72% w/w) at 30°C. The non-soluble is separated by filtration of the solution and both phases are recovered.

LIGN: Composed of the remaining materials of the sequential extractions, it includes the compounds that were not dissolved by the previous extractions.

COD, COT and TKN are measured on the supernatant recovered at the end of each extraction step using COD test tubes (LCK514, Hach-Lange®) for COD and liquid elemental analysis for TOC and TN (TOC-L, Shimadzu®). COD, COT and TKN content of the LIGN fraction are determined by subtracting the COD, TOC and TN content of the fraction SOL, PROT and HOLO of the values measured for the raw substrate. Analyses were performed in triplicate. Protein and non-protein content were calculated according to Girault et al. (2012) using equation (19) and (20):

$$\text{Protein}_{\text{fraction}} (\text{gCOD.kg}^{-1}) = 10.2 \text{ gO}_2/\text{gN} * (\text{TKN}_{\text{fraction}} - \text{NH}_4^+_{\text{fraction}}) \quad (19)$$

$$\text{Non-protein}_{\text{fraction}} (\text{gCOD.kg}^{-1}) = \text{COD}_{\text{fraction}} - \text{Protein}_{\text{fraction}} \quad (20)$$

Bioaccessibility characterization is provided for the substrate used in table 25.

Table 25: Distribution of protein and non-protein compounds into the fractions.

Sample	Non-protein				Protein			
	SOL (gO ₂ .kg ⁻¹)	PROT (gO ₂ .kg ⁻¹)	HOLO (gO ₂ .kg ⁻¹)	LIGN (gO ₂ .kg ⁻¹)	SOL (gO ₂ .kg ⁻¹)	PROT (gO ₂ .kg ⁻¹)	HOLO (gO ₂ .kg ⁻¹)	LIGN (gO ₂ .kg ⁻¹)
CF	88.6	117.4	387.8	400.0	24.1	61.2	25.9	101.3
MS	48.4	54.2	167.0	68.9	12.6	4.2	0.1	13.4
HM	13.5	45.9	65.9	58.5	1.4	8.5	3.8	27.7
Pig slurry	1.6	3.4	2.5	0.0	0.0	2.4	1.8	0.6
I1	10.9	15.9	12.3	40.0	0.8	2.7	4.4	9.3
I2	10.6	23.8	22.8	28.8	2.8	3.0	2.7	2.5
I3	14.3	21.2	21.5	38.9	3.7	3.5	5.1	9.2

*: ammonium is not included in this fraction

2.4. CSTR experiments

Three continuous stirred-tank reactors (CSTR) were used to monitor anaerobic digestion assays on the three influents described in section 2.1 of this chapter. These reactors were operated under mesophilic conditions using a temperature regulation fixed at 37°C. The working volume of the reactor was fixed at 75L for a total volume of 150L. Biogas production was monitored using a gas counter for each reactor. pH and redox potential were monitored using immersive probes into the reactor in order to check whether the process was operating without inhibitions by oxygen and pH. During the experiments, pH remained stable between 7.2 and 7.6 and the redox potential was always below -500mV highlighting no oxygen penetration.

Anaerobic digestion experiments were done with two hydraulic retention times: 28 days and 48 days. Operating parameters are presented table 26. Feeding was operated twice a week. After three times the HRT, biogas production, methane production, digestate quality including COD, TOC, TKN, NH_4^+ , VFAs and bioaccessibility, were measured during a month to ensure process stabilization and to characterize the biogas production and digestate properties at the steady state. Then, an influent pulse, equal to two times the normal feeding, was done. It ensures significant variations of the digestate properties (ammonium concentration and protein and non-protein bioaccessibility) after the pulse to determine kinetic parameters. Evolutions of the different compounds mentioned were monitored until the biogas production and digestate quality reached the steady-state level.

Table 26: Operating parameters.

HRT (days)	Organic load (kgVS.m ⁻³ .j ⁻¹)	Temperature (°C)	Working volume (m ³)	Feed rate (m ³ .week ⁻¹)
28	2.3	38	0.100	0.026
48	1.3	38	0.088	0.013

2.5. Modeling methane production, ammonium production and bioaccessibility

2.5.1. ADMacc model description

ADMacc (Bareha et al., n.d.) was adapted from ADM1 (Batstone et al., 2002) by adding new variables relative to bioaccessibility according to the EPS fractionation. ADMacc is a model that allows the modeling of methane production, ammonium production and bioaccessibility of COD/C/N of organic matter in the digestate. These new variables were numbered up to 15 in replacement (fig.43) of the 6 variables relative to disintegration and hydrolysis in ADM1 (composite X_C , carbonates X_{CH} , lipids X_{LI} , protein X_{PR} , particulate inert X_I and soluble inert S_I).

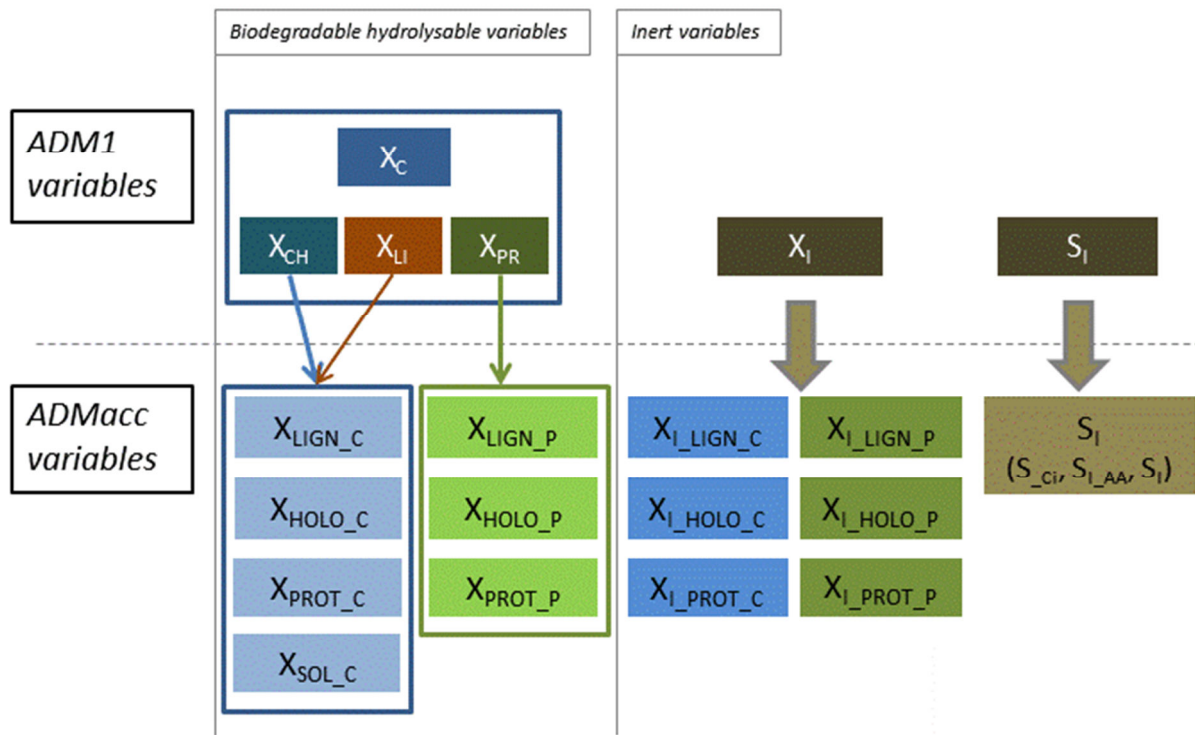


Figure 43: Modifications brought to ADM1 in ADMacc.

The variables relative to soluble compounds are similar to the ones describe in ADM1; so do the associated processes and kinetics. The processes and kinetics associated with the newly added variables are represented in the Peterson matrix along with the process scheme (see supplementary data). According to Bareha et al. (n.d.), the hydrolysis of $X_{LIGN_C\&P}$, $X_{HOLO_C\&P}$ and $X_{PROT_C\&P}$ follow a

first order kinetic as the biodegradation is due to hydrolysis limited by bioaccessibility. X_{SOL_C} is the only variable following a Contois order for hydrolysis. This specificity is due to the fact that non-protein compounds in soluble fraction are highly bioaccessible, hence hydrolysis is mainly limited by the hydrolytic biomass concentration. Inerts $X_{I_LIGN_C\&P}$ and $X_{I_HOLO_C\&P}$ are assumed to be already present in the fraction while inerts $X_{I_PROT_C\&P}$ and $S_{I_AA\&C\&BIO}$ are respectively produced by biomass decay and inert transfer from PROT fraction and decayed biomass.

ADMacc model was implemented in Scilab 5.5.2® and solved with the ordinary differential equation solver “ode” (package ODEPACK).

2.5.2. Modelling method

The methodology used during this study to calibrate and evaluate ADMacc is presented in figure 44. ADMacc was used to simulate steady-state experiments and degradation dynamics following a substrate pulse experiments. Hence, this method combines steady-state modelling and dynamic modelling (modelling of degradation kinetics after the substrate pulse).

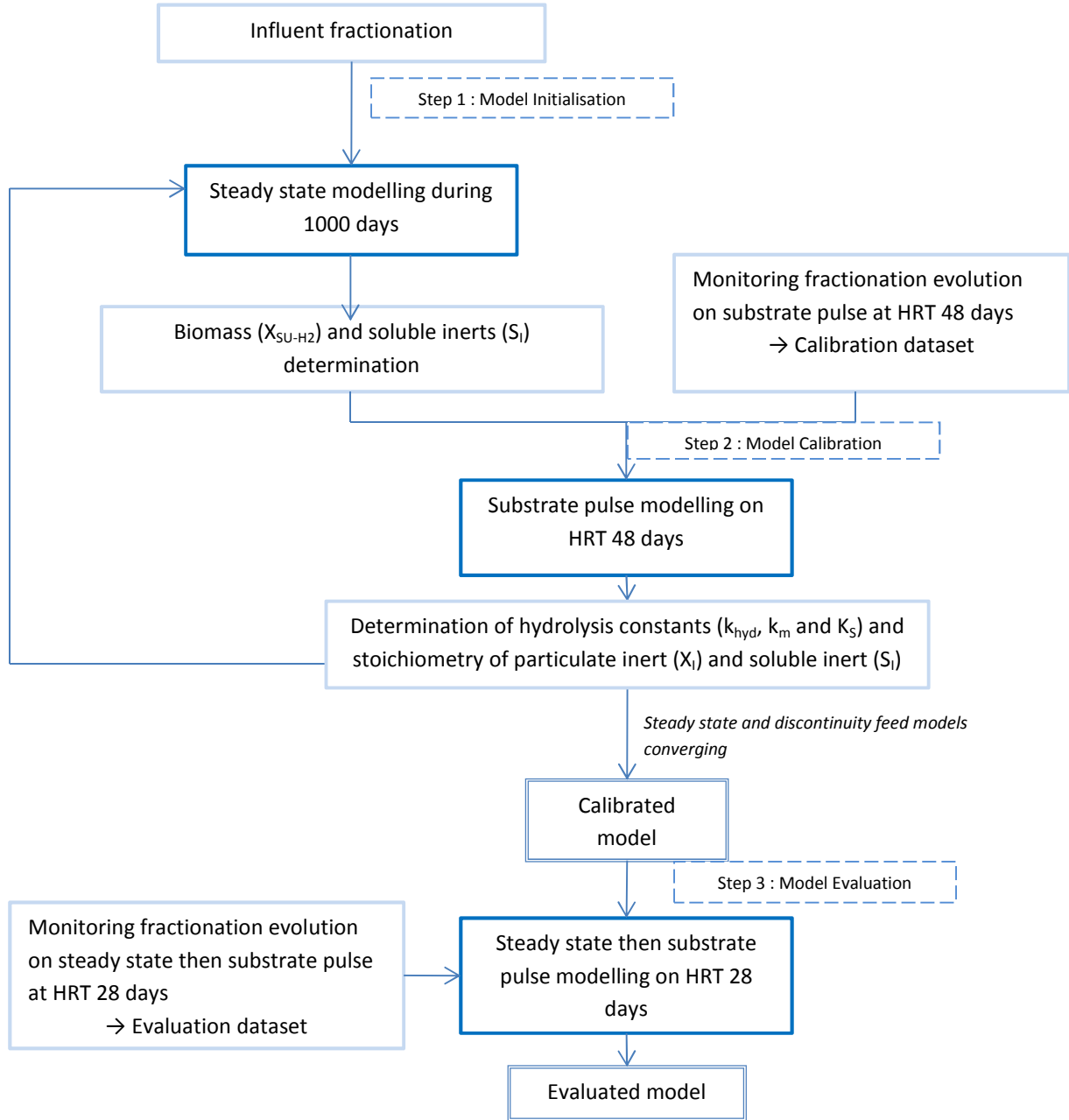


Figure 44: Modelling methodology used for this study.

2.5.2.1. Influent fractionation

Methodology used to initialize the model state variable is presented in table 27. Various hypotheses, determined by Bareha et al. (n.d.), were used to fractionate the influent. Inerts $X_{I_PROT_C\&P}$ and $S_{I_AA\&C\&BIO}$ were considered to be equal to 0 because they are biodegradation by-products. Inerts $X_{I_LIGN_C\&P}$ and $X_{I_HOLO_C\&P}$ were determined by calibration on the evolution of respectively $X_{LIGN_C\&P}$ and $X_{HOLO_C\&P}$.

Biodegradable parts of these fractions were determined by difference between the total amount of protein and non-protein content in the fraction ($X_{LIGN_C\&P}$ and $X_{HOLO_C\&P}$) and the inert in these fractions ($X_{L_LIGN_C\&P}$ and $X_{L_HOLO_C\&P}$). X_{SOL_C} was determined by subtracting the aminoacid S_{AA} , lipids S_{fa} and VFA (S_{VA} , S_{BU} , S_{PR} , S_{AC}) from SOL COD. Sugars were assumed to be equal to 0.

Table 27: Method used for influent characterization aiming model initialization.

State variable	Variable ADMacc	Type	Method of determination
Particulate	X_{LIGN_P}	Hydrolysable protein	$X_{LIGN_P} = (LIGN_N - LIGN_{N_INERT}) * 10.2$
	X_{HOLO_P}		$X_{HOLO_P} = (HOLO_N - HOLO_{N_INERT}) * 10.2$
	X_{PROT_P}		$X_{PROT_P} = PROT_N * 10.2$
	X_{LIGN_C}	Hydrolysable carbon	$X_{LIGN_C} = LIGN_{COD} - X_{LIGN_P} - LIGN_{COD_INERT}$
	X_{HOLO_C}		$X_{HOLO_C} = HOLO_{COD} - X_{HOLO_P} - HOLO_{COD_INERT}$
	X_{PROT_C}		$X_{PROT_C} = PROT_{COD} - X_{PROT_P}$
	X_{SOL_C}		$X_{SOL_C} = SOL_{COD} - (S_{SU} + S_{FA} + S_{AA} + S_{VA} + S_{BU} + S_{PRO} + S_{AC})$
	$X_{L_LIGN_P}$	Inert protein	Model calibration
	$X_{L_HOLO_P}$		Model calibration
	$X_{L_PROT_P}$		Not measured
	$X_{L_LIGN_C}$	Inert carbon	Model calibration
	$X_{L_HOLO_C}$		Model calibration
	$X_{L_PROT_C}$		Not measured
Soluble	$S_{L_SOL_P}$	Inert soluble	Not measured
	$S_{L_SOL_C}$		Not measured
	S_{AA}		$S_{AA} = SOL_N * 10.2$
	S_{SU}		Not measured
	S_{FA}		$S_{FA} = (f_{SOL_SFA}) * (SOL_{COD} - S_{AA})$
	S_{VA}	Soluble transformed	Monitoring by HPLC
	S_{BU}		
	S_{PRO}		
	S_{AC}		

2.5.2.2. Model calibration

During this study, ADMacc was calibrated on 48 days HRT assays. Active biomass and soluble inert concentrations were determined by simulating each reactor at steady-state. Simulation time was set to 1000 days to ensure system convergence. Active biomass and soluble inert concentrations were then used to initialize state-variables for substrate pulse simulation. Calibrations of kinetic and stoichiometric parameters were done on this monitoring. After calibration, new parameters were used for steady-state simulation and a new calibration of parameters is operated on the experimental results

obtained after the substrate pulse. This process is operated until the model allows an accurate simulation of steady-state results. First order parameters and Contois order parameters regarding hydrolysis were calibrated on each respective fraction dynamic. These kinetic parameters were calibrated automatically using the Simplex method (*fminsearch* function in Scilab 5.5.2®) in order to minimize the sum of the squared error between the experimental curve and the simulated curve.

Parameter identifiability was investigated on stoichiometric and kinetic parameters associated to desintegration and hydrolysis steps. To this purpose, parameter uncertainties were determined by applying a F distribution to the parameter with a confidence interval of 95% as detailed in (Batstone et al., 2003). Hence, uncertainty was evaluated on couples of parameters calibrated on each calibrated fraction. A surface response was obtained for each couple. This parameter response surface is defined is all the parameter sets that allow to obtained an objective fonction (J, equal to the sum of the squared error between the experimental curve and the simulated curve) inferior to a critical value (J_{crit}). Critical value of the objective function is calculated from the optimal objective function (J_{opt}), defined as the minimum sum of the squared error between the experimental curve and the simulated curve found by automatic calibration. J_{crit} expression is described in equation (21):

$$J_{crit} = J_{opt} \left(1 + \frac{p}{N_{data} - p} * F_{0.05, p, N_{data} - p} \right) \quad (21)$$

Where :

- p: the number of calibrated parameters
- N_{data} : the number of data points
- $F_{0.05, p, N_{data} - p}$: F distribution value for a 95% confidence interval for p parameters and $N_{data} - p$ degrees of freedom.

In addition to identifiability assessment for new stoichiometric and kinetic parameters, these results will highlight if differences obtained between calibrated parameters obtained for each assay are significant or not. Hence, these data will show if a common set of kinetic and stoichiometric parameters can be applied for all the assays or not.

2.5.2.3. *Model evaluation*

Evaluation of ADMacc predictability was done by simulate experimental results obtained with an HRT of 28 days (steady-state and degradation dynamics following the substrate pulse) assays by applying the previously calibrated stoichiometric and kinetic parameters. Calibration performances were assessed regarding the ability of the calibrated model to predict methane production, ammonium concentration and digestate bioaccessibility.

3. Results and discussion

3.1. Impact of the hydraulic retention time on methane and ammonium production at steady-state.

The daily methane and ammonium production in each reactor were determined and compared to the maximum production according to BMP and ANMP measures to obtain BMP and ANMP yields (Y_{BMP} and Y_{ANMP} , respectively). Table 28 presents these experiment results obtained for each influent with HRT of 28 and 48 days.

Table 28: Effect of HRT on methane and ammonium production at steady-state.

Influent	HRT (d ⁻¹)	Methane (%)	Methane productivity (Nm ³ .t ⁻¹ .j ⁻¹)	Organic carbon biodegraded (%C-org)	Y_{BMP}^* (%BMP)	Ammonium productivity (kgN.t ⁻¹ .j ⁻¹)	Organic nitrogen biodegraded (%N-org)	Y_{ANMP}^{**} (%ANMP)
I1	28	62	1.02	70%	80%	0.037	47%	62%
	48	57	0.49	79%	100%	0.023	62%	90%
I2	28	60	0.85	62%	87%	-0.001	0%	-2%
	48	59	0.51	75%	100%	0.0017	10%	85%
I3	28	55	0.43	35%	73%	0.02	24%	101%
	48	55	0.21	38%	75%	0.011	26%	110%

*: Methane production considered as the percentage of the BMP value reached in the reactor.

