THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTUTUT AGRO MONTPELLER ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Génie des procédés

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRAE UR 0050)

Stockage et prétraitement des cultures multi-services environnementaux (CIMSE) avant leur méthanisation

Présentée par Clément Van Vlierberghe
Le 14 avril 2022

Sous la direction de Hélène Carrère et Renaud Escudié

Devant le jury composé de

M. Stephan Brosillon, Professeur, Université de Montpellier	Président du jury, Examinateur
Mme Anne Trémier, Directrice de recherche, INRAE Rennes	Rapportrice
M. Pierre Buffière, Professeur, INSA Lyon	Rapporteur
M. Stéphane Delaunay, Professeur, Université de Lorraine	Examinateur
Mme Hélène Carrère, Directrice de recherche, INRAE Narbonne	Co-directrice de thèse
M. Renaud Escudié, Directeur de recherche, INRAE Narbonne	Co-directeur de thèse
M. Sylvain Frédéric, Responsable R&D, GRDF	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

L'INSTITUT agro Montpellier

Résumé

Le recours aux cultures intermédiaires multi services environnementaux (CIMSE) pour la production de biogaz et de biométhane s'est développé en France ces dernières années. Leur culture n'entre pas en concurrence avec l'usage alimentaire des surfaces agricoles et rend de nombreux services agro-écologiques. Leur valorisation en méthanisation doit être maximisée afin de compenser les coûts de culture. La saisonnalité des récoltes impose un stockage efficace des plantes récoltées et la structure lignocellulosique complexe rend intéressante l'application d'un prétraitement pour augmenter la bio-accessibilité des hollocelluloses et le rendement méthane. L'objectif de ce doctorat était de mieux évaluer les étapes de stockage par ensilage et par prétraitement alcalin et de fournir des leviers d'optimisation. Au regard du taux d'humidité élevé propre à de nombreuses CIMSE, l'étude du stockage par ensilage a été centrée sur la description des mécanismes de fermentation en lien avec les caractéristiques biochimiques de la biomasse et la maîtrise de la production d'effluents lors de cette étape. L'étude des mécanismes de la fermentation d'ensilage a permis de montrer que son impact sur le potentiel méthanogène était limité. Le co-ensilage avec un substrat absorbant s'est distingué comme une méthode permettant de réduire la génération d'effluent. La problématique du prétraitement des CIMSE a été abordée avec une approche innovante par l'application d'un prétraitement à long terme avec de la chaux, celui-ci remplissant également la fonction de procédé de stockage. Appliqué à des CIMSE matures et lignifiées, il permet d'obtenir des gains de potentiel méthanogène intéressants. Les travaux réalisés au cours de la thèse ont permis d'apporter des éléments de compréhension, permettant d'optimiser les pratiques de gestion des CIMSE entre leur récolte et leur valorisation en méthanisation.

Mots clé : Biométhane, CIVE, stockage, ensilage, co-ensilage, prétraitement alcalin

Abstract

The use of cover crops for biogas and biomethane production has increased in France during the last decade. Their culture does not compete with food crops production and brings many agro-ecological services. The valorization of cover crops in anaerobic digestion must be maximized in order to compensate the cultivation costs. The seasonality of the harvest imposes an efficient storage of the plant before its use in the digester and the lignocellulosic structure of the biomass makes worthwhile the application of a pretreatment to increase the bioaccessability of holocelluloses and methane yield. The aim of this thesis was to bring enhancement elements to optimize the silage storage and alkaline pretreatment steps. Due to the high moisture content met in several catch crops at harvesting, the study of silage storage focused on the description of fermentation mechanisms in relation with the physico-chemical properties of the biomass and the control of silage effluent production. The study of silage fermentation mechanisms showed that this step has few impact on the methane potential of the biomass. Co-ensiling of cover crops with an absorbent material was identified as a method allowing an efficient reduction of effluent production. The problematic of catch crops pretreatment was addressed by an innovating approach based on a long term alkaline pretreatment using lime that also fulfills the storage function. Applied on lately harvested and highly lignified cover crops, this process allows to obtain interesting increases in methane potential. The work presented in this manuscript brought some insights allowing to optimize the management practices of catch crops between their harvest and valorization in anaerobic digestion.

Key words: Biomethane, intermediate crops, storage, ensiling, co-ensiling, alkaline pretreatment

Thèse CIFRE n°2018/706 préparée au sein du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement LBE-INRAE UR 0050 (102 Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France) en collaboration avec la société GRDF (6 rue Condorcet, 75009 Paris, France).

Remerciements

Cette thèse est une étape importante de mon développement personnel et professionnel, et je tiens à remercier tous ceux qui ont rendu cette aventure possible (et agréable).

Je tiens en premier lieu à remercier mes encadrants, Hélène Carrère, Renaud Escudié et Sylvain Frédéric. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé, pour vos conseils, votre disponibilité et l'enseignement apporté grâce auquel je me suis réellement senti progresser. J'ai beaucoup apprécié la relation que nous avons eue pendant ces années et j'espère que nous serons à nouveau amenés à travailler ensemble à l'avenir.

Merci aux membres du jury de thèse, Anne Trémier, Pierre Buffière, Stephan Brosillon et Stéphane Delaunay pour avoir accepté notre invitation, pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail et l'intérêt que vous y avez porté ainsi que pour les échanges très riches que nous avons pu avoir lors de la soutenance.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, Éric Trably, Rémy Bayard et Sylvain Marsac pour les remarques et conseils dispensés qui auront eu une grande influence sur les directions prises au cours de la thèse.

Mon aventure avec la méthanisation a commencé au LBE en 2016 lors de mon premier stage. Merci à Nicolas Bernet de m'avoir accueilli à cette occasion où j'ai pu contracter le « virus » de la métha. Merci également pour les échanges et conseils autours des publications de la thèse, et pour avoir été un compagnon nordiste au labo !

Je tiens à remercier particulièrement Morgane Le Coeur et Amal Chiboubi pour l'implication dont vous avez fait preuve au cours de vos stages, une grande partie des résultats de la thèse en découle. Merci pour tout, j'espère avoir également pu vous apporter quelque chose lors de votre passage au LBE.

Je remercie fortement tous les membres du personnel du laboratoire que j'ai pu solliciter lors de ma thèse. Gaëlle pour les analyses microbio, Guillaume et Pascal pour les pilotes et les cafés, Philippe pour… un peu de tout ! Y compris les longues discussions sur la lactofermentation, la fabrication des fromages et les vélos.

Merci à la dream team du labo : Annie, Alexandra, Nadine, Stéphanie et Sylvie pour votre immense gentillesse, votre patience et votre efficacité légendaire !

L'aventure Narbonnaise ne s'est pas limitée à la stricte enceinte du LBE et je dédie une mention spéciale à tous ceux qu'il m'a été donné de rencontrer ici ces dernières années. Randonnées, bivouacs, sorties vélo, séjour au ski, après-travail à la plage, sessions de pêche toujours réussies, barbecues, soirées… Vous avez contribué à rentre la vie audoise un peu plus douce et faire de ce séjour une expérience inoubliable.

Merci aux anciens : Aurélie, Hélène, Felipe, Florian, Gabriel, Gaetano et Ulysse ! C'est en partie grâce aux super moments que l'on a passés ensemble lors de mon stage que j'ai voulu revenir ensuite pour la thèse ! Et le moins que je puisse dire c'est que je n'ai pas regretté cette décision.

Merci à mes compagnons de « promo » Alex, à Roberto, Julien, Kevin le Bachelor et Kevin Djokovic, on aura fait un bon bout de chemin ensemble à Narbonne et c'était génial de partager cette expérience avec vous ! Allez, Marie Groëtte, on peut aussi t'ajouter à cette liste en tant que preskancienne ou passinouvelle, d'autant qu'on aura partagé pas mal au sujet des bactéries et de leurs productions gazeuses.

Merci à mes compagnons de bureaux successifs, Bastien, Claire, Céline, Florian, Lorraine, Margaud, Malo et Pablo pour les partages de musiques pourries, les séances de taï-chi et la super ambiance qui y a toujours régné !

Remerciements particuliers à Mr et Mme Schmitt et à Niska pour l'accueil à leur domicile au début et à la fin de mon passage à Narbonne, j'espère que votre réfrigérateur n'en est pas ressorti trop traumatisé.

Merci à tous ceux qui auront contribué à ce petit pincement au cœur avec lequel je suis reparti de Narbonne, à Clémence pour les échanges culinaires, à Davido Pepito, Merchita la mamita et Josito el diablito pour cette riche expérience culturelle, à Domi pour la bonne humeur infinie, à Noémie F pour les folles soirées et le séjour dans le Lot, à Momix le roi du mix pour les apéro/épaule d'agneau/mojito, à Néméhie pour tes séances dégustations de rhum, à Romain pour celles de pâté basque, à Lucita pour les shows de danse en tous genres, à Eric Latrille pour les bon plans audois, à Jean phi pour les conseils avisés et les apparitions en soirée. Merci à Roulie ma chèvre catalane préférée ! A nos soirées échoppes à parler de tout de rien et surtout de n'importe quoi. Merci à Solène, Virginie, Antoine, Benoit, Doha, Nicolas, Emilie, Pierre, Raffaello, Lucie S, Lucie P, Margot, Ali, Eqwan, Axel, Coralie, Elisa, Clémentine, Emeline et Chloé, j'ai adoré vous rencontrer et merci d'avoir été là !

La liste est longue mais témoigne bien de la magnifique expérience qu'ont pu être ces années narbonnaises ! Une mention spéciale à petite Noémie pour son soutien, particulièrement ces derniers mois. Je quitte Narbonne mais une autre aventure commence avec toi ;)

Pour finir, un grand merci à ma famille pour leur soutien et leur amour inconditionnels. De Narbonne à nos terres septentrionales il y a une belle trotte mais je vous ai toujours senti proches ces dernières années.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES XI

LISTE DES TABLEAUX XIII

LISTE DES ABBRÉVIATIONS XV

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES XVII

INTRODUCTION 1

1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 5

1.1 Introduction 5

1.2 La Méthanisation 6
1.2.1 Le biométhane, une énergie renouvelable 6
1.2.2 Historique et potentiel de production en France et en Europe 6
1.2.3 Le procédé de méthanisation 7
1.2.4 Utilisation des CIMSE en méthanisation 13

1.3 Stockage par ensilage de la biomasse lignocellulosique et des CIMSE 17
1.3.1 Le procédé de stockage par ensilage 17
1.3.2 L'ensilage pour la méthanisation : principaux objectifs et voies de dégradation 22

1.4 Prétraitements de la biomasse lignocellulosique et des CIMSE 38
1.4.1 Prétraitements physiques 39
1.4.2 Prétraitements chimiques et physico-chimiques 41
1.4.3 Prétraitements biologiques 46

1.5 Combinaison de procédés de stockage et de prétraitement 47
1.5.1 Stockage et prétraitement biologique 47
1.5.2 Stockages et prétraitements chimiques 48

1.6 Conclusion et objectifs 49

2 MATERIEL ET METHODES 51

2.1 Introduction 51

2.2 Substrats utilisés et méthode de prélèvement 52

2.3 Approche et dispositifs expérimentaux 54
2.3.1 Stockage en bouteille 54
2.3.2 Stockage en colonne 55

2.4 Procédure d'échantillonnage et d'analyses 57
2.4.1 Caractérisation physico-chimique de la matière brute 57
2.4.2 Extraction et caractérisation de la phase soluble à l'eau 61

2.4.3 Analyses de la phase gazeuse 62

2.5 Analyses statistiques 62
2.5.1 Test de Student 62
2.5.2 Analyse exploratoire des données 63

2.6 Synthèse des expériences de la thèse 63

3 ETUDE DE L'IMPACT DES PROPRIETES DES CIMSE SUR LA FERMENTATION D'ENSILAGE ET LA PRESERVATION DU POTENTIEL METHANOGENE LORS DU STOCKAGE. 65

3.1 Contexte et objectifs 65

3.2 Rappels méthodologiques 66

3.3 Caractérisation des CIMSE utilisées 66

3.4 Evaluation préalable de l'ensilabilité des CIMSE utilisées 69

3.5 Impact des propriétés initiales sur la fermentation d'ensilage 70

3.6 Impact des mécanismes de fermentation sur la préservation des CIMSE 75

3.7 Conclusion 78

4 ETUDE DE L'APPLICATION DU CO-ENSILAGE POUR L'AMELIORATION DU STOCKAGE PAR ENSILAGE DES CIMSE HUMIDES. 81

4.1 Introduction 81

4.2 Co-ensiling and field wilting investigated as preparation methods for the ensiling of a wet harvested catch crop for biomethane production 82
4.2.1 Introduction 83
4.2.2 Material and methods 86
4.2.3 Results and discussion 88
4.2.4 Conclusion 97
4.2.5 Acknowledgements 98

4.3 Improving the storage of cover crops with co-ensiling: effect on fermentation and effluent production 99
4.3.1 Introduction 100
4.3.2 Material and Methods 102
4.3.3 Results and discussions 106
4.3.4 Conclusion 120
4.3.5 Acknowledgements 121

4.4 A retenir 122

5 ETUDE DU STOCKAGE ET PRETRAITEMENT ALCALIN DE CIMSE 125

5.1 Introduction 125

5.2 Long term alkaline storage and pretreatment process of cover crops for anaerobic digestion 126
5.2.1 Introduction 127
5.2.2 Materials and Methods 129
5.2.3 Results and Discussion 133
5.2.4 Conclusions 142
5.2.5 Acknowledgements 143

5.3 Conditions for efficient alkaline storage of cover crops for methane production 144
5.3.1 Introduction 145
5.3.2 Material and Methods 148
5.3.3 Results and discussions 152
5.3.4 Conclusion 164
5.3.5 Acknowledgements 165

5.4 A retenir 166

6 CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 167

6.1 Résultats marquants et discussion générale 167

6.2 Perspectives 173

7 RÉFÉRENCES 177

A ANNEXE : ETUDE DE LA VOLATILISATION DES ACIDES ORGANIQUES LORS DE LA DETERMINATION DU TAUX DE MATIERE SECHE PAR SECHAGE 201

Liste des Figures

Figure 0-1 : Production primaire d'énergies renouvelables par filière en 2020 en France, (Ministère de la transition écologique, 2021)..... 1
Figure 1-1 : Evolution du parc national des installations de production électrique à partir de biogaz (a) et d'injection de biométhane (b) au 1er trimestre 2021. Source : SDES (Service des données et études statistiques (SDES), 2021a, 2021b)..... 7
Figure 1-2 : Schéma récapitulatif des étapes de la méthanisation..... 8
Figure 1-3 : Réglementation encadrant le statut des digestats de méthanisation (InfoMétha, n.d.) .. 13
Figure 1-4 : Evolution de la composition moyenne de l'herbe selon le stade de développement (Murphy et al., 2011)..... 16
Figure 1-5 : Les principales phases de stockage d'un ensilage bien préservé..... 19
Figure 1-6 : Evolution du volume d'effluent d'ensilage en fonction du taux de matière sèche et comparaison avec les éqyations de prédiction de Bastiman et Altman & Sutter (Barmaki et al., 2018; Fransen and Strubi, 1998; Khorvash et al., 2006; Mayne and Gordon, 1986; Okine et al., 2007; P. Savoie et al., 2002; Razak et al., 2012; Woolford et al., 1983)..... 26
Figure 1-7 : Evolution du débit de production de jus d'ensilage au cours du stockage, adapté de Mayne & Gordon (1986)..... 26
Figure 1-8 : Evolution du taux de matière sèche de différentes plantes cultivables comme CIMSE en fonction de leur maturité (Khorasani et al., 1997)..... 28
Figure 1-9 : Comparaison entre le volume d'effluent lors de l'ensilage direct et le co-ensilage avec différents cosubstrats en fonction du taux de MS du mélange (Fransen and Strubi, 1998; Okine et al., 2007)..... 30
Figure 1-10 : Valeurs critiques du couple pH - taux de MS permettant l'obtention d'un ensilage stable en conditions anaérobies. Adapté de Pahlow et al. (2003). 33
Figure 1-11 : Pertes de matière sèche lors du désilage en fonction de la densité de tassement et de la vitesse d'avance. Adapté de Borreani et al. (Borreani et al., 2018). 37
Figure 1-12 : Solubilité de la chaux dans l'eau en fonction de la température..... 45
Figure 1-13 : Variation de l'indice de sévérité d'un prétraitement acide ou basique dans le cadre de l'ensilage sans additif ou d'un procédé de stockage et prétraitement chimique à 20°C..... 48
Figure 2-1: Préparation des CIMSE avant stockage : récolte manuelle et broyage..... 52
Figure 2-2 : Stockage en bouteille - dispositif expérimental..... 54
Figure 2-3 : Stockage en tube - dispositif expérimental..... 56
Figure 2-4 : Schéma de fonctionnement des silos de stockage en tube..... 56
Figure 2-5 : Organigramme simplifié de la procédure d'échantillonnage et d'analyse 57
Figure 3-1 : Variation des caractéristiques des CIMSE ayant un impact critique sur la fermentation d'ensilage..... 67
Figure 3-2 : Analyse en composantes principales réalisée sur les 4 paramètres critiques des CIMSE utilisées. Le stade de maturité (BBCH) est représenté en tant que variable supplémentaire et n'est pas pris en compte dans le calcul de l'ACP. 68
Figure 3-3 : Ensilabilité des CIMSE prélevées selon Kaiser et al. (2004). 70
Figure 3-4 : Evolution de la concentration en métabolites, du pH et de la production de gaz au cours du stockage..... 72
Figure 3-5 : Comparaison des valeurs de couple pH – taux de MS avec les valeurs critiques de la littérature. 73
Figure 3-6 : Matrice de corrélation calculée sur les données de caractérisation initiales des CIMSE utilisées en ensilage et les propriétés de fermentation. *** : corrélation significative avec $p < 0.001$; ** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$ 75

Figure 3-7 : Relation entre le BMP initial et final lors du stockage par ensilage, en fonction des pertes de MV ayant lieux lors du stockage. Gauche : résultats issus des expériences de thèse. Droite : résultats issus de la littérature (Cui et al., 2020; Herrmann et al., 2011a). 75
Figure 3-8 : Matrice de corrélation calculée sur les données de fermentation d'ensilage des CIMSE et les performances de stockage. *** : corrélation significative avec p < 0,001 ; ** : p < 0,.01 ; * : p < 0,05 77
Figure 4-1 : Variation in pH, WSC and metabolites and cumulated fermentation gas during storage. Direct cut silage, Wilted silage and Co-ensiling (ryegrass) concentrations are expressed in g per kgVS of ryegrass. Co-ensiling (mix) concentrations are expressed in g per kgVS of (ryegrass + straw) mix. WSC : Water soluble carbohydrates..... 90
Figure 4-2: Microbial abundance and repartition between the main bacterial orders 91
Figure 4-3: Lactobacillales proportion at the genus level. 91
Figure 4-4: VS losses over storage for the different silage conditions. DC, PW and CE (ryegrass) concentrations are expressed in g per kgVS of ryegrass. CE (mix) concentrations are expressed in g per kgVS of (ryegrass + straw) mix. 96
Figure 4-5: Cumulated effluent volume after 60 days of co-ensiling (sunflower + wheat straw). Dots indicate mean, errorbars indicate maximum and minimum. 109
Figure 4-6 : pH, metabolite concentration and cumulated gas production during storage. Metabolites are expressed in $g.kgVS_{added}^{-1}$ of mix (cover crop + co-substrate). CO_2 and H_2 are expressed in cumulated $L.kgVS_{init}^{-1}$. R stand for rye. Paper, Misc, Wood, Chicken M and Horse M stand for soiled paper and cardboard, miscanthus stalks, wood chips, chicken manure and horse manure, respectively. 112
Figure 4-7: Ammonia concentration variation during storage. Concentrations are expressed in $g.kg_{VSadded}^{-1}$ of mix (cover crop + co-substrate); R stand for rye. Paper, Misc, Wood, Chicken M and Horse M stand for soiled paper and cardboard, miscanthus stalks, wood chips, chicken manure and horse manure, respectively. 113
Figure 4-8: Microbial characterization of raw substrates (relative abundance of major orders). Values on top represent the microbial population quantification (16S rRNA gene copy number . g_{FM}^{-1}) 115
Figure 4-9: (A) Variation of total microbial abundance during storage (16S rRNA gene copy number . g_{FM}^{-1}); (B) Relative composition of microbial community at the order level. 116
Figure 4-10 : Matrix of Pearson's correlation with the main bacterial orders for all ensiling and co-ensiling experiments of rye. **: Significant with p-palvue <0.01, *: Significant with p-value <0.05 .. 118
Figure 4-11: Impact of storage under the different co-ensiling conditions on methane production per unit of VS of mix (cover crop + co-substrate). BMP reported to added VS represent the crop biodegradability after storage, and BMP reported to initial VS reflects the global impact of storage on methane potential. *: significant difference two BMP values for a given storage condition (p<0.05). 120
Figure 5-1: WSC, gas and metabolites variation during storage. Lactic acid (LA), Acetic acid (AA), Propionic Acid (PA), Butyric acid (BA) and Ethanol (ETOH) are expressed in $mmol.kgVS_{add}^{-1}$. CO_2 and H_2 are expressed in cumulated $mmol/kgVS_{init}^{-1}$. The error bars indicate standard deviation. 135
Figure 5-2: Variation of the COD repartition between WSC, soluble metabolites and gases. The error bars indicate standard deviation. 135
Figure 5-3 : Alkaline storage effect on fiber distribution. The error bars indicate standard deviation. 139
Figure 5-4: Dynamics of mass losses. The error bars indicate standard deviation. 140
Figure 5-6: Impact of storage duration on methane potential. BMP ($NmLCH_4.gVS_{added}^{-1}$) and BMP ($NmLCH_4.gVS_{initial}^{-1}$) represent pretreated crop biodegradability and methane potential reported to

the VS amount before pretreatment, respectively. $BMP_{metabolites}$ represent the contribution of soluble metabolites in BMP ($NmLCH_4.gVS_{initial}^{-1}$). The error bars indicate standard deviation..... 141
Figure 5-7: Variation of acetic acid, WSC and pH during the first days of alkaline storage. Dots represent averaged values of the sacrificed triplicates. Error bars indicate standard deviation within triplicates..... 154
Figure 5-8: Effect of CaO loading and MS on acetic release after 2 days of reaction. Each dot represent a value from a single replicate..... 155
Figure 5-9: pH, metabolites and gaz variation during storage. CO2 and H2 are expressed in cumulated $L.kg_{VSinit}^{-1}$. Metabolites are expressed in $g.kg_{VSadded}^{-1}$. W.Alk, D.Alk and Sil stand for wet alkaline, dry alkaline, respectively. SUN stand for sunflower..... 156
Figure 5-10: Major OTUs abundance (relative abundance >1.5% for at least one storage time) expressed in 16S rRNA gene copy.g_{FM}-1. (a): Principal orders, (b): bacteria affiliated to Lactobacillales order, (c): bacteria affiliated to Enterobacteriales and Clostridiales orders. W.Alk, D.Alk and Sil stand for wet alkaline, dry alkaline, respectively. SUN stand for sunflowe..... 159
Figure 5-11: Impact of storage condition and duration on BMP. The error bars indicate standard deviation. W.Alk, D.Alk and Sil stand for wet alkaline, dry alkaline, respectively. SUN stand for sunflower..... 164
Figure 6-1 : Interaction entre pertes de masse, production d'hydrogène et variation du BMP lors du stockage anaérobie de CIMSE. 171
Figure 6-2 : Matrice de corrélation entre la préservation du BMP et les principales propriétés de fermentation pour l'ensemble des expériences de stockage anaérobie 172
Figure A-1 : Volatilisation de l'acide lactique en fonction du pH, substrat synthétique. — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach 202
Figure A-2 : Volatilisation de l'acide acétique en fonction du pH, substrat synthétique. — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach 202
Figure A-3 : Volatilisation de l'acide lactique en fonction du pH, substrat réel — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach..... 203
Figure A-4 : Volatilisation de l'acide acétique en fonction du pH, substrat réel. — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach..... 203
Figure A-5 : Volatilisation de l'acide butyrique en fonction du pH, substrat réel — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach..... 204

Liste des tableaux

Table 4-1: Physicochemical characteristics of the substrates..... 89
Table 4-2: Stoichiometric variation yields in metabolites concentration ($mol.mol^{-1}$) associated with the consumption of 1 mol in lactic acid concentration between day 60 and 180. 94
Table 4-3: Variation of BMP during storage. BMP expressed in $NmLCH_4 \cdot gVS_{add}^{-1}$refer to the degradability of the analyzed sample while BMP expressed in $NmLCH_4 \cdot gVS_{initial}^{-1}$ take into account the VS losses that occurred during storage. Within a column, different capital letters (AB) express a statistical difference ($p<0.05$) between two samples of the same storage duration. Different lowercase letters (ab) express a statistical difference ($p<0.05$) between two samples of the same storage condition stored for a different duration..... 97
Table 4-4: Fresh cover crop and co-substrate characteristics. BC: buffering capacity; WHC: water holding capacity; WSC: water soluble carbohydrates. 108
Table 4-5: Fresh co-ensiling mixtures characteristics 110
Table 5-1: Physicochemical characteristics of the catch crops 134

Table 5-2: pH and NH4-N variation during storage.: 136
Table 5-3: Pretreatment conditions applied for the second phase of deacetylation experiment and effect on pH 149
Table 5-4 : Main physicochemical characteristics of the studied cover crops. n.d. : not determined; <d.l. : below the detection limit 153
Table 5-5: Fiber distribution of the fresh and 180d stored crops expressed in %VSinit. Within each column, different letters (abc) express a statistical difference between two samples of the same crop species stored under different conditions. 163

Tableau 1-1: Gamme de rendement de récolte, potentiel méthanogène et rendement méthane par hectare pour différentes espèces cultivées ou potentiellement cultivables en tant que CIMSE (Braun, 2007) 15
Tableau 1-2: Principaux objectifs comparés pour le stockage par ensilage à destination de l'élevage et de la méthanisation (Kaiser et al., 2004; Teixeira Franco et al., 2016; Villa et al., 2020) 23
Tableau 1-3: Valeurs indicatives de compacité de l'ensilage d'herbe (Latsch and Sauter, 2014) 25
Tableau 1-4: Estimation du volume d'effluent produit lors de l'ensilage de 15 000 tonnes de CIMSE selon les équations de Bastiman et Sutter (entre parenthèse) en considérant une concentration en DCO de 50 $g.L^{-1}$ et 350 $NmLCH_4.g_{DCO}^{-1}$ 27
Tableau 1-5: Principales caractéristiques de substrats utilisables en tant qu'absorbants en co-ensilage 29
Tableau 1-6: Potentiel énergétique de différents substrats et produits de fermentation exprimé en équivalent de demande chimique en oxygène (DCO) et potentiel méthanogène (DCO) 31
Tableau 1-7: Bilan massique et énergétique (DCO) de différentes réactions de fermentation. Les gaz produits sont considérés comme des pertes. Adapté et complété de Kreuger et al. (2011) (Kreuger et al., 2011) 32
Tableau 1-8: Liste récapitulative des différents additifs d'ensilage et de leur utilisation. Adapté de Kaiser et al. (Kaiser et al., 2004) 34
Tableau 1-9 : Récapitulatifs des voies de dégradations possibles lors de l'ensilage (da Silva et al., 2017) 38
Tableau 1-10 : Principaux prétraitements applicables à des biomasses lignocellulosiques similaires aux CIMSE (Abraham et al., 2020). 40
Tableau 1-11 Prétraitements alcalins variés avec leurs conditions d'application et principaux effets (Kim et al., 2016). 43
Tableau 2-1 : Liste des prélèvements de CIMSE réalisés 53
Tableau 2-2 : Co-substrats utilisés lors des expériences de co-ensilage 54
Tableau 2-3 : Etapes d'extraction lors du fractionnement Van Soest et fractions associées 60
Tableau 2-4 : Plan global simplifié des expériences de la thèse 64
Tableau 3-1 : Principales caractéristiques des échantillons de CIMSE utilisées. 66

Liste des abbréviations

Abréviation		*Français*	*Anglais*
AA	*AA*	Acide acétique	*Acetic acid*
AB	*BA*	Acide butyrique	*Butyric acid*
-	*ADF*	Résidu d'extraction au détergent acide	*Acid detergent fiber*
-	*ADL*	Lignine sulfurique	*Acid detergent lignin*
AL	*LA*	Acide lactique	*Lactic acid*
AP	*PA*	Acide propionique	*Propionic acid*
-	*AMPTS*	Système de mesure de potential méthanogène automatisé	*Automatic methane potential test system*
-	*CAL*	Résidu de calcination	*Calcination residue*
-	*CEL*	Cellulose	*Cellulose*
DA	*AD*	Digestion anaérobie	*Anaerobic digestion*
-	*HEM*	Hémicelluloses	*hemicelluloses*
-	*HPLC*	Chromatographie liquide à haute performance	*High Performance Liquid Chromatography*
ACP	*PCA*	Analyse en composantes principales	*Principal component analysis*
AGV	*VFA*	Acides gras volatiles	*Volatile fatty acids*
-	*ANOVA*	Analyse de la variance	*Analysis of variance*
-	*BC*	Pouvoir tampon	*Buffering capacity*
CIMSE	*CC*	Cultures intermédiaires multi services environnementaux	*Cover crops*
DCO	*COD*	Demande chimique en oxygène	*Chemical oxygen demand*
-	*ETOH*	Ethanol	*Ethanol*
-	*LIGN*	Lignine	*Lignin*
MB	*FM*	Matière brute	*Fresh matter*
MS	*TS*	Matière sèche	*Total solids*
MV	*VS*	Matière volatile	*Volatile solids*
NH_3-N	*NH_3-N*	Ammonium	*Ammonia*
-	*NDF*	Résidu d'extraction au détergent neutre	*Neutral detergent fiber*
PBM	*BMP*	Potentiel bio-méthanogène	*Biochemical methane potential*
-	*SOLU*	Fraction soluble au détergent neutre	
-	*TC*	Carbone total	*Total Carbon*
-	*TN*	Azote total	*Total Nitrogen*
-	*W.EX*	Extrait à l'eau	*Water extract*
-	*W.SOLU*	Extrait soluble à l'eau	*Water soluble compounds*
-	*WSC*	Sucres solubles	*Water soluble carbohydrates*

Publications et communications scientifiques et techniques

A la date du dépôt de these, les travaux présentés dans le manuscrit ont donné lieu aux communications suivantes

Publications en revues à comité de lecture

Van Vlierberghe, C., Escudié, R., Bernet, N., Frederic, S., Carrere, H., 2021. Long term alkaline storage and pretreatment process of cover crops for anaerobic digestion. Bioresource Technology 330, 124986. doi : 10.1016/j.biortech.2021.124986

Van Vlierberghe, C., Escudié, R., Bernet, N., Santa-Catalina, G., Frederic, S., Carrere, H., 2022. Conditions for efficient alkaline storage of cover crops for biomethane production. Bioresource Technology 348, 126722. doi : 10.1016/j.biortech.2022.126722

Van Vlierberghe, C., Carrere, H., Bernet, N., Santa-Catalina, G., Frederic, S., Escudié, R., Co-ensiling and field wilting investigated as preparation methods for the ensiling of a wet harvested catch crop for biomethane production. Renewabale Energy 195, 1230 – 1237. doi : 10.1016/j.renene.2022.06.078

Van Vlierberghe, C., Chiboubi, A., C., Carrere, H., Bernet, N., Santa-Catalina, G., Frederic, S., Escudié, R., Improving the storage of cover crops with co-ensiling: effect on fermentation and effluent production, *Soumission prevue à Waste Management en juillet 2022*

Communication orale en congrès international

Van Vlierberghe, C., Escudié, R., Bernet, N., Frederic, S., Carrere, H., Alkaline alternative to ensiling for the storage of a catch crop for biogas production, *8th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation WasteEng20, online*

Communication orale en congrès national

Van Vlierberghe, C., Chiboubi, A., C., Carrere, H., Bernet, N., Santa-Catalina, G., Frederic, S., Escudié, R., Maîtriser les effluents d'ensilage de CIVE grâce au coensilage, *JRI Biogaz méthanisation 2022 – Lyon*

Communication affichée

Van Vlierberghe, C., Carrere, H., Frederic, S., Bernet, N., Escudié, R., Stockage et prétraitement des CIMS avant méthanisation, *JRI Biogaz méthanisation 2020 – Toulouse*

Van Vlierberghe, C., Escudié, R., Bernet, N., Frederic, S., Carrere, H., Combined storage and pretreatment process of sunflower catch crop under alkaline conditions prior to anaerobic digestion, *29th European Biomass Conference & Exhibition EUBCE 2021, online*

Autres

Optimisation du stockage et du prétraitement des CIVE, *Rencontre du club Biométhane Occitanie, Novembre 2019*

Optimisation du stockage et du prétraitement des CIVE, *Comité de pilotage du projet RECITAL, Décembre 2020*

Marsac, S., Dagorn, N., Van Vlierberghe, C., Cresson, R., Cabeza-Orcel, P., ZOOM sur le potentiel méthanogène des CIVE, *Perspectives Agricoles 491, Septembre 2021*

Bonnes pratiques d'ensilage pour la méthanisation, *Livret technique à destination des agriculteurs méthaniseurs, en préparation*

Introduction

En raison des émissions de gaz à effets de serre causées par l'utilisation des énergies fossiles telles que le pétrole, le gaz naturel et le charbon, la part de ces énergies dans le mix énergétique mondial est appelée à être drastiquement réduite au cours des années à venir. En plus des enjeux climatiques, la dépendance à ces énergies importées à plus de 99% causait en 2019 en France un déficit commercial de 44 milliards d'euros dont la quasi-totalité s'explique par les importations de pétrole et de gaz naturel (Ministère de la Transition écologique, 2021). La hausse récente du prix des énergies fossiles sur les marchés internationaux et le tarissement inéluctable des gisements sont des arguments supplémentaires poussant à leur remplacement par des énergies renouvelables produites sur le territoire français. En croissance constante ces dernières décennies, les énergies renouvelables représentaient en 2020 348 des 2651 TWh d'énergie primaire totale consommée en France. A l'heure actuelle, une importante diversité d'énergies renouvelables est produite en France (Figure 0-1).

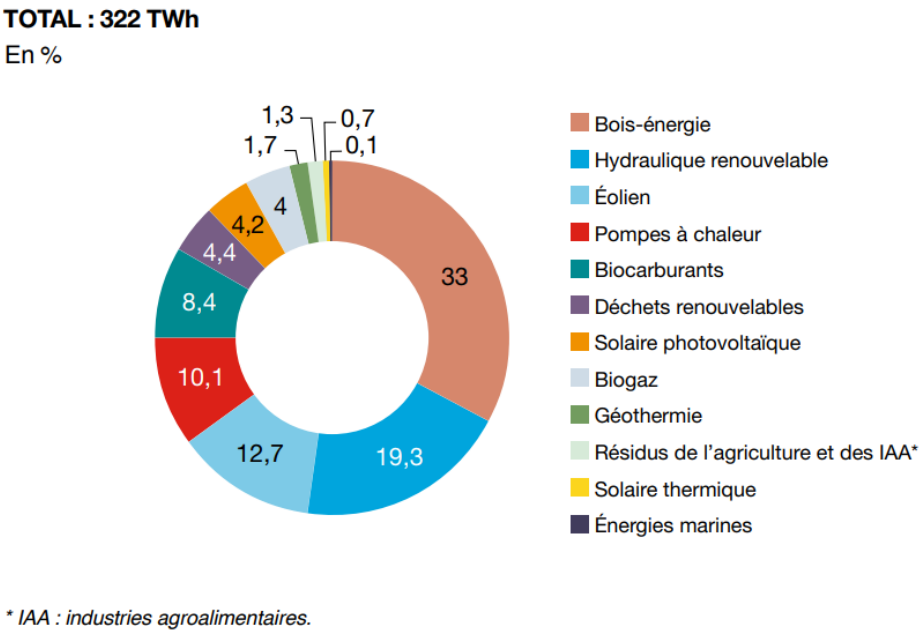

Figure 0-1 : Production primaire d'énergies renouvelables par filière en 2020 en France, (Ministère de la transition écologique, 2021)

La digestion anaérobie, ou méthanisation, est une des filières ayant suscité un intérêt croissant depuis le début des années 2000. Elle repose sur la conversion biologique dans des conditions anaérobies de matières biodégradables en un biogaz essentiellement constitué de méthane et de dioxyde de carbone. La méthanisation présente plusieurs avantages. Ce procédé accepte une très large variété d'intrants jusqu'alors considérés comme des déchets, tels que des effluents industriels, boues de station d'épuration, bio-déchets, déjections animales, résidus de cultures, etc. La méthanisation présente ainsi une certaine souplesse d'application, et permet de valoriser de nombreux substrats. Le

biogaz produit par la méthanisation présente quant à lui l'avantage d'être valorisable de différentes façons : production de chaleur localement par combustion, production d'électricité et de chaleur par cogénération, production et consommation locale de biocarburant ou injection du biométhane épuré dans le réseau de gaz naturel.

L'injection du biométhane épuré dans le réseau de gaz naturel permet de proposer une solution de substitution directe au gaz naturel d'origine fossile. Présentant les mêmes propriétés et les mêmes usages que le gaz naturel, le biométhane est une énergie transportable et stockable qui peut être utilisée pour le chauffage, la production d'eau chaude sanitaire, la cuisson des aliments, la mobilité (bioGNV) et l'industrie. Substituer le gaz naturel par du biométhane pour ces applications permet également de prolonger la durée de vie d'équipements fonctionnels, contrairement à ce qu'aurait requis l'électrification. La production de biométhane par des procédés de méthanisation présente de nombreux avantages, toutefois son développement est aujourd'hui limité en partie par son coût de production. Le tarif d'achat du biométhane varie entre 50 et 145€/MWh, soit 3 à 6 fois plus que le gaz naturel (GRDF, 2021). Afin d'encourager le développement de la production de biométhane, de nombreux acteurs de la filière méthanisation dont GRDF œuvrent au développement de solutions permettant une réduction significative des coûts de production.

Au-delà de la problématique du coût, la production de biométhane et plus généralement de biogaz est également dépendante de la disponibilité des substrats à méthaniser. En plus des intrants typés « déchets », le recours à des biomasses produites spécifiquement pour être méthanisées a connu un essor important afin d'accroitre la capacité de production de biogaz. Si le recours aux cultures énergétiques dédiées est critiqué pour la concurrence induite entre l'usage alimentaire et énergétique des surfaces agricoles, l'emploi des cultures intermédiaires multi services environnementaux (CIMSE) connaît un intérêt croissant. Ce mode de production de biomasse permet de limiter la concurrence avec la vocation alimentaire des terres arables tout en fournissant plusieurs services agro-écologiques tels que la diminution de l'érosion des sols (Jian et al., 2020a) et du lessivage des nitrates (Igos et al., 2016; Sapkota et al., 2012), l'accumulation de matière organique dans le sol (Jian et al., 2020a) et le contrôle des adventices (Büchi et al., 2020; Kadziene et al., 2020).

Par définition, les CIMSE sont cultivées pendant la période d'interculture des cultures dites principales. Pour cette raison, elles bénéficient souvent pour leur développement de durées courtes et/ou de conditions météorologiques peu favorables à leur croissance. Les rendements de production sont donc relativement aléatoires et peuvent régulièrement remettre en cause la rentabilité économique de la conduite de la culture (Marsac et al., 2019a). Si le rendement de récolte est le premier levier influant

sur la rentabilité économique des CIMSE, l'utilisation optimale de la biomasse récoltée est également capitale afin de maximiser la valorisation du potentiel méthanogène des cultures récoltées.

Les récoltes de CIMSE sont imposées par l'organisation du calendrier de rotation de culture et ont lieu une à deux fois par an. En revanche, les réacteurs de méthanisation doivent être alimentés en continu tout au long de l'année. La préservation efficace des récoltes de CIMSE sur des durées allant de six mois à un an est donc indispensable. Elle peut également servir à compenser une année de récolte insuffisante en allongeant la durée de stockage. Le stockage des cultures récoltées humides (c'est à dire : non séchées tel que lors de la fabrication de foin) est réalisé par ensilage. Cette méthode est pratiquée avec succès dans le secteur de l'alimentation animale et repose sur la fermentation spontanée de la plante en conditions anaérobies qui conduit à l'accumulation d'acide lactique et à l'acidification de la biomasse. La combinaison d'un pH acide et de conditions anaérobies permet alors d'inhiber efficacement l'activité des microorganismes qui pourraient causer la dégradation de la biomasse. Si ce procédé a été très largement étudié pour la préservation des fourrages d'élevage, son utilisation dans le cadre de la méthanisation est relativement nouvelle, et l'impact de l'ensilage sur le potentiel méthanogène des plantes stockées reste partiellement compris (Kreuger et al., 2011; Teixeira Franco et al., 2016).

L'amélioration de la valorisation des CIMSE en méthanisation peut également passer par l'utilisation de prétraitements permettant d'en augmenter la conversion en méthane. En effet, ce type de substrat est composé en grande partie de parois cellulaires constituées d'une matrice complexe de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines appelée lignocellulose. Les sucres constituants la cellulose et les hémicelluloses ont un fort pouvoir méthanogène, cependant leur accessibilité pour les microorganismes est limitée par la structure de la lignocellulose et la présence de lignine. L'application d'un procédé de prétraitement peut permettre de déstructurer cette matrice complexe et ainsi d'augmenter la biodégradabilité de la biomasse. Afin d'optimiser leur application, combiner les deux fonctions de stockage et de prétraitement dans un procédé unique permettrait de simplifier le processus d'utilisation de la biomasse tout en profitant d'un temps de réaction étendu pour le prétraitement. Les étapes de stockage et de prétraitement qui se déroulent entre la récolte des CIMSE et leur utilisation en méthanisation peuvent jouer un rôle crucial à ce sujet. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit portent sur l'amélioration du stockage par ensilage des CIMSE et sur le développement d'une méthode innovante permettant d'allier stockage et prétraitement. Ce doctorat s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement d'INRAE et GRDF.

Le mémoire est divisé en six chapitres :

- Le **premier chapitre** présente le procédé de méthanisation et le contexte de l'mploi des CIMSE à des fins énergétiques ainsi qu'un état de l'art des connaissances techniques et scientifiques autour des procédés de stockage et de prétraitement applicables aux CIMSE en méthanisation. Cette analyse bibliographique permet ainsi de préciser le contexte du doctorat et de préciser la définition des objectifs scientifiques de la thèse.

- Le **deuxième chapitre** est consacré à la présentation des dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyse utilisés au cours de la thèse.