**: Ammonium production considered as the percentage of the ANMP value reached in the reactor.

3.1.1. Methane production

With an HRT of 28 days, the methane and productions did not reach BMP values, respectively. Indeed, Y_{BMP} is equal to 81%, 86% and 74% for I1, I2 and I3 respectively. HRT increase to 48 days leads to a significant increase of Y_{CH_4} only for I1 (pig slurry + cattle feed waste) and I2 (pig slurry + maize silage). Indeed, Y_{BMP} of the influent increased from 81% to 100% for I1, from 86% to 100% for I2 and stayed stable for I3 (pig slurry + heifer manure). These results highlight that, in the HRT range considered, the impact of HRT on methane production is significant only for cattle feed waste and maize silage.

3.1.2. Ammonium production

With an HRT of 28 days, results highlight a significant mineralization of organic nitrogen for I1 (47%_{Norg}) and I3 (24%_{Norg}). Hence, for then, substrates, organic nitrogen mineralization reach 62 and

101% of the ANMP value, for I1 and I2, respectively. For I2, no significant apparent organic nitrogen mineralization or ammonium assimilation is observed, corresponding to almost 0% of ANMP value of the influent. When the HRT value increases to 48 days, apparent organic nitrogen mineralization significantly increases for I1 (+15% of organic nitrogen mineralized, reaching 90% of the ANMP value) and I2 (+10% of organic nitrogen mineralized, reaching 85% of the ANMP value). For I3, in the HRT range considered, no significant impact of the HRT is observed with an apparent organic nitrogen mineralization which remains quite stable at 26%_{Norg}. As reported by (Kobayashi et al., 2014) for seaweeds, HRT increase significantly impact methane and ammonium production in the reactor. Nevertheless, this impact is strongly substrate-dependent. Observed trends cannot be correlated with bioaccessibility of influents. However, as shown in table 28, significant impact of HRT value on apparent organic nitrogen mineralization is only observed for substrates with high carbon biodegradation (I1 and I2). Indeed, for these substrates, more significant biomass growth occur which lead to ammonium assimilation, in comparison to I3. Hence, biomass decay that can occur at high HRT, lead to more significant mineralization of organic nitrogen contained in biomass for I1 and I2 than for I3, which can partially explain the substrate-dependent effect of HRT.

3.1.3. Effect of co-substrates on methane and ammonium production

Methane and ammonium productions strongly depend on the co-substrates added to the pig slurry. Indeed, CF, MS and BM respectively represented 98%, 80% and 82% of the carbon brought by the influent. Thus, methane production due to pig slurry is negligible. Organic nitrogen brought by the substrates is respectively equal to 88%, 54% and 60% of the nitrogen content of the mix. I1 and I2 produce the same amount of methane while I3 produces less. On the other hand, I1 leads to high ammonium production while I2 and I3 present low ammonium production. Two main reasons explain these disparities in methane and ammonium production: substrate NH_4^+/NTK and substrate C/N ratio.

CF is the most biodegradable substrate according to BMP and ANMP. According to Bareha et al. (2018) this substrate, according to its low NH_4^+/NTK ratio, did not go through a storage process that affected BMP and ANMP. Thus, the ammonium produces by I1 is due to CF at 85% and to pig slurry at 15% (calculation based on ANMP values). BM, in opposition, presents low BMP and ANMP in

addition to a high NH_4^+/NTK ratio. This ratio do not exceed 30% as found by Bareha et al (2018), however, as a manure, it presents similarities with substrates with high NH_4^+/TKN ratio according to the low ANMP found. Consequently, only 33% of the ammonium produced by I3 was due to mineralization of BM organic nitrogen. Regarding MS substrate, BMP is high while ANMP is low. This substrate has a low NH_4^+/TKN ratio which match with a high ANMP. However, its C/N ratio is high (39.9) highlighting a low quantity of organic nitrogen brought by the substrate. Indeed, major part of the organic nitrogen mineralized in I2 is from pig slurry. Consequently, mineralization of organic nitrogen from substrates is significantly balanced by ammonium assimilation by biomass for growth due to the high organic carbon available for biodegradation (Yen and Brune, 2007). According to these results, the typology developed by Bareha et al. (2018) could be improved by taking into account C/N ratio and by discriminating manures from other substrates.

3.2. Impact of the hydraulic retention time on bioaccessibility fractions.

EPS fractionation was applied to the influents and the digestates from influent digestion at HRT 28 and 48 days. Results of the fractionation of non-protein and protein contents in influents and digestates are presented in figure 45.

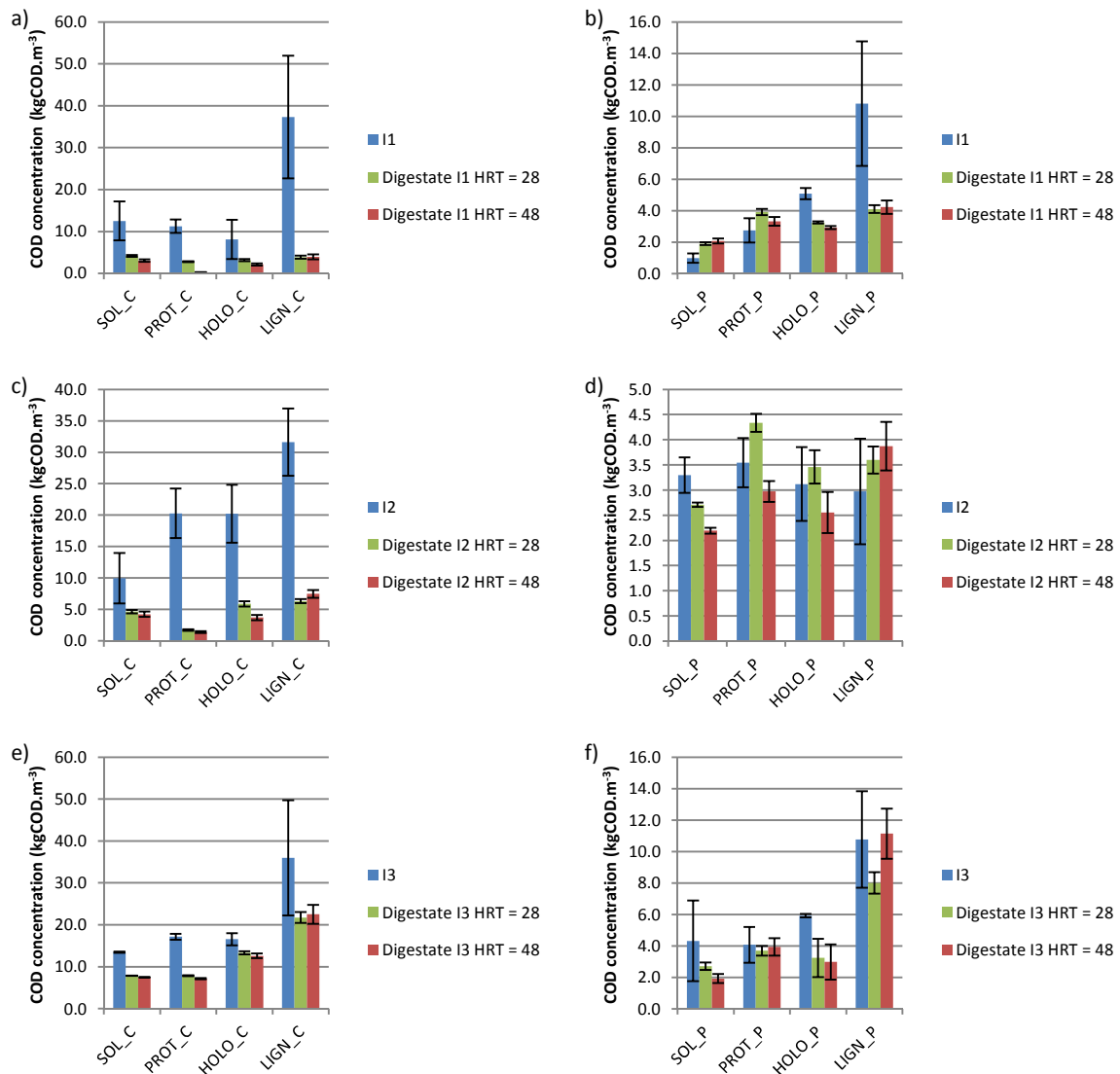


Figure 45: Non-protein reduction for I1 (a), I2 (c), I3 (e) and protein reduction for I1 (b), I2 (d), I3 (f) according to bioaccessibility at HRT 28 and 48 days.

Almost all non-protein fractions are biodegraded but its range of biodegradation strongly depends on the influent and the HRT considered. Nevertheless, when the HRT raises, significant increase in the biodegradation of some fractions is observed only for I1 and I2. These results comply with the effect of HRT on the methane production. .

SOL_C fraction was reduced by 67%, 53% and 42% for I1, I2 and I3 respectively at an HRT of 28 days. This reduction was slightly more important at an HRT of 48 days with 76% of reduction for I1 but no significant difference is when the HRT increases for I2 and I3. PROT_C fractions were reduced by 75%, 92% and 54% at an HRT of 28 days and 97%, 93% and 58% at an HRT of 48 days for respectively I1, I2 and I3. HOLO_C is reduced by 61%, 71% and 20% at an HRT of 28 days and reduced by 74%, 82% and 24% at an HRT of 48 days for respectively I1, I2 and I3. Finally, LIGN_C was reduced by 90%, 80% and by 40% for both HRT.

Regarding protein content in these fractions, the statement is different. Indeed, the protein reduction is not significantly different in most fractions, except for I1. I2 shows significant variations only in SOL_P and PROT_P fractions. For I3, only SOL_P and HOLO_P significantly vary. Indeed, for I2, SOL_P fraction is reduced by 18% for an HRT of 28 days and 33% for an HRT of 48 days. On the other hand, PROT_P increases by 22% with an HRT of 28 days and remains at the influent value for an HRT of 48 days. For I3, SOL_P is reduced by 37% and 56% at respectively HRT of 28 and 48 days. These values reach 45% and 50% for HOLO_P. For I1, no significant impact of HRT is observed except on PROT_P. Indeed, at HRT of 28 days, the protein content of this fraction increases by 18% and remained at the same protein content at HRT of 48 days. The rest of the fractions for I1 show significant difference between the influent and the digestates obtained at both HRT values. HOLO_P and LIGN_P show protein content reduction of respectively 38% and 60%. Only SOL_P shows significant protein increase between the influent and the digestates. Indeed, SOL_P increases by 100% in the digestates.

Biodegradation rates on the fractions are not similar between non-proteins and protein content. Indeed, for non-protein fractions, digestion leads to a significant biodegradation of all fractions whatever the substrates. For protein fractions, fractions are less significantly degraded and, depending on the substrate, a decrease of each fraction can be observed or not. Moreover, accumulations of SOL_P and PROT_P fractions can be observed after digestion highlighting transfers of nitrogen from a fraction to another. At an HRT value of 28 days, accumulation of PROT_P fraction highlights the biomass

growth. This accumulation is visible on I1 and I2 influents due to the high carbon biodegradation of the influent combined with the low biodegradation of protein content of the PROT_P fraction. This phenomenon observed on these influents contributes to the low variations on PROT_P on the other influent and is in accordance with Bareha et al.(n.d.) that showed that biomass was located in this fraction.

Accumulation of SOL_P fraction is observed for I1 too. This result is due to soluble inert production during anaerobic digestion as highlighted by Bareha et al. (n.d.). This production of inert compounds probably takes place for all the influent, but it is not visible on I2 and I3 due to the high amount of SOL_P fraction brought by the substrate and its partial biodegradation during anaerobic digestion.

Whatever the fraction, biodegradations strongly differ between protein and non-protein compounds, highlighting that non-protein and protein transformations have to be considered separately in the model scheme.

3.3. Modelling methane production and digestate quality.

3.3.1. ADMacc calibration on HRT48 assays.

ADMacc was calibrated on experimental result from steady-state phase and dynamic phase following the substrate pulse as describe in section 2.5.2.2 (monitoring lasted 14 days after the substrate pulse). Influent fractionation used for steady state simulation and the calibrated values obtained are reported in supplementary data. Calibration of ADMacc allow good simulation performances according to the low RMSE obtained on methane, ammonium and protein and non-protein bioaccessibility as presented figure 46 for the steady state experiment and figure 47 for the substrate pulse experiment. Evolution of non-protein and protein content of the fraction on substrate pulse experiment for I1 is presented figure 48.

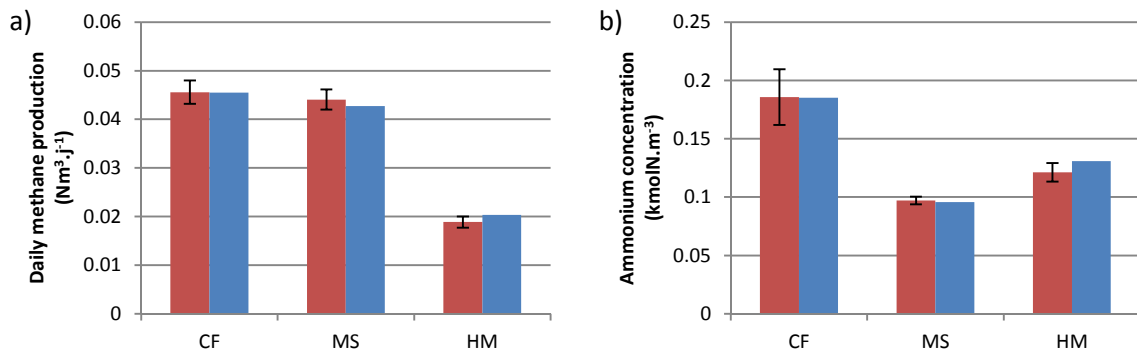


Figure 46: Calibration results on methane (a) and ammonium (b) got from steady state experiments. (Red: measured value; blue: simulated value).

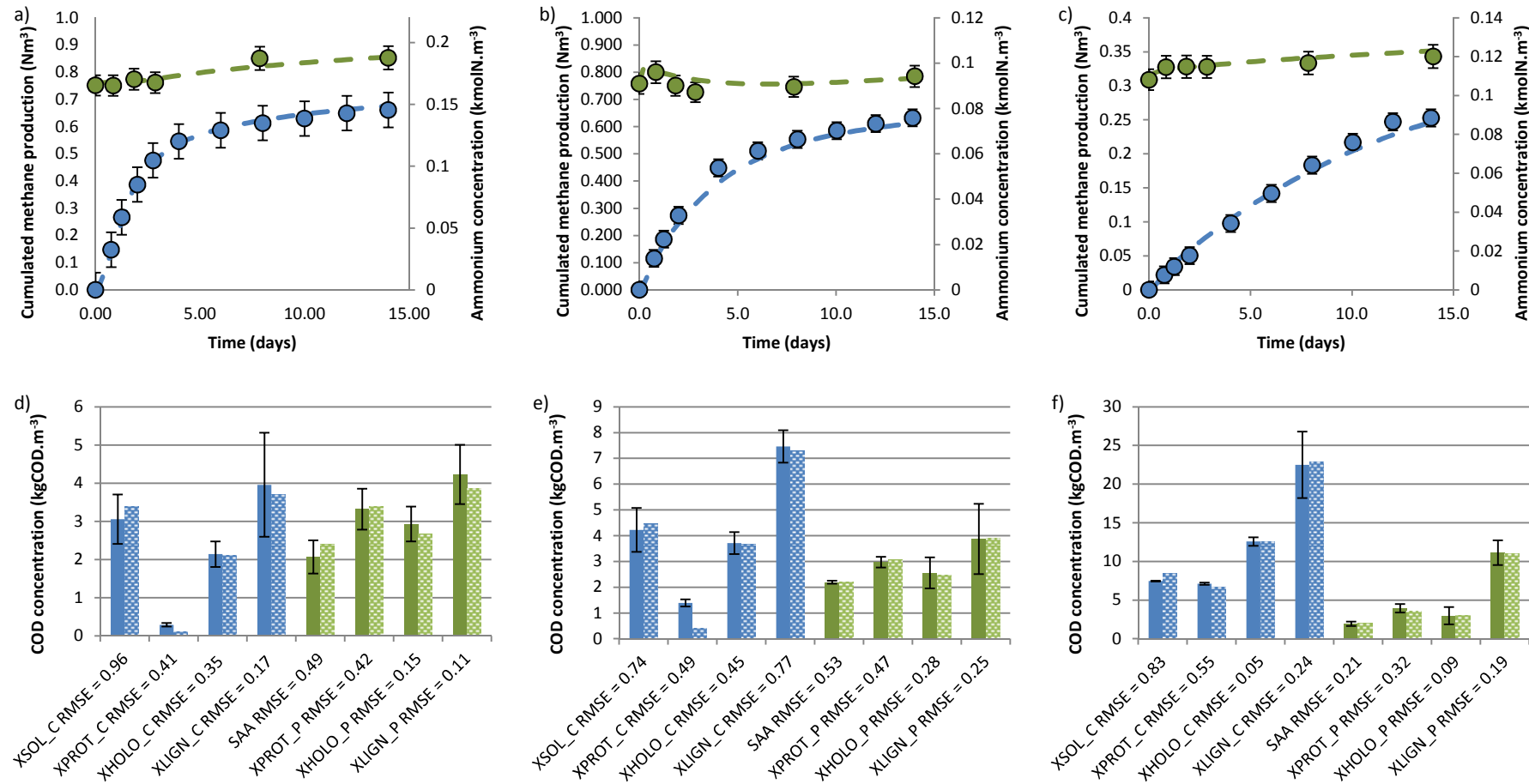


Figure 47: Calibration results on methane (blue) and ammonium (green) production for I1 (a), I2 (b) and I3 (c) (experimental points: dot, simulation : dotted line) along with bioaccessibility of non-protein (blue) and protein (green) content in I1 (d), I2 (e) and I3 (f) digestates after digestion at HRT48 (experimental digestate: plain plot, simulate digestate: dotted plot).