- Le **troisième chapitre** est consacré à l'étude de la variabilité des principales caractéristiques des CIMSE qui peuvent avoir un impact sur le déroulement de la fermentation d'ensilage. Il permet également de mieux comprendre l'impact des différents types de fermentation pouvant survenir lors du stockage sur la préservation du potentiel méthanogène des récoltes. Ce travail vise aussi à identifier les principaux liées à l'ensilage de CIMSE et à apporter des éléments permettant de définir un « bon ensilage » pour la méthanisation.

- Le **quatrième chapitre** aborde une problématique liée au stockage des plantes humides : la génération d'effluents d'ensilage. Ces effluents très chargés en matière organique peuvent causer de graves problèmes de pollution des eaux de surface et de corrosion des installations, ainsi que des pertes de potentiel méthanogène si leur récupération n'est pas optimale. Une des solutions permettant de les éviter est le co-ensilage de CIMSE avec un substrat absorbant. L'effet de l'addition d'un co-substrat sur la rétention des effluents d'ensilage et la fermentation d'ensilage a été étudié.

- Le **cinquième chapitre** s'intéresse au développement d'un procédé alliant stockage et prétraitement grâce à l'ajout d'un réactif alcalin : la chaux. L'impact de l'ajout de chaux sous forme de poudre sèche ou accompagnée d'eau sur les propriétés de la matrice lignocellulosique a été évalué, ainsi que les conditions permettant l'inhibition de l'activité microbienne au cours du stockage.

En fin de manuscrit, une conclusion générale reprenant les résultats marquants obtenus dans les différents chapitres de la thèse est proposée. Elle permet de synthétiser la contribution scientifique des travaux réalisés et de proposer des recommandations techniques sur la bonne gestion du stockage des cultures. Ce chapitre présente enfin les perspectives scientifiques et techniques pour l'amélioration de ces étapes clé de l'utilisation des CIMSE en méthanisation.

1 Synthèse Bibliographique

1.1 Introduction

Ce chapitre présente le contexte, les enjeux ainsi que les bases techniques et scientifiques utiles au développement et à la compréhension de ce mémoire de thèse. Il est composé de 4 parties : la première aborde la méthanisation, en décrivant le procédé et en introduisant le cadre de l'utilisation des cultures intermédiaires multi services environnementaux (CIMSE) pour la production de méthane. La seconde partie présente le stockage des cultures par ensilage et l'impact de cette étape sur la méthanisation des CIMSE. Ensuite, la troisième partie s'intéresse à l'étape de prétraitement des biomasses lignocellulosiques pour la méthanisation et à leur impact sur les propriétés de la biomasse. Enfin, la combinaison des procédés de stockage et prétraitement en une étape unique est présentée.

1.2 La Méthanisation

Dans cette section sont présentés le contexte de la méthanisation en France et en Europe ainsi que les bases techniques permettant la compréhension de ce procédé.

1.2.1 Le biométhane, une énergie renouvelable

Une énergie renouvelable est définie par l'article L211-2 du code de l'énergie comme suit :

« L'énergie produite à partir de sources renouvelables, ou " énergie renouvelable ", est une énergie produite à partir de sources non fossiles renouvelables, à savoir l'énergie éolienne, […], la biomasse, les gaz de décharge, les gaz des stations d'épuration d'eaux usées et le biogaz. »

Issu de la purification du biogaz, le biométhane s'inscrit donc dans la liste des énergies renouvelables et participe aux objectifs de production de ces énergies de l'Union Européenne. La directive 2009/28/CE a fixé comme objectif une consommation moyenne de 20% de ces énergies en 2020 dans l'UE, et il a été relevé à 32% en 2030 par la directive 2018/2001.

Parmi les énergies renouvelables, le biométhane présente l'avantage d'être stockable et produit de façon continue, indépendamment des conditions météorologiques. Il permet également de valoriser des biomasses traditionnellement considérées comme des « déchets » telles que les biodéchets, déjections d'élevage et boues de station d'épuration. Le biométhane peut se substituer au gaz naturel d'origine fossile puisqu'il présente les mêmes caractéristiques physiques. Il peut donc être utilisé directement dans les installations existantes fonctionnant au gaz naturel, évitant le renouvellement ou la modification d'un grand nombre d'équipements.

Le biométhane peut être obtenu à partir de 3 procédés : la méthanisation, la pyrogazéification et le power-to-gaz. La pyrogazéification consiste à chauffer des matières carbonées à haute température (250 à 1500°C) en absence ou défaut d'oxygène. Il en résulte la production de gaz de synthèse appelé syngaz, composé de monoxyde de carbone, hydrogène et méthane pouvant être utilisé directement comme combustible, ou converti en biométhane par méthanation. Le power-to-gaz consiste quant à lui à stocker une partie de la production électrique issue de sources renouvelables (éolien, photovoltaïque) en produisant de l'hydrogène par électrolyse de l'eau, puis en le convertissant en méthane par méthanation. La méthanisation, reposant sur la dégradation microbienne anaérobie de composés fermentescibles, est présentée plus en détails dans ce mémoire.

1.2.2 Historique et potentiel de production en France et en Europe

Bien que le procédé soit connu depuis plus d'un siècle, la méthanisation a principalement pris son essor en France et en Europe à partir des années 2000 (Scarlat et al., 2018). Essentiellement portée par l'Allemagne, la production d'énergie primaire de biogaz est passée de 2 186 à 16 630 ktep entre 2000 et 2019 (Brémond et al., 2021; Eurobserv'ER, 2020). Dans l'union européenne, la France occupait

en 2019 la place de 4ème producteur avec 879 ktep. En France, cette croissance a dans un premier temps concerné les installations valorisant le biogaz en cogénération avant une accélération du développement des installations en injection de biométhane depuis 2015. Bien que les installations de cogénération soient toujours plus nombreuses que les installations en injection en France (884 contre 234 au 31/03/2021), la dynamique de développement de l'injection du biométhane est bien plus forte ces dernières années (Figure 1-1).

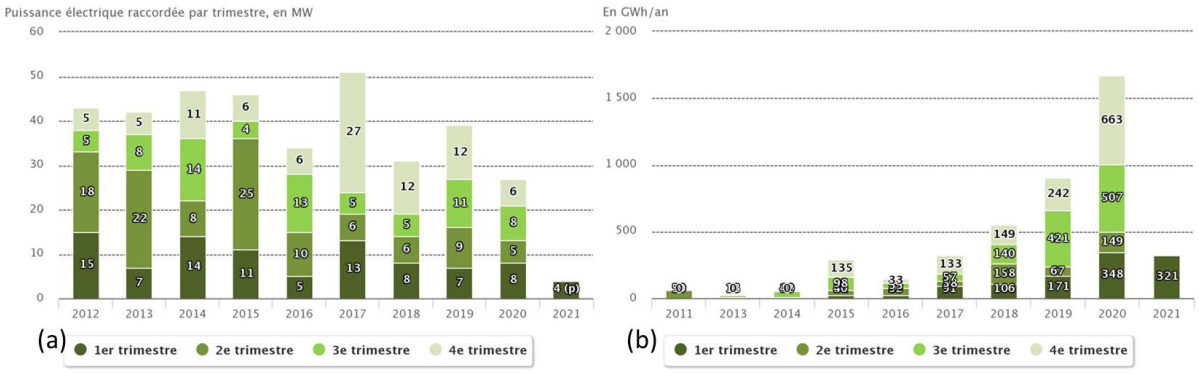

Figure 1-1 : Evolution du parc national des installations de production électrique à partir de biogaz (a) et d'injection de biométhane (b) au 1er trimestre 2021. Source : SDES (Service des données et études statistiques (SDES), 2021a, 2021b).

En France, la Programmation Pluriannuelle de l'Energie de 2020 fixe à 7% la part du biométhane dans la consommation finale en 2030. Cependant, selon les acteurs de la filière, ces objectifs pourraient être largement dépassés. En Europe, la perspective de développement du biométhane est également croissante dans plusieurs pays (Brémond et al., 2021; Scarlat et al., 2018). Cependant, la croissance réelle de la part du biométhane au sein du mix énergétique dépendra en grande partie de sa compétitivité économique vis-à-vis des autres énergies renouvelables.

1.2.3 Le procédé de méthanisation

La méthanisation, ou digestion anaérobie, est une réaction naturelle de dégradation de la matière organique en conditions anaérobies ayant lieu dans des écosystèmes variés tels que les marais, les rizières ou le système digestif de nombreux animaux tels que les ruminants. Ce procédé est utilisé en conditions contrôlées pour la production de biogaz, contenant environ 50 à 70% de CH_4, 30 à 50% de CO_2 et un mélange d'autres gaz présents à l'état de traces (H_2S, N_2, H_2, NH_3) (Moletta, 2015). La dégradation de la matière organique par méthanisation est décrite dans cette section.

1.2.3.1 Les principales étapes du procédé de méthanisation

La digestion anaérobie est un processus pouvant être décrit en quatre phases principales qui font appel à des groupes de micro-organismes différents. Ces phases sont interdépendantes et l'efficacité de la méthanisation dépend de la bonne coordination de celles-ci. Elles sont récapitulées dans la Figure 1-2 et décrites succinctement dans la suite du manuscrit.

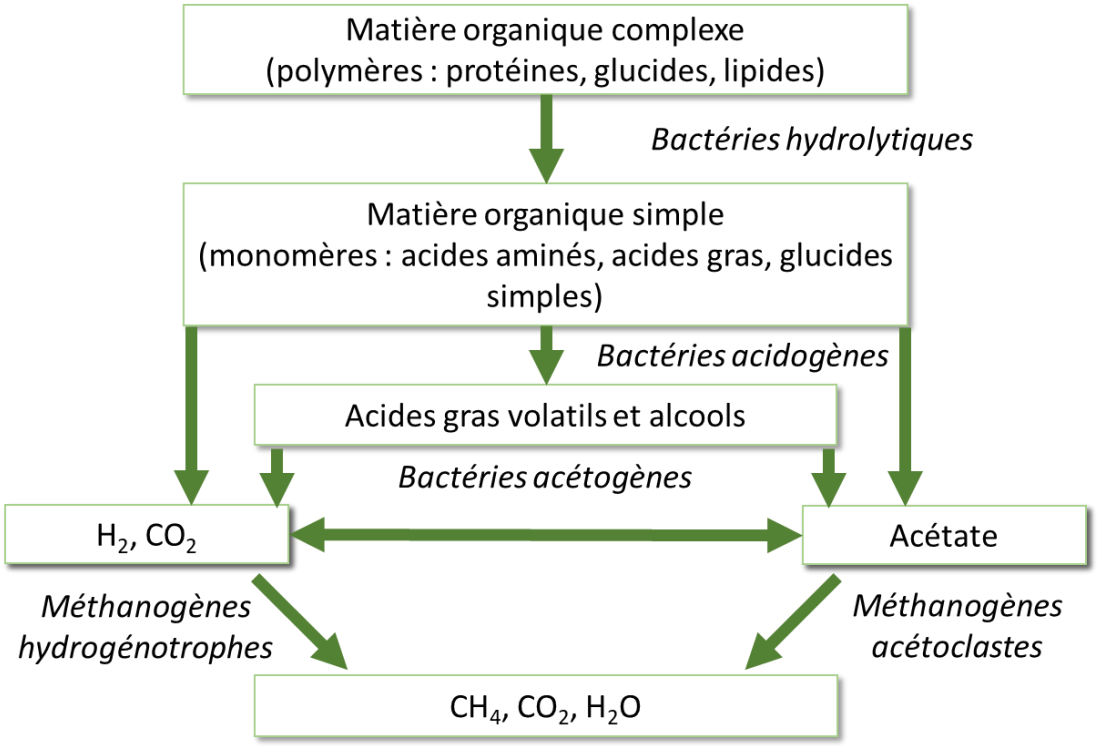

Figure 1-2 : Schéma récapitulatif des étapes de la méthanisation

Hydrolyse

Durant cette première étape, les polymères constituant le substrat sont dégradés en composés simples solubles (monomères). Elle est réalisée par des bactéries anaérobies facultatives sécrétant des exo-enzymes permettant la solubilisation des composés organiques complexes (Delfosse, 2010). Aucune bactérie ne produit l'ensemble des exo-enzymes permettant la dégradation de l'ensemble des substrats entrant dans le réacteur. Chaque exo-enzyme ne permet de dégrader qu'un substrat ou groupe de substrats spécifiques, une grande diversité de bactéries est ainsi nécessaire pour assurer la dégradation de ces composés complexes (Gerardi, 2003). L'hydrolyse est fondamentale pour la suite de la réaction car elle conditionne la disponibilité du substrat. Les bactéries les plus recensées pour la réalisation de cette étape appartiennent au genre *Clostridium* ainsi que certains Cocci anaérobies (*Peptococcus* et *Staphylococcus*) (Stronach et al., 1986). Ces micro-organismes ont une croissance rapide mais l'hydrolyse de la matière organique est une réaction lente souvent limitante, notamment à cause de la structure lignocellulosique de la matière présente dans les végétaux qui ralentit sa dégradation (Hendriks and Zeeman, 2009).

Acidogénèse

Cette étape consiste en la conversion des monomères précédemment libérés en Acides Gras Volatils appelés AGV (acide acétique, acide propionique, acide butyrique et acide valérique), alcools, acides organiques comme l'acide lactique, hydrogène et dioxyde de carbone (Stronach et al., 1986). La majorité des bactéries impliquées dans l'acidogénèse participent également à l'hydrolyse. Il est retrouvé, entre autres, les genres *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Paenibacillus*. Cette étape est la plus rapide et peut conduire à une accumulation d'AGV en cas d'inhibition des étapes postérieures.

Acétogénèse

Cette étape permet la conversion des métabolites produits lors de l'acidogenèse en précurseurs directs du méthane : l'acide acétique, l'hydrogène et le dioxyde de carbone. Deux voies permettent cette conversion. La voie hétérofermentaire qui produit du CO_2, de l'H_2 et des acides comme le pyruvate, l'acide butyrique et l'acide propionique. La voie homoacétogène génère quant à elle exclusivement de l'acide acétique. Trois groupes de bactéries peuvent réaliser ces transformations : les acétogènes productrices obligées d'hydrogène, les bactéries homoacétogènes et certaines bactéries sulfato-réductrices. Cette étape est inhibée en cas de trop forte pression partielle en H_2. Ainsi, la symbiose de ces bactéries avec d'autres organismes consommateurs d'hydrogène, comme les méthanogènes, est indispensable (Moletta, 2015).

Méthanogénèse

C'est la dernière étape de minéralisation de la matière organique. Elle transforme les produits de l'acétogenèse en méthane selon deux types de réaction : la transformation du dioxyde de carbone et de l'hydrogène, réalisée par les méthanogènes hydrogénotrophes, et celle de l'acide acétique par les méthanogènes acétotrophes. Les micro-organismes responsables de cette dernière étape appartiennent au domaine des *Archaea* comme les genres *Methanogenium* et *Methanosaeta* (Moletta, 2015).

Autres réactions

En plus des populations impliquées dans la méthanisation, d'autres micro-organismes entrent en compétition pour la consommation du substrat. C'est le cas des bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui utilisent le sulfate (SO_4^{2-}) comme accepteur final d'électrons et le convertissent en sulfure (S^{2-}) (A.J.M. Stams, S.J.W.H. Oude Elferink, 2003). Le sulfure d'hydrogène produit par ces bactéries est toxique pour les méthanogènes et inhibe la production de méthane (Gunaseelan, 1997). Deux réactions du cycle de l'azote peuvent également se produire en conditions anaérobie : la dénitrification et l'oxydation anaérobie de l'ammonium.

1.2.3.2 Principaux procédés de méthanisation

Différentes technologies de méthanisation existent selon la configuration des réacteurs et le taux de matières sèches du substrat et du milieu réactionnel. Principalement, on retrouve les procédés de méthanisation en voie sèche ou humide, opérés de façon continue ou discontinue. Différentes températures peuvent également être appliquées au milieu réactionnel.

Méthanisation voie humide ou voie sèche

On parle de procédé en voie humide en présence d'un taux de matière sèche du milieu inférieur à 15% environ (Kothari et al., 2014). Les procédés en voie humide sont principalement adaptés aux substrats liquides tels que les boues, lisiers ou effluents industriels. Les substrats solides peuvent également être valorisés par voie humide, mais une préparation est nécessaire (broyage, dilution, homogénéisation). Ces procédés sont bien adaptés à un mode d'alimentation continu. Pour la méthanisation de substrats variés liquides et solides, les réacteurs CSTR (Continuously Stirred-Tank Reactor) sont largement employés dans la filière française et permettent une grande flexibilité dans les matières à traiter. En revanche, l'important taux de dilution génère des volumes de digestat liquide importants à gérer.

Les procédés en voie sèche présentent généralement un taux de matière sèche compris entre 20 et 40%. Ils sont particulièrement adaptés aux substrats solides tels que les fumiers, cultures et résidus de cultures. Bien que cette voie présente l'avantage de ne pas nécessiter de dilution des substrats, la siccité élevée du mélange rend l'opération des réacteurs en mode continu plus compliquée et limite souvent à un fonctionnement en batch. La méthanisation en garage est un procédé relativement répandu en méthanisation discontinue en voie sèche. Cependant, des exemples de méthanisation continue en voie sèche existent comme les réacteurs voie sèche à flux piston.

Méthanisation psychrophile, mésophile ou thermophile

Trois gammes principales existent concernant la température du méthaniseur. En l'absence de système de chauffage du réacteur, la méthanisation est réalisée en condition psychrophile (Hagos et al., 2017). La température de réaction est alors généralement comprise entre 5 et 25°C. Cette configuration est rencontrée dans de nombreux cas tels que les installations de stockage des déchets non dangereux (ISDND), fosses septiques, fosse de stockage des digestats, etc. La méthanisation en conditions psychrophiles présente l'avantage d'être peu énergivore, mais nécessite des temps de réaction très longs.

La méthanisation en conditions mésophiles fait appel à une régulation de la température du réacteur entre 35 et 40°C. Cette fourchette de température permet d'accélérer la cinétique de dégradation de la biomasse tout en conservant une stabilité et une robustesse du procédé satisfaisantes.

Enfin, dans le cas de la méthanisation thermophile, la température est augmentée jusqu'à une valeur voisine de 55°C. La digestion est alors plus rapide qu'en conditions mésophiles, ce qui permet de réduire le temps de séjour des substrats et la taille des réacteurs (Hagos et al., 2017). De plus, la température élevée permet l'hygiénisation de la matière et un abattement des microorganismes pathogènes (Popat et al., 2010). En revanche, la consommation énergétique de ce type d'installation est généralement supérieure et la rend plus pertinente dans le cadre d'exploitations ayant une source de chaleur à valoriser comme c'est le cas en cogénération. Les procédés thermophiles sont également réputés moins stables que les procédés psychrophiles et mésophiles.

1.2.3.3 Valorisation des produits de la méthanisation

Les deux principaux produits de la méthanisation sont le biogaz et le digestat. Chacun de ces produits et de ses sous-fractions fait l'objet de valorisations spécifiques.

Valorisation du biogaz sous forme de chaleur

Une des valorisations possibles du biogaz consiste à l'utiliser dans une chaudière afin de produire de l'énergie thermique. La chaleur ainsi générée peut servir au chauffage du digesteur, de bâtiments d'élevage, d'habitations ou autres. En France, la valorisation unique du biogaz en chaleur ne concerne que quelques installations, la cogénération ou l'injection de biométhane dans le réseau lui étant généralement préférés (ADEME, 2016).

Valorisation du biogaz en cogénération

La valorisation du biogaz par cogénération (moteur ou turbine) aboutit à la production d'électricité (rendement de 30 à 45%) et de chaleur (rendement de 40 à 50%) (ADEME, 2016). L'électricité est alors revendue au tarif d'achat fixé lors du montage du projet. Le tarif d'achat souscrit est valable pour une durée de 20 ans. La chaleur produite peut être valorisée de la même façon que dans la section précédente.

Valorisation du biogaz par injection de biométhane

L'injection de biométhane dans le réseau de gaz naturel est autorisée en France depuis 2011. Elle est possible après épuration, consistant à déshumidifier le biogaz ainsi qu'à séparer le méthane des autres gaz (CO_2, H_2S…) afin de parvenir à une teneur en méthane supérieure à 97%. La qualité du biométhane doit être conforme aux spécifications des gestionnaires de réseaux. Elles sont précisées dans le contrat d'injection signé entre le producteur et le gestionnaire du réseau dans lequel le biométhane est injecté (GRDF, 2017). Par rapport à la valorisation du biogaz en cogénération, l'injection de biométhane permet de s'affranchir de la nécessité de valoriser la chaleur issue de la cogénération à proximité du site de méthanisation et présente un meilleur rendement de conversion énergétique. Partageant les mêmes caractéristiques que le gaz naturel, le biométhane peut être substitué à ce dernier et ainsi

participer significativement à la diminution des émissions de gaz à effet de serre. Le biométhane épuré peut également être utilisé en tant que carburant dans des véhicules fonctionnant au GNV (Gaz Naturel Véhicule) et remplacer des combustibles fossiles tels que l'essence ou le gazole. La conversion de véhicules thermiques existants (gazole ou essence) au GNV est également possible, évitant le remplacement prématuré de véhicules fonctionnels (Clarke et al., 2012).

Valorisation du CO_2 de méthanisation

Le CO_2 obtenu lors de la purification du biogaz en biométhane est également un produit valorisable. Le CO_2 peut être utilisé dans l'agriculture pour l'usage en serres ou la culture de micro-algues. Dans l'industrie, une très grande variété d'usages du CO_2 existe : confection de boissons gazeuses, acidification d'effluents industriels, utilisation comme fluide réfrigérant… (CTBM, 2020). Bien que peu d'applications industrielles concrètes de récupération du CO_2 de méthanisation soient actuellement à l'œuvre, de nombreuses pistes sont à l'étude, ce qui permettrait de compléter les revenus des installations de méthanisation tout en proposant un CO_2 biogénique « vert » aux entreprises clientes (CTBM, 2020).

Valorisation du digestat

Le digestat est le produit résidu de la méthanisation, composé de matières organiques non dégradées, de matières minérales et d'eau. Avant d'être utilisé en agriculture, le digestat brut est généralement séparé en deux phases, liquides et solides, par des procédés mécaniques (presse à vis, centrifugation…). Dans le cas d'une séparation efficace, le digestat liquide, riche en azote ammoniacal et en potassium, peut être utilisé pour la fertilisation azotée des cultures. Le digestat solide enrichi en matières organiques et en autres minéraux (P, S, Ca, Mg…) possède également un pouvoir amendant (Guilayn et al., 2019). Selon la nature des intrants utilisés sur l'installation de méthanisation, le digestat revêt un statut de produit ou de déchet. Le statut de produit lui confère une valeur marchande et affranchit le producteur de la responsabilité de son devenir. Dans le second cas, sa commercialisation est alors interdite et il est soumis à un plan d'épandage (Figure 1-3) (InfoMétha, n.d.).

1.2.3.4 Biomasses valorisables en méthanisation

Une grande variété de substrats, également appelés intrants, peut être valorisée par méthanisation. Ces intrants peuvent provenir de l'assainissement des eaux usées (boues de station d'épuration), des déchets des ménages et collectivités (restes de repas, biodéchets, déchets verts), de l'industrie agro-alimentaire (effluents chargés en matières organiques, sous-produits IAA) et de l'agriculture (déjections d'élevage, résidus de cultures, cultures énergétiques et cultures intermédiaires). Selon l'ADEME, le gisement mobilisable pour la méthanisation s'élèverait à 56 TWh à l'horizon 2030, et 138 TWh en 2050 (ADEME, 2018). Les intrants d'origine agricole représentent la grande majorité de ce

gisement pour ces deux horizons. Parmi ceux-ci, les cultures multi services environnementaux (CIMSE), aussi appelées cultures intermédiaires à vocation énergétique (CIVE) connaissent un développement important en France. Le cas des CIMSE est abordé plus en détail dans la section suivante.

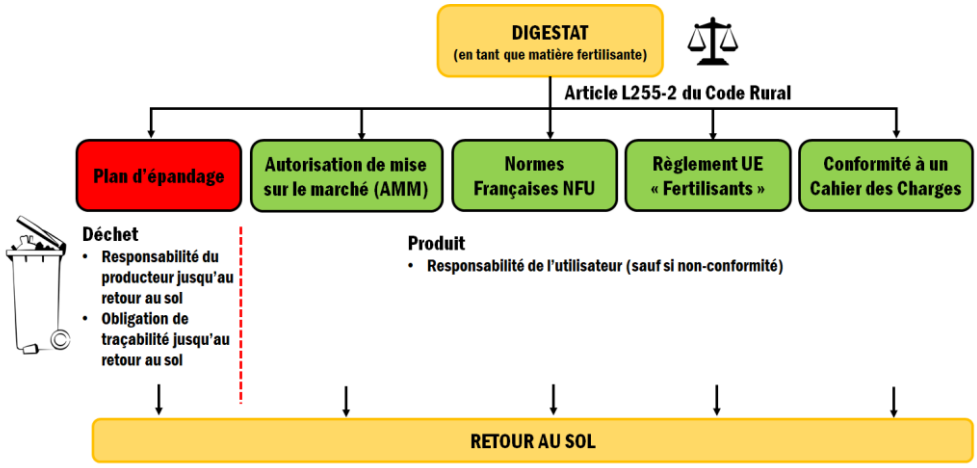

Figure 1-3 : Réglementation encadrant le statut des digestats de méthanisation (InfoMétha, n.d.)

1.2.4 Utilisation des CIMSE en méthanisation

Afin de permettre la production de biomasse pour la méthanisation sans engendrer de concurrence avec l'usage alimentaire des surfaces arables, le recours aux CIMSE se développe au sein des exploitations de méthanisation agricole. Selon une étude réalisée par Solagro pour l'ADEME (ADEME, 2018), les CIMSE pourraient représenter 36% du gisement permettant de produire 138 TWh de biométhane issu de méthanisation à l'horizon 2050.

1.2.4.1 Cadre réglementaire des CIMSE

L'article D543-291 du code de l'environnement décrit une culture intermédiaire comme une culture semée et récoltée entre deux cultures principales. Une culture principale est définie comme la culture d'une parcelle qui est « soit présente le plus longtemps sur un cycle annuel ; soit identifiable entre le 15 juin et le 15 septembre sur la parcelle, en place ou par ses restes ; soit commercialisée sous contrat ». Une culture principale peut également être utilisée à des fins de production d'énergie, on parle alors de culture énergétique. Afin de limiter la concurrence entre l'usage alimentaire et énergétique des surfaces agricoles, l'article D543-292 limite à 15% la part des cultures énergétiques dans le tonnage brut annuel des intrants d'un méthaniseur. Cette limitation ne concerne pas les CIMSE, qui ne sont pas des cultures principales.

1.2.4.2 Avantages énergétiques et agro-écologiques liés au CIMSE et points de vigilance

Dans le cas des installations de méthanisation agricole, les CIMSE peuvent permettre de fournir une quantité importante de biomasse et d'assurer l'alimentation des méthaniseurs avec un substrat à haut potentiel méthanogène. Les CIMSE peuvent également être essentielles aux agriculteurs n'ayant pas d'activité d'élevage pour accéder à la méthanisation tout en produisant leur propre engrais vert grâce au digestat. Contrairement aux cultures énergétiques qui occupent la surface agricole durant la majorité de l'année et supplantent les cultures à vocation alimentaire, les CIMSE sont cultivées pendant la période d'interculture des cultures dites « principales » à vocation alimentaire. Cette caractéristique leur permet de ne pas entrer en concurrence avec les cultures à vocation alimentaire. En plus de la production d'énergie par la méthanisation de la biomasse produite, les CIMSE apportent plusieurs services agro-écologiques qui leur valent parfois l'appellation de cultures intermédiaires multi-services environnementaux (CIMSE). En évitant de laisser le sol découvert, l'implantation d'une CIMSE limite le lessivage des nutriments comme les nitrates (Igos et al., 2016; Sapkota et al., 2012) et l'érosion des sols (Jian et al., 2020b). La conduite d'une CIMSE permet également le stockage de carbone dans le sol via l'apport de matière organique fraîche (système racinaire et chaumes) et humifiée (digestat) (Jian et al., 2020b; Jurgutis et al., 2021). En maitrisant la pousse des adventices par étouffement, les cultures intermédiaires peuvent également limiter le recours aux désherbants chimiques (Büchi et al., 2020; Kadziene et al., 2020). L'utilisation de CIMSE au sein d'une rotation de culture nécessite toutefois la prise en compte de certains points de vigilance. En particulier, l'implantation de la CIMSE ne doit pas impacter significativement la ressource hydrique, ce qui induirait un stress sur la culture suivante (Meyer, 2020). La disponibilité des éléments nutritifs (notamment l'azote) pour la culture principale doit également être surveillée. Le tassement des sols et la modification des dates de semis et de récolte sont également deux problématiques associées à la conduite de la CIMSE qui doivent être considérées avec attention.

1.2.4.3 Espèces cultivées et principales caractéristiques

Les CIMSE d'été et les CIMSE d'hiver se distinguent selon la période de l'année où elles sont implantées (Arvalis, 2020). Les CIMSE d'hiver précèdent une culture alimentaire d'été (maïs, tournesol, sorgho, soja…). Elles sont généralement semées en fin d'été et récoltées au début du printemps. Les CIMSE d'hiver les plus exploitées sont le seigle, l'orge et les méteils (mélange céréale – légumineuse) (BIO-VALO, 2020). Les CIMSE d'été sont quant à elles positionnées après une culture alimentaire d'hiver (blé, orge, colza, pois…). Elles sont semées en été et récoltées en début d'automne. Le maïs, le sorgho et le tournesol sont les CIMSE d'été les plus cultivées (BIO-VALO, 2020). Le Tableau 1-1 présente une gamme de potentiel méthanogène et de rendement méthane pour différentes plantes cultivées ou potentiellement utilisables en CIMSE (pour le calcul de rendement méthane à l'hectare, une approximation MS = MV a été faite). Les CIMSE présentent généralement un potentiel méthanogène

spécifique élevé. Toutefois, le rendement méthanogène final par hectare s'explique davantage par le rendement de récolte que par le potentiel méthanogène, ce dernier étant relativement peu variable d'une espèce à l'autre.

Tableau 1-1: Gamme de rendement de récolte, potentiel méthanogène et rendement méthane par hectare pour différentes espèces cultivées ou potentiellement cultivables en tant que CIMSE (Braun, 2007).

	Rendement de récolte $T_{MS}.ha^{-1}$	**Potentiel méthanogène** $Nm^3 \cdot t_{MV}^{-1}$	**Rendement méthane calculé** $Nm^3 \cdot ha^{-1}$
Maïs (plante entière)	9 – 30	397 - 618	3600 - 18500
Herbe	12 – 14	298 – 467	3600 – 6500
Trèfle violet	5 – 19	300 – 350	1500 – 6500
Chanvre	8 – 16	355 – 409	2800 - 6500
Tournesol	6 – 8	154 – 400	900 – 3200
Colza	2.5 – 7.8	240 – 340	600 – 2600
Orge	3.6 – 4.1	353 – 658	1300 – 2700
Triticale	3.3 – 11.9	337 – 555	1100 – 6600
Sorgho	8 – 25	295 – 372	2400 – 9300
Sorgho du soudan	10 – 20	213 - 303	2100 - 6000
Luzerne	7.5 – 16.5	340 – 500	2500 - 8200
Lin	5.5 – 12.5	212	1200 - 2600
Raygrass	7.4 – 15	390 – 410	2900 – 6100
Pois	3.7 – 4.7	390	1400 – 1800

Bien que le paysage français soit dominé par quelques espèces de CIMSE présentant les meilleurs rendement de production de biomasse, une très grande variété de plantes est en réalité exploitable en tant que CIMSE (Molinuevo-Salces et al., 2014, 2013). Les propriétés physico-chimiques de ces potentielles CIMSE sont très variables. En effet, en plus des différences de caractéristiques inter-espèces, de nombreux paramètres sont aussi fortement impactés par le stade de maturité (Figure 1-4), l'application ou non de fertilisants, les conditions météorologiques ainsi que l'heure de récolte. Le stade de maturité, paramètre le plus impactant, peut être décrit grâce à l'utilisation d'outils tels que l'échelle BBCH qui facilite les comparaisons inter-études (Meier, 1997).

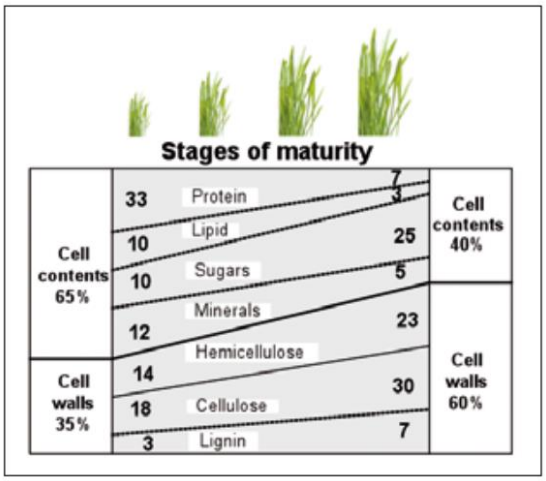

Figure 1-4 : Evolution de la composition moyenne de l'herbe selon le stade de développement (Murphy et al., 2011)

1.2.4.4 Problématiques liées à l'utilisation des CIMSE en méthanisation et leviers d'amélioration

Comme introduit ci-dessus, le rendement méthanogène final dépend essentiellement du rendement de récolte, exprimé généralement en $t_{MS} \cdot ha^{-1}$. De récents travaux menés par Arvalis ont montré que ce rendement de récolte était une des principales clés de rentabilité de l'exploitation des CIMSE (Marsac et al., 2019a). L'étude a ainsi défini un seuil de rentabilité moyen de 6 $t_{MS} \cdot ha^{-1}$ permettant de compenser les coûts de culture par la vente de biométhane.

La valorisation efficace de la biomasse récoltée revêt également une importance capitale. Entre la récolte et son introduction dans le méthaniseur, les étapes de stockage et de prétraitement jouent un rôle clé dans l'optimisation de l'utilisation de la biomasse. En effet, les CIMSE sont récoltées de façon saisonnière, alors que les réacteurs de méthanisation sont alimentés de façon continue tout au long de l'année. Un stockage efficace des récoltes de CIMSE est donc impératif afin de préserver leur potentiel méthanogène. Le stockage des CIMSE par ensilage est présenté en section 1.3. Un stockage performant des CIMSE sur une longue durée peut également permettre de compenser une récolte de CIMSE insuffisante par la précédente.

De plus, la dégradation des CIMSE et leur conversion en méthane étant également limitées par la structure lignocellulosique complexe des parois cellulaires, l'application de prétraitements, visant à déconstruire cette structure et faciliter l'accès des microorganismes aux sucres de la cellulose et des hémicelluloses, peut permettre d'augmenter le rendement de conversion en méthane. Les problématiques du stockage et du prétraitement sont abordées dans les sections 2 et 3 de cette revue bibliographique. La perspective de procédés alliant stockage et prétraitement est quant à elle abordée en section 4.

1.3 Stockage par ensilage de la biomasse lignocellulosique et des CIMSE

L'ensilage est une technique de stockage de la biomasse reposant sur la fermentation lactique anaérobie, selon un procédé proche de celui de la fabrication de choucroute et d'autres aliments lacto-fermentés. La méthode d'ensilage est décrite pour le stockage des fourrages à destination de l'élevage depuis la fin du XIX° siècle (Goffart, 1877), bien que son utilisation étendue en France se soit principalement intensifiée à partir des années 1970 avec le développement du maïs fourrage (Arvalis, 2011). L'ensilage présente de nombreux avantages par rapport à la conservation sous forme sèche par la confection de foin. La digestibilité de l'ensilage par le bétail est meilleure que celle du foin, de même que la préservation du potentiel énergétique (Kaiser et al., 2004). Le stockage par ensilage permet également des débits de récolte supérieurs à ceux permis lors de la confection de foin, et est moins dépendant des conditions météorologiques. L'ensilage a rapidement été adopté dans la majorité des exploitations d'élevage de ruminants, aussi bien pour la conservation du maïs que d'autres plantes utilisées en tant que fourrages. D'une manière analogue, l'ensilage peut être utilisé pour le stockage de CIMSE avant méthanisation (Teixeira Franco et al., 2016). Le stockage des CIMSE par ensilage pour la méthanisation a été abordé dans le rapport SAM de l'ADEME (Peyrelasse et al., 2017) qui présente les recommandations de bonnes pratiques des intrants de méthanisation. Cette section de la revue bibliographique du manuscrit de thèse vise à présenter le procédé d'ensilage de façon plus détaillée en s'intéressant aux transformations du substrat qui surviennent lors du stockage ainsi qu'aux enjeux qui y sont associés. Le stockage par ensilage repose sur une succession d'étapes, allant de la récolte à l'utilisation finale du substrat, qui sont développées ci-après.

1.3.1 Le procédé de stockage par ensilage

Les principales étapes du procédé de stockage par ensilage sont listées dans cette section. Le chantier d'ensilage démarre au champs lors de la récolte de la plante, et se termine à la fermeture du silo. Démarre alors la fermentation d'ensilage, suivie d'une phase de stabilité qui s'étend jusqu'à l'ouverture du silo.

1.3.1.1 Récolte et confection des silos

Lors de sa récolte, la partie aérienne de la plante est prélevée et broyée, avant d'être transportée du champ au site de stockage. Restent alors au champs la partie souterraine ainsi que des chaumes d'une hauteur moyenne de 10cm. Deux cas de figure principaux peuvent être rencontrés selon la plante à récolter, le contexte climatique/météorologique et les contraintes organisationnelles.

Ensilage « coupe directe »

Lors de l'ensilage en coupe directe, les étapes de fauche et de broyage sont réalisées de manière simultanée par l'ensileuse. Ce mode opératoire permet de limiter les étapes et passages de tracteur au champ, ainsi que les pertes de matière dues à la respiration aérobie et aux manipulations

successives (Kaiser et al., 2004). Cette technique de récolte est la plus employée pour les cultures d'été telles que le maïs, le sorgho ou le tournesol. Les céréales d'hiver (blé, avoine, orge…) ainsi que les herbes peuvent également être récoltées en coupe directe, toutefois le problème de la génération d'effluents au silo se pose en cas de récolte précoce, étant donné le taux d'humidité important de ces plantes.

Ensilage « préfané »

Le recours au préfanage consiste à réaliser la fauche et le broyage de la plante en deux étapes distinctes lors de la récolte. La fauche est alors réalisée au préalable, la récolte étant alors regroupée en andains de largeur variable et laissée au sol quelques heures à quelques jours jusqu'à l'obtention du taux de matière sèche désiré.

Cette technique permet principalement de rehausser le taux de matière sèche d'une plante trop humide pour être récoltée de façon optimale. Cette méthode s'applique principalement pour les fourrages comme les céréales récoltées immatures, les herbes et légumineuses. Plusieurs stratégies peuvent être adoptées selon l'objectif à atteindre et le matériel disponible, et nécessiter plusieurs passages successifs pour la formation ou le retournement des andains (Kaiser et al., 2004). Comparé à l'ensilage direct, le recours au préfanage permet également de faciliter et accélérer le travail de l'ensileuse, qui récolte alors les andains rassemblés.

Confection du silo

Après avoir été récoltée et broyée, la plante est ensuite transportée jusqu'au site de stockage pour la confection du silo. Quatre types de silos principaux peuvent être rencontrés : les silos tours, boudins, taupinières et couloirs. L'ensilage peut également être réalisé en balles pressées, on parle alors d'enrubannage.

Le silo couloir, le plus répandu en France, permet un compromis intéressant entre coût d'investissement, performance de stockage et praticité de confection/ouverture. Ce modèle sera retenu pour la suite de la description du procédé. Le remplissage du silo a lieu par couches successives fortement tassées à l'aide de tracteurs lestés. Le tassement permet l'évacuation d'un volume d'air aussi important que possible du silo, permettant la mise en place rapide de conditions anaérobies. Une fois le tassement effectué, le silo est fermé hermétiquement afin d'éviter la pénétration d'oxygène causant des dégradations aérobies de la biomasse. Plusieurs méthodes de couvertures existent, faisant appel le plus communément à des bâches de plastique, mais également à d'autres substrats comme de la sciure de bois, du sol, (Minson and Lancaster, 1965) des substrats organiques divers (pulpe de betterave, épluchures de pommes de terre…)(CIPF and La Clinique des Plantes, 2019) ou un couvert

végétal semé. Le recours à une couverture est parfois délaissé, mais cette pratique peut engendrer d'importantes pertes de potentiel méthanogène (Section 1.3.2.2).

1.3.1.2 La fermentation d'ensilage

La fermentation d'ensilage démarre dès la fermeture du silo. Après une brève période aérobie utilisant l'oxygène résiduel piégé dans le silo, la fermentation anaérobie démarre et permet la préservation du substrat durant plusieurs mois. La succession de ces étapes est résumée dans la Figure 1-5, et précisée ci-après.

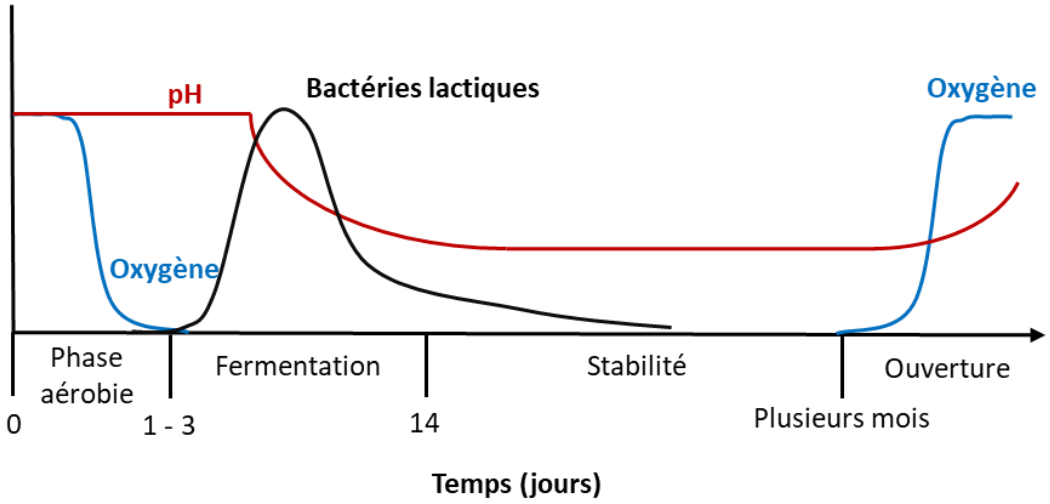

Figure 1-5 : Les principales phases de stockage d'un ensilage bien préservé.

Phase aérobie

La phase aérobie débute en réalité immédiatement après la coupe de la plante et se poursuit jusqu'à la disparition de l'oxygène à l'intérieur du silo. L'action des enzymes de la plante cause la dégradation de polyosides complexes en sucres solubles simples et la respiration de ces sucres, causant des émissions de chaleur et de CO_2 selon l'équation (1-1) (Kaiser et al., 2004).

$$WSC + O_2 \rightarrow CO_2 + eau + chaleur\ (\ 16\ MJ/kg\ WSC\ ) \qquad (\ 1\text{-}1\ )$$

Où WSC = Sucres solubles (Water Soluble Carbohydrates). Si la disparition de l'oxygène est trop lente (à cause, notamment, d'un mauvais tassement ou d'une étanchéité imparfaite du silo), des microorganismes aérobies comme les levures et moisissures peuvent également se développer et contribuer à la détérioration du substrat.

Fermentation primaire

La fermentation démarre une fois les conditions anaérobies atteintes. Les bactéries anaérobies présentes dans le milieu entrent alors en compétition pour le substrat. Les sucres solubles disponibles dans le substrat sont convertis majoritairement par les bactéries lactiques en acide lactique. Dans les

ensilages fermentés avec succès, les bactéries lactiques prennent le dessus sur les entérobactéries, clostridies et autres bactéries indésirables (Pahlow et al., 2003). La production rapide d'acide lactique entraine un abaissement significatif du pH jusqu'une valeur de 5 à 3,7 et l'arrêt quasi-total de l'activité microbienne. Selon les critères de la littérature, un ensilage est généralement considéré comme de bonne qualité lorsque les paramètres suivants sont atteints à la fin de la fermentation primaire : pH inférieur à 4,5, concentration en acide lactique supérieure à 30 g $kgTS^{-1}$, concentration en acide butyrique inférieure à 10% de la concentration en acides totaux et concentration en azote ammoniacal inférieure à 100 g N.kg N^{-1} (Pahlow et al., 2003).

Les bactéries les plus régulièrement décrites comme participant à la fermentation lactique primaire appartiennent aux genres *Lactobacillus, Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Selon les principaux métabolites produits, deux mécanismes de fermentation lactique sont identifiés. La fermentation homolactique dégrade les hexoses et aboutit à la formation d'acide lactique par la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof-Parnass et fermentation anaérobie du pyruvate selon l'équation simplifiée (1-2) (Woolford and Pahlow, 1998).

$$Glucose/Fructose + 2\ ADP \rightarrow 2\ Acide\ lactique + 2\ ATP \qquad (1\text{-}2)$$

La fermentation hétérolactique aboutit quant à elle à la production d'une plus grande variété de métabolites, en plus de l'acide lactique à partir d'hexoses ou pentoses. La dégradation des hexoses aboutit à la production d'acide lactique, acide acétique et éthanol selon les équations suivantes :

$$Glucose + ADP \rightarrow Acide\ lactique + Ethanol + CO_2 + ATP \qquad (1\text{-}3)$$

$$3\ Fructose\ + 2\ ADP \rightarrow\ Acide\ lactique\ +\ 2\ Mannitol\ +\ Acide\ acétique\ +\ CO_2 + 2\ ATP \qquad (1\text{-}4)$$

Les pentoses, principalement l'arabinose et le xylose, sont eux dégradés en acide lactique et acide acétique selon l'équation (1-5).

$$Arabinose/Xylose + 2\ ADP \rightarrow Acide\ acétique + Acide\ lactique + 2\ ATP \qquad (1\text{-}5)$$

Par unité de glucose ou fructose, la fermentation hétérolactique aboutit donc à une quantité inférieure d'acide lactique produite. Pour cette raison, cette voie fermentaire est souvent décrite comme moins désirable, car participant moins efficacement à l'acidification du substrat. La production d'acide

acétique améliore en revanche la stabilité aérobie de l'ensilage, évitant d'importantes pertes énergétiques lors de l'ouverture du silo (section ?). Par conséquent, des additifs d'ensilage promouvant une fermentation hétérolactique sont parfois utilisés (Herrmann et al., 2015). Contrairement à la fermentation homolactique, la fermentation hétérolactique peut, selon les substrats dégradés, aboutir à des pertes de masse par la production de CO_2. Toutefois, ces pertes de masse ne sont pas accompagnées de pertes de potentiel méthanogène (Gissén et al., 2014). Ceci s'explique par le fait que la demande chimique en oxygène (DCO) du CO_2 est nulle, et que des composés à plus haute densité énergétique que les sucres dégradés sont produits. Ce phénomène est développé dans la section 1.3.2.4.

Fermentation secondaire

Lorsque la fermentation primaire ne permet pas d'atteindre rapidement un pH suffisamment bas, l'inhibition des bactéries indésirables pour la bonne conservation et la stabilité de l'ensilage n'est pas obtenue. Le développement des bactéries de la famille des clostridies est rapporté comme étant particulièrement indésirable dans la littérature (Kaiser et al., 2004; Teixeira Franco et al., 2016). Deux groupes de clostridies se développent alors majoritairement dans l'ensilage. Les clostridies ayant une activité saccharolytique comme *C. butyricum* et *C.tyrobutyricum* dégradent le glucose et l'acide lactique pour produire de l'acide butyrique, du CO_2 et de l'hydrogène selon les équations (1-6) et .(1-7) (Woolford and Pahlow, 1998).

$$Glucose + 3\,ADP \rightarrow Acide\ butyrique + 2\,CO_2 + 2\,H_2 + 3\,ATP \qquad (1\text{-}6)$$

$$2\,Lactate + ADP \rightarrow Acide\ butyrique + 2\,CO_2 + 2H_2 + ATP \qquad (1\text{-}7)$$

La dégradation du glucose en acide butyrique entre en compétition avec les fermentations homolactiques et hétérolactiques, et aboutit à la formation d'un métabolite ayant un pouvoir acidifiant plus faible et en moins grande quantité. Par exemple, par unité de glucose consommée, la fermentation butyrique n'aboutit qu'à une unité d'acide butyrique (pKa = 4,81) contre 2 unités d'acide lactique (pKa = 3,86) par fermentation homolactique. De plus, la production d'hydrogène entraine des pertes énergétiques (Section 1.3.2.4).

Les clostridies à activité protéolytique prolifèrent à un pH supérieur à 5 et réalisent quant à elles le catabolisme des acides aminés, produisant principalement de CO_2 et de l'ammoniac (Woolford and Pahlow, 1998). Deux exemples de protéolyse clostridiale sont donnés en équations (1-8) et (1-9).

$$Lysine \rightarrow Acide\ acétique + Acide\ butyrique + 2\ NH_3 \qquad (1\text{-}8)$$

$$Alanine + 2\,H_2O \rightarrow Acide\ acétique + 2\,NH_3 + CO_2 \qquad (1\text{-}9)$$

Contrairement à l'activité saccharolytique, l'activité protéolytique n'entraîne pas de pertes énergétiques directes, la DCO étant conservée au cours de la réaction. En revanche, la production d'ammoniac participe à l'élévation du pH et peut causer des pertes d'azote par volatilisation.

1.3.1.3 Ouverture du silo et phase aérobie

Lors de l'ouverture du silo ou en cas de pénétration d'air, l'activité des microorganismes aérobies (principalement les levures et moisissures) peut reprendre. Les sucres solubles résiduels et métabolites sont alors dégradés par voie aérobie, ce qui aboutit à la production de CO_2, chaleur et eau selon la réaction (1-1), l'échauffement pouvant alors causer une hausse de la température au-dessus de 50°C. La capacité d'un ensilage à résister aux dégradations aérobies, aussi appelée stabilité aérobie, dépend de nombreux facteurs tels que la teneur en matière sèche, le taux de sucres solubles résiduels et les métabolites présents dans le milieu. Les facteurs affectant la stabilité aérobie des ensilages sont développés plus en détails en section ?.

1.3.2 L'ensilage pour la méthanisation : principaux objectifs et voies de dégradation

Avec le développement de l'utilisation des cultures en méthanisation, l'ensilage s'est imposé comme la méthode de stockage de prédilection (Teixeira Franco et al., 2016; Villa et al., 2020), de par sa capacité à permettre la préservation efficace des substrats humides malgré des débits de récolte élevés. Les objectifs de l'ensilage pour la méthanisation, les principales voies de dégradation et les points clés pour la réussite du stockage sont développés dans cette section.

Utilisé depuis plusieurs décennies pour le stockage des fourrages à destination de l'alimentation animale, l'ensilage est une technique maitrisée dans le secteur agricole, et de très nombreux travaux scientifiques ont porté sur son optimisation pour cette utilisation. Dans le secteur de la méthanisation en revanche, l'utilisation croissante des cultures énergétiques ou intermédiaires en méthanisation (et le recours à l'ensilage pour leur stockage) a principalement pris son essor au début du XXIème siècle (Scarlat et al., 2018). Par conséquent, les standards et méthodes définis pour la bonne conservation des fourrages à destination de l'élevage sont encore largement appliqués en méthanisation. Pourtant, les objectifs et impératifs propres aux deux cas d'application sont différents (Tableau 1-2) et des ensilages considérés comme étant de piètre qualité pour l'alimentation animale selon certains critères pourraient constituer un substrat intéressant pour la méthanisation (Villa et al., 2020).

Tableau 1-2: Principaux objectifs comparés pour le stockage par ensilage à destination de l'élevage et de la méthanisation (Kaiser et al., 2004; Teixeira Franco et al., 2016; Villa et al., 2020)

	Elevage	**Méthanisation**
Digestibilité	Préservation de la valeur nutritive des protéines, de la valeur énergétique et la digestibilité du substrat	Préserver le potentiel méthanogène, et la dégradabilité du substrat
Appétence	Optimiser l'appétence du fourrage pour une consommation accrue par le bétail	-
Innocuité sanitaire	Limiter le risque de botulisme en cas d'ensilage contaminé par *Clostridium botulinum*, possible développement de *Listeria monocytogenes* et intoxication par des micotoxines suite au développement des moisissures	? Bien moins problématique que pour d'autres substrats communément utilisés en méthanisation (biodéchets, fumiers…)
Maîtrise des émissions polluantes	Gestion des émissions d'effluents, NH_3 et odeurs	Gestion des émissions d'effluents, NH_3 et odeurs

Selon les pratiques employées et les conditions d'ensilage, les pertes de potentiel énergétique peuvent évoluer entre 7 et 40% (Egg et al., 1993). Afin de maîtriser ces pertes et définir les caractéristiques attendues et les facteurs permettant la réussite d'un « bon ensilage » pour la méthanisation, il est utile d'étudier les voies de dégradation possible de l'ensilage pour cette application. De la récolte de la plante à l'ouverture du silo, différents points sont à surveiller et sont détaillés ci-après.

1.3.2.1 Pertes à la récolte

Les pertes à la récolte incluent les pertes de matières dues aux opérations mécaniques (fauche, confection et retournement des andains, transport) et aux dégradations aérobies imputées aux enzymes de la plante et à l'action des microorganismes.

Les pertes mécaniques ont principalement lieu en cas de recours au préfanage (i.e., séchage au champ) lors de la multiplication des opérations de manipulation de la récolte. Lors de ces opérations, 5 à 15% de la matière sèche peuvent être perdus en fonction des pratiques de récoltes (Kaiser et al., 2004; Shinners, 2003). Ces pertes dépendent également de la plante récoltée, les légumineuses étant 3 à 4 fois plus sujettes à la chute des feuilles lors de la manipulation que les herbes (Shinners, 2003). Lors du recours à l'ensilage en coupe directe, ces pertes sont généralement négligeables et inférieures à 1% (Kaiser et al., 2004).

Les dégradations dues à la respiration des enzymes de la plante et à l'action des microorganismes aérobies ont principalement lieu lors du préfanage. Si les pertes peuvent être limitées à 2% en cas de

préfanage rapide, leur valeur peut cependant significativement augmenter en cas de préfanage prolongé. Des pertes allant de 0.15 à 0.35 %MS·h^{-1} peuvent alors être observées selon la température ambiante (Kaiser et al., 2004). Par conséquent, lorsque les conditions de préfanage ne sont pas optimales, le recours à l'ensilage en coupe directe est recommandé (Teixeira Franco et al., 2017).

1.3.2.2 Pertes aérobies au début et au cours du stockage

Les pertes aérobies par respiration après fermeture du silo dépendent directement de la quantité d'oxygène pénétrant à l'intérieur du silo. Dans des conditions de tassement normales et pour un silo scellé efficacement, l'oxygène emprisonné avec la récolte disparait rapidement, avec 90% de O_2 consommé en 15 minutes et seulement 0.5% d'oxygène résiduel au bout de 30 minutes (Woolford, 1990). Dans ces conditions idéales, les pertes excèdent rarement 4 à 6% de la MS (Kaiser et al., 2004; Rees, 1982). En revanche, en cas de couverture inadaptée du silo, la pénétration de l'air est possible tout au long du stockage. La présence d'oxygène à l'intérieur du silo dépend de l'étanchéité de couverture du silo et de la perméabilité de l'ensilage. La perméabilité de l'air au sein de l'ensilage dépend elle-même de sa porosité, qui est fonction de nombreux facteurs tels que la densité, la longueur de coupe et l'humidité (Williams, 1994). La densité de tassement de l'ensilage est un paramètre important pour limiter la perméabilité de l'air au sein du silo. La valeur optimale du tassement dépend fortement du taux de matière sèche de la plante ensilée (Tableau 1-3). Les ensilages humides permettent généralement d'atteindre des densités de tassement satisfaisantes et une pénétrabilité de l'air faible. Au contraire, les plantes récoltées à un stade de maturité trop avancé et présentant un taux de matière sèche élevé rendent difficile l'application d'un tassement satisfaisant, facilitant la pénétrabilité de l'air (Williams, 1994). Dans des conditions non optimales de couverture et de pénétrabilité, les dégradations aérobies au cours du stockage peuvent alors dépasser 10% de MS (Kaiser et al., 2004). A l'extrême, dans le cas où aucune couverture n'est utilisée, Oelberg *et al.* (Oelberg et al., 1983) ont montré que les pertes de matière sèche par respiration peuvent s'élever à plus de 30% après seulement 3 mois de stockage sur l'ensemble du silo, et à plus de 50% sur les couches superficielles. D'autres travaux ont quant à eux mesuré des pertes de potentiel méthanogène de CIMSE de plus de 80% après 3 mois lors du stockage à l'air libre (Teixeira Franco et al., 2017), montrant encore une fois l'importance de la couverture efficace des silos d'ensilage.

Tableau 1-3: Valeurs indicatives de compacité de l'ensilage d'herbe (Latsch and Sauter, 2014)

Teneur en MS **% MB**	**Cible tassement** $kg_{MS} \cdot m^{-3}$	**Cible tassement** $kg_{MB} \cdot m^{-3}$
20	155 – 165	800
25	170 – 180	700
30	190 – 200	650
35	205 – 215	600
40	220 – 230	560
45	240 – 250	545
50	255 – 270	525
55	275 - 290	515

1.3.2.3 Pertes par production d'effluents

Lors du stockage de plantes humides (moins de 25% de MS), d'importantes quantités d'effluents d'ensilage peuvent être générées. Leur volume peut atteindre plusieurs centaines de litres par tonne de plante fraîche pour les récoltes les plus humides (Gebrehanna et al., 2014). Du fait de leur forte teneur en matière organique avec des concentrations en DCO allant jusqu'à 80 $gO_2 \cdot L^{-1}$ et une valeur moyenne de 50 $gO_2 \cdot L^{-1}$ (Gebrehanna et al., 2014), les jus d'ensilage peuvent être une source importante de pertes de potentiel méthanogène, allant jusqu'à 10% en cas d'absence de collecte appropriée. Ils sont également une source importante de pollution des eaux de surface à cause de leur importante concentration en DCO et en nutriments (azote et phosphore notamment) et de nuisances olfactives (Keck et al., 2018). Plusieurs travaux portant sur le stockage par ensilage se sont intéressés à la problématique de la génération d'effluents et ont abouti à des équations permettant d'estimer le volume cumulé d'effluent produit lors du stockage par ensilage d'une plante en fonction de son taux de matière sèche (MS). Parmi celles-ci, les équations de Bastiman (Bastiman and Altman, 1986) (Equation (1-10)) et Sutter (Sutter, 1957) ((1-11)) sont parmi les plus utilisées dans la littérature :

$$V = 767 - 53.4 \times MS + 0{,}936 \times MS^2 \qquad (1\text{-}10)$$

$$V = 672 - 22{,}40 \times MS \qquad (1\text{-}11)$$

Bien qu'elles s'accordent sur le fait que le volume d'effluent devient nul à partir de 30% MS, les volumes prédits par ces équations pour des plantes plus humides sont toutefois significativement différents. Sur la plage de 10 à 25 % de MS, l'écart de volume prédit varie en effet entre 95 et plus de

160 $L.t_{MB}^{-1}$. Ces différences peuvent s'expliquer par la grande variabilité du volume d'effluent produit lors de l'ensilage, qui dépend de nombreux autres paramètres tels que l'espèce de plante ensilée, la technique et la finesse de hachage (Mayne and Gordon, 1986; P. Savoie et al., 2002), l'intensité de compactage (Woolford et al., 1983) ou encore l'ajout d'additifs comme l'acide formique (Woolford et al., 1983). Différents volumes cumulés de jus d'ensilage mesurés lors d'expérimentations à des échelles variées sont présentées dans la Figure 1-6.

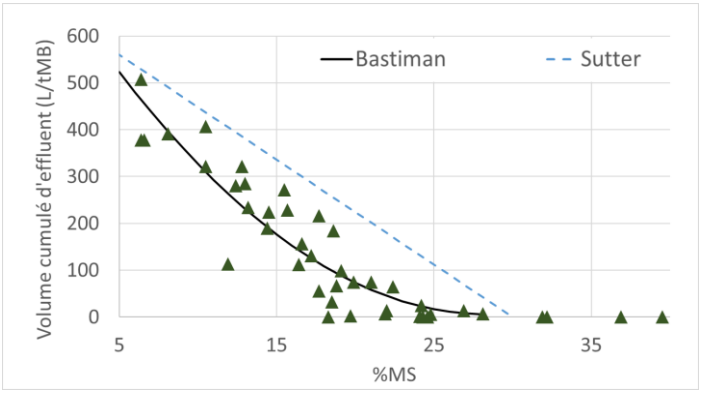

Figure 1-6 : Evolution du volume d'effluent d'ensilage en fonction du taux de matière sèche et comparaison avec les éqyations de prédiction de Bastiman et Altman & Sutter (Barmaki et al., 2018; Fransen and Strubi, 1998; Khorvash et al., 2006; Mayne and Gordon, 1986; Okine et al., 2007; P. Savoie et al., 2002; Razak et al., 2012; Woolford et al., 1983).

Concernant la cinétique de production des jus, dans la plupart des cas, la production a principalement lieu au cours des premiers jours du stockage. 90% du volume total d'effluent est généralement produit lors des 20 à 26 premiers jours, avec un pic de production avant les 10 premiers jours de stockage (Gebrehanna et al., 2014; Mayne and Gordon, 1986; P. Savoie et al., 2002), (Figure 1-7).

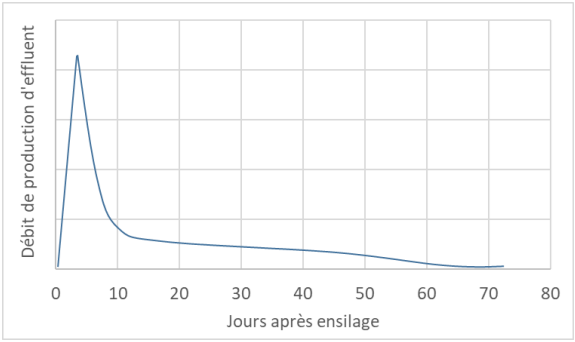

Figure 1-7 : Evolution du débit de production de jus d'ensilage au cours du stockage, adapté de Mayne & Gordon (1986)

Dans le cas où la configuration des silos le permet, la récupération des jus d'ensilage est possible, permettant leur valorisation en méthanisation. Toutefois, la production d'effluents d'ensilage n'est pas régulière au cours du temps, et son volume cumulé, ainsi que sa cinétique de production sont difficilement prévisibles (Gebrehanna et al., 2014), ce qui peut rendre difficile l'optimisation de la

ration du méthaniseur lors des pics de production d'effluents d'ensilage. Si le stockage des effluents afin de maîtriser leur apport au sein du méthaniseur est possible, des coûts d'investissement supplémentaires liés à l'important volume produit sont à prévoir. De plus, des pertes de potentiel énergétique peuvent avoir lieu lors de leur stockage. Le Tableau 1-4 présente une estimation du volume d'effluent attendu lors de l'ensilage de 15 000 tonnes de CIMSE et témoigne de l'importance des volumes cumulés ainsi que du potentiel méthanogène associé.

Tableau 1-4: Estimation du volume d'effluent produit lors de l'ensilage de 15 000 tonnes de CIMSE selon les équations de Bastiman et Sutter (entre parenthèse) en considérant une concentration en DCO de 50 g.L^{-1} et 350 NmLCH$_4$.g$_{DCO}$$^{-1}$

	CIMSE 20 % MS	**CIMSE 25% MS**
Volume d'effluent cumulé ***m³***	1100 (3400)	250 (1700)
Potentiel méthanogène ***Nm³***	17 000 (59 900)	4000 (26 500)
Equivalent débit CH_4 ***Nm³/h moyen sur les 30 premiers jours de stockage***	24 (83)	6 (37)

Afin d'éviter la génération de jus de silos lors du stockage, l'ensilage des plantes à un taux de matière sèche suffisant est recommandé. Pour un silo couloir, une valeur voisine de 30% MS est préconisée (Bastiman and Altman, 1986; Gebrehanna et al., 2014). Selon l'espèce à ensiler, les conditions météorologiques et la planification de la rotation de cultures, plusieurs solutions peuvent être envisagées. La plus simple consiste à récolter la plante à un stade de maturité suffisamment avancé pour permettre un taux de MS suffisant. En effet pour la plupart des espèces végétales utilisées comme fourrages, l'humidité de la plante décroît à mesure que la maturité augmente. Pour les céréales, le taux de matière sèche augmente rapidement après l'épiaison au fur et à mesure que le grain se remplit (Figure 1-8, (Khorasani et al., 1997)). Pour certaines cultures comme le maïs, le taux de MS peut être facilement prédit à partir de l'état de remplissage du grain et atteint une valeur idéale de 28 à 33% lorsque les 3 formes d'amidon (vitreux, farineux et laiteux) sont visibles sur le grain (Crookston and Kurle, 1988).

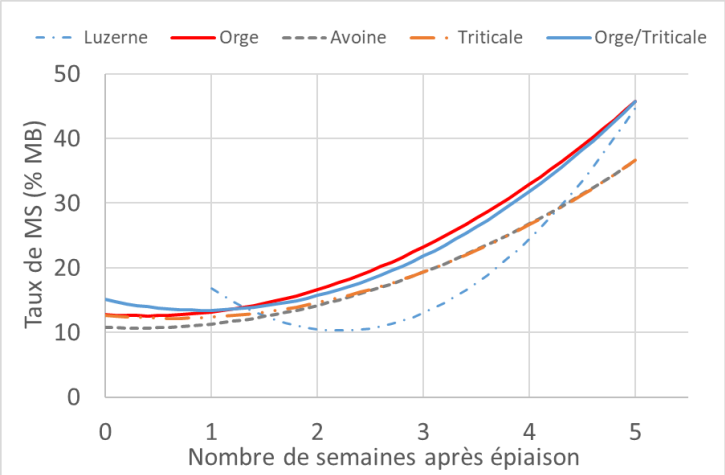

Figure 1-8 : Evolution du taux de matière sèche de différentes plantes cultivables comme CIMSE en fonction de leur maturité (Khorasani et al., 1997)

Concernant les CIMSE, l'attente du stade de maturité permettant un taux de MS optimal est souvent rendu impossible par les impératifs liés à la rotation de culture. En effet, les fenêtres disponibles pour l'implantation des CIMSE sont souvent trop courtes et/ou à des périodes de l'année ne permettant pas d'atteindre un stade de maturité avancé à la récolte (Feng et al., 2019; Molinuevo-Salces et al., 2013). Par conséquent le recours au préfanage a souvent lieu. Cette méthode est décrite en section 1.3.1.1, et les pertes associées sont développées dans le paragraphe précédent « Pertes à la récolte ». Les contraintes liées au préfanage (météo, planning et pertes au champs) et son inefficacité en cas de météo inadaptée amènent à se pencher vers d'autres méthodes permettant de limiter la production d'effluents. Le co-ensilage des récoltes avec un substrat absorbant est une technique permettant la rétention des effluents grâce à l'action du co-substrat, et ainsi de limiter voire supprimer la production de jus de silo tout en évitant le recours au préfanage. Plusieurs co-substrats ont été expérimentés dans la littérature (Tableau 1-5) : pailles et tiges de différentes plantes (Haigh, 1998; Razak et al., 2012), son de blé, riz ou orge (Haigh, 1999; Razak et al., 2012), pulpe de betterave séchée (Fransen and Strubi, 1998; Haigh, 1999; Razak et al., 2012), orge moulu (Khorvash et al., 2006), cosses de haricots séchées (Razak et al., 2012), papier journal (Fransen and Strubi, 1998), bentonite sodique (Fransen and Strubi, 1998; Khorvash et al., 2006; Woolford et al., 1983), différents polymères (Fransen and Strubi, 1998; Healy et al., 1997), etc. Dans la plupart des cas, l'addition de co-substrat permet de réduire la production d'effluent, au moins partiellement. Le taux de réduction du volume d'effluent généré lors du co-ensilage dépend fortement de la capacité de rétention en eau du co-substrat employé (CRE). En effet, pour un même taux MS de mélange, des performances de rétention des effluents variables peuvent être constatées entre différents co-substrats (Figure 1-9).

Tableau 1-5: Principales caractéristiques de substrats utilisables en tant qu'absorbants en co-ensilage

		MV (%MS)	CRE (g/gMB)	CRE (g/gMS)	BMP MV ($NmLCH_4.g_{MV}^{-1}$)	Références
Substrat	MS (%MB)		2,8 - 3,5			(Dennery G., Dezat E., 2012)
Anas de lin	84 - 97		1,5 - 2,7			(Dennery G., Dezat E., 2012)
Céréales moulues (avoine, blé, maïs)				0,7 - 0,9		(Jones and Jones, 1996)
Cosses de céréales	85	85	1,5 - 2,2		242	(Kusch et al., 2011)(Dennery G., Dezat E., 2012; Elsayed et al., 2016)
Bagasse de canne à sucre	95	75,3			214	(Ali et al., 2021)
Cosses et pailles de haricot				2,54	144	(Liu et al., 2016; Razak et al., 2012)
Copeaux et sciure de bois	70 - 90	90 - 95%		3,9 - 4,5		(Bignon et al., 2015; Borges et al., 2014; Böske et al., 2014; Dennery G., Dezat E., 2012)
Déchets verts	60 - 90				200 - 250	(Scarlat et al., 2018)
Rafles de maïs	91	90		1,6 - 2,1		(Jones and Jones, 1996; Surra et al., 2018)
Foin (herbe et luzerne)	85 - 93	81 - 88		2,2	306	(Jones and Jones, 1996; Triolo et al., 2011; Zahan et al., 2018)
Fumier de volaille (diverses litières) paille, copeaux de bois, menues pailles, sciure	40 - 80	34 - 69			257	(ADEME Bourgogne, 2013; Bignon et al., 2015; Pečar and Goršek, 2020; Rochette, 2012; Zahan et al., 2018)
Fumier équin Litière paille et copeaux de bois	18 - 83	11 à 77			25 - 275	(Galibardy et al., 2009)
Menues pailles			3	3,5		(Bignon et al., 2015; Dennery G., Dezat E., 2012)
Paille de Miscanthus	93 - 95	91 - 93		2,3 - 2,8	144 - 158	(Dennery G., Dezat E., 2012; C. Li et al., 2020; Okeke et al., 2020; Pečar and Goršek, 2020; Thomas et al., 2018)
Pailles de céréales (blé, riz, avoine)	75 - 95	70 - 90		3 - 4,8	190 - 290	(Ali et al., 2021; Bignon et al., 2015; Dennery G., Dezat E., 2012; Elsayed et al., 2016; Jones and Jones, 1996; Larsen et al., 2017a; Razak et al., 2012; Scarlat et al., 2018; Triolo et al., 2011; Zahan et al., 2018)
Papier et carton	93 - 98	63 - 93			170 - 280	(Begum et al., 2021; Jansson et al., 2019; W. Li et al., 2020)
Pulpe de betterave séchée	88-92			2,8	445	(Gómez-Quiroga et al., 2022; Jones and Jones, 1996; Ziganshina et al., 2021)

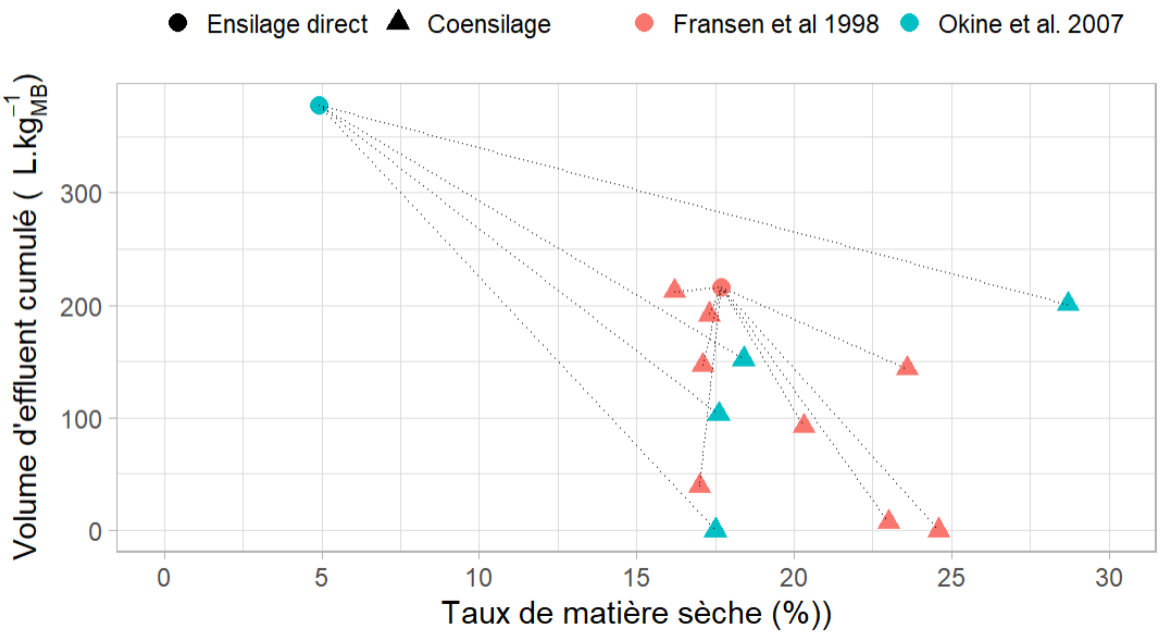

Figure 1-9 : Comparaison entre le volume d'effluent lors de l'ensilage direct et le co-ensilage avec différents cosubstrats en fonction du taux de MS du mélange (Fransen and Strubi, 1998; Okine et al., 2007).

En plus de son effet sur la production d'effluents, le recours au co-ensilage peut également avoir une influence importante sur les processus de fermentation lors de l'ensilage. Selon la nature du substrat, l'apport de sucres solubles, d'azote ou d'une flore bactérienne exogène peut modifier les propriétés de fermentation selon les mêmes mécanismes que ceux décrits en section 1.3.1.2 et dans le paragraphe suivant « Pertes anaérobies par voie fermentaire ».

Le recours au préfanage ou au co-ensilage doivent cependant être fait avec parcimonie. En effet, un taux de MS trop élevé suite à l'application de l'une ou l'autre de ces méthodes aboutit à un tassement du silo difficile (voir paragraphe « Pertes aérobie au début et au cours du stockage » ci-dessus). Un compromis est donc à trouver entre la limitation des pertes aérobie et celle de la production d'effluent (Kaiser et al., 2004).

1.3.2.4 Pertes anaérobies par voie fermentaire

Lors de la fermentation d'ensilage, une fraction de la biomasse, les sucres solubles, est inévitablement dégradée afin de permettre la production d'acide lactique. Toutefois, les fermentations homolactique et hétérolactique n'engendrent pas ou peu de pertes de masse, et théoriquement pas de pertes de potentiel méthanogène. Ce phénomène s'explique par le fait que, contrairement à la respiration aérobie, la fermentation n'aboutit pas à la production d'une quantité importante de chaleur mais de métabolites à haut potentiel énergétique. Le potentiel énergétique théorique de plusieurs substrats et produits de fermentation est présenté dans Tableau 1-6. L'équivalent DCO de chaque composé est calculé selon la relation théorique présentée en équation (1-12)

$$C_nH_aO_b + \left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) \rightarrow nCO_2 + \left(\frac{a}{2}\ H_2O\right)$$

$$DCO_{th} = \frac{n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}}{12n + a + 16b} \times 32 \qquad (1\text{-}12)$$

Le potentiel méthanogène est quant à lui estimé grâce à la relation théorique suivante (Moletta, 2015):

$$1\ g\ DCO = 350\ NmL\ CH_4 \qquad (1\text{-}13)$$

A partir de ces valeurs, le bilan massique et énergétique de différentes réactions de fermentation est proposé dans le Tableau 1-7

Tableau 1-6: Potentiel énergétique de différents substrats et produits de fermentation exprimé en équivalent de demande chimique en oxygène (DCO) et potentiel méthanogène (DCO)

Composé	**Masse molaire**	**Equivalent DCO**	**Equivalent DCO**	**BMP**
	$g.mol^{-1}$	$g_{DCO}.mol^{-1}$	$g_{DCO}.g^{-1}$	$NmL_{CH4}.g^{-1}$
Glucose	180	192	1,07	373,3
Fructose	180	192	1,07	373,3
Arabinose	150	160	1,07	373,3
Xylose	150	160	1,07	373,3
Acide lactique	90	96	1,07	373,3
Acide acétique	60	64	1,07	373,3
Acide propionique	74	112	1,51	529,7
Acide butyrique	88	160	1,82	636,4
Acide valérique	102	208	2,04	713,7
Ethanol	46	96	2,09	730,4
1 - propanol	60	144	2,4	840,0
1,2 - propanediol	76	128	1,68	589,5
Mannitol	182	208	1,14	400,0
H_2	2	16	8,00	2800,0
CO_2	44	0	0,0	0,0

Tableau 1-7: Bilan massique et énergétique (DCO) de différentes réactions de fermentation. Les gaz produits sont considérés comme des pertes. Adapté et complété de Kreuger et al. (2011) (Kreuger et al., 2011)

Fermentation	**Substrat**	**Produits**	**Balance massique**	**Balance énergétique**
Homolactique	Glucose/Fructose	2 × Acide lactique	100%	100%
Hétérolactique	Glucose/Fructose	Acide lactique + Ethanol + CO_2	76%	100%
Hétérolactique	3 × Fructose	Acide lactique + 2 × Mannitol + Acide acétique + CO_2	92%	100%
Alcoolique	Glucose	2 × Ethanol + 2 × CO_2	51%	100%
Butyrique	Glucose	Acide butyrique + 2 × CO_2 + 2 × H_2	49%	83%
Butyrique	2 × Acide lactique	Acide butyrique + 2 × CO_2 + 2 × H_2	49%	83%

Ces résultats mettent en évidence que la seule mesure de la perte de MS lors de la fermentation d'ensilage ne permet pas de conclure sur la bonne préservation ou non du potentiel énergétique (Kaiser et al., 2004; Kreuger et al., 2011). En effet, seuls les mécanismes de fermentations entraînant la production d'hydrogène causent une perte de potentiel méthanogène. Du fait de la très faible masse molaire de l'hydrogène, sa production n'entraîne que peu de pertes massiques à l'échelle du silo, contrairement au CO_2 dont la production n'est pas synonyme de dégradation du potentiel méthanogène de la biomasse.

Le développement des clostridies, responsables de la fermentation butyrique (Section 1.3.1.2), est donc le plus souvent considéré comme étant à éviter en ensilage à cause des pertes de potentiel énergétiques associées à leur développement (Kreuger et al., 2011; McEniry et al., 2014; Teixeira Franco et al., 2016). Toutefois, certaines études ont montré que la fermentation butyrique lors de l'ensilage pouvait augmenter le potentiel méthanogène des substrats lignocellulosiques en favorisant l'activité enzymatique et l'hydrolyse des composés complexes à un pH relativement élevé (6.0 – 6.5) (Cui et al., 2020). L'enjeu autour de la fermentation butyrique en ensilage n'est donc encore que partiellement compris. La balance entre les pertes de potentiel énergétique dues à la fermentation et l'augmentation de la dégradabilité du substrat conditionne l'effet global du phénomène sur la préservation du substrat lors du stockage. Au-delà de la balance énergétique du stockage, les fermentations clostridiales lors de l'ensilage peut également causer d'importantes nuisance olfactives. En effet, le stockage des intrants fait partie des principaux émetteurs de pollution olfactive à l'échelle d'un site de méthanisation (Keck et al., 2018). L'acide butyrique et l'ammoniac sont des composés dont l'odeur est perçue comme « très désagréable » à partir de concentrations très faibles (Reyes et al., 2020; Zhao et al., 2019) et leur production en grande quantité dans l'ensilage pourrait augmenter la

pollution olfactive, affectant négativement l'acceptabilité des projets de méthanisation à l'échelle locale (Ruppert et al., 2013; Schumacher and Schultmann, 2017; Zemo et al., 2019).

Le développement des Clostridies est principalement inhibé par une acidité élevée conjuguée à un taux d'humidité faible (Borreani et al., 2009; Pahlow et al., 2003). Ces paramètres étant interdépendants, les valeurs critiques permettant l'inhibition efficace des clostridies et entérobactéries sont présentées en Figure 1-10. Sont désignés comme « stables en conditions anaérobies » des ensilages dans lesquels les conditions de pH et humidité sont susceptibles d'empêcher la fermentation butyrique secondaire.

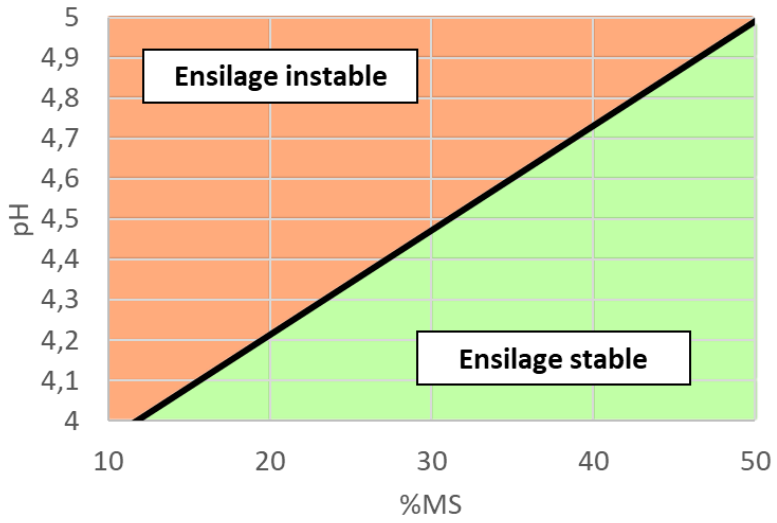

Figure 1-10 : Valeurs critiques du couple pH - taux de MS permettant l'obtention d'un ensilage stable en conditions anaérobies. Adapté de Pahlow et al. (2003).

Afin d'éviter la survenue de fermentations butyriques indésirables, les conditions permettant une inhibition efficace des clostridies doivent-être instaurées, avec les deux principaux leviers que sont le taux d'humidité et le pH. Le taux d'humidité peut être ajusté grâce au choix d'un stade de maturité adéquat à la récolte, au recours au préfanage ou au co-ensilage, tel que développé dans les paragraphes précédents. Toutefois, l'effet du co-ensilage sur l'inhibition des clostridies pourrait s'avérer inefficace dans certains cas, car l'absorption de l'eau par un co-substrat d'ensilage peut avoir un effet différent sur l'activité de l'eau par rapport au préfanage. L'acidification rapide et efficace de l'ensilage peut également être promue grâce à l'ajout d'additifs d'ensilage. On distingue différentes natures d'additifs d'ensilage qui sont présentés dans le Tableau 1-8. Selon leur nature, ces additifs ont des mécanismes d'action différents.

Tableau 1-8: Liste récapitulative des différents additifs d'ensilage et de leur utilisation. Adapté de Kaiser et al. (Kaiser et al., 2004)

Type d'additif	**Amélioration attendue***	**Exemples d'additifs**	**Cas d'application***
Stimulants de fermentation			
Sucres solubles fermentescibles	A	Mélasses, sucrose, glucose, pulpe de betterave	1
Enzymes	A	Cellulases, hémicellulases, amylases	2
Inocula	A, B	Bactéries homo- et/ou hétérolactiques	2, 3
Inhibiteurs de fermentation			
Acides organiques et inorganiques	A, B	Acides chlorydrique, sulfurique, formique, acétique, lactique, propionique, benzoique…	1, 2, 3
Autres inhibiteurs chimiques	A, B	Formaldéhyde, nitrite de sodium, métabisulfite de sodium…	1, 2, 3

Améliorations attendues :

A : Améliore l'acidification et la stabilité anaérobie,
B : Réduit les dégradations aérobies

Cas d'application :

1 : Plante humide, taux de sucres solubles faible, mauvaises conditions de préfanage
2 : Plante humide, taux de sucres solubles élevé, mauvaises conditions de préfanage
3 : Plante ensilable dans de bonnes conditions mais risque important de dégradations aérobies à l'ouverture

* Tous les additifs listés ne s'appliquent pas dans toutes les conditions

Stimulants de fermentation

Les stimulants de fermentation ont pour objectif de promouvoir et accélérer la fermentation lactique désirable et ainsi permettre une acidification suffisante de l'ensilage. On en distingue 3 catégories principales :

- **Sucres.** L'ajout de sucres solubles facilement accessibles permet de promouvoir une fermentation lactique ainsi qu'un abaissement du pH rapide. Il est employé dans le cas de substrats trop pauvres en sucres solubles pour permettre une production suffisante d'acide lactique. Le plus souvent, l'apport de sucre est fait sous forme de mélasses (Kaiser et al., 2004). Toutefois, d'autres substrats tels que la pulpe de betterave séchée peuvent être utilisés, permettant un apport de sucres solubles tout en limitant la production d'effluent par absorption (Fransen and Strubi, 1998).
- **Additifs biologiques.** Sont inclus dans cette catégorie les additifs à base d'enzymes et d'inocula bactériens. L'ajout d'enzymes comme les cellulases, hémicellulases et amylases a pour objectif d'hydrolyser les glucides à longue chaine et d'augmenter la quantité de sucres solubles disponibles pour les bactéries lactiques. Elles peuvent être employées dans le cas de plantes pauvres en sucres solubles. L'ajout d'inocula permet quant à lui d'apporter une flore bactérienne lactique capable de prendre le dessus sur la flore endogène et d'orienter la fermentation vers des voies considérées comme désirables. Ces inocula sont généralement composés de mélanges bactéries lactiques homofermentaires et/ou hétérofermentaires (Herrmann et al., 2015, 2011a). Les premières permettent de favoriser la chute du pH en privilégiant la production d'acide lactique au détriment des autres métabolites. Parmi les bactéries homolactiques utilisées, on retrouve *Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. salivarius, Pediococcus acidilactici, P. pentosaceus* et *Enterococcus faecium.* L'efficacité des inocula d'ensilage dépend fortement de la combinaison entre la souche choisie et les propriétés de la plante à ensiler. Le recours aux bactéries hétérofermentaires permet principalement d'améliorer la stabilité aérobie de l'ensilage en augmentant la concentration en acide acétique (voir section).