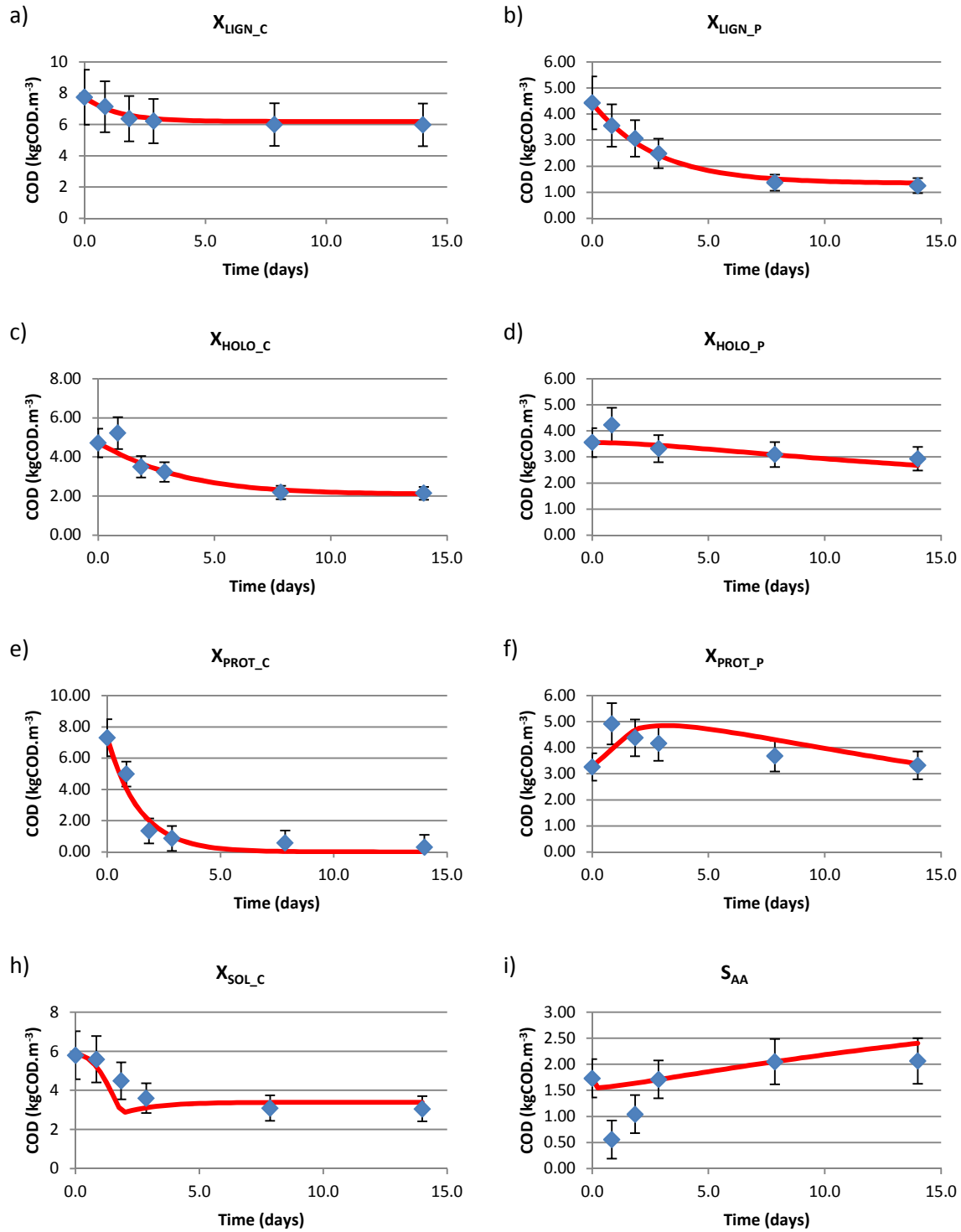


Figure 48: Calibration of ADMacc on I1 substrate pulse evolution of the fractions X_{LIGN_C} (a), X_{LIGN_P} (b), X_{HOLO_C} (c), X_{HOLO_P} (d), X_{PROT_C} (f), X_{PROT_P} (g), X_{SOL_C} (h) and S_{AA} (i). (Blue dots: experimental ; plain red line: simulation)

3.3.2. Stoichiometric parameter changes between batches and semi continuous setup.

Calibration of stoichiometric parameters found for the three influents are presented table 29 along with stoichiometric parameters found by Bareha et al. (n.d.) on batch incubations of cattle feed waste and bovine slurry.

Table 29: Stoichiometric parameter found under CSTR experiment and batch experiments

Process	Stoichiometric parameter abbreviation	I1	I2	I3	CF (Bareha et al., n.d.)	BS (Bareha et al., n.d.)	Unit
Biomass decay	$f_{XI_PROT_P,XSU-H2}$	0	0	0	0.3	0.3	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SAA,XSU-H2}$	0.47	0.47	0.47	0.27	0.27	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SSU,XSU-H2}$	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SFA,XSU-H2}$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SL_SOL_P,XSU-H2}$	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X_{LIGN_P} hydrolysis	$f_{XHOLO_P,XLIGN_P}$	0.09	1	0	0	0	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SAA,XLIGN_P}$	0.91	0	1	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻²
X_{HOLO_P} hydrolysis	$f_{SAA,XHOLO_P}$	1	1	1	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X_{PROT_P} hydrolysis	$f_{SL_SOL_P,XPROT_P}$	1	0.55	0.45	0.8	0.8	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SAA,XPROT_P}$	0	0.45	0.55	0.2	0.2	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X_{LIGN_C} hydrolysis	$f_{XHOLO_C,XLIGN_C}$	0.2	0.4	0	0	0	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{XSOL_C,XLIGN_C}$	0.8	0.6	1	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻²
X_{HOLO_C} hydrolysis	$f_{XSOL_C,XHOLO_C}$	1	1	1	1	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹
X_{PROT_C} hydrolysis	$f_{XSOL_C,XPROT_C}$	0.7	0.7	0	1	0	kgCOD.kgCOD ⁻¹
	$f_{SL_SOL_C,XPROT_C}$	0.3	0.3	1	0	1	kgCOD.kgCOD ⁻¹

3.3.2.1. Stoichiometric parameters associated to $X_{LIGN_C\&P}$ and $X_{HOLO_C\&P}$

Stoichiometry for X_{LIGN} disintegration has been changed in comparison with batch tests. Bareha et al. (n.d.) highlighted that biodegradation of $X_{LIGN_C\&P}$ on a batch setup leads to 100% of X_{SOL_C} and S_{AA} , respectively. Results found in the present study showed that, depending on the influent, the biodegradation of $X_{LIGN_C\&P}$ is distributed between $X_{HOLO_C\&P}$ and X_{SOL_C}/S_{AA} . Indeed, respectively 20% and 40% of X_{LIGN_C} for I1 and I2 is transferred into X_{HOLO_C} fraction. Regarding protein biodegradation in X_{LIGN_P} fraction, 9% and 100% of the I1 and I2 fraction is transferred to X_{HOLO_P} fraction. I3, in opposition, preserve the stoichiometry determined for $X_{LIGN_C\&P}$ biodegradation during batch experimentations.

These stoichiometric modifications between semi-continuous and batch experiments were mainly due to the sampling frequency. Sampling frequency was different between the present study and the batch experiment made by Bareha et al. (n.d.). Indeed, the first sampling in this study was done before the methane production rate peak which allows the observation of a transitive accumulation of $X_{\text{HOLO_C\&P}}$ fractions. On batch experiments, the first sampling was done at the methane production rate peak disabling the visualization of accumulations in these fractions.

Nevertheless, these transitive accumulations are substrate dependent. The amount of $X_{\text{LIGN_C\&P}}$ transferred to $X_{\text{HOLO_C\&P}}$ greatly varies and the stoichiometry is linked to the encapsulated components in the lignin structure. Indeed, as reported in literature (Monlau et al., 2012; Tian et al., 2017), lignocellulosic structures encapsulate various types of molecules. The transfer of non-protein and protein products into the different fractions is consequently linked to the chemical nature of the product freed by lignocellulosic structure breakdown.

Regarding $X_{\text{HOLO_C\&P}}$ biodegradation stoichiometry, results are similar to the ones found by Bareha et al. (n.d.). All the contents of these fractions are transferred to the soluble fraction into $X_{\text{SOL_C}}$ and S_{AA} . It has to be noted that none of the four mentioned fractions $X_{\text{LIGN_C\&P}}$ and $X_{\text{HOLO_C\&P}}$ are transferred to $X_{\text{PROT_C\&P}}$. Indeed, ADMacc considers that these fractions only receive microbial products.

3.3.2.2. *Stoichiometric parameters associated to $X_{\text{PROT_C\&P}}$*

$X_{\text{PROT_C\&P}}$ also show a strong influence of pig slurry and setup design on the biodegradation stoichiometry of these fractions. Values found for the influents are different from the ones obtained under batch conditions. Indeed, $X_{\text{PROT_P}}$ is transferred to inert $S_{\text{I_SOL_P}}$ at 100%, 55% and 45% for respectively I1, I2 and I3. Pig slurry represents respectively 81%, 64% and 31% of the proteins present in the fraction $X_{\text{PROT_P}}$ for I1, I2 and I3 mixes. According to these results, $X_{\text{PROT_P}}$ transferred to inert $S_{\text{I_SOL_P}}$ decreases with the amount of pig slurry used in the mix. Bareha et al. (2018) highlighted that substrates with high NH_4^+/NTK ratio showed low organic nitrogen mineralization rate and PLS regressions linked this low biodegradability with a negligible contribution of $X_{\text{PROT_P}}$. Thus, the stoichiometry of $X_{\text{PROT_P}}$ is strongly driven by the proportion of PROT_P fraction which is from pig slurry.

Pig slurry represented a small amount of $X_{\text{PROT_C}}$ with respectively 20%, 12% and 10% in I1, I2 and I3 influents. Co-substrate in the influent mostly governed the stoichiometry. Regarding batch experiments, the model calibrated on a non-manure-like substrate showed a 0% transfer into inert $S_{\text{I_SOL_C}}$ fraction and another model calibrated on bovine slurry showed a 100% transfer. Thus, influents I1 and I2, with non-manure-like substrates, show only 30% $X_{\text{PROT_C}}$ transfer into $S_{\text{I_SOL_C}}$. This amount of inert produced is due to the pig slurry. In opposition, I3 shows 100% of transfer into $S_{\text{I_SOL_C}}$ explained by the co-digestion of two manure-like substrates.

Thus, calibrated stoichiometry associated to the degradation of $X_{\text{PROT_C\&P}}$ complies with results obtained by Bareha et al. (n.d.) in batch conditions.

3.3.2.3. *Stoichiometric parameters associated to biomass decay*

Calibrated stoichiometry for biomass decay differs from results obtained in batch experiments. Indeed, during CSTR experiments, transfer to $X_{\text{I_PROT_P}}$ no longer happens and transfers to S_{AA} and $S_{\text{I_SOL_P}}$ increased by 20% and 10% respectively in comparison to batch experiments. This difference can be due to overestimation of biomass concentration during biomass initialization for batch tests. Indeed, the protocol used for batch experiments included inoculum centrifugation. According to Batstone et al. (2015), centrifugation affected methanogen activity by breaking links in the trophic chain. Consequently, inactivated biomass was initially present into active biomass and was transferred to the inert of this fraction ($X_{\text{I_PROT_P}}$) via biomass decay.

3.3.3. Calibration of kinetic parameters

Calibration of kinetic parameters associated to $X_{LIGN_C\&P}$, $X_{HOLO_C\&P}$, $X_{PROT_C\&P}$ and X_{SOL_C} degradation are presented in table 30. Acidogenesis, acetogenesis, methanogenesis and decay kinetic parameters were calibrated inside the intervals recommended in ADM1 (Batstone et al., 2002).

Tableau 30: Kinetic parameters calibrated under CSTR experiments compared to the one determined with batch experiments and ADM1 default values.

Parameter	Products	Abbreviation	Unit	I1	I2	I3	CF (batch)	BS (batch)	ADM1
First order parameters	X_{LIGN_P}	$k_{hyd_XLIGN_P}$	d^{-1}	0.37	0.27	0.30	0.07	0.1	-
	X_{LIGN_C}	$k_{hyd_XLIGN_C}$	d^{-1}	0.73	0.40	0.15	0.15	0.12	-
	X_{HOLO_P}	$k_{hyd_XHOLO_P}$	d^{-1}	0.05	0.05	0.08	0.25	0.15	-
	X_{HOLO_C}	$k_{hyd_XHOLO_C}$	d^{-1}	0.33	0.32	0.14	0.2	0.18	-
	X_{PROT_P}	$k_{hyd_XPROT_P}$	d^{-1}	0.70	0.52	0.02	0.08	0.01	-
	X_{PROT_C}	$k_{hyd_XPROT_C}$	d^{-1}	0.70	0.20	0.01	0.08	0.01	-
Contois order parameters	X_{SOL_C}	$k_{m,XSOL_C}$	d^{-1}	2.28	13.68	0.78	0.55	4.2	-
		$K_{S,XSOL_C}$	-	0.05	11.4	2	1.35	26	-

3.3.3.1. Hydrolysis parameters linked to $X_{LIGN_C\&P}$

Calibration of $X_{LIGN_C\&P}$ shows higher values than the ones found under batch conditions. $k_{hyd,XLIGN_P}$ are close for all the influents and equal to 0.37, 0.27 and 0.30 d^{-1} for respectively I1, I2 and I3. Regarding non-protein content X_{LIGN_C} , $k_{hyd,XLIGN_C}$ are substrate-dependent (0.73, 0.40 and 0.15 d^{-1} for respectively I1, I2 and I3). These values are superior to the one determined in batch experiments. This enhancement of kinetic rates is due to the better stirring that speed up the disintegration of lignin barriers combined with biomass acclimation. Indeed, hydrolysis is considered as cumulating both extracellular biological and non-biological processes (Batstone et al., 2002). Thus, the disintegration/hydrolysis of this fraction is linked to lignin composition and physical conditions of the reactor. Values on I1, I2 and I3 for $k_{hyd,XLIGN_P}$ and $k_{hyd,XLIGN_C}$ are different highlighting that protein and non-protein content liberation from lignin are decoupled. Only I3 shows a first order kinetic for X_{LIGN_C} hydrolysis at the same magnitude as the one found under batch conditions. This difference is due the nature of the influent composed of manure-like substrates. This typology also has an influence

on the kinetic because fractions are composed of more recalcitrant material. In this case, the disintegration/hydrolysis was limited by the composition of the lignin barrier.

3.3.3.2. *Hydrolysis parameters linked to $X_{HOLO_C\&P}$*

The calibration of the kinetic constants on the X_{HOLO} fraction shows that the values obtained are generally lower than the rest of the constants (except for influent I3). These low values are due to the feeding of this fraction by the X_{LIGN} fraction. Indeed, some of the degraded products in the X_{LIGN} fraction are transferred into the X_{HOLO} fraction, especially holocellulosic products that are difficult to biodegrade. Due to this supply of holocellulosic compounds that are difficult to biodegrade, the biodegradation kinetics of the X_{HOLO} fractions is very low.

3.3.3.3. *Hydrolysis parameters linked to $X_{PROT_C\&P}$*

$X_{PROT_C\&P}$ hydrolysis is similar, in term of process, under CSTR and batch conditions. Calibrated k_{hyd} on continuous experiments shows higher values in comparison to batch experiments except for I3 that presented similar values to BS slurry. These similarities are explained by the substrate typology for I3. Indeed, I3 is composed of manure-like substrate that present proper specificities linked to X_{PROT} fraction and its biodegradability. Muller et al. (2014) highlighted that alkaline extractions (used for PROT fraction extraction) target humic acids among other components. Humic acids are produced during the biodegradation of organic matter (Veeken and Hamelers, 1999) and are supposed to alter the hydrolytic activity while bound by hydrolytic enzymes (Brons et al., 1985; Fernandes et al., 2015; Smith et al., 2005). In addition, Bareha et al. (2018) showed that for manure-like substrates (with high NH_4^+/TKN ratio) that come from storage process, biodegradation of X_{PROT_P} fraction do not significantly contribute to ammonium production in opposition to non-manure-like substrates. Consequently, high kinetic rates for $X_{PROT_C\&P}$ for I1 and I2 are explained by the presence of highly biodegradable non-humic materials. These values are higher than the one found under batch conditions due to better agitation and biomass acclimation.

3.3.3.4. *Hydrolysis parameters linked to X_{SOL_C}*

ADM1 Contois kinetic parameters values considered are higher than the one used by Bareha et al. (n.d.) on batch experiments. Half saturation parameters are also lower in the present study than the ones found in batch experiments. These differences are due to two major experimental specificities of the batch protocol linked to the impact of inoculum centrifugation and the organic load under batch experiment (Bareha et al., n.d.). According to Batstone et al. (2015), centrifugation affects the trophic chain by breaking links between the different bacterial communities. Thus, growth and affinity with the substrate can be modified. In addition, biomass used during batch experiments was coming from a CSTR fed with a mix of pig slurry and horse food. The inoculum was thus acclimated to this type of influent and not to the substrates added. Combined with the high organic load and the lack of agitation, batch experiments did not allow good conditions for kinetic estimations but allowed the observations of transfers from a fraction to another. Under CSTR experiments, these limitations are removed.

However, kinetic parameters associated to X_{SOL_C} hydrolysis range widely. Identifiability analysis is required to identify if these results are due to lack of identifiability for the calibration of this step. Hence, in the next section, identifiability is evaluated on the calibrated parameters added in ADMacc in comparison to ADM1.

3.3.4. Uncertainty analysis on kinetic and inerts: Toward a unified model

To better appreciate whether the model could be use with unique set of parameters, confidence areas of calibrated parameters were determined. This study will permit to evaluate is optimum calibrated parameters significantly differ for 3 influents or not. Confidence areas on calibrated parameters were determined for most biodegraded fractions according to section 3.3.2. The confidence areas are presented figure 49.

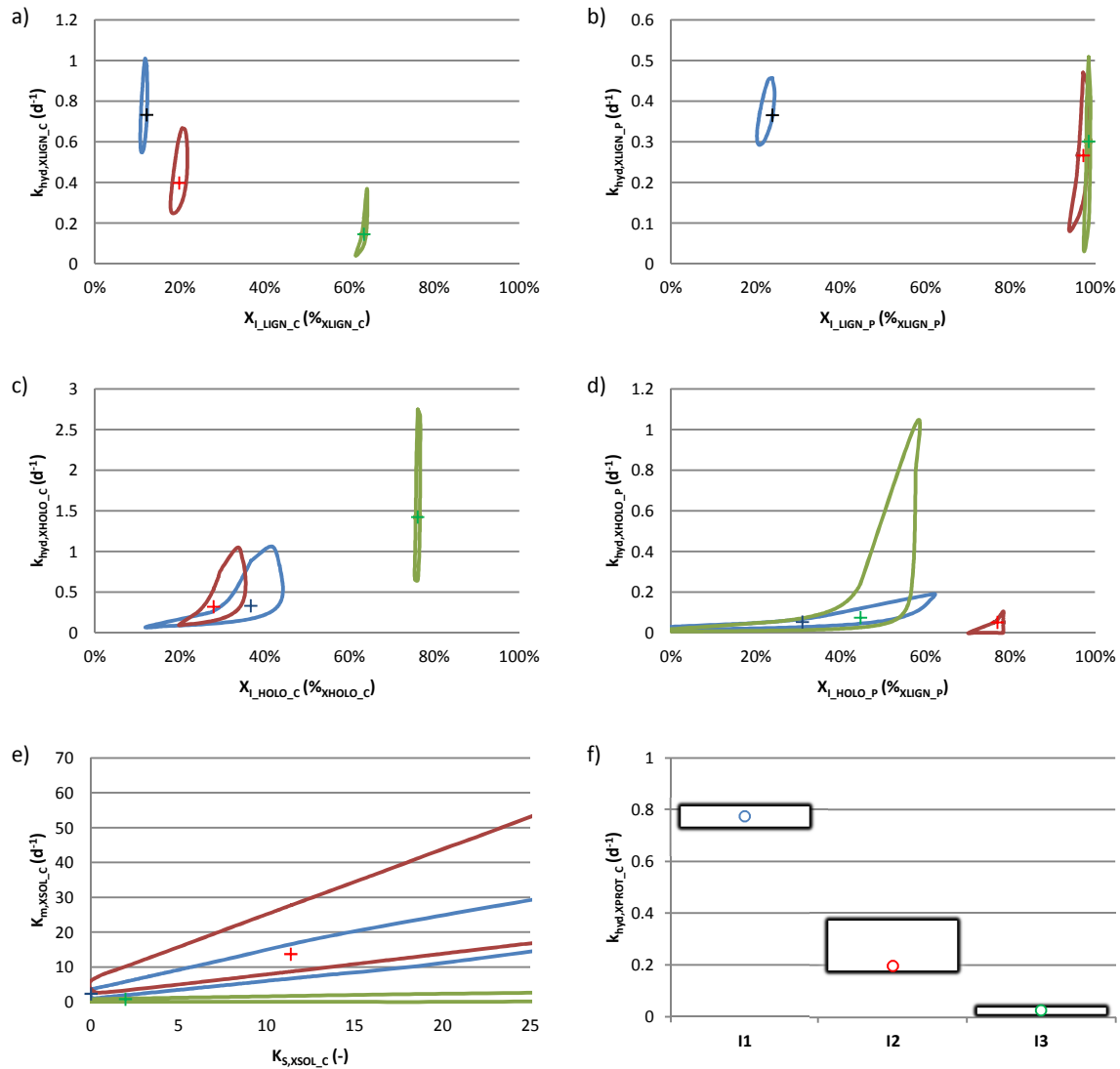


Figure 49: Confidence areas for the parameter couples $k_{hyd,XLIGN_C}/X_{I_LIGN_C}$ (a), $k_{hyd,XLIGN_P}/X_{I_LIGN_P}$ (b), $k_{hyd,XHOLO_C}/X_{I_HOLO_C}$ (c), $k_{hyd,XHOLO_P}/X_{I_HOLO_P}$ (d) and $K_{m,XSOL_C}/K_{S,XSOL_C}$ (e) along with the confidence interval of $k_{hyd,XPROT_C}$ (f) for I1 (blue), I2 (red) and I3 (green).