Inhibiteurs de fermentation

Ces additifs sont utilisés pour stopper tout ou partie de l'activité microbienne lors du stockage. Ces additifs peuvent être classés en deux groupes principaux (Kaiser et al., 2004):

- **Acides.** L'ajout d'acides permet de diminuer instantanément le pH, et ainsi d'inhiber le développement des microorganismes indésirables. Une large variété d'acides peut être utilisée. Les plus utilisés sont l'acide formique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide

acrylique et l'acide propionique. Bien que permettant une acidification et une inhibition efficace des clostridies, leur utilisation peut poser des problèmes de sécurité et de corrosion du matériel. Ils sont généralement employés pour le stockage des plantes humides et pauvres en sucres solubles (Kaiser et al., 2004).

- **Autres inhibiteurs.** D'autres composés ont été reportés dans la littérature tels que le nitrite de sodium et le formaldéhyde (Herrmann et al., 2011b; Kung et al., 2015) qui inhibent le développement des clostridies.

1.3.2.5 Pertes aérobies au désilage

Lors de l'ouverture du silo pour le prélèvement et l'utilisation du substrat, l'ensilage est à nouveau exposé à l'air. Dès lors, les bactéries aérobies, levures et moisissures restées en dormance peuvent reprendre leur activité et dégrader le substrat selon les mêmes mécanismes de respiration que ceux présentés dans la section 1.3.2.2. A mesure que l'activité microbienne aérobie reprend, un échauffement de l'ensilage peut donc être constaté dans les premières heures suivant l'ouverture du silo (Wilkinson and Davies, 2013).

La quantité des pertes aérobies lors du désilage peut varier de quelques % à plus de 40 % (Zhang et al., 2018). Elle dépend de nombreux facteurs que l'on peut considérer comme « physiques » tels que la porosité de l'ensilage, la vitesse d'avance du front d'attaque, la température ambiante et le taux d'humidité et « biologiques » tels que l'abondance de microorganismes aérobies présents avant ouverture et les mécanismes de fermentation ayant eu lieu pendant le stockage. Ces facteurs sont développés ci-après.

<u>Facteurs physiques</u>

La capacité des microorganismes aérobie à dégrader l'ensilage dépend directement de la quantité d'oxygène mise à leur disposition et du temps d'exposition à l'air. Pour cela, la pénétration de l'air doit être limitée au minimum et la durée d'exposition réduite d'autant que possible. La pénétration de l'air dépend de la porosité de l'ensilage et de la densité de tassement. Un tassement insuffisant engendre la pénétration de l'air à une plus grande profondeur depuis le front d'attaque, et contraint à des vitesses d'avance plus élevées (Figure 1-11).

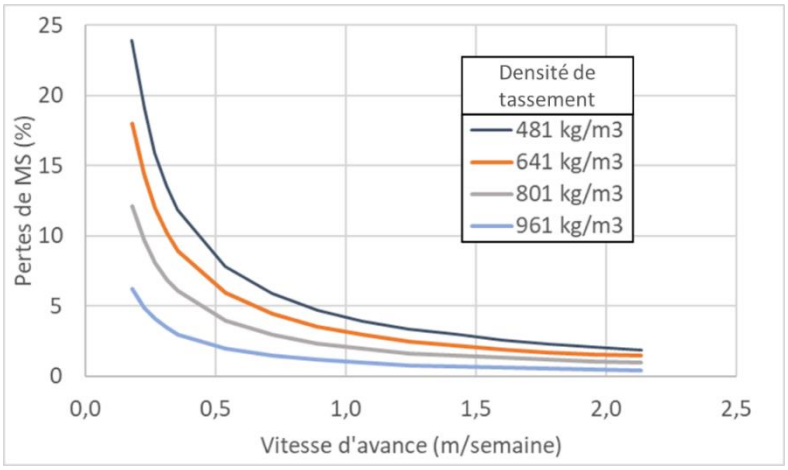

Figure 1-11 : Pertes de matière sèche lors du désilage en fonction de la densité de tassement et de la vitesse d'avance. Adapté de Borreani et al. (Borreani et al., 2018).

Dans le cas d'ensilage nécessitant une vitesse d'avance élevée, le dimensionnement des silos doit être prévu en conséquence en fonction du débit de consommation de substrat. Les silos « longs et étroits » sont préférables aux silos « larges et courts » afin de permettre une vitesse d'au moins 100 mm par jour en hiver et 150 à 200 mm en été (Dubreuil et al., 2004).

Facteurs biologiques

La vitesse de développement des microorganismes aérobie à l'ouverture du silo dépend fortement de leur abondance dans l'ensilage lors de l'ouverture du silo. De nombreuses levures et moisissures étant capables de survivre en conditions acides pendant des durées prolongées, leur présence en quantité sur la plante lors de la récolte impacte directement leur abondance à l'ouverture du silo (Wilkinson and Davies, 2013). Leur densité peut être encore accrue en cas de préfanage long dans des conditions inappropriées, ou de phase aérobie longue en début de stockage (Wilkinson and Davies, 2013). La capacité de développement des levures et moisissures dépend également des mécanismes de fermentation ayant précédé dans l'ensilage, et des métabolites ainsi présents dans le milieu lors de l'ouverture du silo. De nombreux travaux de la littérature ont montré que l'acide acétique (Danner et al., 2003; Hwang et al., 2004; Moon, 1983), l'acide propionique (Hwang et al., 2004; Moon, 1983) ou l'acide butyrique (Wilkinson and Davies, 2013) permettent une meilleure inhibition des microorganismes aérobies et permettait d'allonger la durée de stabilité aérobie. Pour cette raison, le recours à des inocula d'ensilage promouvant une fermentation primaire hétérolactique (Herrmann et al., 2015) ou une fermentation secondaire de l'acide lactique en acide acétique (Oude Elferink et al., 2001) peut être conseillée. Au contraire, l'utilisation d'inocula d'ensilage promouvant une fermentation homolactique peut réduire la stabilité aérobie de l'ensilage par rapport au stockage sans inoculant (Herrmann et al., 2015). L'utilisation d'additifs chimiques comme des sels d'acide

propionique et de benzoate permet également une amélioration de la stabilité aérobie de l'ordre de 15 à plus d'une centaine d'heures (Herrmann et al., 2015; Kung et al., 1998).

1.3.2.6 Récapitulatif sur les pertes potentielles lors de l'ensilage et les solutions associées

Dans cette section, les différents mécanismes pouvant entraîner la dégradation des récoltes de CIMSE utilisées en méthanisation lors du stockage par ensilage ont été abordés. De nombreux facteurs peuvent être sources de pertes de potentiel méthanogène, et le cumul des pertes pouvant avoir lieu à différents points clé peut atteindre 40% du potentiel énergétique initial si de mauvaises pratiques de stockage sont employées (

Tableau 1-9). L'ensilage des cultures pour la méthanisation doit donc être considéré comme une étape cruciale de la chaîne de valorisation de ces substrats.

En plus de la bonne conservation du potentiel énergétique des récoltes lors du stockage, leur bioconversion en méthane peut être améliorée grâce à l'application de prétraitements. Cet aspect est abordé dans la section suivante.

Tableau 1-9 : Récapitulatifs des voies de dégradations possibles lors de l'ensilage (da Silva et al., 2017).

Voie de perte	**Pratiques**	
	Bonnes	**Mauvaises**
Respiration	0 – 4%	10 – 15%
Fermentation	4 – 6%	10 – 15%
Effluents	0 – 2%	5 – 15%
Dégradations aérobies au désilage	5 – 7%	10 – 20%
Total (observé)	9 – 17%	20 – 40%

1.4 Prétraitements de la biomasse lignocellulosique et des CIMSE

Dans le cadre de la méthanisation, certains prétraitements comme le broyage sont généralement utilisés pour à faciliter la manipulation et l'homogénéisation des substrats à l'échelle macroscopique (Carrere et al., 2016) avant leur introduction dans le digesteur. Cependant, à l'échelle microscopique, la dégradation de la biomasse végétale en méthane peut être rendue difficile par la complexité des parois cellulaires et la structure lignocellulosique. Par conséquent, de nombreux prétraitements ont été développés et évalués afin de faciliter l'accès des microorganismes aux sucres des polymères de la lignocellulose (hémicelluloses et cellulose). Les prétraitements appliqués visent généralement plusieurs objectifs tels que la délignification de la matrice lignocellulosique, la réduction de la cristallinité de la cellulose ou l'augmentation de la surface et de la taille des pores (Agbor et al., 2011; Kim et al., 2016). Toutefois, la délignification reste le principal mécanisme permettant d'augmenter la dégradabilité et donc le potentiel méthanogène (Monlau et al., 2013b). Pour être à la fois efficace et

utilisable en environnement réel, un prétraitement doit permettre une amélioration significative du rendement de conversion de la biomasse, limiter la production de composés inhibiteurs pour la méthanisation et représenter des coûts d'investissement et d'opération limités. Dans le cas de la méthanisation agricole, les prétraitements doivent également permettre la production d'un digestat de qualité pour son retour au sol. Les procédés faisant appel à des composés polluants ou perturbant l'équilibre du sol sont donc exclus. De nombreux types de prétraitements sont décrits dans la littérature et sont synthétisés dans le Tableau 1-10 qui présente une liste non exhaustive des différentes technologies étudiées dans la littérature. Il est important de prendre en compte que les gammes de rendement ne sont données qu'à titre indicatif. En effet, pour une expérience de prétraitement donnée, l'amélioration du rendement CH_4 dépend très fortement du BMP du substrat utilisé ainsi que des conditions de mesure du BMP. Ces technologies, leur mode d'action et les principaux avantages/inconvénients sont présentés dans cette section.

1.4.1 Prétraitements physiques

1.4.1.1 Prétraitements mécaniques

Les prétraitements mécaniques visent à améliorer la bioconversion de la biomasse en augmentant la surface spécifique et la porosité, ainsi qu'en diminuant le degré de cristallinité de la cellulose (Monlau et al., 2013b). Les prétraitements mécaniques présentent l'avantage de ne pas faire appel à des réactifs chimiques exogènes et d'améliorer les propriétés rhéologiques de la biomasse à traiter (Tian et al., 2014). De nombreux procédés existent pour le broyage de la matière lignocellulosique utilisant différents types de broyeurs : moulin à attrition, broyeur à billes, moulin centrifuge, broyeur à colloïdes, broyeur à marteaux, à couteaux, extrudeuse… (Amin et al., 2017). Selon les cas, les prétraitements mécaniques peuvent permettent d'augmenter le taux d'hydrolyse de la lignocellulose et le rendement méthane de 5 à 25%, mais également la vitesse d'hydrolyse ce qui peut aboutir à une réduction du temps de digestion de 23 à 59% (Delgenes et al., 2003). De plus, en réduisant la taille des particules, ils permettent d'améliorer les propriétés rhéologiques dans le digesteur et de diminuer la consommation énergétique associée à l'agitation (Tian et al., 2014). Le broyage mécanique est cependant un procédé très énergivore, et un compromis doit être trouvé entre le gain de rendement méthane attendu grâce à la finesse du broyage et la consommation énergétique des installations. Généralement, les procédés permettant une réduction importante de la taille des particules ne sont pas avantageux économiquement. Pourtant, pour obtenir une accessibilité et une hydrolyse satisfaisantes, une taille de particules inférieure à 3mm est recommandée (Barakat et al., 2014). Pour réduire les dépenses énergétiques, le broyage mécanique peut être couplé à un autre prétraitement physicochimique ou chimique. Par rapport à un échantillon non prétraité, P. Adapa *et al.* (Adapa et al., 2011) ont montré que le broyage de pailles d'avoine et de blé explosées à la vapeur nécessitait une énergie spécifique 25 à 90% inférieure.

Tableau 1-10 : Principaux prétraitements applicables à des biomasses lignocellulosiques similaires aux CIMSE (Abraham et al., 2020).

Prétraitement	**Conditions**	**Impact sur le rendement CH_4**
Physique (mécanique)	Broyeur à couteaux, cavitation, plaques de friction, extrusion, deflaker Grubben, disperseur Krima	+ 10 à 60%
Physique (Thermique)	Autoclave, explosion à la vapeur, eau chaude liquide	+ 5 à 65%
Physique (micro-ondes)	Irradiation seule ou couplée à un prétraitement chimique	+ 0 à 55%
Chimique	Acides : H_2SO_4, HCl, CH_3CHOOH	+ 5 à 130%
	Alcalins : NaOH, CaO, KOH, NH_3	+ 15 à 90%
	Oxydatifs : réactif de Fenton, ozone, H_2O_2	+ 33 à 88%
	Solvants organiques : éthanol, NMMO, BMIM	+ 11 à 270%
Biologique	Prétraitement fongique	+ 15 à 100%
	Prétraitement bactérien	+ 17 à 300%
	Prétraitement enzymatique	+ 13 à 37%

1.4.1.2 Prétraitements thermiques

Les prétraitements thermiques permettent d'augmenter la dégradabilité de la biomasse lignocellulosique en solubilisant partiellement l'hémicellulose et la lignine (Rajput et al., 2018). L'explosion à la vapeur est un des prétraitements thermiques les plus étudiés pour les biomasses lignocellulosiques (Carrere et al., 2016). Durant ce traitement, la biomasse est exposée à une vapeur saturée sous haute pression, à une température de 160-270°C sous une pression pouvant approcher les 5 MPa. La pression est maintenue de quelques secondes à quelques minutes, provoquant l'hydrolyse de l'hémicellulose et de la lignine, puis relâchée progressivement. Lors de la détente, la vapeur emprisonnée à l'intérieur de la matrice lignocellulosique s'épand, causant la séparation des fibres et la rupture des parois cellulaires. L'addition d'acides exogènes (H_2SO_4, SO_2) peut permettre de catalyser la réaction en améliorant la séparation de la matrice lignine-hémicellulose et l'hydrolyse (Amin et al., 2017; Monlau et al., 2013b). Elle n'est cependant pas obligatoire, en effet de l'acide acétique provenant des groupes acetyl associés à l'hémicellulose et d'autres acides sont libérés lors du traitement et catalysent la réaction d'hydrolyse. On parle dans ce cas d'auto-hydrolyse (Agbor et al., 2011; Bauer et al., 2014). Employée dans des conditions sévères, cette technologie peut entrainer la production de furanes (furfural, 5-hydroxymethylfurfural) et de composés phénoliques. Accumulées dans des concentration importantes, ces molécules peuvent avoir un effet inhibiteur sur les méthanogènes, causant une diminution de la production de méthane (Monlau et al., 2014). De plus, bien que l'explosion à la vapeur aie montré son efficacité sur des biomasses lignocellulosiques telles que les pailles, ce procédé entraîne une consommation d'énergie importante ainsi que des investissements potentiellement lourds (Carrere et al., 2016).

1.4.1.3 Prétraitements aux micro-ondes

Comparé au prétraitement thermique conventionnel faisant appel à des mécanismes de convection et de conduction, le recours aux micro-ondes permet un échauffement plus rapide et uniforme, mais son efficacité est dépendante du substrat utilisé (Xu, 2015). En plus de l'effet prétraitement thermique, un effet physique de l'action des micro-ondes sur la structure de la biomasse par agitation électromagnétique est parfois avancé dans la littérature, mais la significativité de cet effet est remise en cause (Bichot et al., 2021).

1.4.2 Prétraitements chimiques et physico-chimiques

Les prétraitements chimiques font appel à différents réactifs (acides, alcalins, organiques, ioniques…) pour déstructurer la biomasse et solubiliser la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Lorsque leur action est combinée à celle d'un prétraitement physique (thermique par exemple), le terme de prétraitement physicochimique est employé.

1.4.2.1 Prétraitements acides et alcalins

Les prétraitements acides et alcalins visent à désorganiser la structure complexe de la lignocellulose et à augmenter l'accessibilité des microorganismes aux sucres de la cellulose et des hémicelluloses. Les prétraitements acides permettent d'hydrolyser l'hémicellulose et de désorganiser la lignine, ce qui augmente l'accessibilité de la cellulose aux enzymes microbiennes (Carrere et al., 2016). Les traitements alcalins se montrent plus efficace pour la dépolymérisation de la lignine et permettent également de solubiliser les hémicelluloses. (Behera et al., 2014; Carrere et al., 2016; Martínez-Gutiérrez, 2018; Rodriguez et al., 2017). Un des indicateurs utilisés pour estimer la sévérité d'un prétraitement acide est le facteur de sévérité combiné (CSF) (Equation (1-14). Sa version étendue permet de l'appliquer aux prétraitements alcalins (5-14) (Lloyd and Wyman, 2005; Yuan et al., 2019).

$$CSF = log\left[t \times exp\left(\frac{T - T_R}{14.75}\right)\right] - pH \qquad (1\text{-}14)$$

$$Extended\ CSF\ = log\left[t \times exp\left(\frac{T - T_R}{14.75}\right)\right] + |pH - 7| \qquad (1\text{-}15)$$

Avec t = durée du prétraitement, T = température appliquée au prétraitement (°C) et T_R = température de référence (100°C)

Prétraitements acides

Les principaux acides étudiés dans le cadre de prétraitements sont H_2SO_4, H_3PO_4, HNO_3 et HCl. Les prétraitements acides sont principalement efficaces pour la solubilisation des hémicelluloses (Millati et al., 2020). Les prétraitements sont peu efficaces pour la solubilisation de la lignine, mais permettent toutefois d'en désorganiser la structure (Carrere et al., 2016). Pour cette famille de prétraitements, des températures élevées (au-dessus de 100°C) sont souvent employées, entraînant une consommation énergétique supplémentaire et la libération de composés inhibiteurs comme des acides carboxyliques, furanes et composés phénoliques (Millati et al., 2020). Toutefois, la digestion anaérobie est moins impactée par ces composés que la fermentation sombre et l'hydrolyse enzymatique (Monlau et al., 2014).

Prétraitements alcalins

Le prétraitement alcalin fait partie des prétraitements chimiques les plus étudiés en amont de la méthanisation. Différents composés sont utilisés comme la soude, la chaux, la potasse, l'ammoniac, l'hydroxyde d'ammonium et (Banerjee et al., 2012; Behera et al., 2014; Mielenz, 2009; Sharma et al., 2013; Sherman et al., 2012). Le traitement alcalin s'attaque aux groupes acétyle et acides uroniques de l'hémicellulose, augmentant l'accessibilité de l'hémicellulose et de la cellulose aux enzymes hydrolytiques

(Behera et al., 2014). Il permet également la solubilisation de la lignine, la rupture des liaisons lignine-carbohydrate ainsi que le gonflement et la décristallisation de la cellulose, augmentant encore son accessibilité (Behera et al., 2014; Loow et al., 2016).

Plusieurs conditions d'opération ont été étudiées dans la littérature pour l'application des prétraitements alcalins. Elles font appel aux différents réactifs cités précédemment et exploitent des gammes de couple temps/températures larges (5 minutes à plusieurs semaines, -18 à 230°C) (Khor et al., 2015; Kim et al., 2016; Taherdanak and Zilouei, 2014). Quelques réactifs ainsi que les conditions de réaction et les résultats associés sont présentés dans le Tableau 1-11 (Kim et al., 2016). Pour permettre une action efficace du prétraitement alcalin, un pH du milieu réactionnel supérieur à 11 est recommandé (Sierra et al., 2009a).

Tableau 1-11 Prétraitements alcalins variés avec leurs conditions d'application et principaux effets (Kim et al., 2016).

Réactif alcalin	**Conditions de réaction**	**Effets principaux**
Soude	0.5 – 10% NaOH ; 60-180°C ; 5 – 60min ; 10 – 30% MS	Dissolution de 50% de l'hémicellulose, 60 à 80% de délignification
Carbonate de sodium	1 – 30 % Na_2CO_3 ; 60 – 180°C ; 5 – 60 min ; 10 – 30% MS	Dissolution de 20 à 40% de l'hémicellulose, 40 à 60% de délignification, récupération plus facile que NaOH.
Hydroxyde d'ammonium	5 – 30% NH_4 ; 30 – 210°C ; 5 – 60 min ; haute pression (2 – 17 atm) ; 10 – 50% MS	Dissolution de 10 à 50% de l'hémicellulose, solubilisation et/ou déstructuration élevée de la lignine.
Ammoniac gazeux anhydre	Ammoniac gazeux 25 – 80°C ; ~72h ; 50% MS	Similaire à hydroxyde d'ammonium mais MS élevée possible ; conditions de réaction douces.
Ammoniac liquide anhydre	70 – 90°C ; ~5 min ; haute pression (15 – 20 atm) ; 60 – 90% MS	Peu d'effets sur l'hémicellulose et la lignine, récupération facile par évaporation et liquéfaction de l'ammoniac.
Chaux	25 – 130°C ; 1h – 8 semaines ; 5 – 15% $Ca(OH)_2$; 5 – 20% MS	Dissolution de 20 à 40% de l'hémicellulose, 60 à 80% de délignification, peu énergivore.

Les différentes technologies présentées dans cette section sont classées selon le réactif employé. Pour chaque réactif, différents modes opératoires et conditions de réaction peuvent être appliqués.

Prétraitement à la soude

La soude est la base minérale la plus produite et la plus consommée dans le monde. C'est un des catalyseurs basiques les plus puissants qui permet une bonne solubilisation de l'hémicellulose et de la lignine. Il attaque efficacement les liaisons entre la lignine et les hémicelluloses dans les complexes lignine-carbohydrates, particulièrement les liaisons éther et ester. Il s'attaque également aux liaisons ester et C-C de la lignine liées à l'acide férulique (Kim et al., 2016). La soude permet une délignification efficace, avec un taux de solubilisation de la lignine allant jusque 80% (Kim et al., 2016) et une augmentation du potentiel méthanogène de l'ordre de 35 (Monlau et al., 2012) à 60% (Jiang et al., 2017). La soude présente l'avantage d'avoir un impact significatif sur le potentiel méthanogène avec un dosage aussi faible que 1g.kgTS^{-1} (Sambusiti et al., 2012b). Un des inconvénients majeurs de l'utilisation de l'hydroxyde de sodium dans une filière de méthanisation est que la présence de sodium dans le digestat peut participer à la salinisation des sols avec un effet phytotoxique (Hargreaves et al., 2008; Walter et al., 2006). De plus, le coût de ce réactif est élevé, ce qui a une influence importante sur l'efficience économique de son utilisation dans le cadre d'un prétraitement (Jiang et al., 2017).

Prétraitement à la chaux

La chaux peut être utilisée sous la forme de chaux vive (CaO) ou éteinte ($Ca(OH)_2$). C'est un réactif issu de la calcination du calcaire, une roche extrêmement abondante à la surface terrestre. La calcination du calcaire étant un procédé émetteur de CO_2 (Sagastume Gutiérrez et al., 2012), la chaux doit toutefois être utilisée en quantité suffisamment limitée pour que ses émissions soient compensées par le surplus de production de biogaz. L'utilisation de la chaux a également été largement étudiée dans la littérature scientifique pour le prétraitement des biomasses lignocellulosiques. Réputée moins efficace que la soude, la chaux permet tout de même d'obtenir une bonne efficacité de délignification (Kim et al., 2016) et une augmentation de BMP allant jusque 25 voire près de 40% (Khor et al., 2015). Bien que son efficacité soit légèrement en retrait, la chaux a l'avantage d'être nettement moins onéreuse que la soude, ce qui lui permet d'être économiquement plus avantageuse (Jiang et al., 2017). En plus de sa capacité de délignification, la chaux permet également la solubilisation des groupes acetyls liés aux hémicelluloses, ce qui augmente l'accessibilité des microorganismes aux sucres des hémicelluloses et de la cellulose (Sierra et al., 2009b). Concernant les conditions opératoires de son utilisation, si des températures relativement élevées allant de 55 à plus de 100°C sont régulièrement employées dans la littérature (Kim et al., 2016;

Monlau et al., 2012), certains travaux tels que ceux de W.C Khor *et al.* (Khor et al., 2015) montrent que des conditions conjuguant une température basse et un temps de réaction long peuvent être avantageuses. En effet, la solubilité dans l'eau de la chaux augmente à mesure que la température diminue (National Lime Association, n.d.) (Figure 1-12). Par conséquent, à basse température, une plus grande quantité de réactif est disponible pour participer au prétraitement de la lignocellulose.

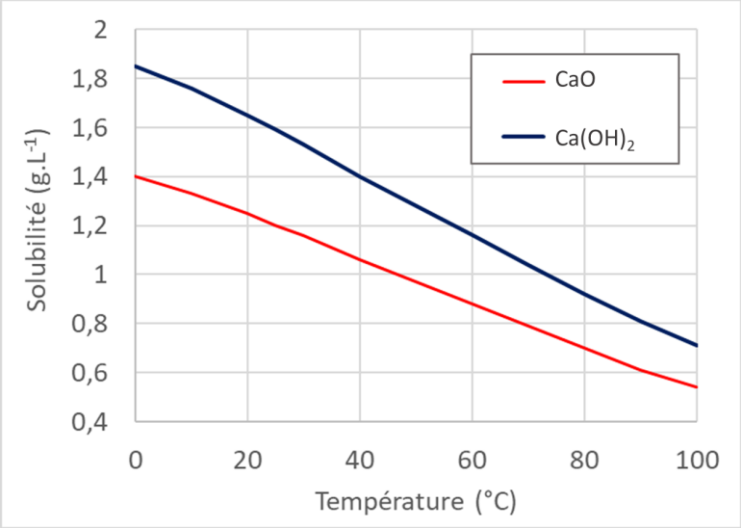

Figure 1-12 : Solubilité de la chaux dans l'eau en fonction de la température.

Plusieurs travaux de la littérature témoignent de la pertinence de l'application d'un prétraitement à la chaux dans des conditions douces, en employant une concentration en réactif limitée et une température basse. Les travaux de Thomas *et al.* (Thomas et al., 2018) montrent que, dans le cas d'un prétraitement alcalin de miscanthus à température ambiante, l'impact de la durée du prétraitement est plus important que celui de la concentration en chaux, et qu'un allongement du temps de réaction au-delà de 5 jours pouvait-être bénéfique. Cette tendance observée est confirmée par les travaux de Kim *et al* (Kim and Holtzapple, 2006) qui montrent que la cinétique de délignification lors d'un prétraitement alcalin à la chaux est très lente, et que jusqu'à 16 semaines sont nécessaires avant d'atteindre un taux de délignification de 40 à 50%. Un autre résultat intéressant de cette étude est que la valeur finale du taux de délignification est indépendante de la température sur la gamme testée (25 – 55°C), confirmant l'intérêt de l'application de conditions douces et d'un temps de réaction long.

Prétraitement à l'ammoniac

De nombreux travaux de recherche portent sur l'utilisation de l'ammoniac dans le cadre d'un prétraitement alcalin. L'ammoniac peut être utilisé sous différentes formes : en solution aqueuse, sous forme gazeuse ou sous forme liquide anhydre. L'ammoniac présente l'avantage d'être peu onéreux, peu

corrosif et facilement recyclé lors du procédé de prétraitement grâce à sa haute volatilité (Kim et al., 2016). Les effets du prétraitement à l'ammoniac sur la lignocellulose sont similaires à ceux des autres réactifs : solubilisation de la lignine, augmentation de la surface spécifique du substrat, de la taille des pores et de la structure des holocelluloses. Ces prétraitements font toutefois appel à des températures et des pressions élevées entraînant d'importantes dépenses énergétiques. De plus, la récupération de l'ammoniac pour son recyclage au sein du procédé est elle aussi très énergivore (Kim et al., 2016).

1.4.3 Prétraitements biologiques

Les prétraitements biologiques offrent une solution prometteuse de par leur coût raisonnable et leur faible impact sur l'environnement. On distingue trois catégories principales de prétraitements biologiques : les prétraitements enzymatiques, anaérobies et aérobies (Brémond et al., 2018).

Prétraitements enzymatiques

Les prétraitements enzymatiques peuvent faire appel à des enzymes ajoutées au substrat en amont de la digestion dans une cuve dédiée ou être ajoutée dans le milieu réactionnel du méthaniseur. Une large variété d'enzymes a été étudiée dans la littérature, avec des résultats variables (Brémond et al., 2018). Parmi celles-ci, les enzymes dégradant les carbohydrates tels que les hémicelluloses et la cellulose sont parmi les plus étudiées et les plus prometteuses. Toutefois, la maîtrise des paramètres du milieu permettant leur action efficace (température, pH, temps d'application…) peut compliquer leur utilisation. D'autres enzymes comme les laccases et peroxydases dégradant spécifiquement la lignine sont également à l'étude avec des résultats prometteurs (Brémond et al., 2018).

Prétraitements anaérobies

Les principaux prétraitements biologiques anaérobies de la lignocellulose sont l'utilisation d'un pré-digesteur et l'ensilage (Brémond et al., 2018). L'utilisation d'un pré-digesteur permet de séparer les étapes d'hydrolyse et d'acidogénèse de celles d'acétogénèse et méthanogénèse. Cette configuration permet d'opérer à un pH plus acide dans le pré-digesteur, plus favorables aux premières étapes de la digestion anaérobie, et ainsi d'augmenter le rendement en méthane ainsi que la charge appliquée au réacteur. Cependant, la complexité supérieure de l'installation entraine une augmentation de son coût. L'ensilage, procédé de stockage par fermentation, a été présenté en détail en section 1.3. Les transformations du substrat ayant lieu lors de ce procédé (conversion des sucres solubles en acide lactique et autres métabolites, ainsi qu'une hydrolyse partielle des hémicelluloses) amène parfois à considérer l'ensilage comme un prétraitement sous certaines conditions (Cui et al., 2020). Néanmoins, bien que la cinétique de

dégradation de la biomasse soit parfois accélérée, l'effet du procédé sur la valeur finale du potentiel méthanogène est le plus souvent nulle (Brémond et al., 2018).

Prétraitements aérobies

Ces prétraitements font appel à des micro-organismes anaérobies facultatifs et aérobies. Ils peuvent être appliqués par simple aération de la biomasse ou par l'ajout d'inocula de bactéries aérobies et/ou champignons. Si ces prétraitements peuvent avoir un impact intéressant sur la dégradabilité de la biomasse lignocellulosique et la dégradation de la lignine, ils sont souvent accompagnés de pertes massiques et énergétiques dues à la respiration de microorganismes aérobies tel que présenté dans la section 1.3.2.2. Pour cette raison, leur impact global sur le potentiel méthanogène du substrat est incertain car les pertes causées par la respiration ne sont pas toujours compensées par l'augmentation de la dégradabilité (Brémond et al., 2018).

1.5 Combinaison de procédés de stockage et de prétraitement

Afin de simplifier la valorisation de la biomasse en réduisant le nombre d'étapes et de manipulations, des procédés alliant stockage et prétraitement en une seule étape sont envisagés. Le fait d'utiliser l'étape de stockage pour réaliser une action de prétraitement permet également d'allonger fortement le temps de réaction et ainsi d'espérer une efficacité de prétraitement supérieure. Dans la littérature, sont retrouvés principalement des travaux portant sur des procédés biologiques et chimiques.

1.5.1 Stockage et prétraitement biologique

Etant données les modifications de caractéristiques du substrat ayant lieu lors de la fermentation d'ensilage, ce procédé est parfois également considéré comme un prétraitement. Cependant, bien que la dégradabilité des substrats soit parfois augmentée après ensilage si d'importantes pertes de masse ont lieu au cours de la fermentation, le procédé n'apporte généralement pas d'augmentation du potentiel méthanogène. L'utilisation d'additifs visant à augmenter l'hydrolyse de la lignocellulose au cours de l'ensilage a cependant été étudiée. Les perspectives de prétraitement biologique de la lignocellulose ayant lieu pendant le stockage par ensilage portent sur deux mécanismes principaux.

Premièrement, l'action de métabolites (acides lactique, acétique, butyrique…) pouvant participer à la déstructuration de la lignocellulose en conditions acides est évoquée dans la littérature (Cui et al., 2020). Cependant, les pH atteints en ensilage sont généralement compris entre 3.5 et 5.5 (Kaiser et al., 2004) et le facteur de sévérité associé plafonne ainsi à 5 après un temps de réaction de 1 an (Figure 1-13). Pourtant, les travaux de Yan *et al.* (Yuan et al., 2019) ont montré que, dans le cas d'un prétraitement acide, la

décomposition de l'hémicellulose et de la cellulose se produisait à partir d'un indice de sévérité étendu (5-14) compris entre 7 et 8.

Une autre voie de prétraitement biologique couplée au stockage est l'action d'enzymes (cellulase, hémicellulases…) au cours du stockage, pouvant participer à la déstructuration de la lignocellulose. L'utilisation d'enzymes a montré des résultats prometteurs pour le prétraitement de biomasses lignocellulosiques (Brémond et al., 2018). Cependant, au cours de l'ensilage, le pH du milieu décroit rapidement et atteint une valeur voisine de 4, alors que des métabolites fermentaires sont produits. Dans ces conditions, plusieurs enzymes fibrolytiques voient leur activité décroître fortement (ROMSAIYUD et al., 2009; Vicini et al., 2003). Les travaux de Cui *et al* (Cui et al., 2020) ont montré une meilleure hydrolyse et enzymolyse dans le cas d'ensilage à fermentation majoritairement butyrique et pH élevé. Cependant, l'augmentation de biodégradabilité ainsi obtenue doit compenser les pertes énergétiques occasionnées par la production d'hydrogène lors de la fermentation butyrique (Kreuger et al., 2011).

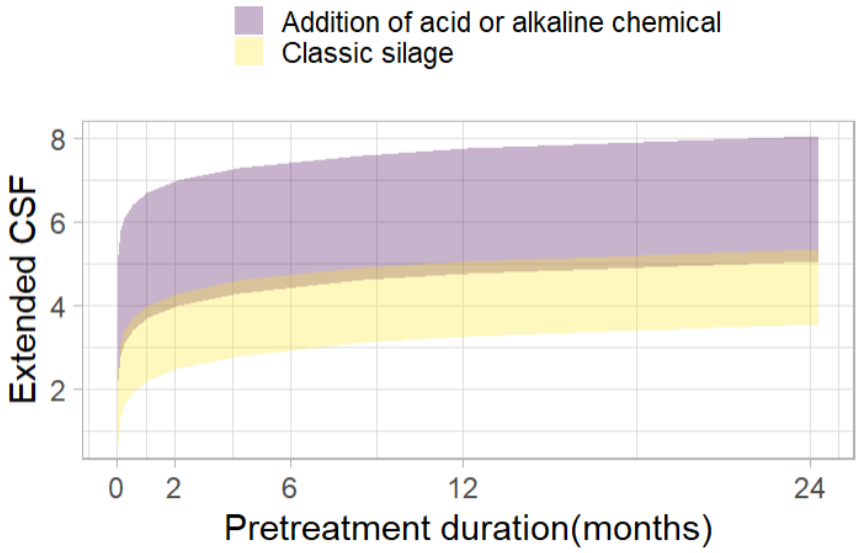

Figure 1-13 : Variation de l'indice de sévérité d'un prétraitement acide ou basique dans le cadre de l'ensilage sans additif ou d'un procédé de stockage et prétraitement chimique à 20°C.

1.5.2 Stockages et prétraitements chimiques

L'utilisation de procédés alliant stockage et prétraitement grâce à l'ajout d'un réactif chimique est également abordée dans la littérature. Des réactifs alcalins et acides sont principalement envisagés pour cette application (Digman et al., 2010; Pakarinen et al., 2011). Ces réactifs permettent d'atteindre des pH plus extrêmes que ceux atteignables par accumulation de métabolites de fermentation, et ainsi d'augmenter la sévérité du prétraitement. En considérant une gamme de pH de 4 à 1 et 10 à 13 dans le cadre de procédés acides ou alcalins, respectivement, des valeurs de CSF comprises entre 7 et 8 peuvent

ainsi être atteintes après 2 mois de stockage, permettant de s'attendre à une hydrolyse significative de la lignocellulose (Yuan et al., 2019). Un nombre très limité de travaux porte sur de tels procédés dans la littérature. Dans le cadre du stockage et prétraitement d'herbes pour la production d'éthanol, Digman *et al.* (Digman et al., 2010) ont étudié l'influence de l'ajout d'acide sulfurique et de chaux sur le rendement de conversion de la cellulose en éthanol après 30 à 180 jours de stockage. L'application du procédé de stockage et prétraitement a permis d'aller jusqu'à doubler (CaO) voire tripler (H_2SO_4) le rendement de conversion, bien que le résultat soit fortement dépendant du substrat ainsi que de la charge en réactif (et donc du pH). Pakarinen *et al* (2011) ont également étudié l'ajout d'acide formique et d'urée lors du stockage. Cependant, les valeurs de pH extrêmes n'ont pas été atteintes, et l'impact du procédé sur le rendement méthane s'en est trouvé limité. De plus, l'absence de prise en compte des pertes de masse au cours du stockage pour certaines conditions ne permet pas de conclure sur l'effet global du procédé.

1.6 Conclusion et objectifs

Les différentes plantes cultivées sous l'appellation de CIMSE ont en réalité des caractéristiques très variées, dépendantes de l'espèce, du stade de maturité à la récolte et du contexte pédoclimatique. Toutefois, une des caractéristiques communes aux CIMSE est leur fort taux d'humidité à la récolte, dû au fait que ces plantes sont généralement récoltées immatures. Dans la littérature, il ressort que l'humidité élevée à la récolte peut avoir un impact significatif sur les performances de stockage par ensilage, en agissant principalement sur les mécanismes de fermentation et la production d'effluents.

Bien que la fermentation au cours de l'ensilage soit un phénomène bien étudié dans la littérature concernant l'alimentation animale, l'impact de cette étape du stockage sur la préservation du potentiel méthanogène de la biomasse, et a fortiori des CIMSE, est moins bien connu et évalué. Il ressort de la littérature que le schéma de fermentation « optimal » pour l'élevage (prédominance de la fermentation homolactique) n'est pas nécessairement requis pour l'ensilage à destination de la méthanisation. Au contraire, la présence d'autres métabolites comme l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique peuvent avoir un effet positif sur certains aspects du stockage tels que la stabilité aérobie à l'ouverture du silo. Toutefois, la survenue de ces voies de fermentation pouvant également entraîner des pertes de potentiel méthanogène et/ou de matière sèche, la bonne connaissance de l'impact des voies de fermentation d'ensilage sur le bilan énergétique du stockage est nécessaire. Etant donné la grande variabilité de caractéristiques physico-chimiques des CIMSE, différents schémas de fermentation pourraient être induits, et ainsi impacter l'efficacité du stockage de ces CIMSE. La compréhension des mécanismes de fermentation propres à chaque type de CIMSE et l'identification des voies de perte par

fermentation permettrait de proposer des mesures correctives visant à améliorer « l'ensilabilité » des différentes plantes pour la méthanisation. Cette problématique est abordée dans le troisième chapitre du manuscrit, dont l'objectif est d'étudier la variabilité des principales caractéristiques des CIMSE et leur influence sur la fermentation d'ensilage, puis à comprendre l'impact du type de fermentation impliquée lors de l'ensilage sur la préservation du potentiel énergétique des CIMSE.

La génération d'effluents d'ensilage est quant à elle un phénomène peu étudié dans le cadre de l'ensilage à destination de la méthanisation. Pourtant, d'importantes pertes de potentiel méthanogène peuvent être causées par ces effluents si leur captation et leur valorisation ne sont pas optimales. De plus, les jus issus des silos peuvent être source de pollutions des eaux de surface, de pollutions olfactives et de corrosions des matériaux (acier et béton). Si le préfanage des cultures après récoltes peut permettre d'éviter la génération de ces effluents, son application n'est pas toujours possible en raison des conditions météorologiques et des contraintes organisationnelles de rotation de culture. Le recours à d'autres méthodes comme le co-ensilage avec des substrats absorbants pourrait constituer une alternative au préfanage et permettre de limiter efficacement la production de jus de silos. Cette problématique est abordée dans le quatrième chapitre du manuscrit. Il vise à étudier l'impact de l'addition de différents substrats absorbants en co-ensilage sur la rétention des effluents au sein de la biomasse et à comprendre quel impact l'addition de ces co-substrats (caractéristiques biochimiques et microbiologiques) peut avoir sur la fermentation d'ensilage.

En ce qui concerne la problématique du prétraitement des CIMSE en tant que biomasse lignocellulosique, il ressort de la littérature que les prétraitements alcalins en conditions douces utilisant la chaux représentent un bon compromis entre efficacité de prétraitement, coût et innocuité du réactif utilisé. Cependant, des temps de réaction longs sont souvent requis pour compenser les conditions douces appliquées. Face à ce constat, le recours à des procédés alliant stockage et prétraitement alcalin est capable d'étendre la durée de prétraitement à plusieurs mois, permettant ainsi de maximiser l'effet du prétraitement sur la lignocellulose. Dans la littérature, un nombre très réduit de publications scientifiques portent sur de tels procédés. De plus, la cinétique d'évolution du substrat sur des durées longues dans de telles conditions n'est pas connue. Le cinquième chapitre du manuscrit porte donc sur l'étude de procédés de stockage alcalin, en étudiant leur impact sur la structure lignocellulosique des CIMSE, et sur les éventuelles fermentations microbiennes pouvant prendre places dans ces conditions spécifiques.

2 Matériel et méthodes

2.1 Introduction

Ce chapitre présente la démarche générale et les méthodes communes des différents travaux expérimentaux de la thèse. Les spécificités propres à chaque expérimentation sont présentées dans les chapitres de résultats, rédigés sous forme d'articles scientifiques. Les expérimentations de la thèse ont porté sur le stockage de CIMSE de différentes natures et selon des modalités de stockage variées. Une synthèse des différentes expériences réalisées sera présentée en fin de chapitre

2.2 Substrats utilisés et méthode de prélèvement

Différentes espèces de CIMSE ont été utilisées au cours de cette thèse. Les substrats utilisés sont présentés dans le Tableau 2-1. La sélection des échantillons de CIMSE a été faite afin de favoriser la diversité des profils rencontrés. Ainsi, des CIMSE d'hiver (récoltées au printemps) et d'été (récoltées en fin d'été) ont été utilisées. La variabilité des caractéristiques physico-chimiques des CIMSE a été recherchée par la diversification des familles : légumineuses (lupin, féverole), crucifères (cameline), graminées (raygrass, seigle, avoine, maïs) et Astéracées (tournesol). Certaines espèces de CIMSE ont également été prélevées à des stades de maturité différents. Pour les essais de co-ensilage, différents co-substrats ont été sélectionnés et sont présentés dans le Tableau 2-2.