3.3.4.1. Kinetic parameters

Confidence areas for $k_{hyd,XLIGN_P}$ and $k_{hyd,XHOLO_P}$ for I1, I2 and I3 (fig. 49b&d) show that these kinetic parameters are not significantly different. These results are in accordance with previous results that highlighted that optimum $k_{hyd,XLIGN_P}$ and $k_{hyd,XHOLO_P}$ values have the same order of magnitude. Thus, protein structures in these fractions are similar and substrate type does not influence the protein biodegradation kinetic. This statement was not the same on non-protein biodegradation kinetic.

Indeed, $k_{hyd,XLIGN_C}$ (fig. 49a) and $k_{hyd,PROT_C}$ (fig. 49f) are significantly different between I1, I2 and I3. The decrease of $k_{hyd,XLIGN_C}$ observed between I1 and I3 highlight differences in the biodegradable non-protein structure which become more recalcitrant with stored substrate eg. I2 and I3. The same statement is observed on $k_{hyd,PROT_C}$. Indeed, as reported by Bareha et al. (2018) stored substrates are submitted to biodegradation previous anaerobic digestion and remaining materials are more recalcitrant such as humic-like substances and lignin. In the case of silage, the biodegraded non-protein content during storage is transferred to more accessible fractions (Hillion et al., 2018). Results show that for I1, I2 and I3 $k_{hyd,XHOLO_C}$ (fig. 49c) values are not significantly different and confidence interval are wide. It highlights a low identifiability for kinetic parameters for that fraction which is due to the slight variation of the concentration of this fraction after the substrate pulse.

For Contois parameters related to X_{SOL_C} biodegradation (fig. 49e), confidence intervals are not closed highlighting a lack of identifiability for this step calibration. These results are due to (i) the lack of experimental results to allow enough identifiability for calibration of a such complex hydrolysis model as Contois equation ; (ii) the complexity of processes that impact the evolution of this fraction during the experiment (production from more complex fraction combined with degradation). However, I1 and I2 show a common confidence interval for kinetic parameters values and, despite the important confidence areas, I3 showed no common interval with the other calibrated values. The $k_{m,XSOL_C}$ interval is lower than the ones common to I1 and I2. Indeed, X_{SOL_C} fraction receives products of the biodegradation of the upper non-protein fractions (X_{LIGN_C} , X_{HOLO_C} and X_{PROT_C}). The lower k_m value found for I3 is in accordance with the higher complexity of the non-protein content in the upper

fractions. Indeed, molecules produced by X_{LIGN_C} , X_{HOLO_C} and X_{PROT_C} degradation which are transferred to X_{SOL_C} fraction can be more complex than for other substrates too.

3.3.4.2. *Inert fractions*

Confidence areas for $X_{L_LIGN_C}$ amount in X_{LIGN_C} are narrow for all the substrates and present no common values (fig. 7a). However, $X_{L_LIGN_C}$ amount in X_{LIGN_C} for I1 and I2 are close with respectively 12 and 20% of inert inside X_{LIGN_C} . The inert part in X_{LIGN_C} for I3 is much higher with 60% of inert. Inert part in X_{HOLO_C} fraction (fig. 49c) shows similar trends with a common confidence area for I1 and I2 influent and still a higher inert part for I3. These results highlight the difference between the non-manures-like and manure-like substrates, which are less biodegradable. In particular, this fraction was previously disintegrated during animal digestion and storage. Thus remaining materials in X_{LIGN_C} are mainly inerts for manure-like substrates. Finally, no common inert content intervals for all the influents for X_{LIGN_C} fraction were found. Hence, a specific calibration for each substrate is required.

Co-substrate type also had a strong influence on the $X_{L_LIGN_P}$ value (fig. 49b). Indeed, protein brought by PS in this fraction is negligible and inert part in X_{LIGN_P} fraction is mainly due to the co-substrate. Results show that inert proteins in X_{LIGN_P} represent 100% of the fraction for I2 and I3 while inert protein in X_{LIGN_P} represented 20% for I1. The high content of inert protein in X_{LIGN_P} for silage and manure was observed by Bareha et al. (n.d.) and was due to the biological transformation happening prior to the digestion. Regarding $X_{L_HOLO_P}$ (fig. 49d), the weight of protein brought by the PS is more important with 45%, 74% and 26% of PS protein on respectively I1, I2 and I3 total protein in the fraction. However, the inert content in this fraction seems to be linked to both the substrate and the pig slurry biodegradation. Thus no common inert content interval was found for the three influents despite the high confidence interval.

Confidence areas determined on the inert content in the $X_{LIGN_C\&P}$ and $X_{HOLO_C\&P}$ fraction did not allow the determination of common initial inert values for the three influents. Thus, further characterization of the fractions with biodegradability analysis on each individual substrate should be applied to determine inert content by complexity analysis as done by several authors (Jimenez et al., 2017;

Maynaud et al., 2017). This characterization will help gain time by avoiding the monitoring the influent biodegradation.

3.3.5. Model evaluation

ADMacc is evaluated on its ability of the calibrated model to simulate experimental results obtained for an HRT of 28 days. Simulations and experimental values are compared figure 50 for the steady state experiment and figure 51 for the substrate pulse experiment.

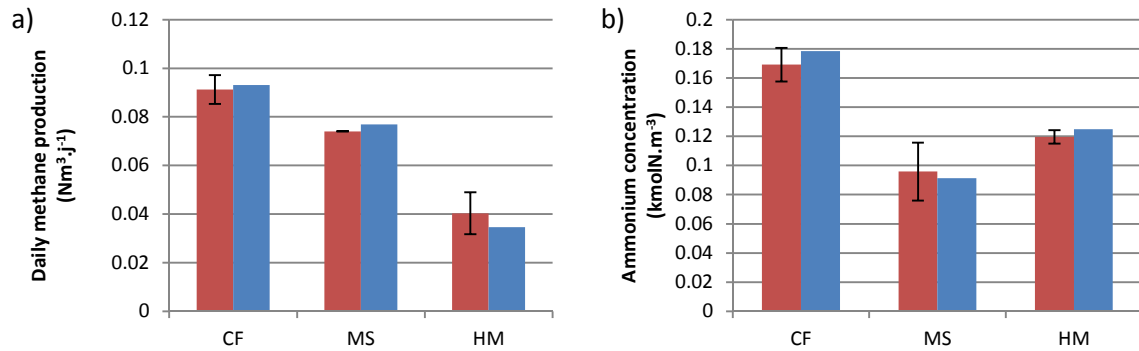


Figure 50: Validation results on methane (a) and ammonium (b) got from steady state experiments. (Red: measured value; blue: simulated value).

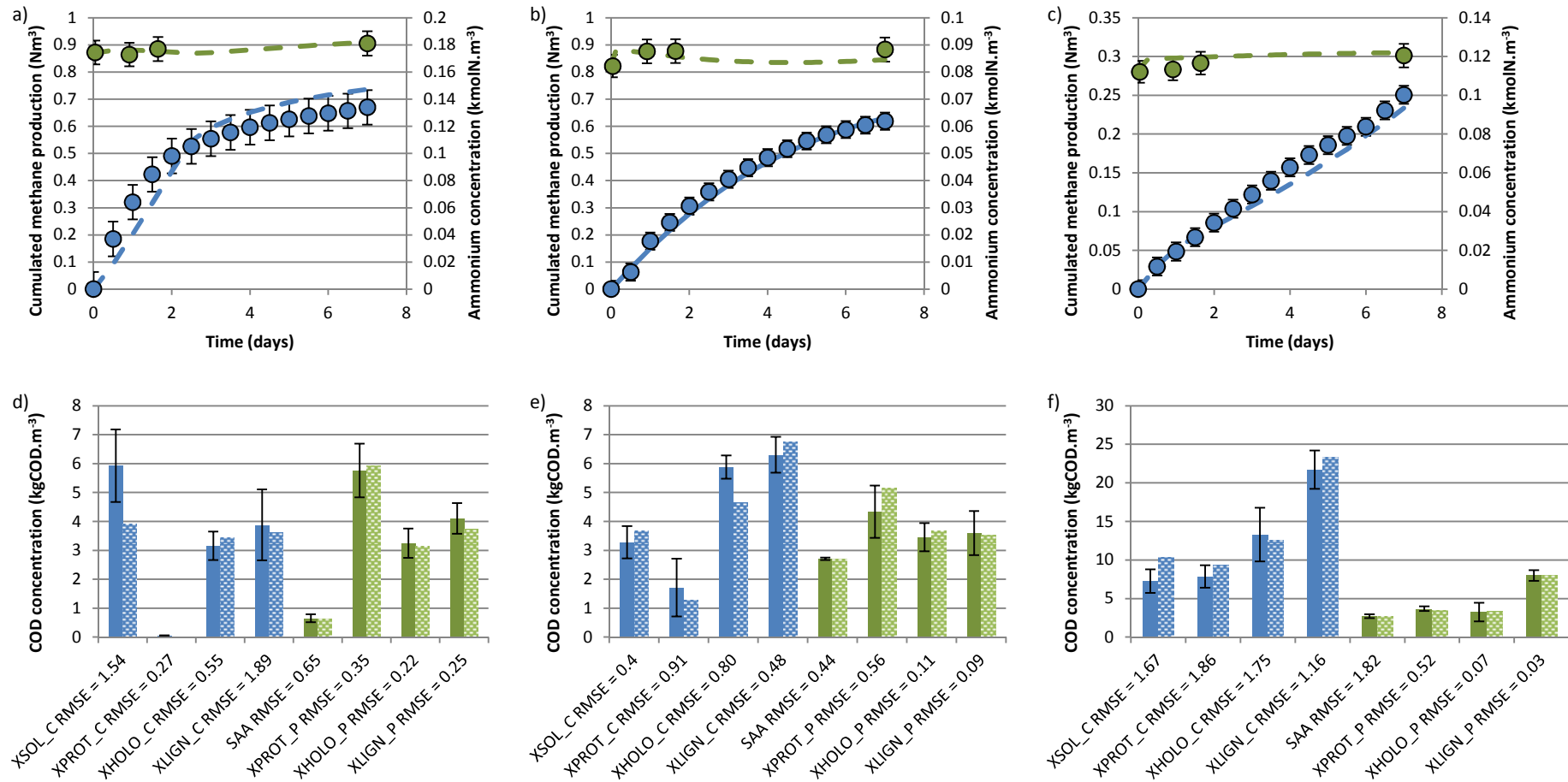


Figure 51: Evaluation results on methane (blue) and ammonium (green) production for I1 (a), I2 (b) and I3 (c) (experimental points: dot, simulation : dotted line) along with bioaccessibility of non-protein (blue) and protein (green) content in I1 (d), I2 (e) and I3 (f) digestates after digestion at HRT28 (experimental digestate: plain plot, simulate digestate: dotted plot).

Results show a good estimation of ammonium production according to the confidence areas. As the result of the biodegradation of the protein content in fractions, this good estimation indicates a good estimation of the total protein molecules remaining in the digestate. The repartition of these proteins into fractions is also good for the majority of the fractions. Indeed, protein content in the fractions is well predicted according to the confidence interval. Thus, ADMacc is suitable for prediction of ammonium content and bioaccessibility of the remaining organic nitrogen in the digestate, for HRT up to 48 days.

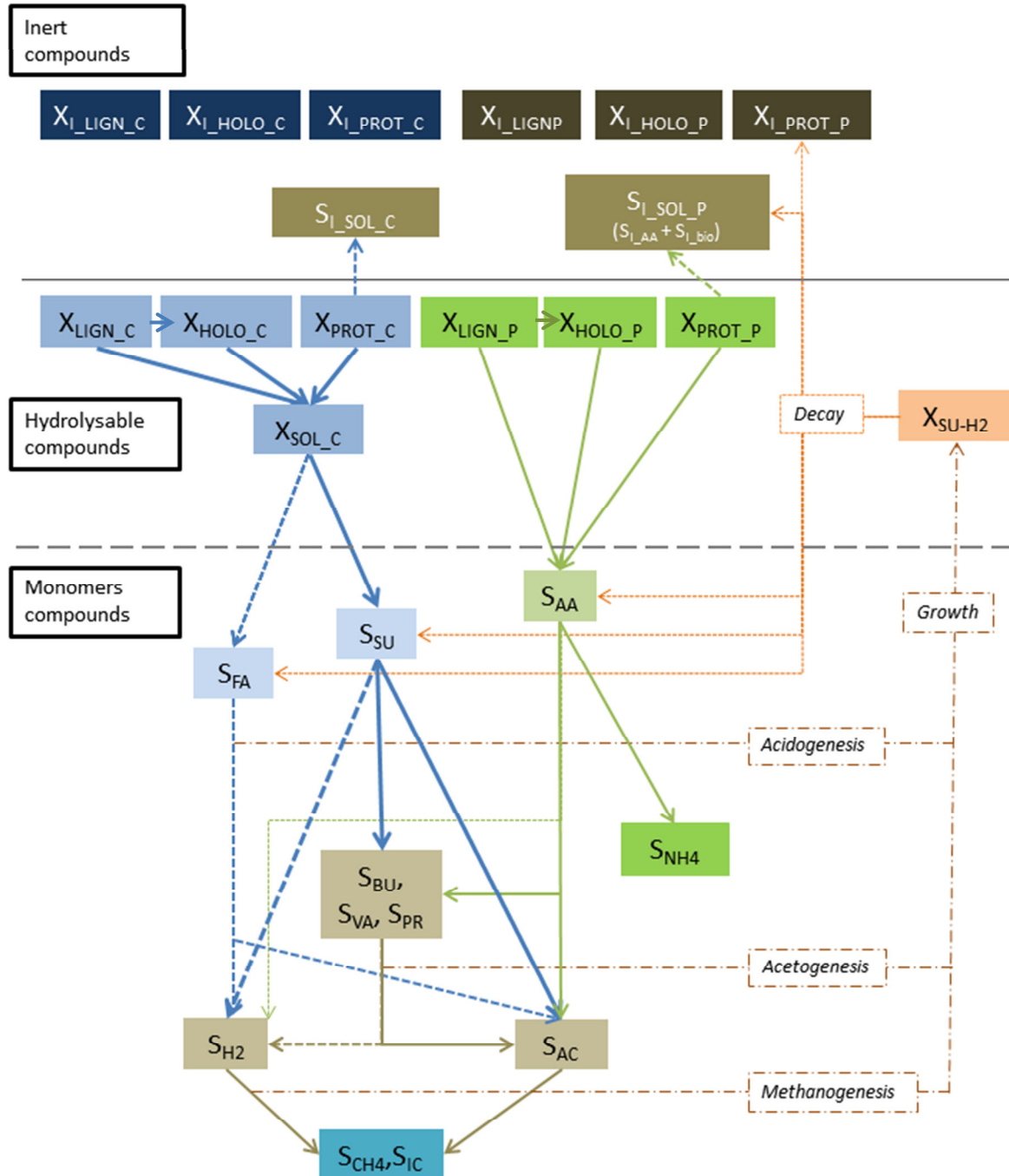
Methane production is accurately estimated for I2. Methane production is slightly overestimated for I1 and underestimated for I3 with respectively 9% and -7% of error. These inaccuracies are insignificants regarding uncertainties regarding experimental results. However, they are mainly due to weak estimations of X_{SOL_C} fraction biodegradation which is underestimated for I1 and overestimated for I3 with respectively errors of -51% and + 30%. These weak estimations on X_{SOL_C} fraction are due to the non-adapted kinetic associated to the process of X_{SOL_C} biodegradation. Contois kinetic is considered as a reliable kinetic to describe biomass-dependent hydrolysis (Vavilin et al., 2008). However, considering the results found in this study, this kinetic order shows a low identifiability and weak prediction performances. Thus, the use of this kinetic order needs further characterizations, such as complexity (Jimenez et al., 2017) or kinetic essays (Girault et al., 2012b; Mottet et al., 2013) improving identifiability of its calibration parameters.

4. Conclusion

The objective of this present study is to calibrate ADMacc and evaluate its ability to describing the effect of HRT on methane, ammonium production and bioaccessibility of protein and non-protein content in digestates. Experiments show that HRT impacts these parameters. Use of ADMacc allows good simulations of the impact of HRT on these parameters. It also highlights the possibility to use a unique set of kinetic parameters on the hydrolysis step except for the more accessible fractions. However, this is not possible with stoichiometric parameters. Thus, the determination of protein and non-protein complexity should allow the determination of inert compounds and enable the use of ADMacc for combined prediction of biogas production and digestate without substrate-specific calibration.