Les différents échantillons de CIMSE ont été récoltés à la main à l'aide d'une faucille, avec une hauteur de coupe d'environ 10 cm. Les plantes entières ont alors été immédiatement transportées au laboratoire. Les expériences de stockage ont débuté le plus rapidement possible après la récolte. Immédiatement avant stockage, les CIMSE ont été broyées à l'aide d'un broyeur à végétaux (Bosch AXT 2550TC) et/ou d'un broyeur à couteaux (Blik BB230) (Figure 2-1). Les échantillons de co-substrats pour les expériences de co-ensilage ont été broyés au broyeur à couteaux (Blik BB230).



Figure 2-1: Préparation des CIMSE avant stockage : récolte manuelle et broyage

Tableau 2-1 : Liste des prélèvements de CIMSE réalisés

CIMSE	Lieu de prélèvement	Date de prélèvement
Seigle A *Secale cereale*	Biométharn, Aiguefonde (81)	10/05/2019
Seigle B *Secale cereale*	Biométharn, Aiguefonde (81)	03/06/2019
Seigle C *Secale cereale*	Biomethagri, Florensac (34)	15/04/2020
Seigle D *Secale cereale*	Biomethagri, Florensac (34)	28/05/2021
Avoine *Avena sativa*	Plateforme Syppre Arvalis, Montardon (64)	02/05/2019
Raygrass italien Lolium multiflorum	Lycée agricole du Gros Chêne, Pontivy (56)	17/04/2019
Féverole d'hiver *Vicia faba*	UMR INRAE Agroécologie, Dijon (21)	25/06/2019
Lupin blanc *Luinus albus*	UMR INRAE Agroécologie, Dijon (21)	25/06/2019
Cameline *Camelina sativa*	Arvalis, baziège (31)	01/10/2019
Maïs *Zea mays*	Essais CIMSE RAGT, Aiguefonde (81)	26/09/2019
Tournesol A *Helianthus annuus*	Essais CIMSE RAGT, Aiguefonde (81)	28/08/2019
Tournesol B *Helianthus annuus*	Essais CIMSE RAGT, Aiguefonde (81)	26/09/2019
Tournesol C *Helianthus annuus*	Essais CIMSE RAGT (Cintegabelle , 31)	14/09/2020

Tableau 2-2 : Co-substrats utilisés lors des expériences de co-ensilage

Co-substrat	**Origine**
Paille de blé	ZOLUX S.A.S., France
Papier et carton souillés	Collecte spécifique au LBE
Tiges de miscanthus séchées	INRAE AgroImpact, Estrée Mons
Sciures de bois	Ets Guille, Narbonne
Fumier de cheval	Narbonne Equitation, Narbonne
Fumier de poulet	GAEC d'Empare, Saint Marcel Sur Aude

2.3 Approche et dispositifs expérimentaux

Les expériences de stockage de CIMSE ont été réalisées en utilisant deux dispositifs expérimentaux. Le premier dispositif (stockage en bouteille) a été utilisé afin de réaliser le suivi cinétique des transformations du substrat au cours du stockage. Le second dispositif (stockage en colonne) a été utilisé pour étudier la production d'effluents d'ensilage lors du stockage.

2.3.1 Stockage en bouteille

Ces expériences de stockage ont été réalisées dans des mini-silos en verre de 2,6 L de contenance (Figure 2-2). Ces silos ont été fermés à l'aide d'un bouchon étanche muni d'un septum permettant la mesure de pression, le prélèvement d'échantillons de gaz et le dégazage. Les silos ont été remplis de 500 à 700 g de matière première broyée et fortement tassée manuellement. Avant fermeture, le ciel gazeux a été flushé à l'azote afin d'apporter des conditions anaérobies. Les silos ont ensuite été stockés dans une pièce sombre à température ambiante (22°C).



Figure 2-2 : Stockage en bouteille - dispositif expérimental

Afin de pouvoir réaliser le suivi cinétique du stockage tout en évitant des perturbations aux silos, la méthode du sacrifice a été employée. Ainsi, pour chaque temps de stockage étudié, un réplicat de silo a été ouvert et analysé. Pour chaque condition de stockage, plusieurs silos ont donc été préparés afin de permettre de caractériser le substrat après 2, 7, 21, 60 et 180 jours. Systématiquement, un sixième silo a été confectionné afin de permettre le suivi de production de gaz de fermentation et de pertes massiques jusqu'à 180 jours avec au moins deux réplicats, et/ou de remplacer un silo détérioré (casse, fuite…). Six silos ont ainsi été préparés pour chaque condition de stockage. Le choix de ne sacrifier qu'un réplicat pour chaque durée de stockage déterminée a été fait au regard des résultats de Hillion et al. (Hillion, 2017) montrant que le dispositif de stockage en bouteilles avait une répétabilité suffisante pour ne sacrifier qu'une fiole à la fois.

La pression des silos a été suivie régulièrement. Pour chaque durée de stockage prédéterminée, une mesure du volume de gaz produit (par différence de pression) et de son contenu (par chromatographie gazeuse, voir section 2.4.3) a été réalisée sur l'ensemble des réacteurs. Après analyse du ciel gazeux, la détente des réacteurs a été opérée, suivie de leur pesée et d'une nouvelle mesure de pression. Cette manipulation a également été réalisée en dehors des échéances prédéfinies à chaque fois que la pression des réacteurs excédait 1,2 bar.

2.3.2 Stockage en colonne

Ces expériences ont été réalisées dans 12 tubes de PVC de 100 mm de diamètre et 800 mm de hauteur (Figure 2-3 et Figure 2-4). Les tubes ont été remplis d'environ 3kg de matière première broyée qui a ensuite été tassée à l'aide d'une presse hydraulique (capacité de 20 tonnes, KS Tools GmbH) jusqu'à la densité recommandée calculée à partir du taux de matière sèche selon Latsch and Sauter (2014). Les tubes ont été fermés aux deux extrémités par des bouchons étanches munis de piquage, permettant le drainage périodique des effluents d'ensilage (bas) et l'échappement des gaz de fermentation (haut). Durant le stockage, la vanne située sur le circuit d'échappement des gaz a été laissée en position 1, permettant un échappement direct vers un compteur à gaz (Ritter MilligasCounter). Pour la vidange de l'effluent d'ensilage, la vanne a été réglée en position 2 permettant à de l'azote contenu dans un sac étanche de venir remplacer le volume d'effluent s'écoulant par le drain. Ce dispositif a été utilisé afin d'éviter la pénétration d'oxygène dans les silos lors du prélèvement des effluents. Les expériences de stockage en colonne ont été réalisées en duplicat.

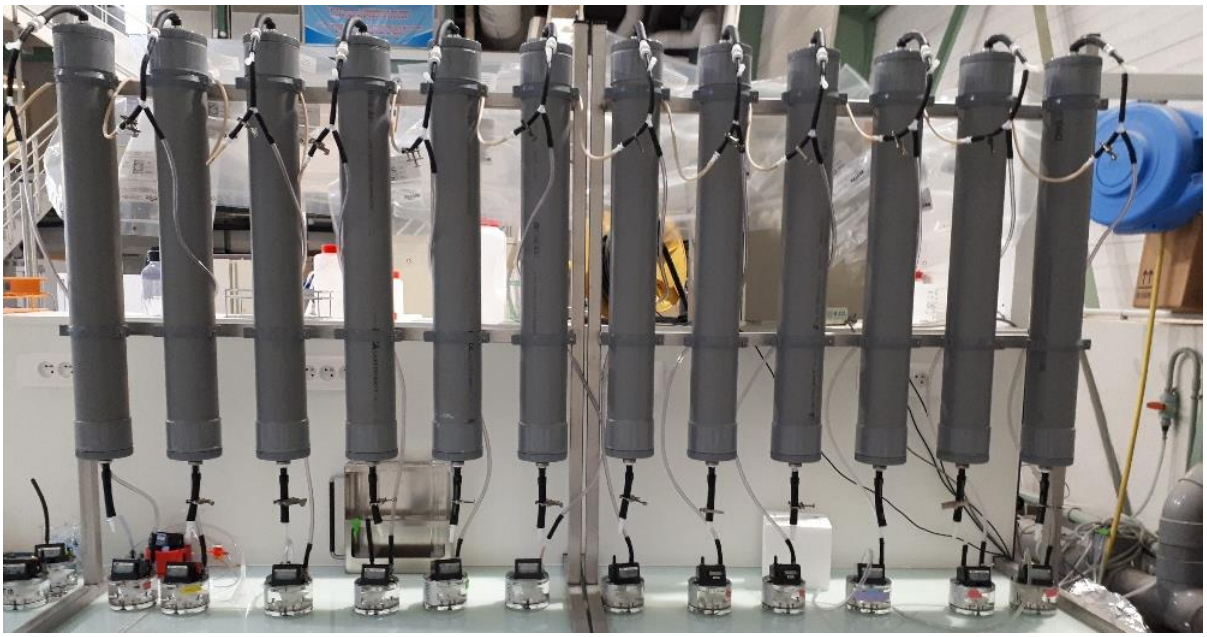

Figure 2-3 : Stockage en tube - dispositif expérimental

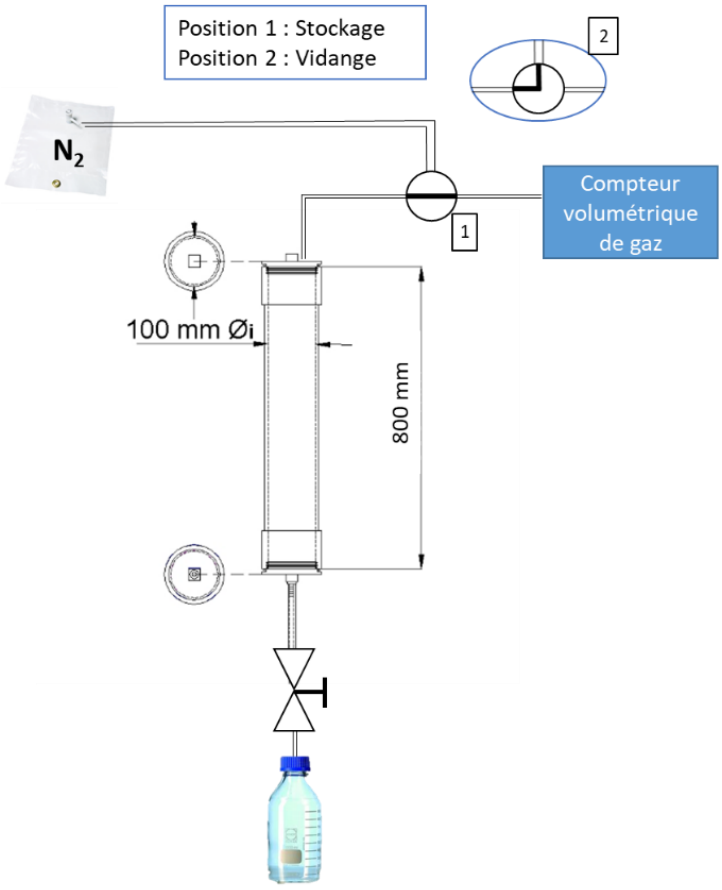

Figure 2-4 : Schéma de fonctionnement des silos de stockage en tube

2.4 Procédure d'échantillonnage et d'analyses

Les échantillons frais et stockés ont été analysés selon le protocole résumé en Figure 2-5. Le détail des différents protocoles d'analyse est fourni dans cette section. Avant analyse, les échantillons prélevés ont été homogénéisés et broyés finement avec un broyeur à couteaux (Pulverisette 11, Fritsch). La même méthode de broyage a été appliquée à tous les échantillons avant analyse.

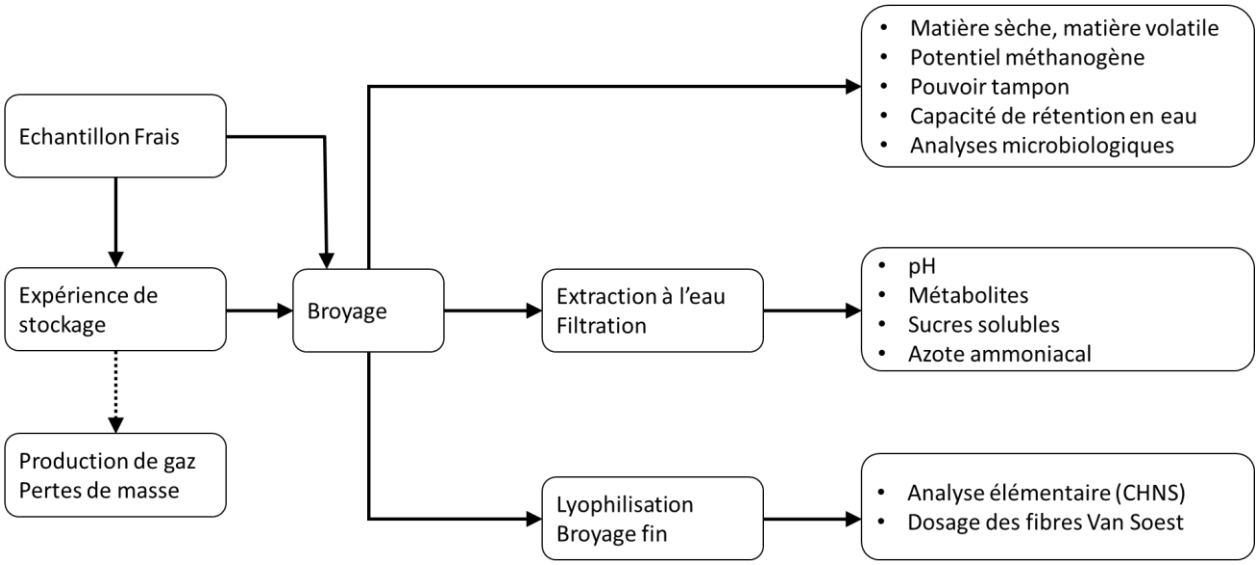

Figure 2-5 : Organigramme simplifié de la procédure d'échantillonnage et d'analyse

2.4.1 Caractérisation physico-chimique de la matière brute

2.4.1.1 Mesure de matière sèche et matière volatile.

Ces analyses ont été faites selon les méthodes standard (APHA, 2012). La mesure de la matière sèche (MS) a été réalisée par pesée différentielle avant et après séchage à 105°C jusqu'à masse constante. La mesure de matière volatile a été déterminée par pesée différentielle avant et après calcination à 550°C du résidu sec précédemment obtenu.

Lors de la mesure de matière sèche de substrats riches en composés volatils tels que l'ensilage, la valeur des taux de MS et MV est sous-estimée (Kreuger et al., 2011) suite à l'évaporation partielle de ces molécules. Pour compenser ce phénomène, l'équation de Porter and Murray (2001) a été utilisée (Eq(5-14).

$$MS_C = MS_{NC} + 0.375\ AL + 0.892 AGV + 0.975\ Alcools \qquad (2\text{-}1)$$

où MS_C et MS_{NC} désignent le taux de MS corrigé et non corrigé, respectivement ; AL = concentration en acide lactique ; AGV = concentration en acides gras volatils totaux ; Alcools = concentration en alcools totaux.

L'équation de Porter and Murray a été utilisée pour la correction des taux de MS/MV au cours des expérimentations présentées dans cette thèse. La valeur des taux de volatilisation théoriques a été vérifiée et est présentée en annexe.

2.4.1.2 Mesure de potentiel méthanogène

Le potentiel bio-méthanogène (BMP) a été mesuré expérimentalement en réacteur batch. Pour ces tests, un inoculum anaérobie issu de boues granulaires de réacteur UASB de papeterie (Saica Paper Papeteries, Laveyron) a été utilisé. Le rapport S/X a été fixé à 1. Les fioles, d'une contenance de 600 mL, ont été opérées avec un volume utile de 400 mL. La concentration en substrat en et inoculum a été fixée à $5 g_{VS}.L^{-1}$. Afin de fournir des conditions de développement optimales à l'inoculum, des solutions de macronutriments et de micronutriments ont été utilisées. Respectivement 8 et 4mL de ces solutions ont été mélangées au milieu réactionnel. Leur composition est la suivante :

Macronutriments (en $g.L^{-1}$) : NH_4Cl : 26,6 ; KH_2PO_4 : 10 ; $MgCl_2,6H_2O$: 3

Micronutriments (en $mg.L^{-1}$) : Cl_2Fe, $4H_2O$: 2000 ; $Cl_2Co,6H_2O$: 500 ; $Cl_2Ni,6H_2O$: 100 ; Na_2O_3Se : 50 ; $MoNa_2O_4,2H_2O$: 10 ; $Cl_2Cu,2H_2O$: 40 ; $ZnCl_2$: 50 ; $Cl_2Mn,4H_2O$: 100 ; H_3BO_3 : 50)f

Afin de tamponner le milieu, 20,8 mL d'une solution de $NaHCO_3$ à $50 g.L^{-1}$ ont également été ajoutés. Avant fermeture, le ciel gazeux des fioles a été remplacé par de l'azote afin d'apporter les conditions anaérobies. Les tests de potentiel méthanogène ont été réalisés en triplicat. Afin de déduire l'activité endogène de l'inoculum, des fioles ne contenant pas de substrat ont été utilisées.

La dispositif automatisé AMPTS II (BioProcess Control) a été utilisé pour l'agitation du contenu des fioles (1 minute toutes les 10 minutes), le contrôle de température (35°C) et la mesure de production de méthane.

La valeur de potentiel méthanogène a été exprimée de deux façons différentes selon l'information souhaitée. Pour estimer le potentiel méthanogène spécifique d'un échantillon frais ou stocké, la valeur de BMP a été rapportée à la quantité de MV prélevée pour le test en batch, exprimée en $NmLCH4.gMV_{add}^{-1}$. Afin de prendre en compte l'impact du stockage sur la préservation des BMP, la valeur de BMP a été corrigée pour prendre en compte les pertes de matière volatile ayant lieu lors du stockage. La valeur de BMP des échantillons stockés, rapportée à la quantité initiale de MV (avant stockage) a été calculée de la façon suivante (équation (2-2)) :

$$\mathrm{BMP}\left(\mathrm{NmLCH4}.gMV_{init}{}^{-1}\right) = \mathrm{BMP}\left(\mathrm{NmLCH4}.gMV_{add}{}^{-1}\right) \times (1 - pertes\ MV\ (\%)) \qquad (2\text{-}2)$$

2.4.1.3 Mesure de pouvoir tampon

La mesure de pouvoir tampon a été réalisée selon la méthode de Playne et McDonald (1966). 10 g d'échantillons frais ont été mélangés dans 250 mL d'eau distillée sous agitation. Le pH du mélange a d'abord été abaissé jusqu'à une valeur de 3 avec une solution de HCl à 0,1 N afin de libérer les ions bicarbonate sous forme de CO_2. L'ensemble a ensuite été titré jusqu'à un pH de 6 avec une solution de NaOH (0,1 N). Le pouvoir tampon a alors été calculé comme la quantité de NaOH (meq) nécessaire pour élever le pH de 4 à 6 par kg de matière sèche de substrat, après correction pour la titration d'un volume de 250 mL d'eau distillée seule.

2.4.1.4 Capacité de rétention en eau

La capacité de rétention en eau (water holding capacity –WHC) des co-substrats utilisés lors des expériences de co-ensilage a été mesurée selon un protocole adapté de Marsac et al. (2019). 10 g_{MB} d'échantillon ont été déposés dans un sachet de nylon (4 x 12 cm, taille de pores ~30 µm, FibreBag ref. 10-0127, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Germany). Les sacs ont été trempés dans l'eau du robinet pendant 2 heures puis centrifugés (200 g, 10 min) dans des flacons de 500 mL dont le fond a été préalablement rempli de billes de verre pour obtenir un milieu drainant. Les mesures de WHC ont été réalisées en triplicat. La WHC, exprimée indifféremment en $g.g^{-1}$ ou en $mL.g^{-1}$ en considérant une densité de l'eau égale à 1, a été calculée de la façon suivante :

$$WHC = \frac{m_h - m_r}{m_r} \qquad (2\text{-}3)$$

Où m_r = masse de l'échantillon avant humidification (g) et m_h = masse de l'échantillon humidifié après centrifugation (g). Préalablement à la détermination de la CRE, les échantillons ont été broyés au broyeur à couteaux (Blik BB230). La granulométrie du co-substrat pouvant avoir un impact significatif sur sa capacité de rétention en eau, la même méthode de broyage a été appliquée aux co-substrats lors de la détermination de la CRE et lors des expériences de co-ensilage.

2.4.1.5 Analyses microbiologiques

Un suivi des communautés microbiennes a été réalisé lors de certaines expériences de stockage en bouteilles. Pour cela, un échantillon de 300 mg de substrat frais a été prélevé dans un tube Eppendorf stérile de 2 mL et stocké à -20°C, pour chaque substrat frais ainsi que pour chaque bouteille sacrifiée des expériences concernées. La caractérisation des communautés microbiennes a été réalisée telle que décrite par Venkiteshwaran et al. (2016). L'extraction de l'ADN a été effectuée avec un kit PowerSoil (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) selon les instructions du fabricant. La région V4-V5 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée avec la paire de primers 515-532U et 909-928U. Le séquençage de l'ADN a été réalisé

à la plateforme Génomique et Transcriptomique (GeT, get.genotoul.fr). L'analyse des communautés microbiennes a été basée sur des unités taxonomiques opérationnelles uniques (OTUs). Seules les OTU présentant une abondance relative d'au moins 1,5% dans au moins un échantillon ont été sélectionnées pour l'interprétation des résultats. Lorsque nécessaire, les séquences de certains OTU ont été soumises à une recherche BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) pour identifier la souche bactérienne la plus proche.

La quantification de l'abondance bactérienne a été réalisée en estimant le nombre de copies du gène de l'ARNr 16S par PCR quantitative (qPCR) selon la méthode décrite par Braun et al. (2011). Une étape d'activation initiale des enzymes de 2 min à 95°C a été réalisée suivie de 40 cycles de dénaturation (95°C, 7 s ; 60°C, 25 s). L'abondance de chaque OTU a ainsi été estimée en multipliant l'abondance relative de l'OTU par le nombre total de copies du gène codant l'ARNr 16S du domaine concerné (bactéries ou archées).

2.4.1.6 Fractionnement des fibres par méthode Van-Soest

La distribution des fibres a été réalisée selon la méthode Van Soest (Van Soest and Wine, 1967). Cette méthode a été choisie comme étant la méthode de référence pour la caractérisation des fourrages. Les échantillons ont été préalablement lyophilisés et broyés finement à travers une maille de 1mm (Pulverisette 14, Fritsch). Les extractions successives ont été réalisées sur une unité automatisée FIWE 6 (VELP Scientifica). La prise d'essai (~1 g) a subi les étapes d'extraction suivantes, présentées dans le Tableau 2-3. La quantification des différentes phases a été réalisée par pesée différentielle après séchage, avant et après extraction.

Tableau 2-3 : Etapes d'extraction lors du fractionnement Van Soest et fractions associées

Etape	**Conditions**	**Fraction quantifiée**
Extraction à l'eau distillée	30min, 100°C	Composés solubles à l'eau (WSOLU)
Extraction au détergent neutre (NDS)	1h, 100°C	Composés solubles au détergent neutre (SOLU)
Extraction au détergent acide (ADS)	1h, 100°C	Hémicelluloses (HEMI)
Extraction à l'acide sulfurique 72%	3h, 25°C	Cellulose (CELL)
Calcination	3h, 550°C	Lignine (LIG)

Pour les échantillons présentant une teneur importante en lipides comme le tournesol, une extraction préalable des graisses a été effectuée avec un appareil ASE (Dionex ASE-200). L'extraction a été réalisée en utilisant un mélange heptane:ethanol (2:1, vol:vol) en tant que solvant. Une pression de 1500 psi a été appliquée ainsi qu'une température de 40°C. L'extraction a été réalisée en deux étapes statiques successives de 10 minutes (Yang et al., 2019).

2.4.1.7 Analyse élémentaire CHNS

L'analyse du carbone et de l'azote totaux a été réalisée grâce à un analyseur élémentaire CHNS (FlashSmart, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons utilisés pour cette analyse ont été préalablement lyophilisés et finement broyés avec un broyeur à billes (MM200, Retsch). Une prise d'essai de 3 à 5 mg a été utilisée.

2.4.2 Extraction et caractérisation de la phase soluble à l'eau

Pour chaque prélèvement de CIMSE fraîche ou stockée, une extraction à l'eau a été réalisée en triplicat selon le protocole décrit par Porter and Murray (2001). 30 g d'échantillon brut ont été mis à tremper dans 150 mL d'eau distillée pendant 16 h à 4°C dans des récipients fermés hermétiquement. Après extraction, les analyses suivantes ont été réalisées.

2.4.2.1 Mesure de pH

La mesure de pH a été réalisée directement dans le mélange macéré avant séparation avec une sonde WTW Sentix 41 branchée sur un pH mètre WTW inoLab pH7110.

2.4.2.2 Dosage des métabolites de fermentation, sucres solubles et ammonium dissout

Pour le dosage des composés solubles, la phase liquide précédemment extraite a été séparée par centrifugation (18600 g, 4°C, 20 min) puis filtration sur filtre nylon (0,2µm). Les sucres solubles (glucose, fructose, xylose et arabinose) ainsi que les métabolites (acide lactique, acide acétique, acide butyrique, acide isobutyrique, acide propionique, éthanol, 1-propanol, 1,2-propanediol, acide valérique, acide isovalérique et acide caproïque) ont été analysés par HPLC.

L'appareil était équipé d'une pré-colonne (Microguard cation H refill catbridges, Biorad) ainsi que d'une colonne Aminex 4PX-87H (BioRad) à 45°C. La phase mobile était constituée d'une solution d'acide sulfurique (0,005 M ; 0,3 $mL.min^{-1}$). La détection a été réalisée par réfractométrie (Waters R4140, 35°C). La concentration en ammonium dissous a été réalisée par titration à l'acide chlorhydrique (0,02 N) après distillation et reprise dans l'acide borique, sur un appareil Vapodest 50s (Gerhardt).

2.4.3 Analyses de la phase gazeuse

Le suivi de la production de gaz de fermentation a été réalisé lors des expérimentations de stockage en bouteilles. Le volume de CO_2 et H_2 produits entre deux points de prélèvement ont été déterminés selon la différence de pression avant et après dégazage comme suit (équation (2-4).

$$\Delta V_g = \left(\left[y_g(j) \times P_1(j) \times \frac{V}{RT}\right] - \left[y_g(j-1) \times P_2(j-1) \times \frac{V}{RT}\right]\right) \times \frac{RT_0}{P_0} \rightarrow \quad (2\text{-}4)$$

Où $P_1(j)$ = pression de la fiole avant dégazage le jour du prélèvement (Pa). $P_2(j\text{-}1)$ = pression de la fiole après dégazage lors du prélèvement précédent. $y_g(j)$ et $j_g(j\text{-}1)$ = teneur du gaz étudié dans le gaz le jour du prélèvement et lors du prélèvement précédent, respectivement. V = volume du ciel gazeux (mL). T = température de la bouteille (K). R = constante des gaz parfaits (8.314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$). T_0 et P_0 = température et pression en conditions normales (273,15 K, 1013 hPa).

Lors des expériences de stockage en bouteille, le volume de ciel gazeux a été calculé grâce à la densité théorique densité du substrat stocké, estimé selon l'équation de Mcnulty et al. (1982) (équation (2-5)

$$\rho_t = 1/\left[\,(M/\rho_l) + (1 - M)/\,\rho_s\,\right] \quad (2\text{-}5)$$

Où M = taux d'humidité ($g_{eau}.g_{MB}^{-1}$), ρ_t = densité du substrat stocké, ρ_l = densité de l'eau = 1000 $kg.m^{-3}$, ρ_s = densité de la fraction sèche = 1421 kg/m^3

La composition du gaz de fermentation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse à partir d'échantillons de 200 µL avec un appareil GC Perkin Elmer Clarus 580. Ce chromatographe est équipé de deux colonnes capillaires. La première (R-Q-bond - 30 m×0,32 mm) permet la séparation du CO_2 et des autres gaz (H_2, O_2, N_2, CH_4). La seconde (Rt-Molsieve 5Å - 30 m×0,32 mm) permet la séparation de ces quatre gaz entre eux. L'argon a été utilisé comme gaz vecteur (350 kPa, 34 mL min^{-1}). La température de l'injecteur a été réglée à 250°C et celle du détecteur à conductivité thermique à 150°C.

2.5 Analyses statistiques

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. (version 4.1.2).

2.5.1 Test de Student

Afin de déterminer si une différence significative existe entre la valeur de BMP ou de fractionnement Van Soest de plusieurs échantillons d'une même expérience, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée en utilisant la fonction anova_test() du package « rstatix ». Lorsqu'une différence significative était trouvée, un test de Student par paire corrigé par la méthode de Bonferroni ou de Holm a été réalisé, après

vérification de l'hypothèse de normalité par un test de Shapiro. Le test de Student a été réalisé grâce à la fonction « paiwise_t_test() ». Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

2.5.2 Analyse exploratoire des données

Pour certaines expériences, la matrice des corrélations de Pearson a été calculée pour confirmer le lien observé entre différentes propriétés des échantillons stockés. La matrice a été construite grâce à la fonction cor() du package « corrplot » de R. Une analyse en composantes principales (ACP) a également pu être réalisée sur des jeux de données sélectionnées grâce à la fonction « PCA() » du package FactoMineR.

2.6 Synthèse des expériences de la thèse

Afin de fournir une vision d'ensemble des travaux expérimentaux réalisés au cours de la thèse, le Tableau 2-4 propose un récapitulatif des conditions appliquées lors des principales expériences.

Tableau 2-4 : Plan global simplifié des expériences de la thèse

Objectif	Chapitre	Description	Substrats et additifs	Dispositif
Etudier la fermentation d'ensilage de différentes CIMSE	3 4 et 5 (contrôles)	CIMSE ensilées directement après récolte	Seigle A, seigle B, raygrass, féverole, lupin, cameline, maïs, tournesol A, tournesol B	Bouteilles
Comparer l'impact du co-ensilage et du préfanage sur la fermentation d'ensilage	4	Ensilage direct de raygrass Ensilage de raygrass préfané Co-ensilage de raygrass	Raygrass Paille de blé	Bouteilles
Optimiser le dosage d'un cosubstrat lors du coensilage	4	Co-ensilage de tournesol avec une quantité variable de co-substrat	Tournesol C Paille de blé	Colonnes
Comparer l'impact de divers co-substrats sur la fermentation d'ensilage et la production d'effluents	4	Coensilage de seigle avec divers substrats	Seigle D Papiers et cartons souillés, Tiges de miscanthus, sciures de bois, fumier de cheval, fumier de poulet	Bouteilles et colonnes
Etudier la cinétique de déacétylation des hémicelluloses lors du stockage alcalin	5	Stockage alcalin à court terme avec suivi cinétique serré Température limitant l'activité microbienne (4°C)	Seigle D CaO	Bouteilles
Etudier l'impact des modalités d'addition de chaux sur le taux de déacétylation des hémicelluloses	5	Teneur en MS (10 et 40%) et dose de CaO (25 et 200g.kg_{MS}^{-1}) variables	Seigle C CaO	Bouteilles
Etudier un procédé de stockage alcalin à long terme – charge en CaO basse	5	Stockage alcalin à 60 $gCaO.kgMS^{-1}$	Avoine, Seigle A	Bouteilles
Etudier un procédé de stockage alcalin à long terme – charge en CaO haute	5	Stockage alcalin à 100 $gCaO.kgMS^{-1}$ Teneur en MS variable	Seigle B, Tournesol B	Bouteilles

3 Etude de l'impact des propriétés des CIMSE sur la fermentation d'ensilage et la préservation du potentiel méthanogène lors du stockage.

3.1 Contexte et objectifs

L'étude bibliographique a permis de mettre en évidence que les caractéristiques physico-chimiques des plantes ont un impact fort sur leurs propriétés et capacités d'ensilage. Selon les mécanismes de fermentation dominants lors de l'ensilage, l'impact sur la préservation du potentiel méthanogène est supposé être différent, bien que les travaux disponibles dans la littérature ne permettent pas de dresser une conclusion définitive à ce sujet. En effet, plusieurs références de la littérature évaluant l'impact des caractéristiques des substrats sur la fermentation d'ensilage ne prennent pas en compte les pertes de masses réelles ayant lieu lors de ce stockage (Zhao et al., 2017) ou la volatilisation de l'acide lactique, des acides gras volatils (AGV) et des alcools lors des mesures de MS et MV (Pakarinen et al., 2008; Zhao et al., 2017). De plus, alors que la production d'hydrogène lors du stockage est identifiée comme pouvant mener à des pertes de potentiel méthanogène, seules quelques études décrivent la production de gaz de fermentation, le plus souvent de façons qualitatives (Hillion, 2017; Teixeira Franco, 2017).

Ce chapitre vise donc à étudier l'impact de la fermentation d'ensilage sur la préservation du potentiel méthanogène des CIMSE, avec pour objectif de caractériser aux mieux les transformations du substrat causées par la fermentation et d'apporter des éléments permettant une meilleure définition des critères d'*ensilabilité* des plantes et de *qualité* des ensilages au regard des spécificités du contexte de la méthanisation.

En premier lieu, différents échantillons de CIMSE ont été récoltés et analysés afin d'étudier la variabilité de leurs principales caractéristiques parmi celles citées dans la littérature comme ayant un impact sur la fermentation. L'ensilabilité de ces différents échantillons a ainsi été évaluée. La deuxième partie de ce chapitre s'intéresse à l'impact des propriétés initiales des CIMSE sur le déroulement de la fermentation d'ensilage avec l'objectif d'évaluer la pertinence des critères d'ensilabilité préalablement étudiés dans le cadre de la méthanisation. Enfin, la troisième section du chapitre étudie l'impact des mécanismes de fermentation ayant eu lieu lors du stockage sur la préservation du potentiel méthanogène.

3.2 Rappels méthodologiques

Les échantillons de CIMSE ont été prélevés sur des sites agricoles variés, à des dates de récolte imposées par le calendrier des différentes exploitations. Le jour de la récolte prévue par l'exploitant, un échantillon de 10 à 20 kg de chaque CIMSE a été prélevé manuellement en laissant une hauteur de chaumes de 10 cm. Les plantes ont alors été transportées entières au laboratoire puis utilisées rapidement pour les expériences de stockage. Les CIMSE ont préalablement été broyées immédiatement avant stockage. De plus amples précisions sur le dispositif expérimental et les lieux de prélèvement sont données dans le chapitre 2.

3.3 Caractérisation des CIMSE utilisées

Les principales caractéristiques des CIMSE employées dans ce chapitre sont présentées dans le Tableau 3-1. Ces paramètres ont été identifiés comme ayant un impact critique sur la fermentation d'ensilage (Teixeira Franco et al., 2016). Différentes familles de CIMSE sont représentées dans les récoltes utilisées : graminées (raygrass, seigle, avoine, maïs), légumineuses (lupin, féverole), crucifères (cameline), et astéracées (tournesol). Pour le tournesol et le seigle, 2 et 3 prélèvements ont été effectués, respectivement, et sont identifiés par les lettres A,B et D. La variabilité des caractéristiques physico-chimiques critiques pour l'ensilage est présentée en Figure 3-1.

Tableau 3-1 : Principales caractéristiques des échantillons de CIMSE utilisées.

	MS	**MV**	**WSC**	**BC**	**BBCH**	**C/N**
	(%MB)	*(%MB)*	*($g.kg_{MV}^{-1}$)*	*($mEq.kg_{MS}^{-1}$)*		*($g.g^{-1}$)*
Seigle A	24,9 ± 0,1	23,7 ± 0,1	66 ± 1	199	59	39,4
Seigle B	37,2 ± 0	36 ± 0	54 ± 4	136	74	53,1
Seigle D	21,1 ± 0,2	19,5 ± 0,1	141 ± 15	248	59	22,2
Avoine	21,8 ± 0	20,8 ± 0	131 ± 1	228	60	58,1
Raygrass	18,2 ± 0,2	16,6 ± 0,2	114 ± 7	481	43	25,9
Féverole	22,9 ± 0	21,5 ± 0	152 ± 8	374	79	17,7
Lupin	18,4 ± 0	17,7 ± 0	172 ± 22	306	79	17,8
Cameline	33,3 ± 0	31 ± 0	50 ± 2	356	80	16,7
Maïs	32,2 ± 0	31,1 ± 0	63 ± 0	194	75	34,3
Tournesol A	18,8 ± 0	17,6 ± 0	155 ± 4	471	65	21,8
Tournesol B	42,5 ± 0	40,1 ± 0	67 ± 1	337	88	23,1

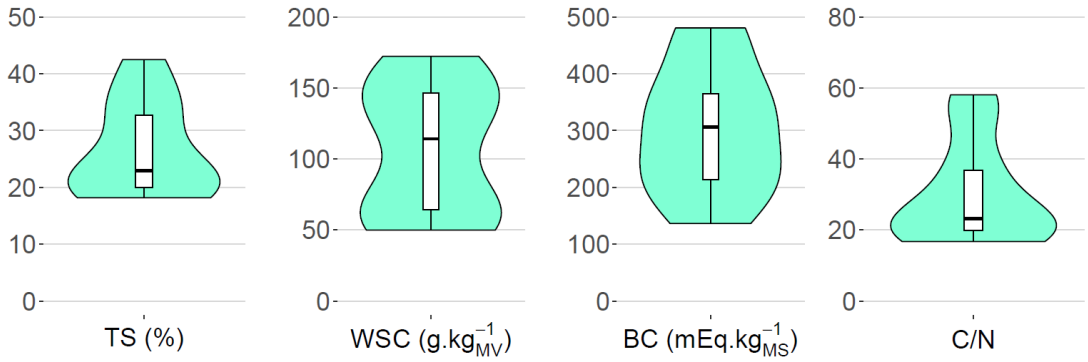

Figure 3-1 : Variation des caractéristiques des CIMSE ayant un impact critique sur la fermentation d'ensilage.

Une forte hétérogénéité a été constatée pour l'ensemble des paramètres étudiés, ce qui s'explique par la diversité des espèces prélevées ainsi que des contextes pédoclimatiques. La teneur en matière sèche MS varie de 18.2 à 42.5% ; toutefois le profil du diagramme en violon et la valeur médiane de 22.9% indiquent que la majorité des échantillons présente un taux de MS bas. Dans le cadre de l'ensilage, un taux d'humidité élevé peut faciliter le développement des clostridies responsables de fermentations butyriques indésirables (Pahlow et al., 2003; Teixeira Franco et al., 2017). Les valeurs de taux de MS observées dans le cas de ces prélèvements sont en accord avec la littérature : les cultures intermédiaires sont décrites comme présentant généralement une forte humidité du fait de leur stade de maturité peu avancé lors de la récolte (Molinuevo-Salces et al., 2013). Le stade de maturité des CIVE prélevées est décrit grâce à l'échelle BBCH. Sa valeur varie ici entre 43 (développement des organes végétatifs) et 88 (maturation des fruits ou graines) avec une moyenne de 69 correspondant à la fin de floraison. La teneur en sucres solubles (Water Soluble Carbohydrates - WSC) des plantes prélevées varie de 50 (cameline) à plus de 170 $g.kg_{MV}^{-1}$ (lupin). Les WSC sont majoritairement composés de glucose et de fructose, qui sont les principaux sucres solubles présents dans les fourrages des zones tempérées (Downing et al., 2008a). Pour l'ensilage, une concentration en WSC suffisante est souhaitable afin de permettre la production d'acide lactique lors des premières étapes de fermentation. Différentes valeurs de concentration optimale en WSC sont citées dans la littérature : une gamme de 60 à 120 $g.kg_{MS}^{-1}$ est recommandée par da Silva et al. (2017) alors que Kaiser et al. (2004) préconisent une concentration minimale de 25 $g.kg_{MB}^{-1}$. Selon ces critères, la concentration en WSC des plantes étudiées peut être considérée comme moyenne (Kaiser et al., 2004) à haute (da Silva et al., 2017). Le pouvoir tampon (buffering capacity – BC) et la teneur en azote (ici décrite par le rapport C/N) jouent également un rôle important. Ces deux paramètres influencent la capacité de l'ensilage à s'acidifier lors de la fermentation. En plus de contribuer à un pouvoir tampon élevé, une forte teneur en

azote peut également causer une hausse de pH à cause de la réaction de protéolyse et de la production d'ammonium. Des valeurs de BC basses et C/N élevées sont donc souhaitables pour permettre une acidification rapide de l'ensilage. Les valeurs de BC rencontrées dans cette étude peuvent être considérées comme basses (<350 mEq.kg_{MS}^{-1}) à moyennes (350 à 550 mEq.kg_{MS}^{-1}) selon la littérature (Kaiser et al., 2004). La valeur du rapport C/N des CIMSE prélevées varie entre 17 et 58, avec une valeur médiane de 23. Ces valeurs sont comparables avec d'autres résultats de la littérature indiquant que le ratio C/N des cultures intermédiaires varie entre 10 et 40 (Ramirez-Garcia et al., 2015; Ruark and Franzen, 2020).

Les interactions entre les différents paramètres critiques ont été évaluées grâce à la méthode de l'Analyse en Composantes Principales ACP (Figure 3-2). L'ACP a été réalisée sur les principales caractéristiques physico-chimiques des plantes décrites comme ayant un impact clé sur la fermentation d'ensilage (Kaiser et al., 2004; Teixeira Franco et al., 2016). Le code BBCH étant un indice et non une grandeur mesurée, sa valeur n'a pas été prise en compte dans le calcul de l'ACP. Toutefois le stade de maturité a été représenté en tant que variable supplémentaire de l'ACP pour observer l'évolution des paramètres clé (taux de MS, teneur en WSC, pouvoir tampon et rapport C/N) selon la maturité des CIMSE.

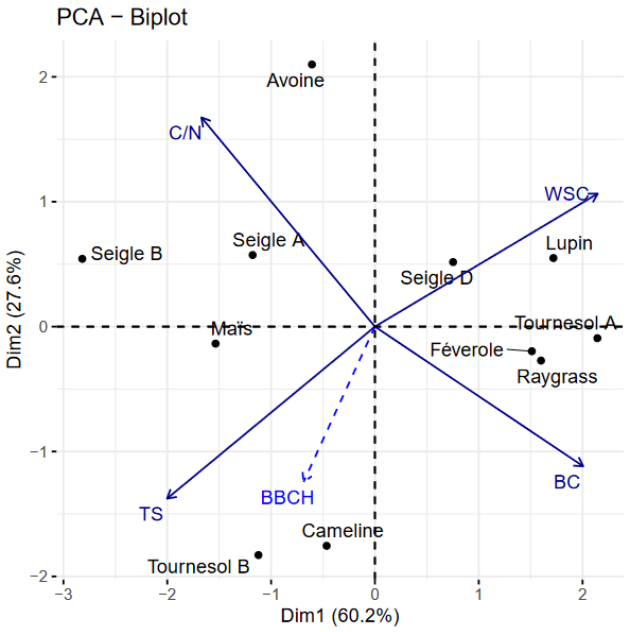

Figure 3-2 : Analyse en composantes principales réalisée sur les 4 paramètres critiques des CIMSE utilisées. Le stade de maturité (BBCH) est représenté en tant que variable supplémentaire et n'est pas pris en compte dans le calcul de l'ACP.

La matrice des corrélations entre ces paramètres a également été calculée. Parmi les corrélations significatives, il ressort que la teneur en MS et la concentration en sucres solubles WSC sont fortement anti-corrélées ($p < 0.01$), tandis que la teneur en MS et le stade de maturité sont eux corrélés avec une p-

value de 0.05. Ces observations sont cohérentes avec la littérature : lorsque la maturité des plantes augmente, la part de sucres solubles est réduite au détriment des parois cellulaires. Le taux de matière sèche augmente également à mesure que la plante avance en maturité (Kaiser et al., 2004). L'ACP montre également que le pouvoir tampon (BC) et le rapport C/N sont anti-corrélés ($p<0,05$), ce qui est en accord avec les observations de la littérature (Kaiser et al., 2004).

La projection des individus sur les 2 premiers axes de l'ACP (60,1 et 27,6% de l'inertie totale) montre une bonne répartition des individus le long de ces deux axes. Les échantillons prélevés présentent donc des propriétés variées permettant de rendre compte de la diversité des plantes pouvant être employées en tant que CIMSE.

3.4 Evaluation préalable de l'ensilabilité des CIMSE utilisées

Les CIMSE prélevées pour cette étude ont été considérées au regard d'un critère de la littérature permettant d'évaluer l'ensilabilité d'une plante, défini par Kaiser et al. (2004). Ce critère d'ensilabilité est estimé selon le couple de paramètres WSC et BC. L'ensilabilité définie par Kaiser et al. (2004) exprime la probabilité d'obtenir une bonne fermentation d'ensilage (i.e. majoritairement lactique) sans avoir recours au préfanage ni à des additifs d'ensilage. Elle est estimée grâce au couple WSC et BC. Les valeurs seuils de ces deux paramètres permettant la définition du critère d'ensilabilité sont définies dans la Figure 3-3. La classification des CIMSE prélevées en fonction de leur ensilabilité est également représentée. Selon ces critères, l'ensilabilité des CIMSE étudiées est considérée comme variant de « bonne » pour 3 cultures, à « mauvaise » pour 2, tandis que la majorité se trouvent dans une zone moyenne. L'apparition de fermentations indésirables lors du stockage est donc hautement probable. Il est à noter que le taux de matière sèche de la plante est également un paramètre important conditionnant le développement de bactéries indésirables comme les clostridies. Ainsi, des plantes le raygrass ou le tournesol A pourraient se voir attribuer une ensilabilité plus défavorable si ce critère était pris en compte. Dans la littérature, d'autres critères d'ensilabilité prenant également en compte le taux de MS existent, tels que le coefficient de fermentescibilité (FC) (Weissbach, 2011). Cependant la valeur de BC utilisée pour le calcul du FC est exprimée en grammes d'acide lactique par kg de MS et non pas en méquiv de NaOH par kg de MS tel qu'utilisé pour les expériences de la thèse. Par conséquent la valeur de FC n'a pas pu être calculée.

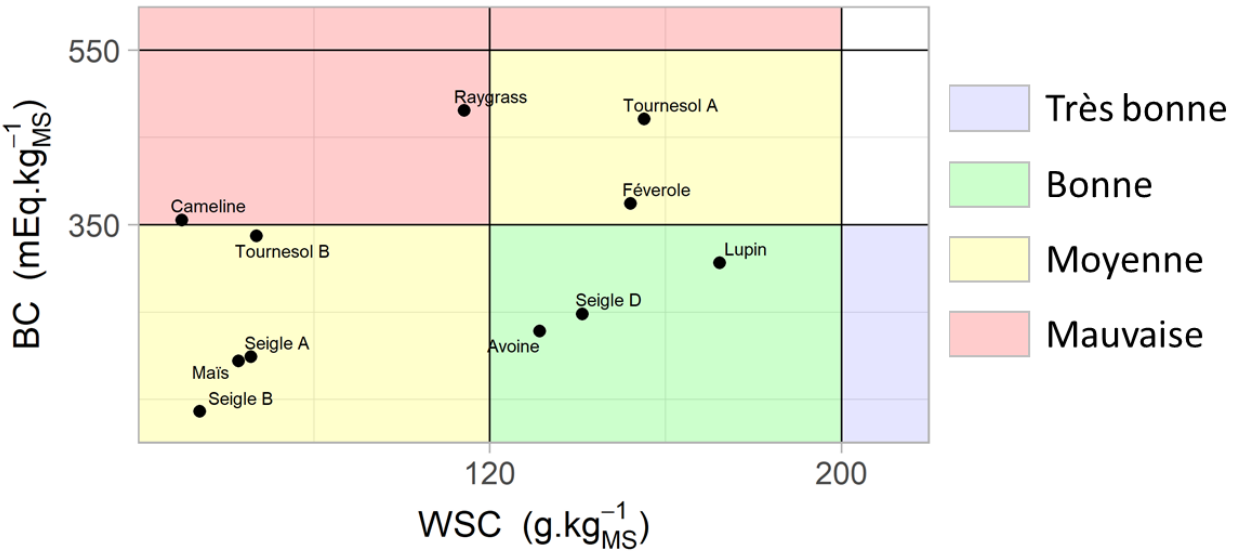

Figure 3-3 : Ensilabilité des CIMSE prélevées selon Kaiser et al. (2004).

3.5 Impact des propriétés initiales sur la fermentation d'ensilage

Le suivi cinétique de la fermentation de l'ensemble des CIMSE présentées précédemment (excepté l'avoine qui a n'a pas été stockée par ensilage) a été réalisé pendant une durée de 6 mois (à l'exception du seigle D dont la durée de stockage est de 4 mois). L'évolution de la concentration des principaux métabolites, du pH et de la production de gaz est présentée en Figure 3-4. Ce chapitre vise principalement à étudier la « qualité » des ensilages issus de CIMSE et son impact sur la préservation du potentiel méthanogène au cours du stockage. Ainsi, les mécanismes de fermentation ne seront ici présentés que de façon succincte afin de préserver une vision d'ensemble des expériences de stockage étudiées. Une description plus détaillée des successions de voies métaboliques associées à la fermentation est présentée dans les chapitres 4 et 5. Les expériences d'ensilage seront regroupées sous deux cas de figure principaux pour la discussion des résultats de ce chapitre selon que l'occurrence ou non de fermentation secondaires.

Dans la tous les cas excepté le stockage du seigle D, la fermentation a été majoritairement dominée par des mécanismes de fermentation lactique. Des concentrations finales de 50 (seigle B) à 126 g.kg$_{MV}^{-1}$ d'acide lactique ont ainsi été atteintes après 3 à 6 semaines de stockage et ont été maintenues jusqu'à la fin de la durée étudiée. L'accumulation d'acide lactique a permis un abaissement rapide du pH jusqu'à des valeurs généralement comprises entre 4 et 4,5.

Lors de l'ensilage du seigle D en revanche, la production d'acide lactique lors des premiers jours du stockage a été plus limitée et a donné lieu à une acidification plus faible. La fermentation lactique a alors été concurrencée par la production d'acides acétique et propionique avant que l'acide lactique ne soit consommé et converti en acide butyrique. Cette conversion a été accompagnée de la production d'un volume cumulé de 20,5 $NLH_2.kg_{MV}^{-1}$. Les fermentations secondaires impliquées lors du stockage du seigle D sont décrites en détail dans le chapitre 4. Deux autres cas de fermentation secondaire ont été observés. Lors de l'ensilage du seigle A, une petite partie de l'acide lactique préalablement produit a été consommée et convertie en acide butyrique, causant une élévation du pH de 0,2 points. La production d'acide butyrique a été accompagnée de celle d'hydrogène à l'état de traces laissant penser que l'hydrogène produit conjointement avec l'acide butyrique a pu être re-consommé par réaction d'homo-acétogénèse. Un autre mécanisme de fermentation secondaire a été observé lors du stockage du raygrass. Après deux mois de stockage, une grande partie de l'acide lactique a été consommée et convertie en acide acétique et 1,2-propanediol. Ce mécanisme est décrit plus en détail dans la le chapitre 4. Dans ce cas, aucune production de H_2 n'a été observée.

Afin de comprendre pourquoi certains ensilages ont connu des fermentations secondaires, les valeurs finales de pH ont été comparées aux valeurs critiques de la littérature (Figure 3-5) en fonction du taux de matière sèche donné par Pahlow et al. (2003). Il en ressort que les 3 cas de stockage où des fermentations secondaires ont été observées correspondent à des couples pH – taux de MS non optimaux. En accord avec les prédictions, le seigle D, dont la valeur est la plus éloignée de la valeur critique, a connu une fermentation butyrique la plus importante. Des additifs d'ensilage favorisation l'acidification lors de la fermentation primaire tels que des stimulants de fermentation pourraient être appliqués pour éviter ces fermentations secondaires. Contrairement aux attentes, parmi les 3 expériences d'ensilage ayant donné lieu à des fermentations secondaires, seul le raygrass avait été préalablement identifié comme ayant une ensilabilité mauvaise. Le seigle D dont l'ensilabilité était estimée comme bonne a quant à lui produit l'ensilage présentant la moins bonne qualité selon les critères de la littérature qui recommandent un pH inférieur à 4,5, une concentration en acide lactique supérieure à 30 $g.kg_{MS}^{-1}$ et une concentration en acide butyrique inférieure à 10% des AGV totaux (Bureenok et al., 2016).

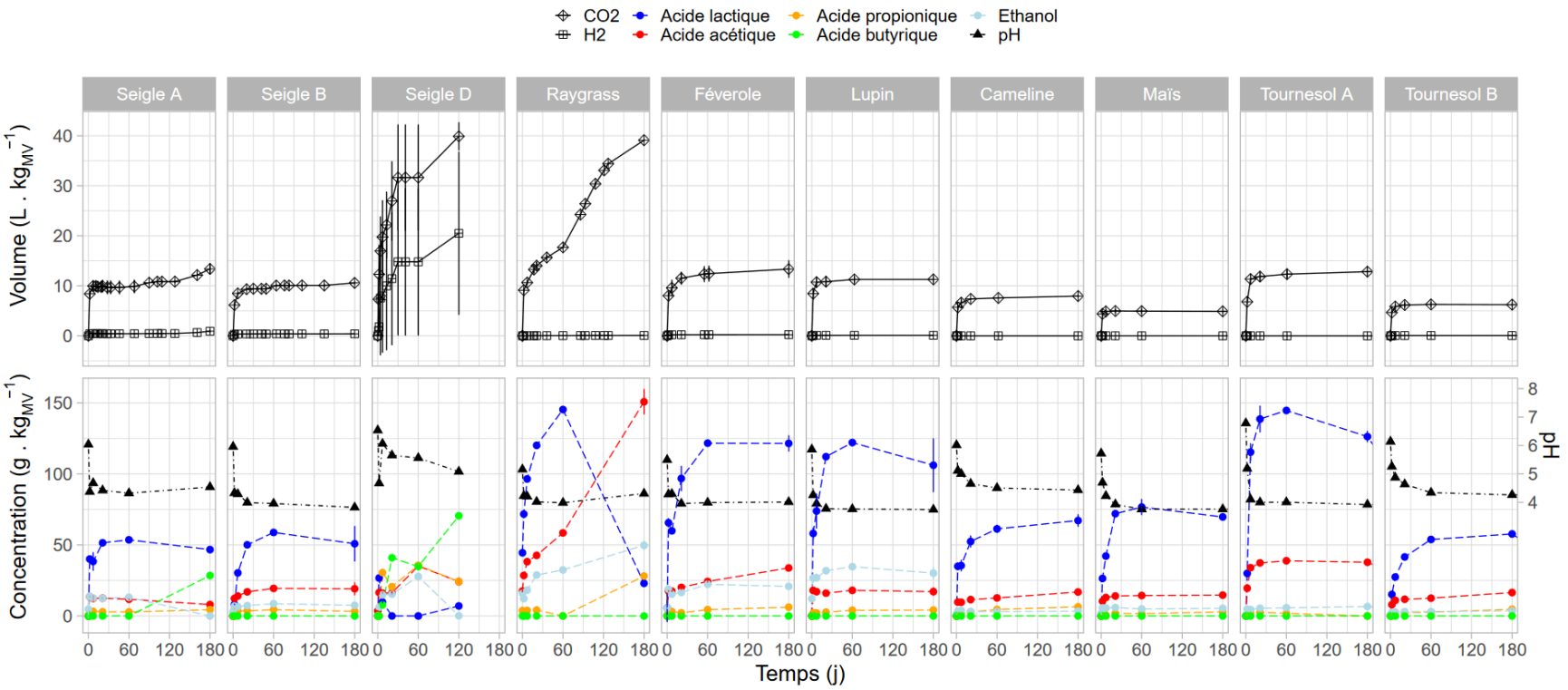

Figure 3-4 : Evolution de la concentration en métabolites, du pH et de la production de gaz au cours du stockage.

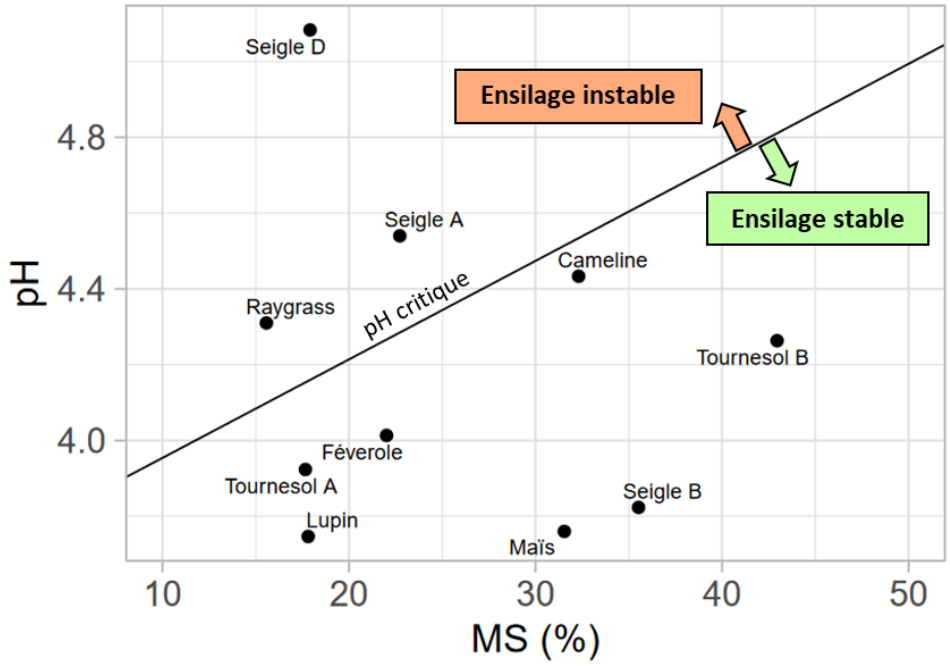

Figure 3-5 : Comparaison des valeurs de couple pH – taux de MS avec les valeurs critiques de la littérature.

Afin de faire le lien entre les caractéristiques initiales des CIVE et les propriétés de fermentation, la matrice de corrélation entre les paramètres initiaux et finaux a été calculée et est présentée en Figure 3-6. Les paramètres initiaux sélectionnés sont ceux décrits précédemment comme ayant un impact critique sur la fermentation d'ensilage (MS, WSC, BC et C/N). Les paramètres finaux permettent quant à eux de déterminer quels ont été les mécanismes de fermentation dominants et la qualité de l'ensilage obtenu selon les standards de la littérature (Bureenok et al., 2016). Ainsi, la valeur de pH ainsi que la concentration des principaux métabolites de fermentation (acide lactique, acide acétique, acide propionique, acide butyrique et éthanol) ont été retenues. Le volume cumulé de gaz de fermentations (CO_2 et H_2) a également été considéré car cette donnée est fortement liée au type de fermentation ayant eu lieu lors du stockage.

L'analyse de la matrice de corrélation permet de constater que les mécanismes de fermentation ne sont pas corrélés aux propriétés initiales des CIMSE qui ont été considérées dans le cadre de ces expériences. En effet, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre l'un des paramètres initiaux et l'un des paramètres finaux. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le déroulement de la fermentation d'ensilage est généralement conditionné par une combinaison des paramètres initiaux et non par un seul de ces facteurs, comme présenté dans la section 3.4. De plus les communautés microbiennes des CIMSE au début du stockage n'ont pas été analysées dans ce chapitre. Les différences de caractéristiques de fermentation observées entre le stockage du seigle D et celui des autres échantillons de CIVE pourraient donc s'expliquer

par la variabilité des communautés microbiennes endogènes. Ces communautés peuvent en effet avoir un impact décisif sur le déroulement de la fermentation, cette problématique est abordée dans le chapitre 4.

En revanche, des corrélations peuvent être trouvées entre les paramètres finaux décrivant les caractéristiques de la fermentation. La matrice montre que la concentration en acide lactique est fortement corrélée avec un pH final bas, ce qui confirme le rôle important de la production d'acide lactique lors de la fermentation d'ensilage (Pahlow et al., 2003). Au contraire, un pH élevé est corrélé avec des paramètres indiquant une fermentation secondaire : présence d'acide butyrique, d'acide propionique et production de H_2. Dans la littérature, la production de ces AGV à la place de l'acide lactique ou par dégradation de celui-ci est décrite comme ayant un impact négatif sur l'acidité de l'ensilage. En effet le pKa de ces composés (4.81 et 4.87 pour l'acide propionique et l'acide butyrique, respectivement) est plus élevé que celui de l'acide lactique (3.90). Les résultats montrent également que la production d'hydrogène lors du stockage est principalement liée à la fermentation butyrique, conformément à ce qui est observé dans la littérature (Pahlow et al., 2003). Elle est également corrélée à la production de CO_2 (ce gaz étant produit conjointement à l'H_2 lors de la fermentation butyrique) et à un pH élevé (favorable au développement des clostridies). La production de CO_2 est également corrélée à la présence d'acide acétique et d'acide propionique. Les voies métaboliques menant à la production de ces deux acides aboutissent en effet généralement à la production de ce gaz (Hillion et al., 2018).

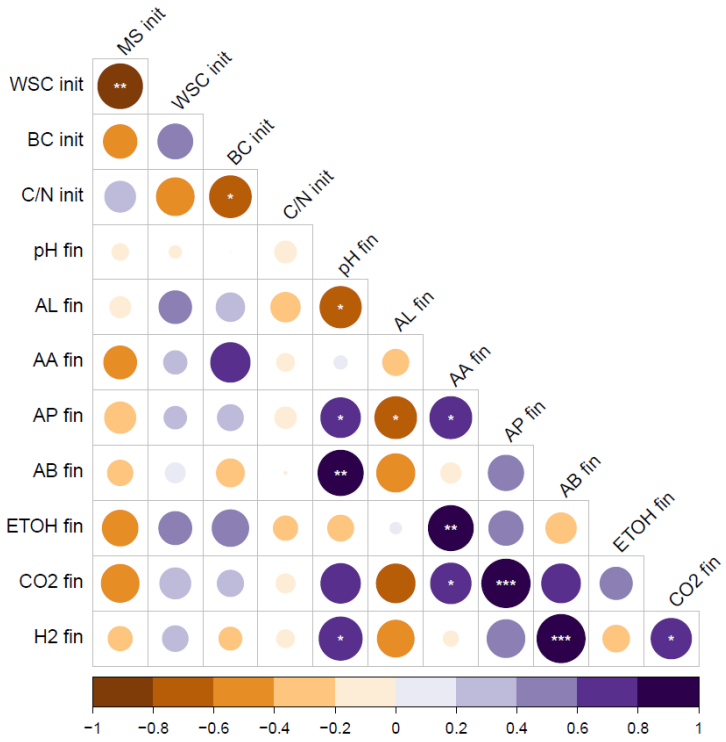

*Figure 3-6 : Matrice de corrélation calculée sur les données de caractérisation initiales des CIMSE utilisées en ensilage et les propriétés de fermentation. *** : corrélation significative avec p < 0.001 ; ** : p < 0.01 ; * : p < 0.05*

3.6 Impact des mécanismes de fermentation sur la préservation des CIMSE

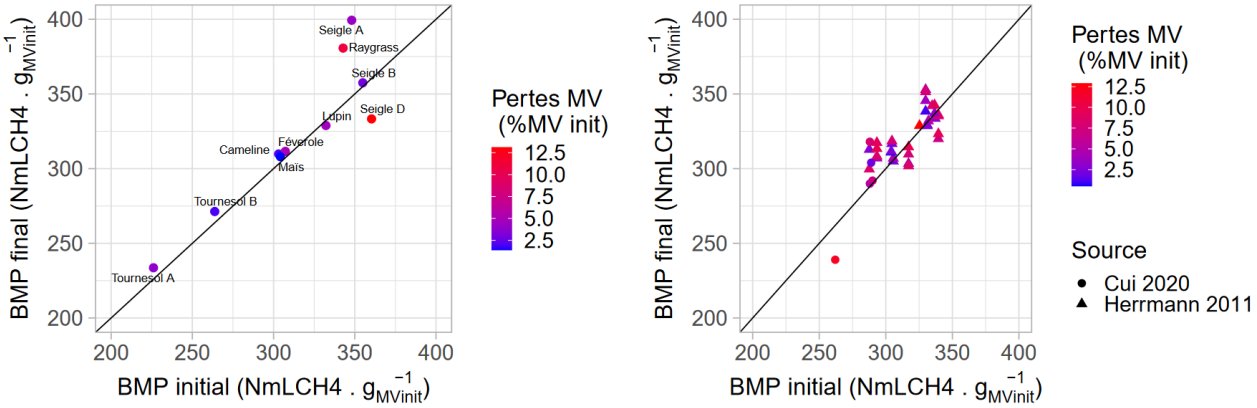

Figure 3-7 : Relation entre le BMP initial et final lors du stockage par ensilage, en fonction des pertes de MV ayant lieux lors du stockage. Gauche : résultats issus des expériences de thèse. Droite : résultats issus de la littérature (Cui et al., 2020; Herrmann et al., 2011a).

Pour évaluer les performances globales du stockage, deux paramètres ont été considérés : la préservation de la masse et la préservation du BMP. Les pertes de masse ont été mesurées par pesée des bouteilles utilisées pour le stockage à l'échelle laboratoire avant et après stockage. Il a été considéré que la masse

perdue au cours du stockage était intégralement constituée de matière volatile (MV). La valeur du BMP avant et après stockage a été décrite en rapportant la valeur de potentiel méthanogène par gramme de MV initiales, tel que décrit dans le chapitre 2. La valeur de BMP avant et après stockage par ensilage des différentes CIMSE étudiées est présentée dans la Figure 3-7. Les pertes de MV ayant eu lieu au cours du stockage sont exprimées en % de la MV initiale et déterminées par pesée des réacteurs. Cette représentation permet de montrer que le potentiel méthanogène des CIMSE est très bien préservé lors de la fermentation d'ensilage. Le graphique montre également que les variations négatives ou positives de BMP sont équitablement réparties entre les ensilages ayant connu des pertes de MV faibles ou importantes au cours du stockage. Les variations observées sont donc plus probablement dues à la précision intrinsèque de la mesure du potentiel méthanogène qu'à une évolution réelle du potentiel méthanogène au cours du stockage. Cette observation se vérifie également pour les exemples de stockage par ensilage de la littérature présentés sur la Figure 3-7.

Les potentielles corrélations entre les propriétés de la fermentation d'ensilage présentées dans la section précédente et les performances de stockage ont également été calculées et sont présentées dans la Figure 3-8. La variation (positive ou négative) du BMP lors du stockage a été calculée. Selon l'équation (3-1) :

$$Variation\ BMP\ (\%) = \frac{BMP\ final - BMP\ initial}{BMP\ initial} \qquad (\ 3\text{-}1\ )$$

Les résultats montrent que la variation du BMP au cours du stockage n'est corrélée à aucun des paramètres de fermentation étudiés. Au contraire, le BMP après stockage est très fortement corrélé au BMP avant stockage avec une p-value inférieure à 0.001. Contrairement à ce qui est présenté dans la littérature, la production d'hydrogène n'est ici pas corrélée significativement avec une dégradation du potentiel méthanogène au cours du stockage. Toutefois, étant donné qu'une seule expérience de stockage par ensilage a donné lieu à un volume significatif d'hydrogène produit lors du stockage, cette conclusion doit être vérifiée à partir d'un plus grand nombre d'expériences. La fermentation d'ensilage lors du stockage du seigle D ayant donné lieu à la production de 20,5 $NLH_2.kg_{MV}^{-1}$, cela représente une DCO de 14,7 $gO_2.kg_{MV}^{-1}$ ou 5.1 $NmLCH_4.g_{MV}^{-1}$. L'émission mesurée de H_2 aurait donc théoriquement causé la perte de 1,4% du BMP initial ce qui est inférieur à l'incertitude de la mesure. Des exemples de la littérature tendent à montrer des résultats similaires concernant la fermentation butyrique et la préservation du BMP. Lors de l'ensilage de CIMSE humides (10%MS) pendant 98 jours, des fermentations secondaires acétique et butyrique ont été observées (Teixeira Franco et al., 2017), probablement accompagnées d'une production

de H_2 (non mesurée). Pourtant, aucune perte significative de BMP n'a été observée entre 7 et 98 jours de stockage. Cui et al. (2020) ont également observé une augmentation significative du BMP de 10,4% après 60 jours de stockage par ensilage, malgré une importante fermentation secondaire butyrique.

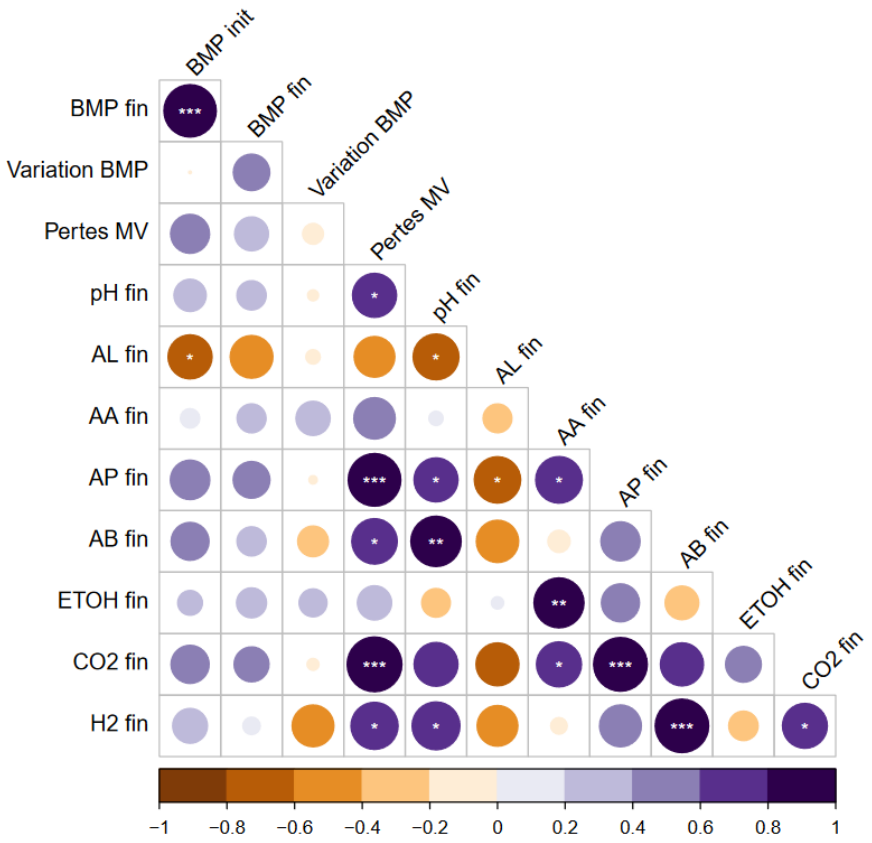

*Figure 3-8 : Matrice de corrélation calculée sur les données de fermentation d'ensilage des CIMSE et les performances de stockage. *** : corrélation significative avec p < 0,001 ; ** : p < 0,.01 ; * : p < 0,05*

La matrice montre que les pertes de matière volatile au cours du stockage sont principalement corrélées à la production de CO_2, avec une p-value inférieure à 0,001. Les pertes de MV sont également corrélées à la production d'acide butyrique, d'hydrogène et à un pH élevé, trois paramètres liés au développement d'une fermentation secondaire pendant laquelle est produite une quantité de CO_2 plus importante que lors de la fermentation lactique primaire.

En ce qui concerne le lien entre les pertes de MV et les pertes de BMP au cours du stockage, la matrice de corrélation confirme le résultat de la Figure 3-7 puisqu'aucune corrélation n'est trouvée entre ces deux paramètres. Ces résultats tendent à montrer que, dans le cadre d'une utilisation en méthanisation, l'ensilage est une technique de préservation efficace des intrants tels que les CIMSE, et ce quel que soit le déroulement de la fermentation d'ensilage.

3.7 Conclusion

Bien que les CIMSE soient souvent récoltées jeunes et humides, la concentration en sucres solubles relativement importante rencontrée chez les plantes les plus immatures permet généralement d'assurer une production d'acide lactique suffisante pour permettre une acidification efficace du substrat lors de la fermentation primaire. Certaines CIMSE présentant *a priori* des caractéristiques tout à fait compatibles avec une bonne fermentation lactique d'ensilage comme le seigle D ont toutefois donné lieu à des fermentations « indésirables » inattendues. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène réside dans la composition des communautés microbiennes épiphytes des plantes qui peut être dominée par des bactéries autres que les bactéries lactiques. L'influence de la flore microbienne endogène sur la fermentation d'ensilage est abordée dans le chapitre 4.

Les résultats de ce chapitre montrent que la fermentation d'ensilage est systématiquement accompagnée de la production de quantités variables de CO_2 pouvant représenter plus de 10% de la matière organique initiale, toutefois les pertes massiques engendrées ne causent pas de pertes de potentiel méthanogène. Par conséquent, la préservation de la masse ne doit pas être retenue comme un paramètre pertinent de l'évaluation des performances de stockage lors de la fermentation d'ensilage.

Bien que certains exemples de fermentations acétique et butyrique aient été observés, aucune dégradation significative du potentiel méthanogène n'a été observée lors de ces expériences. Les ensilages présentant des fortes concentrations en métabolites tels que le l'acide butyrique et un pH élevé semblent donc pouvoir être considérés comme de « bonne qualité » pour une utilisation en méthanisation, contrairement aux critères définis pour l'élevage : pH < 4,5, acide lactique > 30 $g.kg_{MS}^{-1}$, acide butyrique < 10% des AGV totaux (Bureenok et al., 2016). Au regard de ce critère, l'étape de fermentation d'ensilage de CIMSE réputées comme difficilement ensilables à cause d'un taux d'humidité élevé ne semble pas être une source de risques dans le cadre de la méthanisation. Par conséquent, les expériences présentées dans ce chapitre montrent que la fermentation d'ensilage ne semble pas conduire à des pertes significatives de potentiel méthanogène, et ce malgré l'apparition de fermentations secondaires jusqu'ici jugées comme indésirables. Cependant, la production d'hydrogène est restée contenue ce qui explique l'impact limité de la fermentation sur le potentiel méthanogène dans les travaux présentés. Dans le cas où un volume supérieur d'hydrogène serait produit, le risque de perte de potentiel méthanogène serait supérieur.

Le stockage par ensilage ne se limite toutefois pas uniquement à l'étape de fermentation, et de nombreux mécanismes peuvent être responsables de dégradations du substrat. Parmi les propriétés physico-chimiques des CIMSE présentées dans la section 3.3 de ce chapitre, l'humidité moyenne élevée risque

d'entrainer la production de volumes importants d'effluents d'ensilage lors du stockage. Ces effluents sont riches en composés à haut pouvoir méthanogène et sont une source importante de pollution des eaux de surfaces. L'étude de leur gestion lors de l'ensilage des CIMSE pour la méthanisation est abordée dans le chapitre suivant. En particulier, l'ajout de co-substrats absorbants peut permettre de réduire la production d'effluents d'ensilage, toutefois leur addition peut avoir un effet sur la fermentation d'ensilage voire rendre possible une activité méthanogène au cours du stockage en fonction de leurs propriétés. Bien que les résultats de ce chapitre tendent à montrer que la fermentation d'ensilage ait un effet limité voire nul sur les performances de stockage, le déroulement de la fermentation sera étudié dans le chapitre 4 pour confirmer ou infirmer ces premiers résultats.

Dans le cadre des expériences présentées dans ce chapitre, des exemples de fermentation secondaire d'ensilage ont été observés. L'activité microbienne induite n'a pas généré de dégradation significative du potentiel méthanogène, cependant des pertes plus importantes pourraient survenir dans les cas d'une production plus importante d'hydrogène ou d'un début de la réaction de méthanogénèse. Les résultats de ce chapitre ont confirmé que l'activité microbienne était efficacement inhibée par l'acidification de la biomasse lors de la fermentation d'ensilage, mais une diminution du pH insuffisante entraîne la survenue de fermentations secondaires. De façon analogue aux conditions acides, des conditions alcalines obtenues grâce à l'addition d'un réactif tel que la chaux pourraient permettre d'inhiber l'activité microbienne à long terme. En plus de préserver la biomasse, cette méthode pourrait apporter une fonction de prétraitement en permettant la délignification de la lignocellulose par l'action de la chaux. Toutefois, dans le cas où une inhibition efficace de l'activité microbienne ne serait pas obtenue, l'addition de chaux aux CIMSE lors du stockage pourrait mener à des voies de fermentation se déroulant à un pH élevé bien différentes de celles qui sont rencontrées lors de l'ensilage « classique » des CIMSE. L'impact de la fermentation d'ensilage dans ces conditions particulières sur la fermentation d'ensilage sera également étudié dans le chapitre 5.

4 Etude de l'application du co-ensilage pour l'amélioration du stockage par ensilage des CIMSE humides.

4.1 Introduction

Les expériences présentées dans ce chapitre visent à améliorer les propriétés du stockage de CIMSE ayant été récoltées avec un taux de matière sèche inférieur à la valeur optimale de 28-30%. Deux problématiques principales liées au stockage par ensilage de ces récoltes ont été identifiées. Premièrement, le développement d'entérobactéries et de clostridies peut se produire, entraînant la production de métabolites tels que l'acide butyrique et l'acide propionique. Le stockage par ensilage de plantes humides est également associé à la production de volumes importants d'effluents d'ensilage dont l'acidité et la forte concentration en matières organiques peuvent être une source de pollution, de corrosion des installations et de perte de potentiel méthanogène.

Ce chapitre étudie des méthodes qui visent à contrôler la fermentation d'ensilage de CIMSE humides et à réduire le volume d'effluent produit lors du stockage. Les résultats et discussions sont présentés sous forme de deux articles. Dans le premier, deux techniques pouvant être utilisées pour rehausser le taux de matière sèche d'une plante après récolte ont été comparées : le préfanage et le co-ensilage. La capacité de ces deux méthodes à modifier la fermentation d'ensilage a été étudiée grâce à une expérience de stockage de raygrass sous trois conditions : ensilage direct, ensilage préfané et co-ensilage avec un substrat modèle (paille).

Le second article s'intéresse à la compréhension du procédé de co-ensilage et à son optimisation. Un paramètre d'optimisation du dosage du co-substrat basé sur sa capacité de rétention en eau a été déterminé grâce à une expérience de co-ensilage de tournesol avec une charge variable de paille de blé. L'impact de l'addition de différents co-substrats sur les performances générales du stockage a ensuite été étudié avec l'addition de papiers et cartons souillés, tiges de miscanthus, copeaux de bois, fumier de cheval et fumier de poulet à une récolte de seigle. L'impact de l'addition de ces co-substrats sur la fermentation d'ensilage a été étudié grâce à un suivi cinétique de l'évolution des métabolites et des populations microbiennes réalisé pendant six mois. La production d'effluents et la préservation du potentiel méthanogène ont également été étudiés.

4.2 Co-ensiling and field wilting investigated as preparation methods for the ensiling of a wet harvested catch crop for biomethane production

C. VAN VLIERBERGHE[1,2], H. CARRERE[1], N. BERNET[1], G. SANTA-CATALINA[1], S. FREDERIC[2], R. ESCUDIE[1]

[1] *INRAE, Univ. Montpellier, LBE, 102 Avenue des étangs, F-11100, Narbonne, France.*

[2] *GRDF, 9 rue Condorcet, F-75009, Paris, France*

Cet article a été soumis en Février 2022 à la revue *Renewable Energy.*

Abstract

Early harvested cover crops usually present a high moisture content that makes them difficult to store by ensiling because of effluent production and undesirable butyric fermentation. In order to increase the solid content of ryegrass, field wilting (29.0 %TS) and co-ensiling with wheat straw (27.4% TS) were performed and compared with a direct storage of the crop (18.4% TS). The storage experiments were conducted at lab scale and monitored during 180 days to evaluate the fermentation pathways and changes in microbial community structure and methane potential. The addition of straw did not change the fermentation pathway during the ryegrass silage, while field wilting slowed down and decreased the occurrence of secondary fermentations. Despite the presence of secondary fermentations and VS losses up to 11%, the methane potential was efficiently preserved in all conditions. Wheat straw addition should be considered as an alternative to field wilting when unfavorable weather conditions are met.

Keywords

Anaerobic digestion, catch crops, intermediate crops, silage fermentation, field wilting, biogas

4.2.1 Introduction

Because the share of fossil fuels in the global energy mix must decrease in the coming years due to their high emissions of greenhouse gases, the development of low-impact renewable energy is expected. To this extent, biomethane is an interesting option for natural gas substitution. Anaerobic digestion (AD) for biogas and biomethane production is thus facing an increasing development. This technology accepts a wide range of biomasses as feedstocks such as sewage sludge, bio-waste collected from households and catering activities, byproducts of agro-industry and agricultural residues. Among the possible substrates, cover crops (or intermediate crops) (CC) are being increasingly used for biogas production. Cover crops are grown during the intercultural period of food or feed crops and allow a better valorization of crop rotations without causing a high competition with food crops (Szerencsits et al., 2015). CC also deliver many agronomical services by avoiding bare ground during the intercultural period, which can be beneficial for the reduction of nitrate leaching (Igos et al., 2016), accumulation of organic matter in the soil (Jian et al., 2020b), decrease in erosion (Jian et al., 2020b) and control of undesirable weeds (Büchi et al., 2020). However, increasing the share of CC in the feeding of biogas plants brings some new issues. While anaerobic digesters are usually fed continuously all over the year, the harvesting period of CC only takes place once or twice a year, which makes an efficient storage of the feedstock mandatory for their efficient valorization.

The storage of wet harvested crops for biogas production is mainly done by ensilage. This process, which has been used for forage conservation in livestock farming since the end of the 19th century, relies on the bacterial fermentation and acidification of the substrate under anaerobic conditions. The ensiling process is made of several phases that have been well described in the literature (Weinberg and Ashbell, 2003). In short, for silage making, crops are harvested using a forage harvester and crushed finely. Silos are filled with the harvested crops, compacted and sealed. After a short aerobic phase of around 24 h during which the remaining oxygen is consumed by the plant cells and respiration of various microorganisms, the silage fermentation starts. The easily accessible water-soluble carbohydrates (WSC) are then converted mainly to lactic acid, but also to volatile fatty acids (VFA) and alcohols in variable proportions, depending on the mechanisms involved. The accumulation of lactic acid and VFA causes a drop in pH to a value between 4 and 5 that inhibits microbial activity, allowing the preservation of the biomass over several months until its use in the digester.

The ensiling performance greatly depends on the substrate characteristics and silo preparation (Teixeira Franco et al., 2016). Among them, the TS content of the crop is one of the key parameters for silage characterization and performance. It is commonly admitted that the ideal TS for crop ensiling fits in the

range of 30-40%TS (Kaiser et al., 2004), even if a relatively lower TS range from 26 to 36% was reported to be more suitable for ensiling of cereals, maize and grass for biogas production (Villa et al., 2020). In fact, the definition of the adequate TS for ensiling is a complex compromise between several parameters to be optimized. A higher TS content prevents undesirable fermentations that may cause degradations (Borreani et al., 2009; Woolford and Pahlow, 1998) and decreases the cost of transportation by limiting the total mass of the harvested crops. However, a crop that is excessively dry makes difficult to compact the silo, which is important to reduce the amount of trapped air and air penetration in the silo and the aerobic degradation of the organic matter at the silo closing and opening (Wilkinson and Davies, 2013).

On the other hand, silage from crops with a low TS content is more prone to promote undesirable fermentations. Wet silages are more likely to facilitate the growth of bacteria responsible for butyric fermentation such as *clostridia* (Teixeira Franco et al., 2016). The butyric fermentation is commonly pointed out as undesirable in silage since it is accompanied by H_2 production, leading to energy losses (Kreuger et al., 2011). Butyric fermentation may also cause a higher pH due to the production of butyric acid (pKa 4.82) instead of lactic acid (pKa 3.86), which may lead to a start of the overall anaerobic microbial activity, causing the spoilage of the stored crop.

In order to face issues related to high moisture, some practices are applied by farmers to control the TS content of harvested crops. When harvested at a lower than optimal TS content, crops can be field-wilted, which consists in letting the crop laid out on the field after mowing for natural air-drying. When good weather conditions are met, field wilting is an efficient method that allows a fast increase of the crop TS. When proper wilting conditions are met, low degradation of the harvested crop thereby occurs (McEniry et al., 2014; Sousa et al., 2019) and the increase in TS has been shown to increase silage fermentation and the energetic preservation of crops in some cases. Borreani et al. (2009) showed that wilting allowed to reduce the butyric concentration and mass losses in faba bean and field pea. However, wilting did not sufficiently increase the TS content of white lupine (14.2 to 17.3%TS) and no beneficial effect was obtained. The authors however found a significant correlation between high moisture and low quality silage (i.e, with butyric acid and mass losses). Other studies however found that, if wilted silage was well preserved over 110 days, the unwilted control did not undergo Biochemical Methane Potential (BMP) losses due to fermentation (McEniry et al., 2014). However, unfavorable weather conditions may lead to extended wilting duration of up to 48 hours with a limited effect on TS (Pakarinen et al., 2008), causing significant losses of mass and energy potential related to aerobic microbial activities (Teixeira Franco et al., 2017). In

this case, field wilting must be avoided and direct ensiling appears to be a better option. However, silage effluent concerns have to be considered.