5. Supplementary data

Supplementary data 1-a : General scheme of ADMacc processes



Supplementary data 1-b : Petersen matrix modified with biochemical rate coefficients and kinetic rate equations for soluble compounds ($i=8-21, j=8-15$) and for particulate compounds ($i=1-7, 22-29, j=1-7, 16-22$)

Component →																Rate (ρ_i , gCOD.L ⁻¹)
j	Process ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
		X_{LIGN_P}	X_{LIGN_C}	X_{HOLO_P}	X_{HOLO_C}	X_{PROT_P}	X_{PROT_C}	X_{SOL_C}	S_{SU}	S_{AA}	S_{FA}	S_{VA}	S_{BU}	S_{PR}	S_{AC}	
1	Hydrolysis of X_{LIGN_P}	-1				$f_{XPROT_P,XLIGN_P}$				$f_{Saa,XLIGN_P}$						$k_{hyd,XLIGN_P} X_{LIGN_P}$
2	Hydrolysis X_{LIGN_C}		-1				$f_{XPROT_C,XLIGN_C}$	$f_{XSOL_C,XLIGN_C}$	$f_{Ssu,XLIGN_C}$		$f_{Sta,XLIGN_C}$					$k_{hyd,XLIGN_C} X_{LIGN_C}$
3	Hydrolysis of X_{HOLO_P}			-1		$f_{XPROT_P,XHOLO_P}$				$f_{Saa,XHOLO_P}$						$k_{hyd,XHOLO_P} X_{HOLO_P}$
4	Hydrolysis of X_{HOLO_C}				-1		$f_{XPROT_C,XHOLO_C}$	$f_{XSOL_C,XHOLO_C}$	$f_{Ssu,XHOLO_C}$		$f_{Sta,XHOLO_C}$					$k_{hyd,XHOLO_C} X_{HOLO_C}$
5	Hydrolysis of X_{PROT_P}					-1				$f_{Saa,XPROT_P}$						$k_{hyd,XPROT_P} X_{PROT_P}$
6	Hydrolysis of X_{PROT_C}						-1		$f_{Ssu,XPROT_C}$		$f_{Sta,XPROT_C}$					$k_{hyd,XPROT_C} X_{PROT_C}$
7	Hydrolysis of X_{SOL_C}							-1	$f_{Ssu,XSOL_C}$		$f_{Sta,XSOL_C}$					$k_{hyd,XSOL_C} \frac{X_{SOL_C}}{K_{S,XSOL_C} X_{SU} + X_{SOL_C}} X_{SU}$
8	Uptake of sugar								-1				$(1-Y_{SU})f_{Sbu,Ssu}$	$(1-Y_{SU})f_{Spr,Ssu}$	$(1-Y_{SU})f_{Sac,Ssu}$	$k_{m,Ssu} \frac{S_{SU}}{K_{S,Ssu} + S_{SU}} X_{SU}$
9	Uptake of amino acid									-1		$(1-Y_{AA})f_{Sva,Saa}$	$(1-Y_{AA})f_{Sbu,Saa}$	$(1-Y_{AA})f_{Spr,Saa}$	$(1-Y_{AA})f_{Sac,Saa}$	$k_{m,saa} \frac{S_{AA}}{K_{S,saa} + S_{AA}} X_{AA}$
10	Uptake of LCFA										-1				$(1-Y_{FA})f_{Sac,Sta}$	$k_{m,Sfa} \frac{S_{FA}}{K_{S,Sfa} + S_{FA}} X_{FA}$
11	Uptake of valerate											-1		$(1-Y_{C4})f_{Spr,Sva}$	$(1-Y_{C4})f_{Sac,Sva}$	$k_{m,Sva} \frac{S_{VA}}{K_{S,Sva} + S_{VA}} X_{VA}$
12	Uptake of butyrate												-1		$(1-Y_{C4})f_{Sac,Sbu}$	$k_{m,Sbu} \frac{S_{BU}}{K_{S,Sbu} + S_{BU}} X_{BU}$
13	Uptake of propionate													-1	$(1-Y_{PR})f_{Sac,Spr}$	$k_{m,Spr} \frac{S_{PR}}{K_{S,Spr} + S_{PR}} X_{PR}$
14	Uptake of acetate														-1	$k_{m,Sac} \frac{S_{AC}}{K_{S,Sac} + S_{AC}} X_{AC}$
15	Uptake of hydrogen															$k_{m,SH2} \frac{S_{H2}}{K_{S,SH2} + S_{H2}} X_{H2}$
16	Decay of X_{su}					$f_{XPROT_P,Xsu}$			$f_{Ssu,Xsu}$	$f_{Saa,Xsu}$	$f_{Sta,Xsu}$					$k_{dec,Xsu} X_{SU}$
17	Decay of X_{aa}					$f_{XPROT_P,Xaa}$			$f_{Ssu,Xaa}$	$f_{Saa,Xaa}$	$f_{Sta,Xaa}$					$k_{dec,Xaa} X_{AA}$
18	Decay of X_{fa}					$f_{XPROT_P,Xfa}$			$f_{Ssu,Xfa}$	$f_{Saa,Xfa}$	$f_{Sta,Xfa}$					$k_{dec,Xfa} X_{FA}$
19	Decay of X_{c4}					$f_{XPROT_P,Xc4}$			$f_{Ssu,Xc4}$	$f_{Saa,Xc4}$	$f_{Sta,Xc4}$					$k_{dec,Xc4} X_{C4}$
20	Decay of X_{pr}					$f_{XPROT_P,Xpr}$			$f_{Ssu,Xpr}$	$f_{Saa,Xpr}$	$f_{Sta,Xpr}$					$k_{dec,Xpr} X_{PR}$
21	Decay of X_{ac}					$f_{XPROT_P,Xac}$			$f_{Ssu,Xac}$	$f_{Saa,Xac}$	$f_{Sta,Xac}$					$k_{dec,Xac} X_{AC}$
22	Decay of X_{H2}					$f_{XPROT_P,Xh2}$			$f_{Ssu,Xh2}$	$f_{Saa,Xh2}$	$f_{Sta,Xh2}$					$k_{dec,Xh2} X_{H2}$
		bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$	bioaccessible particulate proteins $1/100000 \text{ m}^{-3}$

Component →	<i>i</i>	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	Rate (p, gCOD.L ⁻¹)
<i>j</i>	Process ↓	S_{H2}	S_{CH4}	S_{NH4}	S_c	S_{L_BIO}	S_{L_AA}	S_{L_C}	X_{SU}	X_{AA}	X_{FA}	X_{C4}	X_{PR}	X_{AC}	X_{H2}	$X_{L_PROT_P}$	
1	Hydrolysis of X_{LIGN_P}																$k_{hyd,XLIGN_P} X_{LIGN_P}$
2	Hydrolysis X_{LIGN_C}																$k_{hyd,XLIGN_C} X_{LIGN_C}$
3	Hydrolysis of X_{HOLO_P}																$k_{hyd,XHOLO_P} X_{HOLO_P}$
4	Hydrolysis of X_{HOLO_C}																$k_{hyd,XHOLO_C} X_{HOLO_C}$
5	Hydrolysis of X_{PROT_P}						$f_{SL_aa,XPROT_P}$										$k_{hyd,XPROT_P} X_{PROT_P}$
6	Hydrolysis of X_{PROT_C}							$f_{SL_C,XPROT_C}$									$k_{hyd,XPROT_C} X_{PROT_C}$
7	Hydrolysis of X_{SOL_C}																$k_{hyd,XSOL_C} \frac{X_{SOL_C}}{K_{S,XSOL_C} X_{SU} + X_{SOL_C}} X_{SU}$
8	Uptake of sugar	$(1-Y_{SU})f_{Sh2,Ssu}$		$-(Y_{SU})N_{Xsu}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{i,8}$				Y_{SU}								$k_{m,ssu} \frac{S_{SU}}{K_{S,ssu} + S_{SU}} X_{SU}$
9	Uptake of amino acid	$(1-Y_{AA})f_{Sh2,Saa}$		$N_{Saa} - (Y_{AA})N_{Saa}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{i,9}$					Y_{AA}							$k_{m,saa} \frac{S_{AA}}{K_{S,saa} + S_{AA}} X_{AA}$
10	Uptake of LCFA	$(1-Y_{FA})f_{Sh2,Sfa}$		$-(Y_{FA})N_{Xfa}$							Y_{FA}						$k_{m,sfa} \frac{S_{FA}}{K_{S,sfa} + S_{FA}} X_{FA}$
11	Uptake of valerate	$(1-Y_{C4})f_{Sh2,Sva}$		$-(Y_{C4})N_{Xc4}$								Y_{C4}					$k_{m,sva} \frac{S_{VA}}{K_{S,sva} + S_{VA}} X_{VA}$
12	Uptake of butyrate	$(1-Y_{C4})f_{Sh2,Sbu}$		$-(Y_{C4})N_{Xc4}$								Y_{C4}					$k_{m,sbu} \frac{S_{BU}}{K_{S,sbu} + S_{BU}} X_{BU}$
13	Uptake of propionate	$(1-Y_{PR})f_{Sh2,Spr}$		$-(Y_{PR})N_{Xpr}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{i,13}$								Y_{PR}				$k_{m,spr} \frac{S_{PR}}{K_{S,spr} + S_{PR}} X_{PR}$
14	Uptake of acetate		$(1-Y_{AC})$	$-(Y_{AC})N_{Xac}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{i,14}$									Y_{AC}			$k_{m,sac} \frac{S_{AC}}{K_{S,sac} + S_{AC}} X_{AC}$
15	Uptake of hydrogen	-1	$(1-Y_{H2})$	$-(Y_{H2})N_{Xh2}$	$-\sum_{i=1-17,19-29} C_i V_{i,15}$										Y_{H2}		$k_{m,sh2} \frac{S_{H2}}{K_{S,sh2} + S_{H2}} X_{H2}$
16	Decay of X_{su}					$f_{SL_BIO,Xsu}$			-1							$f_{XL_PROT_P,Xsu}$	$k_{dec,Xsu} X_{SU}$
17	Decay of X_{aa}					$f_{SL_BIO,Xaa}$				-1						$f_{XL_PROT_P,Xaa}$	$k_{dec,Xaa} X_{AA}$
18	Decay of X_{fa}					$f_{SL_BIO,Xfa}$					-1					$f_{XL_PROT_P,Xfa}$	$k_{dec,Xfa} X_{FA}$
19	Decay of X_{c4}					$f_{SL_BIO,Xc4}$						-1				$f_{XL_PROT_P,Xc4}$	$k_{dec,Xc4} X_{C4}$
20	Decay of X_{pro}					$f_{SL_BIO,Xpr}$							-1			$f_{XL_PROT_P,Xpr}$	$k_{dec,Xpr} X_{PR}$
21	Decay of X_{ac}					$f_{SL_BIO,Xac}$								-1		$f_{XL_PROT_P,Xac}$	$k_{dec,Xac} X_{AC}$
22	Decay of X_{h2}					$f_{SL_BIO,Xh2}$									-1	$f_{XL_PROT_P,Xh2}$	$k_{dec,Xh2} X_{H2}$
		Hydrogen gas (kgCOD·m ⁻³)	Methane gas (kgCOD·m ⁻³)	Inorganic nitrogen (kgCOD·m ⁻³)	Inorganic carbon (kgCOD·m ⁻³)	Inerts produced by biomass (kgCOD·m ⁻³)	Inert amino acids (kgCOD·m ⁻³)	Inert soluble carbon (kgCOD·m ⁻³)	Sugar degraders (kgCOD·m ⁻³)	Amino acid degraders (kgCOD·m ⁻³)	LCFA degraders (kgCOD·m ⁻³)	Valerate and butyrate degraders (kgCOD·m ⁻³)	Propionate degraders (kgCOD·m ⁻³)	Acetate degraders (kgCOD·m ⁻³)	Hydrogen degraders (kgCOD·m ⁻³)	Particulate inerts (kgCOD·m ⁻³)	

Supplementary data 2-a: Influent fractionation used for steady state simulation

State variable	I1	I2	I3
XLIGN_P (kgCOD.m-3)	1.32489	0.02381509	0.08451608
XLIGN_C (kgCOD.m-3)	40.33566	38.3180747	32.50368
XHOLO_P (kgCOD.m-3)	0.90491148	0.017051	0.76513945
XHOLO_C (kgCOD.m-3)	5.77276	13.5509759	2.02821696
XPROT_P (kgCOD.m-3)	4.5955	1.79	5.9456
XPROT_C (kgCOD.m-3)	14.851	8.09	10.5738
XSOL_C (kgCOD.m-3)	3.42762	8.29764	2.1407
SSU (kgCOD.m-3)	0	0	0
SAA (kgCOD.m-3)	11.5859	5.2474	7.649
SFA (kgCOD.m-3)	0	0	1.786
SVA (kgCOD.m-3)	0.05412	0.216	0.0216
SBU (kgCOD.m-3)	0.03216	0.0471	0.03192
SPR (kgCOD.m-3)	0.05195	0.1419	0.01419
SAC (kgCOD.m-3)	0.14698	0.5871	0.05871
SH2 (kgCOD.m-3)	0	0	0
NH4 (kmolN.m-3)	0.10527	0.0899	0.085
XILIGN_P (kgCOD.m-3)*	3.09141	3.03018491	6.90038271
XILIGN_C (kgCOD.m-3)*	0.28434	6.88592532	17.65632
XIHOLO_P (kgCOD.m-3)*	2.70318852	1.688049	3.28536055
XIHOLO_C (kgCOD.m-3)*	2.47404	1.63408324	12.605383
XIPROT_P (kgCOD.m-3)*	0	0	0
XIPROT_C (kgCOD.m-3)*	0	0	0
Sci (kgCOD.m-3)	0	0	0
SI (kgCOD.m-3)	0	0	0
SIAA (kgCOD.m-3)	0	0	0

* Calibrated value

Supplementary data 2-b: Biomass calibration from steady state experiments at HRT 28 and 48 days.

State variable	HRT 28			HRT 48		
XSU (kgCOD.m-3)	1.87186	1.9272	0.7713	1.3197	1.3348	0.6123
XAA (kgCOD.m-3)	0.60025	0.2511	0.3039	0.4306	0.175565	0.2034
XFA (kgCOD.m-3)	0.10889	0.04837	0.0042	0.07871	0.05323	0.031
XC4 (kgCOD.m-3)	0.33596	0.2256	0.1555	0.2394	0.15678	0.1124
XPR (kgCOD.m-3)	0.22861	0.2097	0.0943	0.1618	0.14561	0.0753
XAC (kgCOD.m-3)	0.87332	0.7159	0.37143	0.6205	0.5089	0.2867
XH2 (kgCOD.m-3)	0.44778	0.3919	0.18891	0.3174	0.2774	0.1461

Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre et modéliser les processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie afin de prédire la qualité azotée des digestats. La revue de la littérature en matière de transformations de l'azote et de leur intégration dans des modèles de digestion anaérobie a notamment permis d'identifier un manque de connaissances par rapport à la bioaccessibilité de l'azote. Par conséquent, deux problématiques scientifiques ont pu être formulées: (i) Quelle est la bioaccessibilité de l'azote organique des substrats et son évolution au cours de la digestion anaérobie, et (ii) comment intégrer cet indicateur à un modèle de digestion anaérobie de type ADM1. Un premier chapitre de synthèse aura pour objectif de synthétiser les réponses apportées par les travaux menés durant cette thèse à ces verrous scientifiques.

Cependant ces résultats ne permettent pas de répondre à eux seuls aux problématiques opérationnels de pilotage de la digestion anaérobie pour l'optimisation de la substitution des engrais minéraux azotés par les digestats. Pour ce faire, un second paragraphe de synthèse proposera une réinterprétation des résultats obtenus durant cette thèse répondant aux questionnements opérationnels posés en introduction de ce manuscrit.

1. Synthèse des résultats scientifiques

1.1. Compréhension des transformations de l'azote en digestion anaérobie

Le développement des pilotes, adaptés au suivi de l'azote en digestion, a permis de suivre les transformations de l'azote organique des substrats et sa biodégradation. Dans un premier temps, la biodégradabilité totale de l'azote organique des substrats a été mesurée à l'aide de la « méthode ANMP » développée durant cette thèse afin de déterminer si un lien existe entre la biodégradabilité du carbone et de l'azote. Dans un second temps, la bioaccessibilité de l'azote organique a été déterminée selon une méthode d'extractions successives et les modifications de cette bioaccessibilité ont été suivies en conditions batch et en conditions réelles.

1.1.1. Détermination d'une typologie de substrat basée sur l'état initial de minéralisation de l'azote organique.

L'azote organique apporté par les substrats a montré une biodégradabilité partielle et très variable d'un substrat à l'autre. La comparaison entre biodégradabilité du carbone et de l'azote organique a montré

l'existence de deux types de substrats dont les différences étaient gouvernées par l'état de biodégradation avant digestion. En effet, les substrats ayant subi peu ou pas de biodégradation avant digestion, tels que les cultures à vocation énergétique et les déchets d'industries agroalimentaires frais, montraient des biodégradabilités du carbone et de l'azote proches. Dans le cas opposé, des substrats dits stabilisés biologiquement, tels que les effluents d'élevage, montraient une biodégradabilité de l'azote significativement inférieure à celle du carbone. Ces derniers substrats se caractérisaient par une minéralisation initiale de l'azote organique importante avec un ratio NH_4^+/NTK supérieur à 30%.

L'hypothèse de processus de minéralisation découplés entre les composés azotés et carbonés a été émise à ce stade et appuyée par l'exploration de la bioaccessibilité du carbone et de l'azote organique. En effet, la distribution du carbone et de l'azote dans les fractions Van Soest et EPS des substrats avant digestion a montré une répartition différente de ces éléments qui, de plus, dépendait du substrat étudié. Le découplage des processus associés à la minéralisation du carbone et de l'azote a été ensuite démontré via le suivi spécifique de l'évolution de la bioaccessibilité de l'azote organique et du carbone lors de l'étude de l'évolution de la bioaccessibilité en digestion anaérobie.

1.1.2. Transformations de l'azote organique en digestion anaérobie selon la bioaccessibilité.

Le suivi de la bioaccessibilité de l'azote organique lors des expérimentations en réacteur batch a pu mettre en évidence trois types de transformations :

- Des transferts de l'azote des fractions moyennement, peu et difficilement bioaccessibles (PROT, HOLO et LIGN) vers la fraction facilement bioaccessible (SOL). Ces derniers différaient de ceux observés pour le carbone au vu des variations de ratios C/N obtenues au cours de la digestion,
- Des transformations de l'azote organique rapidement bioaccessible en azote ammoniacal
- Des transformations d'azote ammoniacal en azote organique, transféré dans la fraction moyennement bioaccessible.

Ces transformations concernent chaque fraction de façon partielle. En effet, en fin de digestion, de l'azote organique a été retrouvé dans toutes les fractions et sa répartition dépend du substrat digéré.

Les biodégradabilités des fractions ont montré des tendances liées à la typologie mise en place la section précédente. Les substrats avec un ratio NH_4^+/NTK supérieur à 30% ont montré une très faible biodégradation de l'azote organique des fractions peu et difficilement bioaccessibles (HOLO et LIGN) par rapport aux substrats avec un ratio NH_4^+/NTK inférieur à 30%. Ces résultats pour HOLO et LIGN ont montré un degré de complexité des structures lignocellulosiques plus important pour les substrats avec un ratio NH_4^+/NTK supérieur à 30% rendant une plus grande proportion de l'azote organique non disponible à la biodégradation. Cet azote organique est non biodégradable car encapsulé par des composés lignocellulosiques dans le cas des fractions peu et difficilement bioaccessibles (HOLO et LIGN) (Monlau et al., 2013; Tian et al., 2017).

Les transformations de l'azote organique en azote ammoniacal, quant à elles, ont montré des liens avec les dynamiques de biodégradation de l'azote organique dans la fraction facilement bioaccessible (SOL) et dans la fraction moyennement bioaccessible (PROT). En effet, une accumulation d'azote organique dans cette dernière fraction a été observée sur tous les substrats avec une intensité plus ou moins importante. Cette accumulation transitoire correspond à la quantité d'azote assimilée pour la croissance de la biomasse et à la production de produit microbiens de type EPS et acides humiques récalcitrants à la biodégradation (MacCarthy, 1976; Stevenson, 1982). Avec sa désactivation consécutive à la phase de croissance nette, la biomasse et les produits cellulaires sont lentement et partiellement biodégradés. Ces transformations ont été visibles grâce à la faible vitesse de dégradation de la fraction PROT et le transfert de composés azotés non biodégradés dans la fraction SOL. L'azote inerte contenu dans ces fractions (SOL et PROT) était par conséquent associé à la désactivation de la biomasse. L'azote organique inerte détecté dans les fractions PROT et SOL est donc supposé lié à la présence de substances dites humiques particulières produites dans la fraction moyennement bioaccessible (PROT) et partiellement solubilisé lors de la désactivation des microorganismes.

Le changement d'échelle avec l'utilisation d'un pilote de digestion anaérobie à alimentation séquentielle (semi continu) a permis de compléter et valider les connaissances précédemment acquises. Ce type de réacteur permet une acclimatation de la biomasse qui s'adapte au substrat à dégrader. Très peu de différences au niveau des processus ont été observées à l'instar de transfert

d'azote organique de la fraction difficilement bioaccessible vers la fraction peu bioaccessible (LIGN → HOLO). La typologie des substrats est restée pertinente notamment sur la quantité d'azote organique minéralisé et sur la bioaccessibilité de l'azote organique non biodégradé.

1.2. La modélisation comme outil de prédiction.

Les estimations de la biodégradation de l'azote organique basées sur la biodégradabilité du carbone ont vite montré leur limite. Les comparaisons entre les deux biodégradabilités et les découplages entre les processus de transformation du carbone et de l'azote n'ont pas permis d'utiliser la biodégradabilité du carbone comme indicateur de la biodégradabilité de l'azote organique. L'intégration de l'indicateur de bioaccessibilité basé sur le fractionnement EPS s'est avéré une solution pour décrire au mieux les transformations de l'azote en digestion anaérobie. Différents modèles ont pu être développés durant ces travaux en fonction des paramètres de sorties recherchés (biodégradabilité totale, bioaccessibilité/biodégradation à un temps de séjour donné). Ces modèles ont été de deux types : (i) Des modèles de type statistiques visant à prédire la biodégradabilité de l'azote organique. (ii) Un modèle de type biocinétique permettant de modéliser la biodégradation du carbone et de l'azote selon différents critères tels que le temps de séjour, la charge organique etc...

1.2.1. Prédiction de la biodégradabilité totale des substrats en fonction de leur bioaccessibilité

Les modèles statistiques, de type PLS, ont permis de montrer des liens entre les fractions liées à la bioaccessibilité et la biodégradabilité de l'azote organique. Ces modèles ont mis en évidence que les contributions des différentes fractions de l'azote organique étaient fonction de la typologie du substrat. En effet, des substrats déjà dégradés avant digestion montrent une contribution plus importante de l'azote organique des fractions facilement et peu bioaccessibles (SOL et HOLO) tandis que les substrats dits « frais » montraient une contribution plus équilibrée de l'azote organique issu des fractions facilement, moyennement et peu bioaccessibles (SOL, PROT et HOLO) selon le fractionnement EPS. Les modèles développés étaient en accord avec les observations établies sur la biodégradabilité de l'azote organique selon les typologies de substrat décrites. Ces modèles ont donc montré de bonnes capacités à prédire la biodégradabilité totale de l'azote en prenant en compte les typologies établies avec 10% d'erreur au maximum. Néanmoins, lors de cette thèse, il a pu être

observé un impact du temps de séjour qui a nécessité, pour être prédit, le développement d'un modèle prenant en compte les cinétiques de biodégradation de l'azote organique dans les fractions.

1.2.2. Prédiction de la bioaccessibilité de l'azote organique des digestats

Le développement du modèle biocinétique ADMacc, basé sur le modèle ADM1, a permis de simuler la biodégradabilité de l'azote organique et l'évolution de sa bioaccessibilité. Ce modèle permet de prendre en compte les cinétiques de transformation de l'azote et de simuler différents types de configurations de digestion. Ce modèle a été développé sur la base des observations effectuées sur les essais de digestion en batch et en pilote semi continu. Les originalités du modèle ADMacc développé durant cette thèse sont principalement :

- L'implémentation d'un fractionnement basé sur la bioaccessibilité en remplacement de la fraction composite du modèle ADM1. Ce remplacement a eu pour effet d'augmenter le degré de connaissance des processus d'hydrolyse.
- Une meilleure description du recyclage de la biomasse basée sur les observations des transformations de la fraction moyennement bioaccessible (PROT). Cette nouvelle description du recyclage de la biomasse permet de découpler la biodégradation du substrat de celle des produits microbiens.
- Une continuité du ratio C/N dans les transformations des fractions en considérant des transformations découplées des produits azotés et non azotés via séparation des composés protéinés et non-protéinés dans les fractions.

Ces modifications ont pour effet principal de maintenir des ratios C/N stables pour les composés protéinés et de mieux simuler les variations de ce ratio observées au cours de la digestion. La calibration du modèle a mis en évidence des constantes d'hydrolyse généralisables d'un substrat à un autre sur les fractions peu et difficilement bioaccessibles (HOLO et LIGN). Cela a aussi été observé sur les composés protéinés et non-protéinés. Par conséquent, le modèle ADMacc ne nécessite pas de calibration pour ces constantes cinétiques. Ceci est aussi vrai pour les composés azotés dans la fraction moyennement bioaccessible (PROT), notamment de par le poids du recyclage de la biomasse.

Cependant, l'influence des substrats a été visible sur la quantité d'inertes présents dans les fractions peu et difficilement bioaccessibles (HOLO et LIGN). En effet, la proportion d'inertes dans ces fractions varie d'un substrat à l'autre et nécessite des expérimentations préalables pour être déterminée. Cette influence existait aussi sur les constantes cinétiques relatives aux composés non-protéinés des fractions facilement et moyennement bioaccessibles (SOL et PROT). Malgré ces limites, l'utilisation de la typologie déterminée dans cette thèse peut permettre d'estimer les cinétiques de biodégradation de ces fractions avec des constantes cinétiques élevées pour les substrats avec un ratio NH_4^+/NTK inférieur à 30% et inversement pour la seconde typologie de substrats.

La calibration et la validation du modèle ADMacc en batch et en réacteur à alimentation séquentielle ont pu valider les capacités prédictives du modèle notamment sur la production d'ammonium, la production de méthane et la bioaccessibilité de l'azote organique en s'affranchissant d'une calibration systématique du modèle. Ces différents modèles, de par leurs capacités prédictives avérées, présentent un intérêt comme outil d'aide à la décision pour le pilotage de digesteur en fonction d'objectifs concernant la composition azotée des digestats.

2. Applications des résultats de la thèse au pilotage de la qualité azotée des digesteurs.

L'objectif opérationnel de la thèse consistait en la production de données et d'outils permettant d'inclure la qualité azotée des digestats dans les critères de dimensionnement et de pilotage des unités de méthanisation. Si les connaissances et outils numériques développés dans le cadre de cette thèse sont à ce stade essentiellement à destination du milieu scientifique, ils peuvent néanmoins être utilisés pour produire des données à destination opérationnelle répondant à deux questionnements :

- Est-il possible de piloter les propriétés azotées des digestats en utilisant les cocktails de substrats comme variables ?
- Est-il possible de piloter les propriétés azotées des digestats en utilisant le principal critère de dimensionnement des unités de méthanisation utilisé : le temps de séjour des matières ?

Les deux sections suivantes proposent donc d'illustrer en quoi les résultats de cette thèse peuvent être utilisés pour répondre à ces deux questions. Les trois caractéristiques pouvant être utilisées par les agriculteurs pour piloter leur fertilisation azotée d'origine organique sont :

- le NTK : représentant la teneur en azote total du digestat épandu,
- le ratio NH_4^+/NTK qui représente la proportion d'azote sous forme minéralisée rapidement disponible pour la culture fertilisée,
- le ratio C/N, qui représente l'équilibre en les composantes amendantes et fertilisantes des digestats.

C'est donc sur ces trois critères que seront analysés l'impact des cocktails de substrats et du temps de séjour des matières.

2.1. Impact des cocktails de substrats sur les propriétés azotées des digestats

Eléments de méthode : L'ensemble des données de caractérisation des substrats (analyses COT, NTK, NH_4^+ , biodégradabilité du carbone et de l'azote, issues des mesures de BMP et d'ANMP respectivement) ont été utilisées pour simuler un panel de digestats issus de la codigestion d'un substrat de base (lisier de porc ou mélange équiproportionné de lisier et fumier de bovins) avec un

cosubstrat. 42 digestats ont ainsi été obtenus. Les ratios de co-substrats (issus du panel utilisé dans le chapitre 3) ont été calculés au cas par cas de façon à obtenir une charge organique de $2,5 \text{ kgMV.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ et un temps de séjour de 50 jours (données de dimensionnement moyennes observées en Bretagne, Quideau et al., 2018). Afin de prédire les propriétés des digestats obtenus, un rendement de digestion correspondant à 80% des biodégradabilités maximales du carbone et de l'azote a été considéré. Les résultats obtenus ont été analysés via des statistiques descriptives couplées à une analyse en composantes principales afin de classer les différents substrats selon leurs effets sur les caractéristiques des digestats.

2.1.1. Impact du substrat de base sur les propriétés fertilisantes et amendantes des digestats

Les C/N et taux de minéralisation de l'azote obtenus sur les digestats sont présentés sur la figure 52.

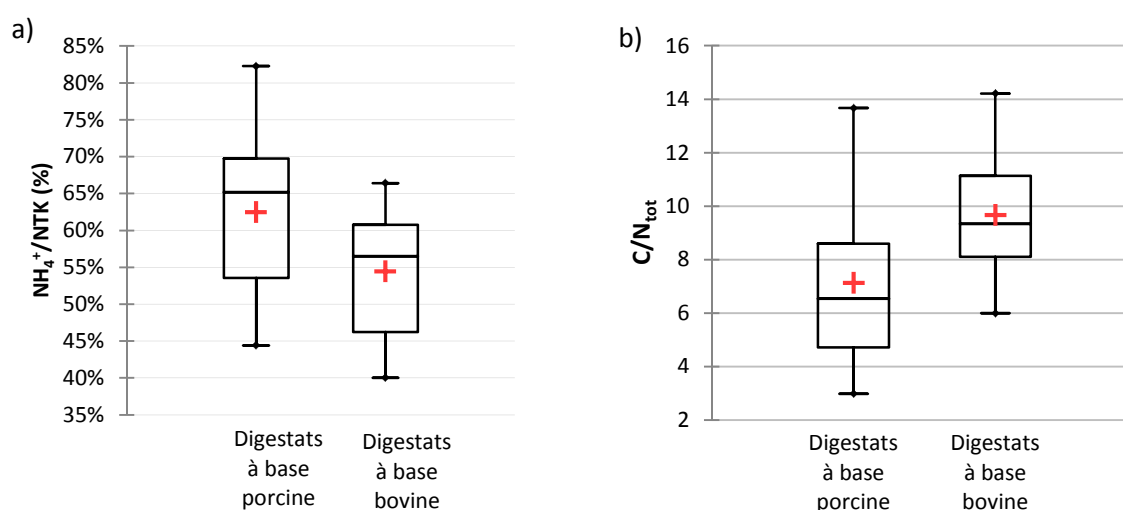


Figure 52: Impact du substrat de base sur les taux de minéralisation de l'azote (a) et le C/N (b) des digestats.

Les résultats obtenus montrent une minéralisation de l'azote plus importante pour les digestats ayant le lisier porcin comme substrat de base (fig. 52a). Cette différence est essentiellement due à la quantité plus importante de co-substrat à ajouter dans le lisier porcin (en moyenne 50% du flux total de substrats, contre 36% pour les digestats issus des scénarii mettant en œuvre le mélange lisier/fumier de bovin comme substrat de base) du fait de sa faible concentration en matière organique combinée avec une biodégradabilité de l'azote organique en général plus importante pour les cosubstrats que les effluents d'élevage ici considérés. Ces résultats simulés sont en accord avec les mesures effectuées

dans le cadre d'essais agronomiques qui montrent une disponibilité de l'azote plus importante pour les digestats « porcins » que pour les digestats « bovins » (Decoopman et al., 2017).

D'autre part, les résultats montrent un C/N plus important en moyenne dans le cas de digestats utilisant les effluents bovins comme substrats de base. Ce résultat corrobore les données observées récemment sur le terrain dans le cadre d'analyses de digestats (Wallrich et al., 2018). Ceci est essentiellement lié au fort impact du substrat de base sur la concentration en carbone organique des digestats obtenus (C/N de 8 et 18 respectivement pour le lisier de porc et le mélange lisier/fumier de bovins) notamment du fait de la faible biodégradabilité du carbone qui en est issu. Ainsi, les propriétés amendantes des digestats issus de filières bovines apparaissent en moyenne plus élevées que dans le cas de filières porcines. Et la symétrie inverse est observée pour les propriétés fertilisantes azotées.

2.1.2. Impact des co-substrats sur les propriétés fertilisantes et amendantes des digestats

Les résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des digestats simulés obtenus sont présentés sur la figure 53. Les résultats montrent que la qualité azotée du digestat dépend aussi de du type de co-substrat ajouté à la matrice lisier. En effet, l'analyse permet d'identifier trois typologies de co-substrats dépendantes de la biodégradabilité du carbone, de l'azote organique ainsi que de leur teneur en carbone et en azote total :

- Type 1 : Les substrats qui ont tendance à réduire le taux de minéralisation de l'azote et à augmenter le ratio C/N (groupe en rouge). Ces substrats sont représentés par des cultures et résidus de cultures à pouvoir méthanogène faible à modéré avec des faibles teneurs en azote total. La biodégradabilité de leur azote organique est très faible.
- Type 2 : Les substrats qui ont tendance à ne pas modifier la qualité du digestat par rapport à la digestion du substrat de base seul (groupe en bleu). Les substrats représentés sont des cultures (ensilées ou non) avec un pouvoir méthanogène modéré à fort et des plus fortes teneurs en azote total que dans le cas du type 1. La biodégradabilité de leur azote organique est moyenne.
- Type 3 : Les substrats qui augmentent considérablement le taux de minéralisation de l'azote dans le digestat (groupe en vert) en apportant peu de carbone au digestat. Les substrats représentés ici sont plus diversifiés avec des déchets d'industries agro-alimentaires, les

biodéchets des ménages et gros-producteurs ainsi que certains ensilages très biodégradables et chargés en azote (ensilage d'herbe). La principale caractéristique est une forte teneur en azote total, combinée à une biodégradabilité de l'azote organique forte.

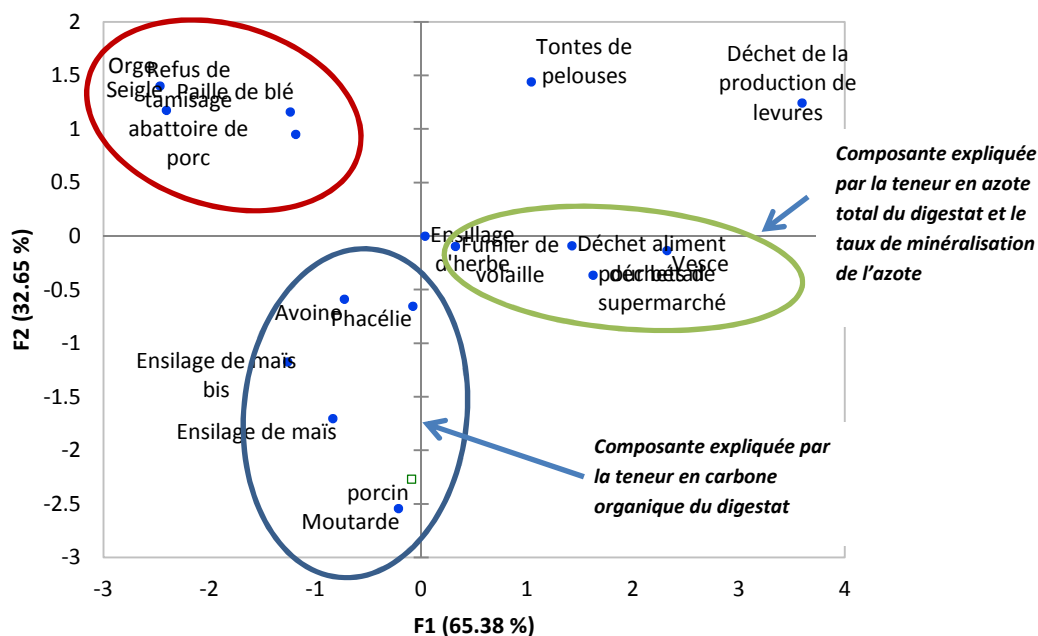


Figure 53: Résultat de l'analyse en composantes principales réalisée sur l'ensemble des digestats simulés.

Ces données montrent qu'il est possible d'optimiser les cocktails de substrats en fonction d'objectifs en terme de propriétés amendantes et fertilisantes des digestats. Cependant, sur le terrain, ces données doivent être croisées avec la production de méthane à atteindre.

2.2. Impact du temps de séjour des matières sur les propriétés fertilisantes azotées des digestats

Eléments de méthode : L'impact du temps de séjour a été évalué à l'aide de prédictions effectuées via le modèle ADMacc sur trois configurations de codigestion : déchets d'aliments pour bétail + lisier porcin ; ensilage de maïs + lisier porcin ; fumier de génisses + lisier porcin (configurations identiques à celles du chapitre 5).

L'effet du temps de séjour des matières sur le taux de minéralisation de l'azote organique observé dans le digesteur sont présentés figure 54. L'impact de ce même paramètre sur les propriétés du digestat (ratio C/N du digestat, concentration en azote ammoniacal et la bioaccessibilité de l'azote organique du digestat) est présenté figure 55.

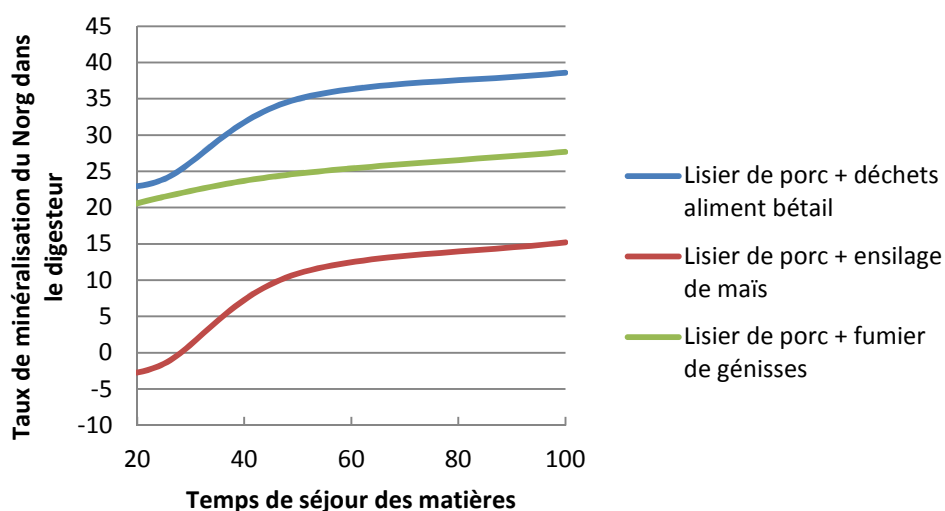


Figure 54: Simulation de l'impact du temps de séjour des matières sur le taux de minéralisation de l'azote organique dans le digesteur.

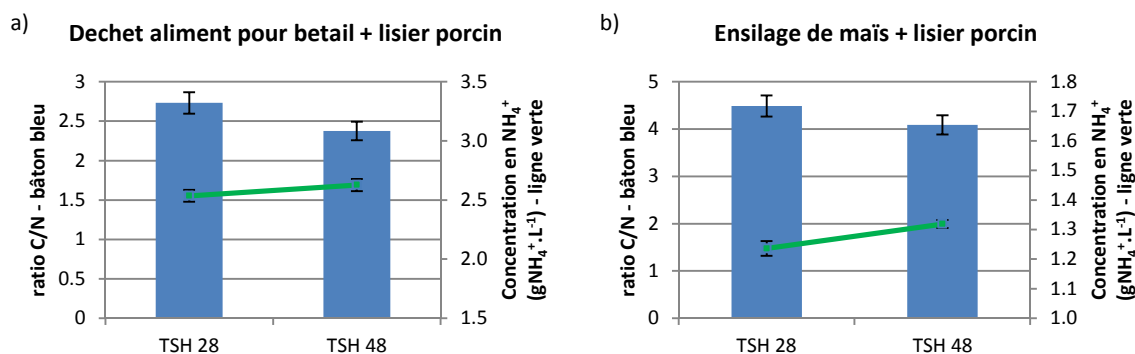


Figure 55: Effet du temps de séjour sur le ratio C/N et la concentration en ammonium (a et b) du digestat.