As an alternative to field wilting to increase TS content, the use of an additional substrate with high TS content and high liquid absorption capacity has been studied previously in the literature. Diverse co-substrates have been studied such as straw and stalks of different crop species (Haigh, 1998; Razak et al., 2012). Among the different co-substrates, straw is an interesting option thanks to its high TS and relatively good availability on agricultural biogas plants. In addition, straw has an interesting biogas potential due to its high content in cellulose and hemicelluloses. Several papers in the literature focused on the use of straw to co-ensile diverse wet products. Hillion et al. (2018) reported efficient storage performances of sugar beet leaves co-ensiled with wheat straw over 6 months. However butyric fermentation could not be avoided and traces of methanogenic activity were pointed at the end of the experiment, which could have led to higher BMP losses over longer storage time. In addition, no comparison with direct ensiling of sugar beet leaves was made. Feng et al. (2019) investigated the effect of co-ensiling of a cover crop with barley straw at different mixture ratios and found a good preservation over a storage period of 4 months with high quality silages (pH ≤ 4.2). However, neither the measurement of fermentation gas production nor a mass balance was performed, making difficult to evaluate the global effect of ensiling on the cover crop.

These results from the literature suggest that co-ensiling with straw could constitute an interesting alternative to field wilting, since good BMP preservation performance can be achieved. However, the difference between the impact of field wilting and co-ensiling with straw on silage fermentation and the influence on BMP preservation still needs to be further investigated. Indeed, increasing the TS of the mixture by adding a co-substrate may have a different effect on fermentation mechanisms than field wilting. To the authors' knowledge, direct comparison between direct cut, wilted and co-ensiled silage has never been reported for biogas production from CC. This paper aims to compare the physico-chemical transformations and fermentation dynamics of each method and their effect on the preservation of the methane potential of a cover crop. Particular attention was paid to metabolic pathways, mass balance and final energetic potential through BMP tests in order to evaluate to what extent co-ensiling was able to influence silage fermentation. The microbial community dynamics also allows a better understanding of the mechanisms involved.

4.2.2 Material and methods

4.2.2.1 Feedstock

The crop was an Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivated as a winter cover crop on an agricultural site (Lycée du Gros Chêne, Pontivy 56300, France). The ryegrass was harvested at the booting stage (BBCH 40-45) at the end of April 2019, and mowing occurred during the afternoon. Field wilting was performed overnight and final harvesting for ensiling was done in the following morning. Favorable wilting conditions were met during the harvesting afternoon (bright sun, 15°C). Two different samples were collected. The first was separated directly after mowing for direct ensiling assay. The second sample was collected after field wilting. For co-ensiling experiments, wheat straw was used (ZOLUX S.A.S., France).

4.2.2.2 Storage conditions and ensiling experiment

Three different storage conditions were applied. Silage of the crop directly cut (i.e., named DC) was made using the ryegrass collected directly after mowing, while silage of pre-wilted crop (PW) was made with the wilted ryegrass. Finally, the co-ensiling condition (CE) was prepared using the same substrate as the DC condition, to which shredded wheat straw was added to reach a final TS content close to the PW condition (150 g of straw per kg of ryegrass, on fresh matter basis). For the different experiments, the substrates were chopped to 1 – 2 cm particle size using a garden shredder (AXT 2550TC, Bosch GmbH). Storage experiments were conducted in 2.6 L glass bottles sealed with air-tight lids equipped with a rubber septum that allows pressure measurement and gas sampling. Six replicates were prepared for each storage condition to be sacrificed after 2, 7, 21, 60 and 180 days of storage to monitor the impact of different storage conditions on biomass conservation and on fermentation kinetics. 700 g of sample were packed into the bottles which were then flushed with N_2 to remove oxygen.

4.2.2.3 Silo monitoring, sampling and physicochemical analysis

The physical-chemical analyses were performed at the Bio2E platform (Bio2E, 2018). Both the production of fermentation gas and mass losses were regularly monitored. The gas composition was analyzed by gas chromatography (Perkin Elmer Clarus 580) as described by Hillion *et al.* (2018). The gas production was measured using a pressure difference method. Pressure measurement was performed using a high precision manometer (Keller LEO® 2) and gas release was made when the pressure rose above 1.2 bar, immediately followed by weighing of the bottles. The volume of gas contained in the bottle (pore space + head space) was calculated by subtracting the volume of the added biomass to the one of the bottle. The biomass volume was calculated using the following equation of McNulty *et al.* (1982) for the theoretical density of silage (4-1):

$$\rho_t = (M/\rho_l) + (1 - M)/\rho_s \qquad (4\text{-}1)$$

where M = moisture content ($g \cdot g_{FM}^{-1}$); ρ_l = liquid or water density = 1000 kg/m^3; ρ_s = dry matter density = 1421 kg/m^3.

When one of the defined storage durations was reached, a replicate of lab-scale silo was opened after final gas and weight measurement. The whole sample was homogenized and finely shredded using a knife mill (Pulverisette 11, Fritsch). The amounts of total solids (TS) and volatile solids (VS) were determined from 30 g samples (triplicate). TS were determined by oven drying (105°C, 24 h) and VS were then measured by calcination of the dry residue at 550°C for 3 h. The TS value measured by oven drying was corrected in order to take into account of the volatilization of lactic acid, VFAs and alcohols following the equation of Porter & Murray (Porter and Murray, 2001) (4-2):

$$TS_C = TS_M + 0.375\,LA + 0.892\,VFA + 0.975\,Alcohols \qquad (4\text{-}2)$$

where TS_C = corrected TS; TS_M = measured TS; LA = lactic acid concentration; VFA = total VFA concentration; Alcohols = total alcohols concentration. All concentrations are in $g.kg_{FM}^{-1}$.

For the analyses of pH, WSC, VFA and other metabolites, water extractions were performed in triplicate following the protocol of Porter & Murray (Porter and Murray, 2001) by soaking 30 g (FM) of samples in 150 mL of deionized water for 16 h at 4°C in sealed plastic pots. pH measurement was performed directly after extraction on the mixture. For the quantification of soluble compounds, the liquid phase was centrifuged (18750 g, 20 min, 4°C), filtered (0.2 µm nylon filter) and analyzed by High Performance Liquid Chromatography on Aminex 4PX-87H column (Bio-Rad) at 45°C. Sulfuric acid (0.005 M; 0.3 mL/min) was used as mobile phase. WSC content was calculated as the sum of glucose, xylose, arabinose and fructose.

BMP was measured in batch assay from frozen samples in triplicate. 550 mL flasks were used, with a working volume of 400 mL. Concentrations of 5 $gTS.L^{-1}$ substrate and 5 $gVS.L^{-1}$ inoculum (granular sludge from paper mill UASB) were used. $NaHCO_3$ buffer (50 g/L), macro- and microelement solutions were added as described by Monlau et al. (2012). An automatic batch system was used for agitation and gas measurement (AMPTS II, Bioprocess Control, Sweden). The endogenous gas production of the inoculum was estimated using control reactors containing only inoculum, and subtracted to the actual methane production. Two methods of calculating and presenting the value of BMP were used were used depending on the objective. To estimate the specific biodegradability of a sample, BMP was expressed in $NmLCH_4.gVS_{added}^{-1}$ considering the VS content of the sample. However, in order to evaluate the global balance of storage on methane potential, BMP was expressed in $NmLCH_4.gVS_{initial}^{-1}$, considering the VS

content of the raw sample before ensiling, taking into account the potential mass losses that may occur during storage.

4.2.2.4 Microbial community analysis

A 300 mg sample was collected for each sampling time of the storage experiment and stored in a 2 mL sterile tube at -20°C. DNA extraction, sequence data analysis and quantitative PCR were performed as described by Venketishwaren et al. (2016). Sequencing was performed at the technology platform Genome and Transcriptome (GeT) of the Génopole Toulouse, France. OTUs with a relative abundance of > 1.5% in at least one sample were selected for further analysis. The generated sequencing datasets are registered in the Sequence Read Archive (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) under the BioProject accession number PRJNA788459.

4.2.2.5 Statistical analysis

To statistically assess the occurrence of significant differences between samples, one-way analysis of variance was performed with R package "rstatix" for BMP after normality (Shapiro-Wilk test) and variance homogeneity (Levene test) verifications. To assess the significance of differences between two samples, pair-wise t-test adjusted with Bonferroni method was further performed.

4.2.3 Results and discussion

4.2.3.1 Raw material characterization

The physicochemical characteristics of the different substrates are presented in Table 4-1. The fresh cover crop from direct cut (DC) had a low TS content of 18.4 ± 0.3 %. This moisture level is reported in the literature to promote secondary clostridial fermentation and the production of liquid effluent (Teixeira Franco et al., 2017). The pre-wilted cover crop (PW) had a much higher TS content of 29.0%, that makes it more suitable for favorable ensiling conditions (Villa et al., 2020). Both crops were characterized by a relatively high WSC content with concentrations in DC and PW of 113 and 172 $g.kg_{VS}^{-1}$, respectively, which are mandatory for silage fermentation. Glucose and fructose were the most represented WSC, in agreement with other forages from temperate regions (Downing et al., 2008a). WSC was higher in raw PW sample than in DC one. This difference can be explained by an aerobic hydrolysis of complex carbohydrates and cell breakdown that occurred during field wilting, which induced a release of non-structural carbohydrates. This phenomenon was observed by Zhang *et al.* (Zhang et al., 2020) after a short wilting of whole mulberry crop. Wheat straw had a much higher TS content of 90.4%, which is an interesting characteristic for co-ensiling with wet crops. WSC content of wheat straw was low compared to raw crops, with only 15 $g{\cdot}kg_{VS}^{-1}$. In the literature, wheat straw is described as a substrate with a low concentration in WSC (Hillion et al., 2018; Yang et al., 2006). The mixture of ryegrass and wheat straw for co-ensiling (150

g of straw per kg of ryegrass, on fresh matter basis) had a TS content of 27.4 ± 3.2, close to the one of PW. Due to straw addition, the WSC content of the mixture (70 $g.kg_{VS}^{-1}$) was lower than the one of DC, which is however in the optimal range of 60-80 $g \cdot kg_{VS}^{-1}$ recommended in the literature to obtain favorable silage conditions (da Silva et al., 2017). Both wilted and unwilted crops had a relatively low nitrogen content with C/N ratios of 25.9 and 30.7, respectively, which is in agreement with the values reported in the literature (Zebarth et al., 2009) for Italian ryegrass (C/N from 20 to 30). The lower nitrogen content measured in the wilted crop may be explained by aerobic degradations that have been reported to increase the protein breakdown in forages (Kaiser et al., 2004). The C/N ratio of wheat straw was very high (81.4) which lowered the nitrogen content of the co-ensiled condition (i.e., 38.3).

Table 4-1: Physicochemical characteristics of the substrates

	Direct cut silage	**Wilted silage**	**Co-ensiling**	**Wheat straw**
pH	5.2 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.2 ± 0.1	6.4 ± 0
TS (%FM)	18.4 ± 0.3	29.0 ± 0.2	27.4 ± 3.2	90.4 ± 0.1
VS (%FM)	16.7 ± 0.2	26.7 ± 0.0	25.2 ± 3.0	84.2 ± 0.1
VFA ($g.kg_{VS}^{-1}$)	21. ± 0.6	11.1 ± 0.6	9.9 ± 2.1	4.0 ± 0.2
LA ($g.kg_{VS}^{-1}$)	44.0 ± 1.9	28.0 ± 2.3	13.9 ± 2.7	n.d.
WSC ($g.kg_{VS}^{-1}$)	112.9 ± 4.4	172.6 ± 4.5	69.6 ± 14.3	14.8 ±0.7
EtOH ($g.kg_{VS}^{-1}$)	15.7 ± 0.3	7.4 ± 0.5	4.2 ± 1	n.d.
N (%TS)	1.6	1.4	1.1	0.5
C (%TS)	42.1	42.4	42.9	42.6
C/N	25.9	30.7	38.3	81.4

4.2.3.2 Effect of co-ensiling and wilting on silage fermentation

The silage fermentations were monitored at lab scale over six months. Figure 4-1 summarizes the variations in the main fermentation characteristics during the ensiling of ryegrass under the three different conditions: direct cut silage (DC), pre-wilted silage (PW) and co-ensiling (CE). The changes in the bacterial community structure are presented in Figure 4-2 and Figure 4-3. In order to evaluate the impact of straw addition on ryegrass fermentation in co-ensiling, two calculation methods were used for this storage condition, depending on whether wheat straw is considered as an inert substrate or a substrate involved in the fermentation. As a consequence, for coensiling experiment, metabolites concentrations and gas productions were expressed per gram of ryegrass VS and per gram of VS of the mixture (i.e., ryegrass and straw). Whatever the conditions, the silage fermentation kinetics can be split into 2 main periods (Figure

4-1). During the first period, a primary heterolactic fermentation occurred (section 4.2.3.2.1), while, during the second one, secondary fermentations partly consumed the lactic acid (Section 4.2.3.2.2).

4.2.3.2.1 Impact of storage method on primary fermentation

Whatever the conditions, the first two months of storage are characterized by a fast lactic acid production and pH drop. The production of lactic acid reached 140, 91 and 87 $g.kg_{VS}^{-1}$ in DC, WS and CE, respectively (Figure 4-1), while acetic acid and ethanol accumulated in lower concentrations, showing that heterolactic fermentation pathways occurred. The lactic-to-acetic acid ratio ranged from 2.3 to 2.8, which is in the range of optimal values (2.5 to 3.0) reported in the literature for adequate silage fermentations (Kung et al., 2018). No other VFA than acetic acid were measured in significant concentration. As fermentation metabolites were produced, the WSC were consumed. After 2 months of storage, the remaining WSC concentration represented 5.7, 34.2 and 5.7% of their initial values for DC, PW and CE, respectively. A considerably higher amount of residual WSC was found in PW at the end of primary fermentation. Several studies of the literature reported a similar phenomenon in wilted silage. This is due to the fact that properly wilted crops tend to acidify and stabilize faster than wet crops, resulting in a lower WSC consumption during primary fermentation (Kaiser et al., 2004; Wilkinson and Davies, 2013). Residual WSC may constitute an easily available substrate for aerobic microorganisms at silo opening and are therefore reported as undesirable in silage (Wilkinson and Davies, 2013).

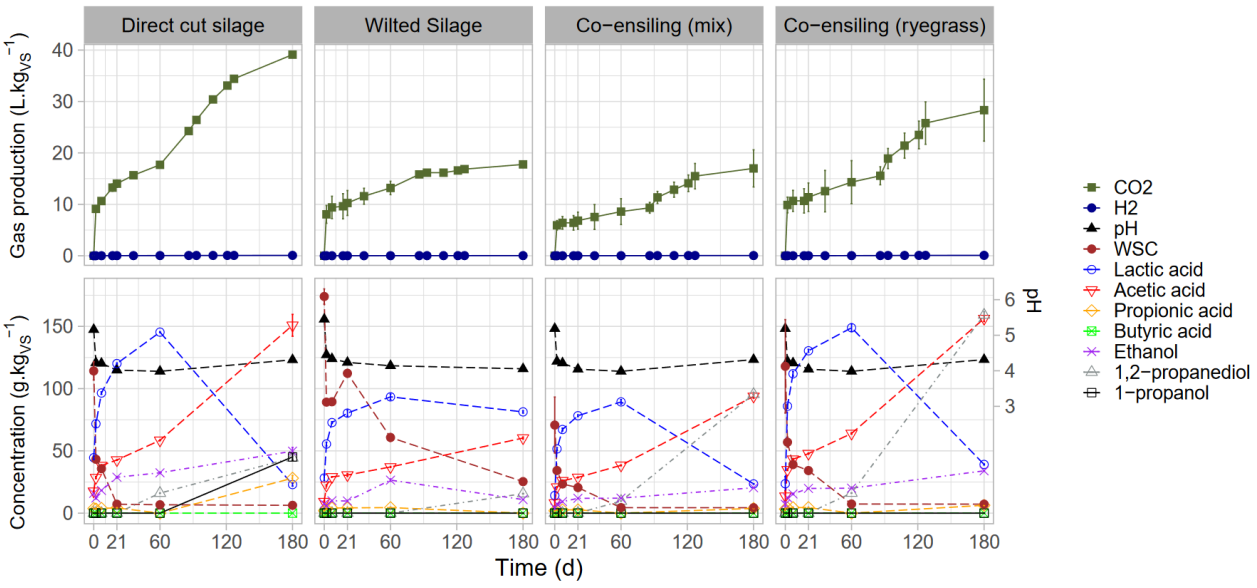

Figure 4-1 : Variation in pH, WSC and metabolites and cumulated fermentation gas during storage. Direct cut silage, Wilted silage and Co-ensiling (ryegrass) concentrations are expressed in g per kgVS of ryegrass. Co-ensiling (mix) concentrations are expressed in g per kgVS of (ryegrass + straw) mix. WSC : Water soluble carbohydrates.

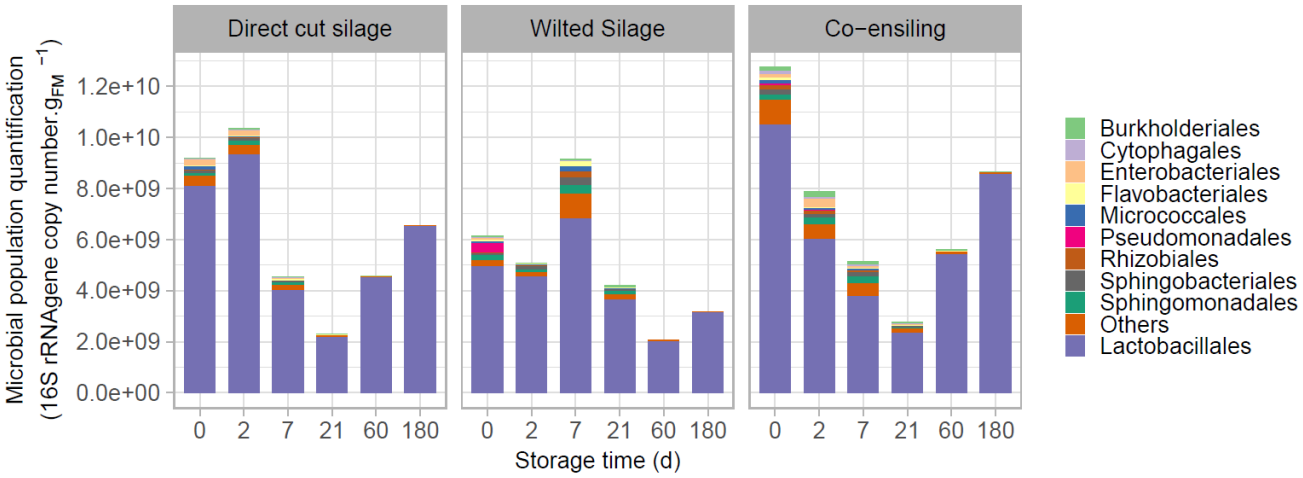

Figure 4-2: Microbial abundance and repartition between the main bacterial orders

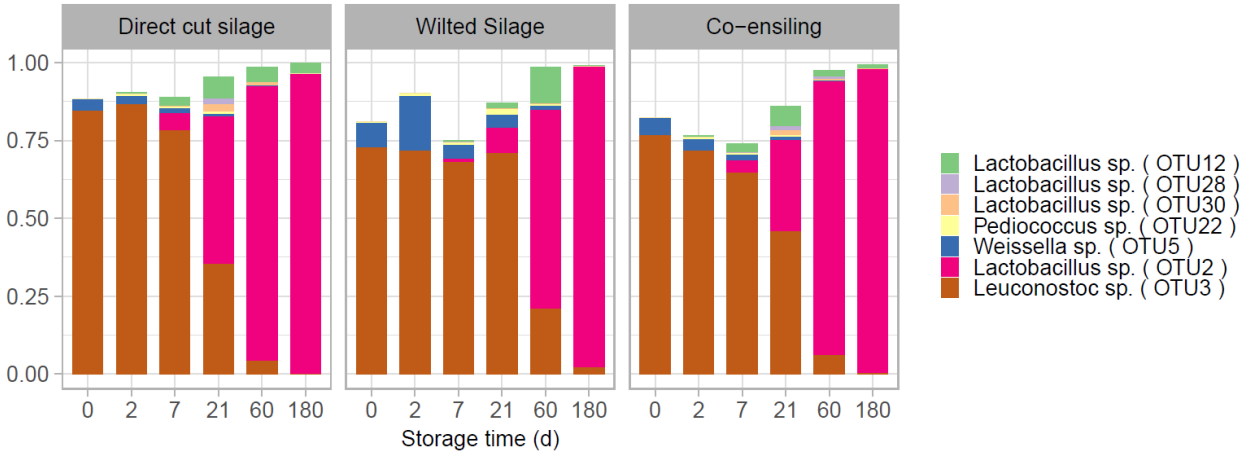

Figure 4-3: Lactobacillales proportion at the genus level.

WSC degradation caused a consumption of 114.0, 121.7 and 69.8 $gO_2 \cdot kg_{VS}^{-1}$ in equivalent COD (considering a COD of 1.07 $gO_2 \cdot g^{-1}$ for glucose and fructose). At the same time, the equivalent COD related to the measured accumulated metabolites raised by 200.0, 140.3 and 142.7 $gO_2 \cdot kg_{VS}^{-1}$ in DC, PW and CE, respectively. The difference between the degraded COD of WSC and the accumulated COD under the form of metabolites shows that additional WSC were continuously released as more complex compounds were hydrolyzed. In DC, lactic acid accumulated to a higher level than in PW and CE. In the literature, silage with low TS were reported to have a considerably higher concentration in acids (Kung et al., 2018). All pH dropped to an acidic value of 4, however the acidification was slightly slower in PW. According to Kalač

(Kalač, 2011), the acidification allowed to reach a pH below the critical value in relation to the TS of crops in all conditions, which can be attributed to the sufficient amount of WSC that was available for lactic fermentation in all conditions. As metabolites were released, a fermentation gas was produced, and it was mostly composed of CO_2 since only traces of H_2 were detected (Figure 4-1). It is interesting to compare the concentrations of metabolites produced during silage of ryegrass alone (DC) and its co-silage (CE) with straw. If the concentrations are expressed in $g.kg_{VS\ mix}^{-1}$ (i.e., VS of straw and ryegrass are considered) they are higher for DC than for CE. However, by expressing them in $g.kg_{VS\ ryegrass}^{-1}$ for CE (i.e., VS of ryegrass is only considered), the concentrations of the most abundant metabolites (e.g., lactic acid and acetic acid) are similar for DC and CE. This suggests that the straw behaves like an inert material with respect to the fermentation, and thus that the lower concentration of metabolites (expressed in $g.kg_{VS\ mix}^{-1}$) in CE than in DC may be due to a dilution effect. In addition, this hypothesis is also confirmed by the fact that the fermentation profile was not influenced by straw addition, and very similar kinetics were observed between DC and CE when they are expressed in $g.kg_{VS\ ryegrass}^{-1}$ (Figure 4-1). Wheat straw addition is thus not expected to improve the primary fermentation in the case of the storage of a crop of poor ensilability. However, if the case of a crop whose properties are compatible with an efficient primary fermentation (e.g. high WSC content), wheat straw addition may be considered in order to avoid silage effluent production without interfering with fermentation.

During the start-up of primary heterolactic fermentation phase in silage, it is expected that the microbial abundance first increases to reach its maximum after a few days. In the present experiment however, the microbial abundance did not rise significantly or even decreased for CE (Figure 4-2), which is likely due to the fermentation start during transport, as microbial abundances were already high at the beginning of the experiment. In all storage conditions, the microbial communities were mainly dominated by a lactic acid bacteria (LAB), identified as *Leuconostoc sp.* (OTU3) (Figure 4-3). Among *Leuconostoc* species, *L. mesenteroides* is an epiphytic bacteria that is commonly found on plants leafs and generally initiates the fermentation following heterolactic pathways (Daeschel et al., 1987; Pahlow et al., 2003). As the medium acidified, *Leuconostoc sp.* (OTU3) progressively decreased due to its low tolerance to acidic conditions (Daeschel et al., 1987). This decrease occurred later in PW than in DC and CE, due to the slower acidification of the wilted crop.

The analysis of primary fermentation in the 3 silage conditions shows that field wilting and co-ensiling had few influence on the first steps of fermentation of ryegrass. The three storage conditions allowed an efficient acidification of the substrate and led to high quality silage according to the standards of the

literature (Kung et al., 2018; Teixeira Franco et al., 2016; Villa et al., 2020). However, wilted ryegrass presented a higher residual WSC concentrations at the end of this phase, which could lead to lower aerobic stability in case of early opening of the silo.

4.2.3.2.2 Impact of storage method on secondary fermentation

Secondary fermentations started after about the third week of storage and became the predominant mechanism after about 2 month. The apparent WSC concentration of PW continued to decrease, but a residual amount of 24 $g.kg_{VS}^{-1}$ was still present in the end of storage. On the opposite, WSC were almost completely consumed after 21 days and 60 days in DC and CE, respectively, suggesting a slower and more limited fermentation in PW.

For silages DC and CE, the secondary fermentation was characterized by a strong decrease in lactic acid concentration, which was converted into acetic acid, 1,2-propanediol and ethanol. The conversion of lactic acid into acetic and 1,2 propanediol is a fermentation pathway that is regularly observed in silage and mostly attributed to *Lactobacillus buchneri.* This metabolism has been shown to preferentially occur in acidic conditions as anaerobic conversion of lactic acid was observed at pH as low as 3.8 (Oude Elferink et al., 2001). Those conditions are met in the present study, since all pH remained between 4.0 and 4.3. Additionally, in DC only, 1,2-propanediol was further converted into 1-propanol and propionic acid, which is likely due to anaerobic bacteria that are distinct from *L.buchneri* (Danner et al., 2003; Krooneman et al., 2002). In the literature, 1-propanol is commonly found in silage but at a concentration lower than 10 $g.kg_{VS}^{-1}$ (Hafner et al., 2013; Oude Elferink et al., 2001; Weissach and Strubelt, 2008) while concentrations of almost 90 $g.kg_{VS}^{-1}$ were measured here. In PW, lactic acid consumption was much more limited, with a decrease of only 13% between the days 60 and 180. Consequently, a smaller amount of 1,2-propanediol was measured. Interestingly, no ethanol release was observed, unlike in DC and CE conditions, suggesting that a different fermentation pathway occurred. In the literature, *L. buchneri* is reported to convert one mole of lactic acid into approximately 0.5 mole of acetic acid, 0.5 mole of 1,2-PDO and traces of ethanol (Oude Elferink et al., 2001). In the present study, the stoichiometric yields associated with a decrease of 1 mole in lactic acid concentration were calculated in order to investigate the metabolic mechanisms that may have occurred and are presented in Table 4-2. Assuming that all the 1-propanol and propionic acid present in DC came from 1,2-propanediol conversion, a decrease in lactic acid concentration in DC was accompanied by the production of 1.05 mole of 1,2-propanediol. These conversion yields suggest that, after day 60, lactic acid was still continuously produced from the solubilization of carbohydrates and converted into acetic acid and 1,2-propanediol in DC and CE, as the lactic acid concentration present in the medium at day 60 could not explain itself the amount of acetic acid and 1,2-propanediol. This

hypothesis may be confirmed by the variation of COD accumulated in the form of metabolites. In DC and CE, the COD of metabolites rose from 311 to 487 $g.kg_{VS}^{-1}$ and 181 to 315 $g.kg_{VS}^{-1}$, respectively, between days 60 and 180.

Table 4-2: Stoichiometric variation yields in metabolites concentration ($mol.mol^{-1}$) associated with the consumption of 1 mol in lactic acid concentration between day 60 and 180.

	Acetic acid	**Ethanol**	**1,2-propanediol**	**1-propanol**	**Propionic acid**
DC	+ 1.07	+ 0.25	+ 0.24	+ 0.54	+ 0.27
PW	+ 2.60	- 2.36	+ 1.35	-	-
CE	+ 1.12	+ 0.21	+ 1.36	-	_

For PW condition, the decrease in lactic acid was associated with 1,2-propanediol production with approximately 1:1 ratio (mole:mole), similarly as in DC and CE. In PW, WSC may have been continuously converted into lactic acid and then into 1,2-propanediol during this period, which may explain the 1:1 conversion ratio that was measured instead of the 1:0.5 theoretical value from the literature. The stoichiometric yields of other metabolites differed from the other conditions, with a higher acetic acid yield, and a decrease in ethanol yield. However, little actual variation in metabolites concentration occurred between day 60 and 180 in PW, and it can be considered that few changes occurred, in comparison with the significant secondary fermentations that took place in DC and CE. In addition, the total COD of metabolites remained stable at approximately 200 $g.kg_{VS}^{-1}$. The difference in secondary fermentation kinetic and intensity between PW and the other conditions can also be observed by the production of fermentation gas (Figure 4-1). For DC and CE, after a decrease in CO_2 production rate from days 7 to 60, the gas production started again, as lactic acid was converted into acetic acid (Hillion et al., 2018). For DC, CO_2 production did not restart, which confirms the apparent stabilization of this storage condition. Metabolite concentrations of CE in g per kg_{VS} of ryegrass were calculated (Figure 4-1). Again, when reporting the metabolite concentrations in $g.kg_{VS\ ryegrass}$, concentrations of the predominant metabolites were similar for CE and DC, even if 1,2- propanediol was further converted into 1-propanol and propionic acid in DC condition. Considering the final concentrations in metabolites and fermentation mechanisms, CE was consequently found to be more similar to DC than PW, suggesting again that wheat straw mostly acted as an inert substrate.

The secondary fermentations observed during this phase were associated with a second phase of bacterial growth in all conditions (Figure 4-2). This growth occurred earlier in DC and CE conditions, and bacterial

abundances increased from $2.30 \cdot 10^9$ to $6.54 \cdot 10^9$ and $2.76 \cdot 10^9$ to $8.65 \cdot 10^9$ rRNA gene copy number$\cdot g_{FM}^{-1}$, respectively. For PW, the bacterial growth occurred later and was more limited, with only an increase from $2.08 \cdot 10^9$ to $3.18 \cdot 10^9$ rRNA gene copy number$\cdot g_{FM}^{-1}$. This difference between DC, CE and PW is consistent with the observed variation in metabolites composition, since PW underwent a more limited and slower secondary fermentation than DC and CE. In all conditions, a switch in bacterial population was observed between the first and second phase of fermentation. *Leuconostoc sp.* (OTU3) was replaced by *Lactobacillus sp.* (OTU2) as the dominant OTU (Figure 4-3). Given the observed fermentation pathway that was previously described with the conversion of lactic acid into acetic acid, 1,2-propanediol and ethanol, OTU2 is likely to be close to *L. Buchneri* (Oude Elferink et al., 2001).

Similarly, as for primary fermentation, wheat straw addition was not shown to interfere with fermentation mechanisms and did not avoid secondary fermentation to happen. On the opposite, field wilting greatly reduced the re-consumption of lactic acid. However, the secondary fermentations that occurred here may be beneficial for the overall storage performance of ryegrass. Indeed, acetic acid is a better inhibitor of yeast and mould development. The inhibition of yeast and moulds increases the aerobic stability of silage at opening, leading to lower methane potential losses. According to the literature, due to their high acetic acid and/or high moisture content, DC and CE samples are expected to be more resistant to aerobic degradations than PW samples (Danner et al., 2003; Herrmann et al., 2015; Wilkinson and Davies, 2013). Additionally, the high amount of WSC found in PW at the end of storage may be detrimental to aerobic stability (Wilkinson and Davies, 2013), while no residual WSC were found in DC and CE.

4.2.3.3 Impact of co-ensiling and wilting on mass losses and BMP preservation

The different fermentation pathways that occurred during the silage storages were accompanied by a CO_2 release that induced mass losses. The mass losses, expressed in g per kg VS of mixture or ryegrass, are presented in Figure 4-4. Considering the results reported to VS of mixture, wilting had a beneficial effect on VS preservation, since only 4.9% losses occurred. In comparison, direct ensiling of the catch crop (DC condition) resulted in a doubling of the mass loss with a value of 10.9%. Co-ensiling with straw allowed to lower the VS losses of the mix to 6%. However, by considering losses reported to VS of ryegrass only, no difference in VS losses was observed between DC and CE, which suggested again that the addition of wheat straw had few impact on silage fermentation and ryegrass conversion. The VS losses are in agreement with values reported in the literature (Kaiser et al., 2004) (from 5% for heavily wilted crop to 12% for unwilted crop).

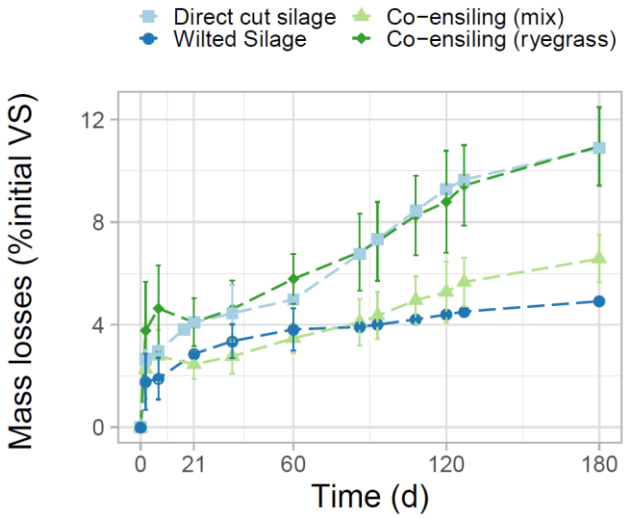

Figure 4-4: VS losses over storage for the different silage conditions. DC, PW and CE (ryegrass) concentrations are expressed in g per kgVS of ryegrass. CE (mix) concentrations are expressed in g per kgVS of (ryegrass + straw) mix.

In order to evaluate the preservation of the methane potential, BMP were measured for the three different storage conditions after 0, 7, 60 and 180 days of storage (Table 4-3). The initial BMP before storage were 222 ± 6, 343 ± 18 and 391 ± 10 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$ for wheat straw, DC and PW, respectively. The BMP of the raw substrates were comparable with the ones found in the literature, with values ranging between 178 – 283 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$ (Feng et al., 2019; Hillion et al., 2018; Larsen et al., 2017b) and 180 – 410 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$ (Murphy et al., 2011; Nolan et al., 2016; Pakarinen et al., 2008) for wheat straw and fresh ryegrass, respectively. The fresh mixture of wheat straw and ryegrass had a BMP of 329 ± 45 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$, which is in agreement with the BMP of the substrates alone according to their respective fraction in the mixture (theoretical value of 295 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$).

BMP measured along the silage storage were expressed in terms of $NmLCH_4 \cdot gVS_{added}^{-1}$ or $NmLCH_4 \cdot gVS_{initial}^{-1}$, in order to evaluate the impact of ensiling on the specific degradability of the substrate and to carry out the global assessment of the methane potential during storage. For DC, the specific degradability significantly increased during storage, reaching a 25 % higher methane potential after 180 days of storage ($p < 0.05$). For PW and CE, the variations in biodegradability are smaller with -7% and +8% changes in BMP, respectively, but those changes were not considered as significant. After taking into account the VS losses that occurred during storage, the variation in BMP (expressed in $NmLCH_4 \cdot gVS_{initial}^{-1}$,) between the initial substrate and the silage after 180 days of storage were +11, +12 and +0 %. These differences were not statistically significant according to the pair-wise t-test corrected with Bonferroni method.

Table 4-3: Variation of BMP during storage. BMP expressed in $NmLCH_4 \cdot gVS_{add}^{-1}$ refer to the degradability of the analyzed sample while BMP expressed in $NmLCH_4 \cdot gVS_{initial}^{-1}$ take into account the VS losses that occurred during storage. Within a column, different capital letters (AB) express a statistical difference ($p<0.05$) between two samples of the same storage duration. Different lowercase letters (ab) express a statistical difference ($p<0.05$) between two samples of the same storage condition stored for a different duration.

Condition	Storage time (d)	BMP $NmLCH_4 \cdot gVS_{add}^{-1}$	BMP $NmLCH_4 \cdot gVS_{initial}^{-1}$
Wheat Straw	0	222 ± 6 A	222 ± 6 A
DC	0	343 ± 18 Ba	343 ± 18 Ba
	7	344 ± 23 Aa	334 ± 22 Aa
	60	363 ± 23 Aab	345 ± 22 Aa
	180	428 ± 40 Ab	381 ± 36 Aa
PW	0	391 ± 10 Ba	391 ± 10 Ba
	7	346 ± 7 Aa	339 ± 7 Bb
	60	384 ± 26 Aa	369 ± 25 Aab
	180	364 ± 21 Ba	346 ± 20 Aab
CE	0	329 ± 45 Ba	329 ± 45 Ba
	7	305 ± 15 Aa	297 ± 15 Ba
	60	328 ± 23 Aa	317 ± 22 Aa
	180	354 ± 18 Ba	331 ± 17 Aa

The fact that BMP of DC samples significantly increased during storage when reported in $NmLCH_4 \cdot gVS_{added}^{-1}$ but not when reported in $NmLCH_4 \cdot gVS_{initial}^{-1}$ is likely due to the fact that the methane potential was concentrated in the remaining material as mass was lost as CO_2. Indeed, high production of 1,2-propanol and 1-propanol occurred. Lactic acid (BMP = 374.5 $NmLCH_4 \cdot g^{-1}$, estimated from theoretical COD) was converted in more energetically dense 1,2-propanediol (588 $NmLCH_4 \cdot g^{-1}$) and 1-propanol (840 $NmLCH_4 \cdot g^{-1}$). At the same time, only CO_2 was released as gas, which caused mass losses, but no BMP losses (Kreuger et al., 2011). These results explain why the methane potential of the crops was well preserved for all conditions despite of relatively high mass losses.

4.2.4 Conclusion

In all tested conditions, silage storage allowed to preserve efficiently the methane potential of ryegrass. While wilting decreased secondary fermentation, straw addition did not interfere on fermentation. Wheat straw addition in silage should be considered to face storage issues like effluent production, but is not appropriate to drive the silage fermentation like field wilting. In order to conclude on the relevance of

straw addition as an alternative to wilting, a focus on silage effluent retention should be made. The effect of a larger variety of co-substrates on silage fermentation should also be explored.

4.2.5 Acknowledgements

National Research and Technology Association (ANRT) is gratefully acknowledged for the PhD grant allocated to Clément Van Vlierberghe under CIFRE convention N° 2018/0706. The authors express their gratitude to Pascal Daniel from "Lycée du Gros Chêne" for providing the ryegrass samples.

4.3 Improving the storage of cover crops with co-ensiling: effect on fermentation and effluent production

C. VAN VLIERBERGHE[1,2], A. CHIBOUBI[1], H. CARRERE[1], S. FREDERIC[2], N. BERNET[1], R. ESCUDIE[1]

[3] *INRAE, Univ. Montpellier, LBE, 102 Avenue des étangs, F-11100, Narbonne, France.*

[4] *GRDF, 9 rue Condorcet, F-75009, Paris, France*

Article prévu pour une soumission à *Waste Management*

Abstract

Cover crops harvested at a low maturity stage generally have a high moisture content, which may generate energy losses during silage storage via effluent production and undesirable fermentations. This paper investigates the use of absorbent co-substrates as a method for increasing the solid content of cover crops before ensiling. The relation between the absorbent water holding capacity and silage effluent volume was first studied to find an effective parameter to prevent effluent production. The impact of different co-substrates (including bio-wastes and manures) on overall ensiling performances was then investigated at an optimized absorbent loading. All co-substrates allowed an efficient effluent retention, and the silage fermentation was modified or mostly unchanged depending on the co-substrate chemical and microbial properties. In most conditions, the methane potential of the crop was efficiently preserved over a storage of 60 days. Co-ensiling was shown to be a relevant silage preparation method for biogas production.

Keywords

Anaerobic digestion ; biogas ; silage effluents ; co-ensiling ; cover crops storage ; fermentation

4.3.1 Introduction

Cover crops, also called catch crops or intermediary crops, are receiving an increasing interest to be used as a substrate for anaerobic digestion. These crops are cultivated during the intercultural period of main crops, and bring agro-ecological services by limiting soil erosion, nitrate leaching and the need for mineral fertilizers (Molinuevo-Salces et al., 2013). In agricultural biogas sector, cover crops allow to produce a large amount of biomass for methane production, without competing with the production of food or feed crops. Due to the management of crop rotations, cover crops are usually harvested once or twice a year. Since the biogas digesters are fed continuously, an efficient storage of the crops from their harvest to their final use in anaerobic digesters is mandatory. The storage of fresh fodder or energy crops is commonly performed by ensiling (Teixeira Franco et al., 2016). This storage process relies on the fermentation of the substrate, mostly by lactic acid bacteria. In the anaerobic environment of the storage silos, the water soluble carbohydrates (WSC) are fermented into lactic acid and other metabolites, causing a pH drop to about 4 (Woolford and Pahlow, 1998). The combination of acidic pH and anaerobic environment then ensures the inhibition of microbial activity over the whole storage duration.

The performance of ensiling greatly depends on silo confection practices and crop characteristics (Teixeira Franco et al., 2016). Among the key parameters, the total solids (TS) content of the crop has a major influence on storage performances. For biogas production, a TS range from 26 to 36% has been reported to be optimal (Villa et al., 2020). Silage production from lower TS crops may lead to fermentation pathways dominated by Clostridia, characterized by butyric acid and H_2 production (Woolford and Pahlow, 1998). In silage production for animal feeding, clostridial fermentations are highly undesirable because of the possible development of pathogenic microorganisms, poor palatability and decrease in feed value (Woolford and Pahlow, 1998). In silage production for biogas production, such issues are less relevant, but clostridial fermentation is reported to induce energy losses due to the production of H_2 (Kreuger et al., 2011). However, the overall effect of clostridial development in silage for biogas remains to be investigated, since energy losses may be compensated by an increase in lignocellulose hydrolysis and biomass degradability (Cui et al., 2020). Another issue with the silage of low TS crops is the high production of liquid effluents (Gebrehanna et al., 2014). For TS values lower than 25%, hundreds of litters of effluent can seep per ton of ensiled crop (Bastiman and Altman, 1986; Sutter, 1957). If not collected and valorized properly, silage effluents may cause methane potential losses (Teixeira Franco et al., 2016) and surface water pollution (Holly et al., 2018). In addition, silage effluents can generate significant odor nuisance (Keck et al., 2018) that greatly threatens the local acceptance of biogas plants (Schumacher and

Schultmann, 2017), and they can also cause corrosion of steel and concrete (Koenig and Dehn, 2016). As a consequence, silage effluent production is reported to be highly undesirable in biogas plants.