L'augmentation du temps de séjour induit, en fonction des substrats, un impact significatif sur le taux de minéralisation de l'azote organique dans le digesteur. Cependant, ceci se traduit par un impact faible à modéré sur la concentration en azote ammoniacal dans le digestat (figure 55a) du fait de la forte concentration initiale en azote ammoniacal des cocktails de cosubstrats mobilisant des effluents d'élevage. Les ratios C/N montrent une tendance inversée par rapport à celle de la concentration en ammonium dans le digestat. En effet, l'augmentation du temps de séjour induit une diminution faible du ratio C/N dont la significativité dépend des substrats. Ces résultats montrent que le temps de séjour des matières dans le digesteur a potentiellement un impact sur les propriétés fertilisantes azotées des digestats. Mais ce dernier reste bien inférieur à celui des substrats. En revanche, les résultats du chapitre 5 ont montré que le temps de séjour des matières peut, selon les substrats, avoir un impact significatif sur la bioaccessibilité de l'azote organique du digestat. Cette caractéristique peut impacter sa dynamique de minéralisation après retour au sol et donc la disponibilité de l'azote organique épandu pour les cultures en place. Cependant, ces impacts restent à investiguer dans la suite de ce travail.

Perspectives

Les modèles et méthodes développés durant cette thèse ont permis des avancées significatives des connaissances sur les transformations de l'azote en digestion anaérobie. La prédiction des taux de minéralisation et de la bioaccessibilité de l'azote et du carbone du digestat a été rendue possible par la transcription des processus observés expérimentalement dans le modèle ADM1 modifié : ADMacc. L'objectif à présent est d'intégrer ce modèle dans un outil de modélisation simulant la filière de valorisation des déchets depuis leur entrée dans le digesteur jusqu'à l'assimilation de l'azote des digestats par la plante ainsi que tous les services agronomiques que peuvent rendre ces résidus de méthanisation. Pour ce faire, il existe encore quelques verrous à lever sur le modèle en lui-même et les modèles qui simulent les étapes en aval de la digestion anaérobie. Ces derniers peuvent être synthétisés autour de trois objectifs scientifiques : (i) déterminer une méthode de quantification de l'azote non biodégradable dans les fractions pour rendre le modèle de digestion 100% prédictif, (ii) déterminer des liens entre les fractionnements des différents modèles traitant des processus en aval de la digestion anaérobie et le modèle ADMacc développé et (iii) comprendre/modéliser les transformations du carbone issu des digestats dans les sols afin de mieux comprendre son lien avec les services agronomiques au sol. Ces trois principales perspectives sont détaillées ci-dessous.

➤ Rendre le modèle ADMacc 100% prédictif

Les principales limites du modèle ADMacc se sont traduites par la variabilité observée sur les biodégradabilités des fractions peu accessibles (LIGN et HOLO) en fonction des substrats. Dans le cadre de cette thèse, les proportions d'inertes ont été déterminées de manière empirique (incubation du substrat sur 50 jours) ou bien estimées lors de la calibration du modèle. Ces méthodes de détermination des inertes sont lourdes car elles nécessitent dans les deux cas la mise en place d'expérimentations coûteuses en temps et moyens. Afin d'utiliser le modèle de manière purement prédictive sans mettre en place ce type d'expérimentation, une caractérisation plus poussée des substrats est nécessaire. Pour ce faire, compléter la caractérisation de la matière organique (azote et carbone organique) avec une caractérisation de la complexité des fractions pourrait être une solution.

En effet, des méthodes fluorométriques 3D couplées au fractionnement EPS telles qu'utilisées par Jimenez et al. (2018) pourraient permettre de prédire la biodégradabilité de chaque fraction dans ses composantes carbonées et azotées, moyennant le développement de modèles statistiques. Néanmoins, la caractérisation de la complexité de l'azote de chaque fraction pourrait nécessiter des développements méthodologiques. En effet, la détection de l'azote pourrait nécessiter l'utilisation de fluorochromes spécifiques à certains acides aminés (Jameson et al., 2003) afin de déterminer les zones de complexité où ils sont localisés. En fonction de la localisation de la protéine sur la matrice d'excitation/émission, l'azote organique sera plus ou moins associé à des structures complexes et pourrait être considéré comme biodégradable ou inerte. De tels développements pourraient rendre le modèle totalement prédictif, les données d'entrée étant uniquement issues d'analyses des substrats (sans expérimentation de digestion anaérobie), et faciliter son intégration dans un modèle de filière.

- Rendre les modèles de digestion développés compatibles avec les autres modèles associés aux étapes en aval sur la filière

L'intégration des modèles développés durant cette thèse à un outil d'aide à la décision montre un grand intérêt pour l'optimisation de l'alimentation d'un digesteur à des fins d'amélioration de la valeur fertilisante des digestats. Cependant, comme mentionné plus haut, les modèles statistiques de prédiction du taux de minéralisation de l'azote et le modèle ADMacc sont basés sur des extractions type EPS lorsque les modèles agronomiques intégrant la minéralisation de l'azote organique sont basés sur des extractions Van Soest. Selon la littérature, ces deux fractionnement diffèrent par leur degré d'agressivité vis-à-vis de l'extraction de la matière organique (Bareha et al., 2018; Jimenez et al., 2015; Mottet et al., 2010). Durant cette thèse, des suivis des fractionnements EPS et Van Soest ont été effectués sur des tests de biodégradation en batch et des correspondances entre ces deux fractionnements, notamment en fin de digestion, ont été visibles sur certains substrats. Ces correspondances sont visibles figure 56 sur toutes les fractions au point final.

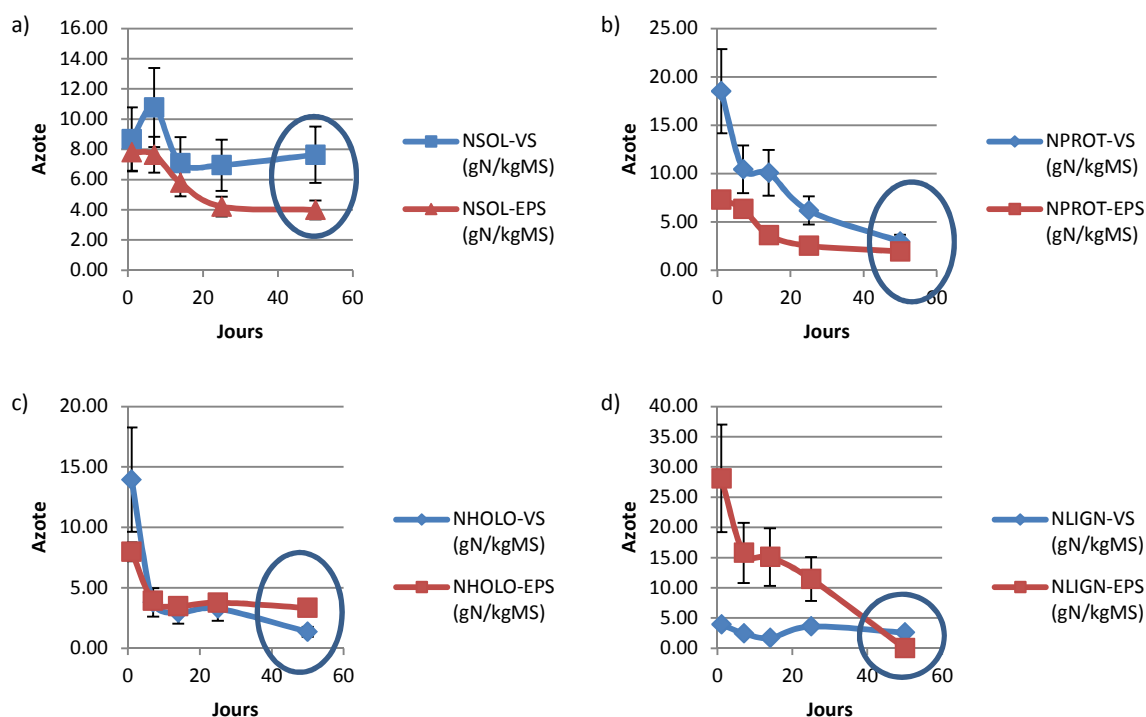


Figure 56: Evolution de l'azote organique dans les fractions NSOL (a), NPROT (b), NHOLO (c) et NLIGN (d) selon le fractionnement Van Soest (bleu) et EPS (rouge) pour les déchets d'aliment pour bétail.

L'approfondissement de l'étude des liens entre ces méthodes de fractionnement pourrait permettre la construction d'un modèle statistique de correspondance permettant la construction d'interfaces entre le modèle de digestion anaérobie et les modèles associés aux étapes en aval sur la filière (retour au sol, compostage...). Ainsi, la compatibilité entre les modèles associés aux différentes étapes permettra d'utiliser l'outil numérique développé dans le cadre d'une optimisation de l'ensemble de la filière dans l'objectif de maximiser conjointement ses services énergétiques et agronomiques.

➤ Explorer la qualité carbonée des digestats.

Le carbone apporté par les digestats dans les sols présente plusieurs impacts sur ses derniers. En effet, selon sa complexité et sa biodégradabilité dans les sols, des impacts sur la biodiversité des sols, sur la stabilité des agrégats, sur les stocks de carbone dans les sols et la minéralisation de l'azote organique peuvent avoir lieu. La connaissance de ces impacts dus aux digestats reste très marginale et cette

approche peut venir compléter les travaux sur la modélisation des propriétés fertilisantes des digestats, en les étendant aux propriétés amendantes de ces dernières. Cependant, pour comprendre les dynamiques de transformation de l'azote au cours de la digestion, le devenir du carbone a été aussi étudié et sa bioaccessibilité a été simulée durant la digestion anaérobie. Par conséquent, il serait possible d'utiliser cette base comme point de départ pour la modélisation de l'impact du dimensionnement et du fonctionnement des unités de méthanisation sur les propriétés carbonées des digestats en lien avec les services écosystémiques rendus par le carbone organique dans les sols, à partir d'une simple caractérisation des substrats à valoriser par digestion anaérobie. Une telle approche nécessitera cependant des adaptations afin que les outils de modélisation de la digestion anaérobie soient capables de prédire l'ensemble des descripteurs impliqués dans les services rendus par le carbone organique dans les sols. Elle apparaît néanmoins nécessaire pour permettre la conception de filières de méthanisation adaptées à l'ensemble des services attendus pour le retour au sol des digestats qui pourront alors être reconnus à leur juste valeur.

Références bibliographiques

- ADEME, al, 2012. Les émissions agricoles de particules dans l'air - Etat des lieux et leviers d'action.
- Albuquerque, J.A., De la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., 2012. Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *Eur. J. Agron.* 43, 119–128.
- Alves, M.M., Pereira, M.A., Sousa, D.Z., Cavaleiro, A.J., Picavet, M., Smidt, H., Stams, A.J.M., 2009. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microb. Biotechnol.* 2, 538–550.
- Andreesen, J.R., Bahl, H., Gottschalk, G., 1989. Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus *Clostridium*. In: Minton, N.P., Clarke, D.J. (Eds.), *Clostridia, Biotechnology Handbooks*. Springer US, pp. 27–62.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K., 1993. A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 159–166.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K., 1999. A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 363–372.
- APHA, 2005. Standard methods for the examination of water and waste water, 21st edn.
- Bareha, Y., Girault, R., Jimenez, J., Trémier, A., 2018. Characterization and prediction of organic nitrogen biodegradability during anaerobic digestion: A bioaccessibility approach. *Bioresour. Technol.* 263, 425–436.
- Bareha, Y., Guezal, S., Chaker, J., Girault, R., Tremier, A., n.d. Modelling the fate of organic nitrogen during anaerobic digestion: development of a bioaccessibility based ADM1. *Submiss.* n.d., n.d.
- Barker, H.A., 1981. Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 23–40.
- Barrett, A.J., Woessner, J.F., Rawlings, N.D., 2012. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier.
- Batstone, D. j., Tait, S., Starrenburg, D., 2009. Estimation of hydrolysis parameters in full-scale anaerobic digesters. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1513–1520.
- 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(ADM 1). *Water Sci. Technol.* 45, 65–73.
- Batstone, D.J., Lu, Y., Jensen, P.D., 2015a. Impact of dewatering technologies on specific methanogenic activity. *Water Res., Special Issue on Sludge Research* 82, 78–85.
- Batstone, D.J., Pind, P.F., Angelidaki, I., 2003. Kinetics of thermophilic, anaerobic oxidation of straight and branched chain butyrate and valerate. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 195–204.
- Batstone, D.J., Puyol, D., Flores-Alsina, X., Rodríguez, J., 2015b. Mathematical modelling of anaerobic digestion processes: applications and future needs. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 595–613.

- Batstone, D.J., Torrijos, M., Ruiz, C., Schmidt, J.E., 2004. Use of an anaerobic sequencing batch reactor for parameter estimation in modelling of anaerobic digestion. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 50, 295–303.
- Bayard, R., Gonzalez-Ramirez, L., Guendouz, J., Benbelkacem, H., Buffière, P., Gourdon, R., 2015. Statistical Analysis to Correlate Bio-physical and Chemical Characteristics of Organic Wastes and Digestates to Their Anaerobic Biodegradability. *Waste Biomass Valorization* 6, 759–769.
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., 2011. *Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.
- Brons, H.J., Field, J.A., Lexmond, W.A.C., Lettinga, G., 1985. Influence of humic acids on the hydrolysis of potato protein during anaerobic digestion. *Agric. Wastes* 13, 105–114.
- Chalhoub, M., Garnier, P., Coquet, Y., Mary, B., Lafolie, F., Houot, S., 2013. Increased nitrogen availability in soil after repeated compost applications: Use of the PASTIS model to separate short and long-term effects. *Soil Biol. Biochem.* 65, 144–157.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064.
- Cirne, D.G., Paloumet, X., Björnsson, L., Alves, M.M., Mattiasson, B., 2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste-Effects of lipid concentration. *Renew. Energy* 32, 965–975.
- Coelho, N.M.G., Droste, R.L., Kennedy, K.J., 2011. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Res.* 45, 2822–2834.
- Cresson, R., Pommier, S., Béline, F., Bouchez, T., Bougrier, C., Buffière, P., Mazéas, L., Pauss, A., Pouech, P., Preys, S., Ribeiro, T., Rouez, M., Torrijos, M., 2015. Results from a french inter-laboratory campaign on the biological methane potential of solid substrates. 2015 14 World Congr. Anaerob. Dig. AD14 Viña Mar CHL 2015-11-15-2015-11-18.
- Decoopman, B., Houot, S., Germain, M., Hanocq, D., Airiaud, A., Lejare, L., Le Roux, C., 2017. Valeur azote des digestats de méthanisation.
- Demirel, B., Yenigün, O., 2002. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 743–755.
- Denes, J., Tremier, A., Menasseri-Aubry, S., Walter, C., Gratteau, L., Barrington, S., 2015. Numerical simulation of organic waste aerobic biodegradation: A new way to correlate respiration kinetics and organic matter fractionation. *Waste Manag.* 36, 44–56.
- DiRusso, C.C., Black, P.N., 2004. Bacterial Long Chain Fatty Acid Transport: Gateway to a Fatty Acid-responsive Signaling System. *J. Biol. Chem.* 279, 49563–49566.
- Dulekgurgen, E., Dogruel, S., Karahan, O., Orhon, D., 2006. Size distribution of wastewater COD fractions as an index for biodegradability. *Water Res.* 40, 273–282.

- Fernandes, T.V., van Lier, J.B., Zeeman, G., 2015. Humic Acid-Like and Fulvic Acid-Like Inhibition on the Hydrolysis of Cellulose and Tributyrin. *BioEnergy Res.* 8, 821–831.
- Fisgativa, H., Marcilhac, C., Girault, R., Daumer, M.-L., Trémier, A., Dabert, P., Béline, F., 2018. Physico-chemical, biochemical and nutritional characterisation of 42 organic wastes and residues from France. *Data Brief* 19, 1953–1962.
- Flotats, X., Palatsi, J., Ahring, B.K., Angelidaki, I., 2006. Identifiability study of the proteins degradation model, based on ADM1, using simultaneous batch experiments. *Water Sci. Technol.* 54, 31–39.
- Fouda, S., von Tucher, S., Lichti, F., Schmidhalter, U., 2013. Nitrogen availability of various biogas residues applied to ryegrass. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 176, 572–584.
- Galí, A., Benabdallah, T., Astals, S., Mata-Alvarez, J., 2009. Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresour. Technol.* 100, 2783–2790.
- Garnier, P., Néel, C., Aita, C., Recous, S., Lafolie, F., Mary, B., 2003. Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 555–568.
- Girault, R., 2011. Étude des cinétiques de dégradation anaérobie et des interactions entre substrats organiques : impact sur les filières de co-digestion. Rennes 1.
- Girault, R., Bridoux, G., Nauleau, F., Poullain, C., Buffet, J., Peu, P., Sadowski, A.G., Béline, F., 2012a. Anaerobic co-digestion of waste activated sludge and greasy sludge from flotation process: Batch versus CSTR experiments to investigate optimal design. *Bioresour. Technol.* 105, 1–8.
- Girault, R., Bridoux, G., Nauleau, F., Poullain, C., Buffet, J., Steyer, J.-P., Sadowski, A.G., Béline, F., 2012b. A waste characterisation procedure for ADM1 implementation based on degradation kinetics. *Water Res.* 46, 4099–4110.
- Girault, R., Rousseau, P., Steyer, J.P., Bernet, N., Béline, F., 2011. Combination of batch experiments with continuous reactor data for ADM1 calibration: application to anaerobic digestion of pig slurry. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 63, 2575–2582.
- González-Fernández, C., García-Encina, P.A., 2009. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass Bioenergy* 33, 1065–1069.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 15, 127–167.
- Gunaseelan, V.N., 2007a. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. *Bioresour. Technol.* 98, 1270–1277.
- Gunaseelan, V.N., 2007b. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. *Bioresour. Technol.* 98, 1270–1277.

- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure : inhibition by ammonia. *Water Res.* 32, 5–12.
- Hao, L.P., Mazéas, L., Lü, F., Grossin-Debattista, J., He, P.J., Bouchez, T., 2017. Effect of ammonia on methane production pathways and reaction rates in acetate-fed biogas processes. *Water Sci. Technol.* 75, 1839–1848.
- Harper, H.A., Granner, D.K., Murray, R.K., 2002. *Biochimie de Harper*. De Boeck Université.
- Hendriksen, H.V., Ahring, B.K., 1991. Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 85, 241–245.
- Hennebelle, F., Coorevits, T., 2013. Propagation des distributions - Détermination des incertitudes par la méthode de Monte Carlo. *Techniques de l'ingénieur*.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M., 2006. Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3 [WWW Document]. URL <http://test.iwaponline.com/wio/2006/10/wio200610RF1900222248.htm#.VXAY5c-8MXA> (accessed 6.4.15).
- Hillion, M.-L., Moscoviz, R., Trably, E., Leblanc, Y., Bernet, N., Torrijos, M., Escudié, R., 2018. Co-ensiling as a new technique for long-term storage of agro-industrial waste with low sugar content prior to anaerobic digestion. *Waste Manag.* 71, 147–155.
- Hobson, P.N., Bousfield, S., Summers, R., Kirsch, E.J., 1974. Anaerobic digestion of organic matter. *C R C Crit. Rev. Environ. Control* 4, 131–191.
- Jain, S., Lala, A.K., Bhatia, S.K., Kudchadker, A.P., 1992. Modelling of hydrolysis controlled anaerobic digestion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53, 337–344.
- Jameson, D.M., Croney, J.C., Moens, P.D.J., 2003. [1] Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. In: *Methods in Enzymology, Biophotonics, Part A*. Academic Press, pp. 1–43.
- Jimenez, J., Aemig, Q., Doussiet, N., Steyer, J.-P., Houot, S., Patureau, D., 2015. A new organic matter fractionation methodology for organic wastes: Bioaccessibility and complexity characterization for treatment optimization. *Bioresour. Technol.* 194, 344–353.
- Jimenez, J., Charnier, C., Latrille, E., Torrijos, M., Harmand, J., Patureau, D., Sperandio, M., Morgenroth, E., Beline, F., Ekama, G., Vanrolleghem, P.A., Robles, A., Seco, A., Batstone, D.J., Steyer, J.P., 2016. Modelling hydrolysis: simultaneous versus sequential biodegradation of the hydrolysable fractions.
- Jimenez, J., Gonidec, E., Cacho Rivero, J.A., Latrille, E., Vedrenne, F., Steyer, J.-P., 2014. Prediction of anaerobic biodegradability and bioaccessibility of municipal sludge by coupling sequential extractions with fluorescence spectroscopy: Towards ADM1 variables characterization. *Water Res.* 50, 359–372.

- Jimenez, J., Lei, H., Steyer, J.-P., Houot, S., Patureau, D., 2017. Methane production and fertilizing value of organic waste: Organic matter characterization for a better prediction of valorization pathways. *Bioresour. Technol.* 241, 1012–1021.
- Kalfas, H., Skiadas, I.V., Gavala, H.N., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2006. Application of ADM1 for the simulation of anaerobic digestion of olive pulp under mesophilic and thermophilic conditions. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 54, 149–156.
- Karahan, Ö., Dogruel, S., Dulekgurgen, E., Orhon, D., 2008. COD fractionation of tannery wastewaters—Particle size distribution, biodegradability and modeling. *Water Res.* 42, 1083–1092.
- Kleerebezem, R., Loosdrecht, M.C.M.V., 2006. Waste characterization for implementation in ADM1. *Water Sci. Technol.* 54, 167–174.
- Klimiuk, E., Gusiatin, Z.M., Bułkowska, Pokój, T., Rynkowska, S., 2015. ADM1-based modeling of anaerobic codigestion of maize silage and cattle manure – a feedstock characterisation for model implementation (part I) / Modelowanie kofermentacji kiszonki kukurydzy i obornika bydłęcego za pomocą ADM1 – charakterystyka wsadu surowcowego (część I). *Arch. Environ. Prot.* 41, 11–19.
- Kobayashi, T., Wu, Y.-P., Lu, Z.-J., Xu, K.-Q., 2014. Characterization of Anaerobic Degradability and Kinetics of Harvested Submerged Aquatic Weeds Used for Nutrient Phytoremediation. *Energies* 8, 304–318.
- Kobayashi, T., Xu, K.-Q., Li, Y.-Y., Inamori, Y., 2012. Effect of sludge recirculation on characteristics of hydrogen production in a two-stage hydrogen–methane fermentation process treating food wastes. *Int. J. Hydrog. Energy*, XII International Symposium on Polymer Electrolytes: New Materials for Application in Proton Exchange Membrane Fuel Cells 37, 5602–5611.
- Kouas, M., Charnier, C., Harmand, J., Sayadi, S., Sousbie, P., Steyer, J.-P., Torrijos, M., 2015. Kinetic modelling of anaerobic digestion with new fractionation using simple model and ADM1. 2015 14 World Congr. Anaerob. Dig. AD14 Viña Mar CHL 2015-11-15-2015-11-18.
- Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B., Lapp, H.M., 1979. Anaerobic Treatment Process Stability. *J. Water Pollut. Control Fed.* 51, 718–727.
- Kumar, A.G., Kamatchi, P., Umashankari, J., Vidhya, S., Murthy, P.S., Sekaran, G., 2007. Acidogenic fermentation of proteinaceous solid waste and characterization of different bioconversion stages and extracellular products. *Biodegradation* 19, 535–543.
- Leclerc, H., Gaillard, J.-L., Simonet, M., 1999. Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien. Doin.
- Liu, T., Sung, S., 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 45, 113–120.

- Liu, X., Bayard, R., Benbelkacem, H., Buffière, P., Gourdon, R., 2015. Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics. *Biomass Bioenergy* 81, 534–543.
- Lü, F., Hao, L., Guan, D., Qi, Y., Shao, L., He, P., 2013. Synergetic stress of acids and ammonium on the shift in the methanogenic pathways during thermophilic anaerobic digestion of organics. *Water Res.* 47, 2297–2306.
- Lübken, M., Kosse, P., Koch, K., Gehring, T., Wichern, M., 2015. Influent Fractionation for Modeling Continuous Anaerobic Digestion Processes. In: Guebitz, G.M., Bauer, A., Bochmann, G., Gronauer, A., Weiss, S. (Eds.), *Biogas Science and Technology, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing, pp. 137–169.
- Lübken, M., Wichern, M., Schlattmann, M., Gronauer, A., Horn, H., 2007. Modelling the energy balance of an anaerobic digester fed with cattle manure and renewable energy crops. *Water Res.* 41, 4085–4096.
- MacCarthy, P., 1976. A proposal to establish a reference collection of humic materials for interlaboratory comparisons. *Geofis. Int.* 16, 179–181.
- Mairet, F., Bernard, O., Cameron, E., Ras, M., Lardon, L., Steyer, J.-P., Chachuat, B., 2012. Three-reaction model for the anaerobic digestion of microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 415–425.
- Massé, D.I., Croteau, F., Masse, L., 2007. The fate of crop nutrients during digestion of swine manure in psychrophilic anaerobic sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 98, 2819–2823.
- Maynaud, G., Druilhe, C., Daumoin, M., Jimenez, J., Patureau, D., Torrijos, M., Pourcher, A.-M., Wéry, N., 2017. Characterisation of the biodegradability of post-treated digestates via the chemical accessibility and complexity of organic matter. *Bioresour. Technol.* 231, 65–74.
- McInerney, J.O., Wilkinson, M., Patching, J.W., Embley, T.M., Powell, R., 1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1646–1648.
- Mekki, A., Arous, F., Aloui, F., Sayadi, S., 2017. Treatment and Valorization of Agro-wastes as Biofertilizers. *Waste Biomass Valorization* 8, 611–619.
- Miroshnikov, K.A., Marusich, E.I., Cerritelli, M.E., Cheng, N., Hyde, C.C., Steven, A.C., Mesyanzhinov, V.V., 1998. Engineering trimeric fibrous proteins based on bacteriophage T4 adhesins. *Protein Eng.* 11, 329–332.
- Moletta, R., 2008. *La méthanisation* (2e ed.). Lavoisier.
- Molina, J. a. E., 1996. Description of the model NCSOIL. In: Powlson, D.S., Smith, P., Smith, J.U. (Eds.), *Evaluation of Soil Organic Matter Models, NATO ASI Series*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 269–274.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2004. Biological Degradation and Greenhouse Gas Emissions during Pre-Storage of Liquid Animal Manure. *J. Environ. Qual.* 33, 27–36.

- Möller, K., 2015. Effects of anaerobic digestion on soil carbon and nitrogen turnover, N emissions, and soil biological activity. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 1021–1041.
- Möller, K., Müller, T., 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Eng. Life Sci.* 12, 242–257.
- 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.
- Mosier, Nathan S., Hall, Phillip, Ladisch, Christine M., Ladisch, Michael R., 1999. Reaction Kinetics, Molecular Action, and Mechanisms of Cellulolytic Proteins. In: Tsao, P.D.G.T., Brainard, A.P., Bungay, H.R., Cao, N.J., Cen, P., Chen, Z., Du, J., Foody, B., Gong, C.S., Hall, P., Ho, N.W.Y., Irwin, D.C., Iyer, P., Jeffries, T.W., Ladisch, C. M., Ladisch, M. R., Lee, Y.Y., Mosier, N. S., Mühlemann, H.M., Sedlak, M., Shi, N.-Q., Tsao, G.T., Tolan, J.S., Torget, R.W., Wilson, D.B., Xia, L. (Eds.), *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 23–40.
- Mottet, A., François, E., Latrille, E., Steyer, J.P., Déléris, S., Vedrenne, F., Carrère, H., 2010. Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge. *Chem. Eng. J.* 160, 488–496.
- Mottet, A., Ramirez, I., Carrère, H., Déléris, S., Vedrenne, F., Jimenez, J., Steyer, J.P., 2013. New fractionation for a better bioaccessibility description of particulate organic matter in a modified ADM1 model. *Chem. Eng. J.* 228, 871–881.
- Muller, M., Jimenez, J., Antonini, M., Dudal, Y., Latrille, E., Vedrenne, F., Steyer, J.-P., Patureau, D., 2014. Combining chemical sequential extractions with 3D fluorescence spectroscopy to characterize sludge organic matter. *Waste Manag.* 34, 2572–2580.
- Müller, T., Walter, B., Wirtz, A., Burkovski, A., 2006. Ammonium Toxicity in Bacteria. *Curr. Microbiol.* 52, 400–406.
- Müller-Stöver, D.S., Sun, G., Kroff, P., Thomsen, S.T., Hauggaard-Nielsen, H., 2016. Anaerobic co-digestion of perennials: Methane potential and digestate nitrogen fertilizer value. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 179, 696–704.
- Nagase, M., Matsuo, T., 1982. Interactions between amino-acid-degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2227–2239.
- Nielsen, H.B., Angelidaki, I., 2008. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Bioresour. Technol.* 99, 7995–8001.
- Palmisano, A.C., Barlaz, M.A., 1996. *Microbiology of Solid Waste*. CRC Press.

- Park, S., Kim, M., 2015. Effect of ammonia on anaerobic degradation of amino acids. *KSCE J. Civ. Eng.* 20, 129–136.
- Pavlostathis, S.G., Gossett, J.M., 1986. A kinetic model for anaerobic digestion of biological sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1519–1530.
- Pereira, M.A., Pires, O.C., Mota, M., Alves, M.M., 2005. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 15–23.
- Poggio, D., Walker, M., Nimmo, W., Ma, L., Pourkashanian, M., 2016. Modelling the anaerobic digestion of solid organic waste – Substrate characterisation method for ADM1 using a combined biochemical and kinetic parameter estimation approach. *Waste Manag.* 53, 40–54.
- Polizzi, C., Alatrisme-Mondragón, F., Munz, G., 2017. Modeling the Disintegration Process in Anaerobic Digestion of Tannery Sludge and Fleshing. *Front. Environ. Sci.* 5.
- Prasad Maharjan, R., Ferenci, T., 2003. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 313, 145–154.
- Procházka, J., Dolejš, P., Máca, J., Dohányos, M., 2012. Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 439–447.
- Quéré, L., 2015. Analyse des marges cultures 2014 en Bretagne - Chambre d’agriculture du Finistère. Terra.
- Quideau, P., Morvan, T., Guiziou, F., Daumer, M.-L., Pourcher, A.-M., Béline, F., 2013. Les effets et conséquences de la méthanisation sur la matière organique et l’azote des lisiers de porc. *Sci. Eaux Territ. Numéro* 12, 66–71.
- Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–641.
- Ramirez, I., Mottet, A., Carrère, H., Déléris, S., Vedrenne, F., Steyer, J.-P., 2009. Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated waste activated sludge. *Water Res.* 43, 3479–3492.
- Ramsay, I.R., 1997. Modelling and control of high-rate anaerobic wastewater treatment systems.
- Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C., 2001. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation* 12, 247–257.
- Raposo, F., Fernández-Cegri, V., Rubia, M.A.D. la, Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., Wilde, V. de, 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1088–1098.

- Rasit, N., Idris, A., Harun, R., Wan Ab Karim Ghani, W.A., 2015. Effects of lipid inhibition on biogas production of anaerobic digestion from oily effluents and sludges: An overview. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 45, 351–358.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., Portmann, R.W., 2009. Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science* 326, 123–125.
- Rinzema, A., Alphenaar, A., Lettinga, G., 1989. The effect of lauric acid shock loads on the biological and physical performance of granular sludge in UASB reactors digesting acetate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 46, 257–266.
- Römling, U., Galperin, M.Y., 2015. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol.* 23, 545–557.
- Rousseau, P., Steyer, J.-P., Volcke, E.I.P., Bernet, N., Béline, F., 2008. Combined anaerobic digestion and biological nitrogen removal for piggery wastewater treatment: a modelling approach. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 58, 133–141.
- Schnürer, A., Nordberg, Å., 2008. Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci. Technol.* 57, 735–740.
- Schreiber, F., Wunderlin, P., Udert, K.M., Wells, G.F., 2012. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Evol. Genomic Microbiol.* 3, 372.
- Shao, L., Wang, T., Li, T., Lü, F., He, P., 2013. Comparison of sludge digestion under aerobic and anaerobic conditions with a focus on the degradation of proteins at mesophilic temperature. *Bioresour. Technol.* 140, 131–137.
- Siegrist, H., Vogt, D., Garcia-Heras, J.L., Gujer, W., 2002. Mathematical Model for Meso- and Thermophilic Anaerobic Sewage Sludge Digestion. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1113–1123.
- Sikkema, J., Bont, J.A. de, Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022–8028.
- Skiadas, I.V., Gavala, H.N., Lyberatos, G., 2000. Modelling of the periodic anaerobic baffled reactor (PABR) based on the retaining factor concept. *Water Res.* 34, 3725–3736.
- Smith, A.H., Zoetendal, E., Mackie, R.I., 2005. Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. *Microb. Ecol.* 50, 197–205.
- Sommer, S.G., 1997. Ammonia volatilization from farm tanks containing anaerobically digested animal slurry. *Atmos. Environ.* 31, 863–868.
- Stevenson, F.J., 1982. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. Wiley.
- Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., Adani, F., 2009. Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresour. Technol.* 100, 3140–3142.

- Teixeira Franco, R., Buffière, P., Bayard, R., 2016. Ensiling for biogas production: Critical parameters. A review. *Biomass Bioenergy* 94, 94–104.
- Tian, J.-H., Pourcher, A.-M., Bureau, C., Peu, P., 2017. Cellulose accessibility and microbial community in solid state anaerobic digestion of rape straw. *Bioresour. Technol.* 223, 192–201.
- Tomei, M.C., Braguglia, C.M., Mininni, G., 2008. Anaerobic degradation kinetics of particulate organic matter in untreated and sonicated sewage sludge: Role of the inoculum. *Bioresour. Technol.* 99, 6119–6126.
- 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, 9395–9402.
- Vallee, B.L., Ulmer, D.D., 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 41, 91–128.
- Van Soest, P.J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 1. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46, 825–829.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Manag.* 28, 939–951.
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y., 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour. Technol.* 56, 229–237.
- Vedrenne, F., Béline, F., Dabert, P., Bernet, N., 2008a. The effect of incubation conditions on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 146–155.
- Vedrenne, F., Béline, F., Dabert, P., Bernet, N., 2008b. The effect of incubation conditions on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 146–155.
- Veeken, A.H.M., Hamelers, H.V.M., 1999. Removal of heavy metals from sewage sludge by extraction with organic acids. *Water Sci. Technol., Waste Management Problems in Agro-Industries* 1998 40, 129–136.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7, 737–750.
- Wallrich, A., Ollivier, D., Jimenez, J., Houot, S., 2018. Définition de classes de digestats agricoles en vue de la préconisation de leur insertion dans les pratiques de fertilisation.
- Westerholm, M., Levén, L., Schnürer, A., 2012. Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7619–7625.

- Westerholm, M., Roos, S., Schnürer, A., 2011. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 260–266.
- Wett, B., Eladawy, A., Ogurek, M., 2006. Description of nitrogen incorporation and release in ADM1. *Water Sci. Technol.* 54, 67–76.
- White, D., Drummond, J.T., Fuqua, C., 2007. *The physiology and biochemistry of prokaryotes.* Oxford University Press New York.
- Wittmann, C., Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D., 1995. Growth inhibition by ammonia and use of a pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 519–525.
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst., PLS Methods* 58, 109–130.
- Yang, G., Zhang, P., Zhang, G., Wang, Y., Yang, A., 2015. Degradation properties of protein and carbohydrate during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 192, 126–130.
- Yasui, H., Goel, R., Li, Y.Y., Noike, T., 2008. Modified ADM1 structure for modelling municipal primary sludge hydrolysis. *Water Res.* 42, 249–259.
- Yen, H.-W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134.
- Yerkes, D.W., Boonyakitsombut, S., Speece, R.E., 1997. Antagonism of sodium toxicity by the compatible solute betaine in anaerobic methanogenic systems. *Water Sci. Technol., Anaerobic Digestion VIII* Selected Proceedings of the 8th IAWQ International Conference on Anaerobic Digestion 36, 15–24.
- Yoon, Y.-M., Kim, S.-H., Shin, K.-S., Kim, C.-H., 2014. Effects of Substrate to Inoculum Ratio on the Biochemical Methane Potential of Piggery Slaughterhouse Wastes. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27, 600–607.
- Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., Tan, T., 2014. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 38, 383–392.
- Zhang, Y., Zamudio Cañas, E.M., Zhu, Z., Linville, J.L., Chen, S., He, Q., 2011. Robustness of archaeal populations in anaerobic co-digestion of dairy and poultry wastes. *Bioresour. Technol.* 102, 779–785.

Titre : Modélisation des processus de transformation de l'azote en digestion anaérobie : Application à l'optimisation de la valorisation des digestats.

Mots clés : Digestion anaérobie, azote, biodégradabilité, bioaccessibilité, modélisation, ADM1

Résumé : La valorisation des déchets par digestion anaérobie conduit à la production d'un résidu, appelé digestat, qui est composé de la matière organique non biodégradée et présente une forte teneur en azote ammoniacal et organique. De par cette richesse en azote, les digestats présentent un intérêt grandissant pour la substitution aux engrais minéraux.

L'objectif de cette thèse est de comprendre les transformations de l'azote en digestion anaérobie afin de prédire la qualité azotée des digestats. Cette compréhension des processus de transformation de l'azote ouvrira la possibilité de dimensionner et piloter le procédé de digestion anaérobie pour une substitution optimisée des engrais minéraux par les digestats.

Pour cela, deux approches ont été développées: (i) une approche compréhensive centrée sur la compréhension de la bioaccessibilité de l'azote organique en lien avec sa biodégradabilité, et la compréhension des transformations de l'azote en digestion anaérobie en conditions de laboratoire et pilote; et ; (ii) une approche numérique où les processus identifiés ont été intégrés à des outils de modélisation à bases statistiques et biocinétiques permettant de prédire les propriétés azotées des digestats en fonction des cocktails de substrats et du temps de séjour dans le digesteur.

Title: Modelling nitrogen transformation processes in anaerobic digestion: Application to the optimization of digestate valorization.

Keywords : Anaerobic digestion, nitrogen, biodegradability, bioaccessibility, modelling, ADM1

Abstract : Energetic recovery of waste by anaerobic digestion leads to the production of a residue called digestate, which is composed of non-biodegraded organic matter and has a high content of ammoniacal and organic nitrogen. Due to this high nitrogen content, digestates are growing interest for the substitution of mineral fertilizers. The objective of this thesis is to understand the transformations of nitrogen that occur during anaerobic digestion in order to predict the nitrogen quality of digestates.

This understanding of nitrogen transformation processes will allows the design and management of anaerobic digestion plants aiming at the optimization of the substitution of mineral fertilizers by digestates.

To this end, two approaches were used in this work: (i) an experiment approach focused on the understanding of the bioaccessibility of organic nitrogen in relation to its biodegradability, and the understanding of the transformations of nitrogen in anaerobic digestion under laboratory and pilot conditions; and; (ii) a numerical approach where previously developed knowledge has been integrated in statistical and biokinetic modeling tools to predict the nitrogen properties of digestates according to substrate cocktails and residence time in the digester.