Because they are grown during short periods and/or with unfavorable weather conditions, cover crops are often harvested at a low maturity stage which is associated to a low TS. TS of less than 20% are commonly met in cover crops (Molinuevo-Salces et al., 2013), and significant volumes of effluents are expected during the storage of such crops. In order to avoid this issue, various practices can be adopted, such as field wilting or the addition of an absorbent co-substrate. Field wilting consists in a partial open-air drying of the freshly mowed crop prior to its storage and can result in an efficient increase in TS when proper conditions are met (Borreani et al., 2009). This method is however weather-dependent and unsuitable conditions may make wilting inappropriate (Teixeira Franco et al., 2017). The addition of a dry co-substrate presents the advantage of being independent from weather conditions, and co-ensiling a wet organic matter with a substrate having absorbent properties allows to immediately increase the TS of the pre-silage mixture and avoids the effluent production (Jones and Jones, 1996). In the literature, diverse co-substrates have been studied like the straw and stalks of different crop species (Haigh, 1998; Razak et al., 2012), rice, barley and wheat bran (Haigh, 1999; Razak et al., 2012), dried beet pulp (Fransen and Strubi, 1998; Haigh, 1999; Razak et al., 2012), ground barley (Khorvash et al., 2006), dry bean hulls (Razak et al., 2012), newspaper (Fransen and Strubi, 1998), sodium bentonite (Fransen and Strubi, 1998; Khorvash et al., 2006; Woolford et al., 1983) and various polymers (Fransen and Strubi, 1998; Healy et al., 1997), with different liquid holding efficiencies. These co-ensiling experiments were mainly applied for silage production for animal feeding, and thus most of the tested co-substrates are edible. In the context of anaerobic digestion, the strategy for selecting co-substrates is different, since as an example, high value edible substrates like ground barley or dried beet pulp should be avoided. On the other hand, non-edible substrates compatible with anaerobic digestion can be considered.

This study focuses on the use of waste-like and/or agricultural byproducts as absorbent substrates in ensiling prior to anaerobic digestion. The first objective was to evaluate the behavior of a well-studied absorbent substrate (wheat straw) as a co-ensiling substrate with sunflower, in order to define the adequate co-substrate loading. In a second part, the influence of the addition of various co-substrates (soiled paper and cardboard, wood chips, miscanthus straw, chicken manure and horse manure) on the ensiling of rye was investigated. Production of effluent, metabolites and gas as well as the influence on microbial community structure and the preservation of methane potential were analyzed during two

months of storage, in order to propose a global understanding of the addition of co-substrate on silage storage.

4.3.2 Material and Methods

The experiments and physico-chemical analyses were performed at the Bio2E platform (Bio2E, 2018).

4.3.2.1 Catch crops and co-ensiling substrates

Two catch crops, sunflower and rye, were kindly provided by RAGT Semences and Biométhagri, respectively. Sunflower cover crop was harvested in Cintegabelle (Haute Garonne, France) at BBCH stage 65 (full flowering) in September of 2020. The BBCH maturity scale is described by Uwer et al. (Meier, 2018). Rye cover crop was collected in Florensac (Hérault, France) at BBCH 59 (end of heading). These crops were hand harvested using a sickle, at cutting height of about 10 cm. Sunflower was chopped using a garden shredder (AXT 2550TC, Bosch GmbH) and a knife mill (BB230, BLiK®) and further frozen at -20°C until use. Rye was chopped according the same protocol, but was used directly after for storage experiments.

Concerning the co-substrate, a wheat straw, commercialized as a bedding material, was used (ZOLUX S.A.S., France). Soiled paper and cardboard (named Paper) were separated from kitchen wastes. Wood chips (Wood) were collected in a sawmill that processes different wood species (Ets Guille, Narbonne, Aude, France). Miscanthus stalks (*M. x giganteus Britannique,* Misc) were supplied by INRAE AgroImpact (Estrées Mons experimental unit, Péronne, 80203, France). Chicken manure (Chicken M) was collected on a chicken farm (GAEC d'Empare, Saint Marcel Sur Aude, Aude, France). Horse manure (Horse M) was collected at a horse riding club (Narbonne Equitation, Narbonne, Aude, France). Both manures contained cereal straw as a bedding material.

4.3.2.2 Silage storage experiments

4.3.2.2.1 Experimental setups

Two different storage protocols were used, depending on the objective.

For the monitoring of silage effluent production, the experiments were conducted in mini-silos made of PVC pipe of 100 mm inner diameter and 800 mm height (6.3 L volume), in a similar configuration to that described by Savoie et al (2002). The filling was carried out by adding, in a successive way, layers of approximately 200 mm of loose catch crop which were compacted using a hydraulic press (20-ton capacity, KS Tools GmbH) until the targeted packing density. The packing density was applied as recommended by Latsch and Sauter (2014) (Fresh matter basis – FM): 800 $kg.m^{-3}$ for 20% TS forage ; 700 $kg.m^{-3}$ for 25% TS forage ; 650 $kg.m^{-3}$ for 30% TS forage. Packing density of intermediate levels of TS were calculated by linear interpolation. The silos were closed, and two tamps allowed to measure the gas volume and composition

and to collect the liquid effluent at the bottom. In order to avoid air penetration, liquid effluent drainage was performed at most once a day. The effluent was characterized as described in section 4.3.2.2.4. Experiments were performed in duplicate and operated for 2 months. The silos and their content were weighted before and after storage.

For the dynamic monitoring of silage fermentation, 2.6L glass bottles were used, as previously described (Van Vlierberghe et al., 2021). This storage method was used in addition to storage in PVC silos for the co-ensiling of rye, in order to allow a higher number of replicates for dynamic monitoring of storage. For each storage condition, several replicates were prepared to be sacrificed after 2, 7, 21 and 60 days of storage in order to carry out a complete physico-chemical and microbial analysis of the samples during the ensiling process as described in section 4.3.2.2.5.

A 60-day storage period was chosen as sufficient for fine effluent and fermentation characterization. Previous studies of the literature reported that the peak flow of effluent production usually occurs during the first days of storage, with 90% of the total volume being usually released during the 20 to 26 first days of storage (Mayne and Gordon, 1986). Concerning fermentation, most of the transformations that may occur usually happen during the first weeks of storage (Woolford and Pahlow, 1998).

4.3.2.2.2 Co-ensiling of sunflower with straw with variable absorbent loading

A first round of experiments was only conducted in tubular PVC silos. Five different ratios of wheat straw were tested: 0, 40, 80, 150 and 250 $g \cdot kg_{sunflower}^{-1}$, on a fresh matter basis. In each reactor, 3 kg_{FM} of sunflower were added, and the amount of wheat straw was adapted in order to match with the desired loading. A first layer of wheat straw was added and packed, and sunflower was then added on top, and packed (protocol called "bottom"). A second protocol, named "mixed", was also carried out for the ratio of wheat straw of 40 $g \cdot kg^{-1}$; sunflower and straw were homogenized before filling into the silos. 6 different storage conditions were thus tested.

4.3.2.2.3 Co-ensiling of rye with diverse co-substrates at a determined absorbent loading.

This storage experiment was conducted both in tubular PVC silos and bottle silos, in order to evaluate the impact of the type of co-substrate on the volume of effluent produced and on the fermentation and microbial community structure, respectively. Five different co-substrates were used (soiled paper and cardboard, miscanthus stalks, wood chips, chicken manure and horse manure) and rye was used as catch crop. One ensiling condition containing only rye was also prepared as a control. The calculation of the loading of each co-substrate was based on the expected cumulated effluent volume of rye ensiled alone ($mL \cdot kg_{FM}^{-1}$) and the measurement of water holding capacity (WHC) (see section 4.3.2.2.6). In each PVC silo,

3 kg_{FM} of rye were added. The amount of absorbent was adapted in order to match with the desired loading. In glass silos, 700g of mixture were added, with the same co-substrate/rye ratio as in the PVC silos.

4.3.2.2.4 Silage effluent characterization

Silage effluents from tubular silos were characterized by their volume and their chemical oxygen demand (COD) at most once a day, depending on the flow rate. COD was determined by colorimetric method (Aqualytic® COD Vario 0-1500 $mgO_2.L^{-1}$) after 1/100 dilution.

4.3.2.2.5 Physicochemical analysis of solid samples

The cover crops, co-substrates and their mixtures were characterized as follows. Total solids (TS) were determined by oven drying (105°C, 24h). Volatile solids (VS) were measured by calcination of the dry residue (550°C – 3h). A TS correction method for Lactic acid, VFA and alcohols volatilization was applied as described by Porter and Murray (2001). For pH, ammonia, WSC, and metabolites analysis, a water extraction of the solid samples was made according to the protocol of Porter and Murray (2001). 30 g of freshly collected sample were soaked in 150 mL of distillated water for 16 h to 20 h at 4°C in sealed plastic pots in triplicate. pH measurement was made directly on the mixture after extraction. The liquid phase was then separated by centrifugation (18750 g, 20 min, 4°C) and stored at -20°C until analysis. The quantification of WSC, VFA and metabolites was performed on the liquid extract by HPLC, and ammonia measurement was made by titration with boric acid using a Gerhardt® Vapodest 50 s® carousel. The total carbon (TC) and total nitrogen (TN) were determined via an elemental analyzer (FlashSmart®, Thermo Fisher Scientific®) on finely grounded freeze dried samples.

Biochemical methane potential (BMP) were made according to the recommendations of Holliger et al. (2016). Samples for BMP tests were previously prepared by freezing a certain amount of substrate containing around 2 g_{TS} of sample (exact TS and VS were calculated later). BMP values were calculated following two different methods depending on the objective. Methane potential expressed as the volume of methane per amount of VS added ($NmLCH_4.gVS_{add}^{-1}$) are useful to estimate the substrate degradability before and after storage. BMP reported to the initial amount of VS after taking into account the mass losses that occur during storage ($NmLCH_4.gVS_{init}^{-1}$) are mandatory to assess the global balance of silage storage on energy potential.

The buffering capacity (BC) of the fresh cover crops, co-substrates and mixtures was measured following the method of Playne and McDonald (1966). 10 g of finely shredded samples were put in 250 mL of distillated water. This mixture was first titrated under agitation to pH 3 with a solution of 0.1 N HCl in order

to release bicarbonate as carbon dioxide, and then titrated to pH 6 with a solution 0.1 N NaOH. BC was expressed as mequiv of NaOH per kg of dry matter to elevate the pH from 4 to 6, after correction for the titration of a 250 mL water blank.

For microbial community analysis, 300 mg of fresh medium were sampled and stored at -20°C in a 2mL sterile tube. DNA extraction, sequence data analysis and quantitative PCR were performed as described by (Venkiteshwaran et al., 2016). Sequencing was achieved at the technology platform Genome and Transcriptome (GeT) of the Génopole Toulouse, France. OTUs with a relative abundance of > 1.5% in at least one sample were selected for further analysis.

4.3.2.2.6 Water holding capacity and preliminary effluent volume estimation

The water holding capacities of co-ensiling substrates were characterized. WHC was measured following a protocol adapted from Marsac *et al.* (Marsac et al., 2019b). 10 g of shredded substrate were introduced into a nylon bag (4 x 12 cm, ~30 µm pore size, FibreBag ref. 10-0127, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Germany). The bags were soaked in tap water for 2 hours and then centrifuged (200 g, 10 min) into a 500 mL bottle with a draining material in the bottom (i.e., glass balls). WHC measurements were performed in triplicate. WHC was calculated as the amount of water that was hold in the sample after centrifugation, as follows (4-3):

$$WHC = \frac{m_h - m_r}{m_r} \qquad (4\text{-}3)$$

with WHC the Water Holding Capacity ($g.g^{-1}$), m_r the mass of raw sample (g) and m_h the mass of humidified sample after soaking and centrifugation (g).

A preliminary estimation of effluent volume to be produced by the cover crop during storage was made as follows. First, effluent volume estimations from Bastiman (1986) (4-4) and Sutter (1957) (4-5) were calculated.

$$V_{Bastiman} = 767 - 53.4 \times \mathrm{TS} + 0.936 \times \mathrm{TS}^2 \qquad (4\text{-}4)$$

$$V_{Sutter} = 672 - 22.40 \times \mathrm{TS} \qquad (4\text{-}5)$$

wWith V = cumulated silage effluent volume per ton of fresh crop ($L.t_{FM}^{-1}$) and TS = Total Solid content ($kg.kg_{FM}^{-1}$). From these values, $V_{effl\ expect}$ was calculated as the average value between $V_{Bastiman}$ and V_{Sutter},

based on previous experiments (not shown). This estimation was used for the calculation of co-substrates loadings in the rye storage experiment following equation (5-14).

$$Cosub = \frac{V_{effl\ expect}}{WHC} \qquad (4\text{-}6)$$

where Cosub represents the co-substrate loading ($g_{FM\ co\text{-}substrate}.kg_{FM\ crop}^{-1}$), $V_{effl\ expect}$ the expected effluent volume ($mL \cdot kg_{FM\ crop}^{-1}$) and WHC the Water holding capacity of the co-substrate ($mL \cdot g_{FM\ co\text{-}substrate}^{-1}$).

4.3.2.3 Statistical analysis and data representation

One-way analysis of variance was made on BMP results after verifying both the normality (Shapiro-Wilk test) and the variance homogeneity (Levene test) with R package "rstatix". A pair-wise t-test adjusted with Holm method was further realized for assessing the significance of the difference in means between two samples. The matrix of Pearson's correlation was obtained using "corrplot" package. A linear model was calculated on co-ensiling data of sunflower using lm function of R. The package "ggplot2" was used for graphical representations.

4.3.3 Results and discussions

4.3.3.1 Sample characterization

The main characteristics of the crops and co-substrates are presented in Table 4-4. Sunflower and rye were characterized by a low TS content of 14.6 and 21.1%, respectively. The expected volume of effluent produced, estimated from the average between the estimations of Bastiman and Altman (1986) and Sutter (1957), were 266 and 138 $mL \cdot kg^{-1}$, respectively. Co-ensiling substrates were characterized by higher TS contents, with value ranging from 53 (horse manure) to 92.7 % (miscanthus stalks). The WHC of the different co-substrates ranged from 0.8 (chicken manure) to 2.1 $mL.g^{-1}$ (soiled paper and cardboard), which confirmed their ability to be used as absorbent materials. These values are lower than other found in the literature. For example, WHC of 2.3 – 2.8 $mL.g^{-1}$ were reported for miscanthus stalks (Dennery G., Dezat E., 2012) and of around 3 for wheat straw (Razak et al., 2012). This difference may be explained by the protocol used in the present work (centrifugation with a draining material), ensuring that no water remained in the interstitial spaces of the substrate. The two crops had C/N ratios of 22.2 and 22.1 $g.g^{-1}$ for rye and sunflower, respectively, which corresponds to the medium values for cover crops (Molinuevo-Salces et al., 2014). For the co-ensiling substrates, different patterns can be observed. Wheat straw, soiled paper and cardboard, miscanthus stalks, and wood chips had very high C/N ratios ranging from 81 to 447, while horse manure had a similar C/N ratio to that of the crops. Finally, chicken manure presented the highest nitrogen content, with a C/N ratio of 8.2. Both crops presented high WSC of 181 and 131 $g.kg_{TS}^{-1}$

in sunflower and rye, respectively, which are sufficient to initiate the silage fermentation (da Silva et al., 2017). In all co-substrates, a negligible amount of WSC was found.

Rye and sunflower had buffering capacities of 248 and 283 $mEq \cdot kg_{TS}^{-1}$, respectively, which are considered as low values (Kaiser et al., 2004). Wheat straw, soiled paper and cardboard, miscanthus stalks and wood chips had a very low buffering capacity, between 14 to 88 $mEq \cdot kg_{TS}^{-1}$, while that of manure was 148 $mEq \cdot kg_{TS}^{-1}$, a lower value than for rye. However, chicken manure presented a high buffering capacity of 509 $mEq \cdot kg_{TS}^{-1}$, which was likely due to its high nitrogen content. High buffering capacity makes it difficult to lower the pH during silage fermentation, and is considered as undesirable (Teixeira Franco et al., 2016).

4.3.3.2 Impact of co-substrate loading on co-ensiling

The cumulated volumes of effluent measured in the co-ensiling experiment of sunflower with wheat straw are presented in Figure 4-5. Ensiling of sunflower alone resulted in the production of 295 $mL \cdot kg_{sunflower}^{-1}$ in average, which is comparable with the average estimations from Bastiman (1986) and Sutter (1957) (266 $mL \cdot kg^{-1}$). Wheat straw addition was shown to efficiently reduce the production of silage effluent. The volume of effluent produced was inversely proportional to straw loading up to 150 $g \cdot kg^{-1}$. For higher straw loadings, the effluent is almost totally retaining in the solid medium. A linear model was used to fil the data presented in Figure 4-5, excepted for 250 $g \cdot kg^{-1}$ straw loading, since full retention was considered to be reached over 150 $g \cdot kg^{-1}$. The regression line was forced to intercept with the effluent volume value of the control. For a straw loading ranging from 0 to 150 $g \cdot kg^{-1}$, 1.6 mL of effluent were retained per g of wheat straw added, which corresponds to the theoretical WHC capacity of wheat straw calculated previously. The straw addition method also influenced the effluent retention capacity. At a loading of 40 $g \cdot kg^{-1}$, mixing straw with sunflower allowed to decrease the effluent production by 28 $mL \cdot kg_{CC}^{-1}$ compared to adding the same amount of straw as a single layer at the bottom of the silo.

The COD concentration of the effluent produced during the ensiling of sunflower alone was 58 $gO_2.L^{-1}$, which is in the range of COD concentration met in silage effluent in the literature (Gebrehanna et al., 2014). The BMP of pooled effluent samples was measured, and a 309 ± 18 $NmLCH_4.gCOD^{-1}$ was found, which is close to the theoretical relation of 1g COD = 350 $NmLCH_4$, indicating that the organic matter contained in the effluent is mostly biodegradable.

Table 4-4: Fresh cover crop and co-substrate characteristics. BC: buffering capacity; WHC: water holding capacity; WSC: water soluble carbohydrates.

Fresh substrates	**Sunflower**	**Rye**	**Wheat straw**	**Soiled paper and cardboard**	**Miscanthus stalks**	**Wood chips**	**Horse manure**	**Chicken manure**
TS (%FM)	14.6 ± 0.7	21.1 ± 0.2	90.4 ± 0.1	88.4 ± 0.4	92.7 ± 0.1	88.3 ± 0.1	53.0 ± 0.1	75.5 ± 0.0
VS (%FM)	12.9 ± 0.6	19.5 ± 0.1	84.2 ± 0.1	73.2 ± 1.2	69.2 ± 6.5	87.6 ± 0.8	44.7 ± 0.1	31.8 ± 0.0
pH	7.1 ± 0.0	6.5 ± 0.0	6.4 ± 0	8.2 ± 0.1	6.27 ± 0.1	5.42 ± 0.0	7.53 ± 0.1	8.59 ± 0.1
BC ($mEq.kg_{TS}^{-1}$)	283	248	88	73	14	23	143	509
WHC ($g_{water}.g^{-1}_{FM}$)	n.d.	n.d.	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.19	1.0 ± 0.13	1.4 ± 0.09	1.4 ± 0.18	0.8 ± 0.14
C (%TS)	40.7	46.8	42.6	47.5	49.2	52.5	42.1	19.8
N (%TS)	1.8	2.1	0.5	0.2	0.2	0.1	1.4	2.4
C/N	22.1	22.2	81.4	223.0	216.8	447.1	29.4	8.2
VFA ($g.kg^{-1}_{VS}$)	< d.l.	3.6 ± 0.2	4.0 ± 0.3	<d.l	<d.l	<d.l	5.7 ± 1.4	19.9 ± 0.9
WSC ($g.kg^{-1}_{VS}$)	181 ± 13	141 ± 15	14.8 ± 0.7	<d.l	<d.l	<d.l	2.0 ± 0.3	<d.l
BMP ($NmLCH_4.g_{VS}^{-1}$)	n.d.	360 ± 31	n.d.	354 ± 25	181 ± 22	26 ± 16	134 ± 65	172 ± 10

The methane potential of the effluent was consequently estimated to be 17.9 $NLCH_4.L_{effluent}^{-1}$. Considering the initial VS content and cumulated effluent volume of sunflower, a cumulated methane potential of 40.5 $Nm^3.t_{VS\ init}^{-1}$ flowed in the effluent when sunflower was ensiled alone. This represents 18% of fresh sunflower BMP. Co-ensiling allowed to gradually reduce effluent production and thus BMP flow through effluent down to until 4.2 $Nm^3.t_{VS\ init}^{-1}$, i.e. 1.7% of fresh sunflower BMP as the straw loading increased.

Straw addition had little influence on silage fermentation. In fact, very similar chemical properties were found for all conditions at the end of storage, with an average pH of 4.0 ± 0.0 and lactic to acetic acid ratio of 4.6 ± 0.4 (ranging from 3.9 to 5.3). No significant amount of other VFA than acetic acid was produced. All silages were thus considered of "high quality" regarding their fermentation characteristics.

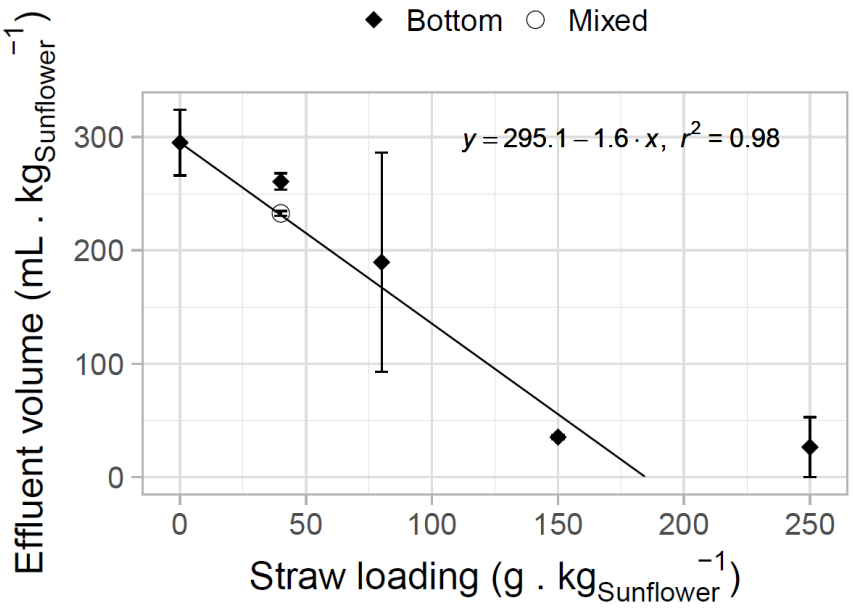

Figure 4-5: Cumulated effluent volume after 60 days of co-ensiling (sunflower + wheat straw). Dots indicate mean, errorbars indicate maximum and minimum.

This experiment confirmed the interest of using a dry co-substrate for silage effluent retention. The theoretical WHC of the co-substrate was found to be a relevant parameter for its dosing in a co-ensilage and it was consequently used for the calculation of co-substrate loadings in the following experiment.

4.3.3.3 Impact of co-substrate type on co-ensiling

4.3.3.3.1 Physicochemical characteristics of fresh mixtures

The characteristics of the different pre-silage mixtures (rye + co-substrates) are presented in Table 4-5. Due to the loading calculation method based on WHC, the co-substrate loading varied from 58.9 (R + Paper) to 182.3 $g.kg_{rye}^{-1}$ (R + Chicken M) on fresh matter basis, as an effluent volume of 138 $mL{\cdot}kg_{rye}^{-1}$ was

expected. The TS content of the mixtures ranged from 23.3 (R + Horse M) to 29.6% (R + Chicken M). Whatever the co-substrate, the pH of the mixture was close to that of rye (6.5), excepted for R + Chicken M where it was higher (7.5). Depending on the buffering capacity of co-substrate, those of the mixtures decreased (R+ Misc, R+ Wood), were unchanged (R + Paper, R + Horse M) increased (R + chicken M). However, due to the low initial buffering capacity of rye, the buffering capacity of all mixtures remained low according to the literature (Kaiser et al., 2004). For the mixtures R + Paper, R + Misc, R + Wood, the C/N ratio was slightly increased, while its value dropped to 14.3 for R + chicken M. The range of C/N ratios was however suitable for further anaerobic digestion, since ratios from 15 to 30 are recommended (Kalač, 2011). WSC content of all mixtures remained high and suitable for efficient silage fermentation (da Silva et al., 2017).

Table 4-5: Fresh co-ensiling mixtures characteristics

Fresh co-ensiling mixtures	R + Paper	R + Misc	R + Wood	R + Horse M	R + Chicken M
Co-substrate loading (g.kg^{-1})	58.9	124.3	85.6	92.5	182.3
TS (%FM)	25.1 ± 0.1	29.1 ± 1.1	25.1 ± 0.3	23.3 ± 0.2	29.6 ± 0.4
VS (%FM)	23.4 ± 0.1	26.4 ± 1.1	23.5 ± 0.6	20.9 ± 0.1	20.4 ± 0.6
pH	6.8 ± 0.0	6.3 ± 0.0	6.4 ± 0.0	6.4 ± 0.1	7.5 ± 0.0
BC (mEq.kg$_{TS}^{-1}$)	246	179	214	268	314
C (%TS)	46.1	46.7	48.3	45.7	37.6
N (%TS)	1.7	1.9	1.9	1.9	2.6
C/N	26.7	25.2	26.1	23.5	14.3
VFA (g.kg$^{-1}_{VS}$)	3.4 ± 0.2	3.6 ± 0.6	3.3 ± 0.4	5.5 ± 0.3	6.5 ± 0.5
WSC (g.kg$^{-1}_{VS}$)	117 ± 4	109 ± 7	102 ± 17	126 ± 21	115 ± 5

As a consequence, the type of co-substrates influenced some key parameters of the mixture that can drive the efficiency of the silage fermentation. However, the main characteristics of the mixture remained in the recommended range for "adequate ensilability", according to the literature.

4.3.3.3.2 Silage effluent production

An effluent was only produced during the ensiling of rye alone. In this condition, an average volume of 76 mL.kg$_{CC}^{-1}$ was measured, which was lower than the previously estimated volume (138 mL·kg^{-1}) but between the estimation of Bastiman and Altman (1986) (57 mL.kg$_{CC}^{-1}$) and the one Sutter (1957) (199 mL.kg$_{CC}^{-1}$). In addition, despite of the relatively low TS content of the mixtures R + Paper, R + Wood and R + Horse M that should have led to an effluent production according to Bastiman and Altman (1986) and Sutter (1957)

estimations, no effluent was produced. This result shows that, for co-ensiling experiments, the TS content of the mixture is not a reliable parameter to estimate the effluent production, and that it is essential to consider the estimation of the volume of effluent produced by the crop together with the holding capacity of the co-substrate.

The average COD concentration in effluent collected during the storage of rye alone was 59 $gO_2.L^{-1}$, and a BMP of 332 ± 13 $NmLCH_4.gCOD^{-1}$ (equivalent to 19.6 $NLCH_4.L_{effluent}^{-1}$) was found. Considering the initial VS content of rye, the cumulated effluent production represented 7.6 $Nm^3.t_{VS\ init}^{-1}$ of fresh rye, i.e 2 % of fresh rye BMP. Co-ensiling of rye allowed to suppress effluent production and thus methane potential losses through effluent.A significantly lower BMP loss due to effluent production was found during the ensiling of rye alone when compared to sunflower alone, which is due to higher TS content and higher BMP of fresh rye and lower effluent volume. However, the addition of absorbent co-substrates allowed to drastically cut the methane potential losses due to effluent production.

4.3.3.3.3 Fermentation pathways during co-ensiling

The fermentation pathways that occurred during the different co-ensiling conditions were monitored by the dynamic analysis of pH, metabolites and gases (Figure 4-6) and ammonia (Figure 4-7). Depending on the type of co-substrate and initial properties of the mixture, two different patterns were identified. On the one hand, in all conditions except for the mixture R + Horse M, secondary fermentations occurred from the second week. On the other hand, for the mixture R + Horse M, a more restricted homolactic fermentation took place and led to a fast and efficient acidification. The two fermentation patterns are resented in this section.

Silage fermentation of Rye, R + Paper, R + Misc, R + Wood and R + Chicken M

In these storage conditions, the fermentation was characterized by a limited lactic acid production and acidification during the first days of storage. After one week, a peak in lactic acid concentration of only 30 $g.kg_{VS}^{-1}$ was reached in Rye, R+ Misc, R+ Wood and R+ Chicken M. Due to this low lactic acid production, the pH did not drop below 4.7. In the mixture R + Paper, lactic acid concentration was higher and reached 55 $g.kg_{VS}^{-1}$, but the pH was also higher than 4.7. In the mixture R + Chicken M, the pH was never lower than 6.2, which was likely due to the high ammonia concentration that was measured from the very first days of storage (Figure 4-7).

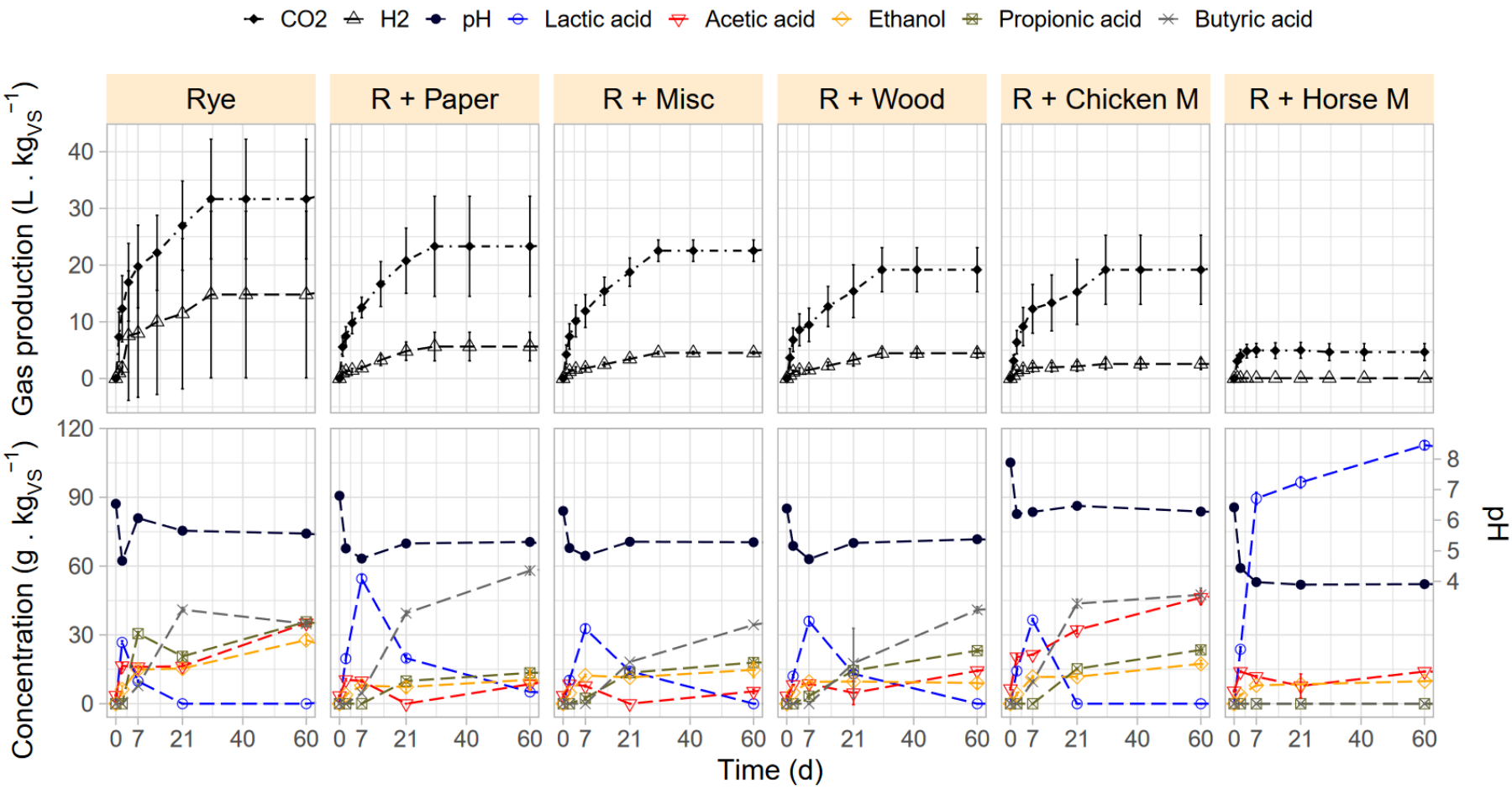

Figure 4-6 : pH, metabolite concentration and cumulated gas production during storage. Metabolites are expressed in g.kgVS$_{added}^{-1}$ of mix (cover crop + co-substrate). CO_2 and H_2 are expressed in cumulated L.kgVS$_{init}^{-1}$. R stand for rye. Paper, Misc, Wood, Chicken M and Horse M stand for soiled paper and cardboard, miscanthus stalks, wood chips, chicken manure and horse manure, respectively.

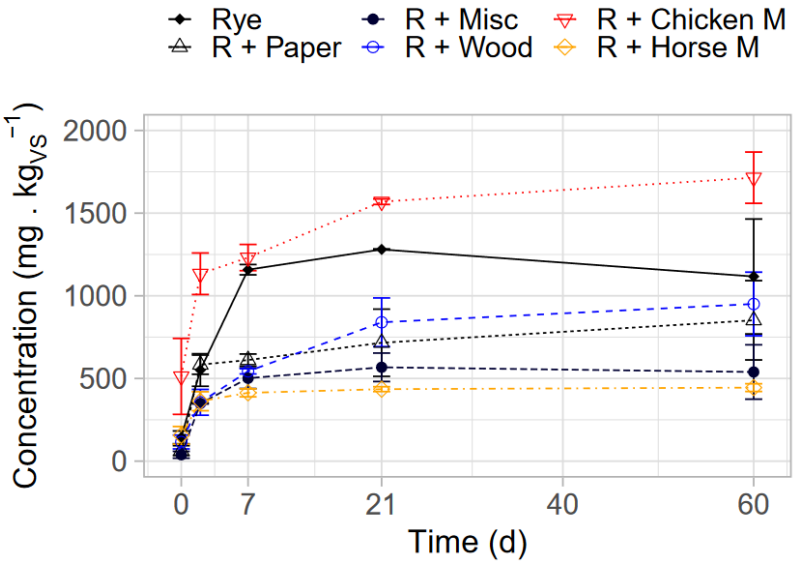

Figure 4-7: Ammonia concentration variation during storage. Concentrations are expressed in g.kg$_{VSadded}^{-1}$ of mix (cover crop + co-substrate); R stand for rye. Paper, Misc, Wood, Chicken M and Horse M stand for soiled paper and cardboard, miscanthus stalks, wood chips, chicken manure and horse manure, respectively.

Whatever the conditions, lactic acid production was also coupled with other metabolites such as acetic acid and ethanol and with CO_2 production, indicating heterolactic fermentation pathways. In silage fermentation, heterolactic metabolisms are mentioned to be less efficient at lowering the pH than homolactic fermentation (Woolford and Pahlow, 1998). Additionally, a significant propionic acid accumulation was found for rye ensiling alone. Propionic acid fermentation may be also considered as undesirable for silage due to its lower acidification capacity compared to lactic acid fermentation. However, acetic and propionic acids have stronger antifungal properties than lactic acid, and allow a better aerobic stability when the silo is opened (Pahlow et al., 2003).

At the end of this first phase, pH values in all conditions remained above the critical value that is necessary to inhibit clostridial activity and ensure a silage stability (Pahlow et al., 2003). Consequently, from day 7 to 21, clostridial fermentation started. The lactic acid that was previously produced was completely consumed before the end of the 60-day storage and converted into butyric acid. The secondary fermentation was coupled with the production of CO_2 and H_2 which is reported to induce methane potential losses (Kreuger et al., 2011). As lactic acid was converted into butyric acid, the pH increased and reached 5.3 (R + Paper, R + Misc, R + Wood), 5.7 (Rye) and 6.5 (R + Chicken M). Both the pH rise and difference in pH values between the different conditions may also be explained by ammonia production, that mostly took place between days 2 and 21. After three weeks of storage, the highest ammonia concentration was measured in the mixture R + chicken M with a value of 1.6 g.kg$_{VS}^{-1}$, which was equivalent to 36 % of initial total nitrogen (TN_{init}). For rye ensiling, 1.3 g.kg$_{VS}^{-1}$ (49 %TN_{init}) were measured, and lower

values were found in the other conditions, with 0.7 (33 $\%TN_{init}$), 0.6 (41 $\%TN_{init}$) and 0.8 $g.kg_{VS}^{-1}$ (27 $\%TN_{init}$) in R + Paper, R + Wood and R + Misc, respectively. In the literature, it is generally accepted that NH_3-N concentration should be lower than 10% of the total nitrogen in well preserved silages (Bureenok et al., 2016). The high concentration in NH_3-N found here is an indicator of the activity of enterobacteria and/or clostridia (Pahlow et al., 2003). Despite of the non-optimal properties of silage with high pH, stabilization was reached from day 30, since gas production stopped. This stable state may be due to the fact that all WSC were consumed during the first weeks of storage (data not shown). The inhibitory effect of the accumulated metabolites, mostly acetic acid and butyric acid, may also contribute to the inhibition of microbial activity (Wang et al., 2008).

Silage fermentation of R + Horse M

The addition of horse manure to rye had a different impact on silage fermentation. This storage condition was characterized by a fast and high lactic acid production. After 7 days of storage, 92 $g.kg_{VS}^{-1}$ of lactic acid had accumulated in the medium, i.e. nearly 2 to 3 times more than in the other storage conditions. This accumulation induced a significant acidification as pH dropped to 4.4 after 2 days and stabilized at 4.0 after one week. The fermentation was coupled with a limited CO_2 production, since only 5 $NL.kg_{VS}^{-1}$ were measured and no H_2 was detected. The fermentation characteristics suggested that mostly homolactic fermentations occurred, since lactic acid was largely dominant among the other metabolites produced. Since the pH was below the critical value that ensures anaerobic stability (Pahlow et al., 2003), secondary fermentations did not occur. Production of NH_3-N was also lower than in the other conditions (0.4 $g.kg_{VS}^{-1}$, 21 $\%TN_{init}$). The silage obtained by co-ensiling rye with horse manure fulfilled the criteria defining a "well preserved silage" according to the literature, with pH <4.5, lactic acid > 30 $g.kg_{TS}^{-1}$ and butyric acid < 10% of total volatile fatty acids. Only NH_3-N overpassed 10% of total Nitrogen, however no other signs of undesirable microbial activity were recorded.

4.3.3.3.4 Microbial development during ensiling and impact of co-substrate addition

In addition to modifying the physico-chemical characteristics of the mixture, the co-substrates had different microbial properties that can influence the silage fermentation. Microbial communities and total microbial abundance of raw substrates and their change during co-ensiling storage are presented in Figure 4-8 and Figure 4-9, respectively

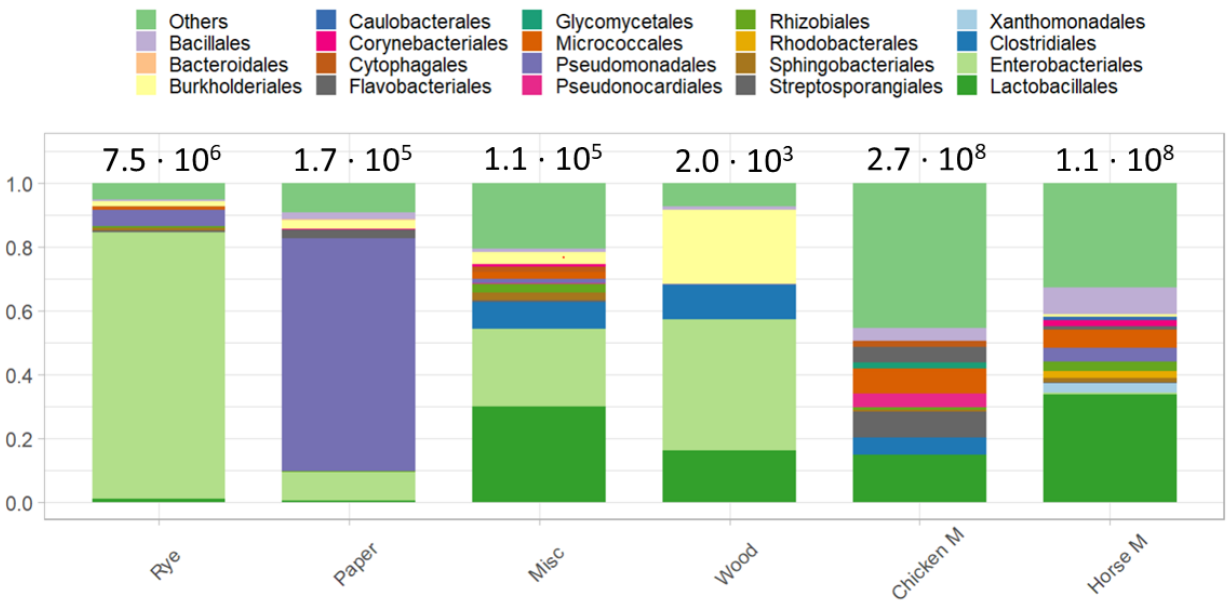

Figure 4-8: Microbial characterization of raw substrates (relative abundance of major orders). Values on top represent the microbial population quantification (16S rRNA gene copy number . g_{FM}^{-1})

Among the microorganisms that are likely to play a role in silage fermentation, the microbial community of fresh rye was largely dominated by enterobacteriales order, mostly from enterobacteria family. Enterobacteria are commonly found on crops as epiphytic bacteria (Pahlow et al., 2003). In silage fermentation, enterobacteria compete with lactic acid bacteria for WSC, and produce a mixture of acids, and ethanol and have thus a detrimental action on silage acidification. In paper, Misc and Wood, Lactobacillales, Enterobacteriales and Clostridiales were found. However, the total microbial abundance of these substrates was much lower. The total specific abundance of these three orders was thus lower than in rye, and few modifications of the initial microbial community of the related mixtures were noted (Figure 4-9). Paper, Misc and Wood had also few influence on microbial community changes during storage when compared to rye alone, which is consistent with the observations made previously on fermentation metabolites. In these four storage conditions, Lactobacillales grew fast from the very first days of ensiling and likely competed with Enterobacteriales, whose abundance remained high all over the storage duration. From the second week of storage, the amount of Clostridiales increased, which is consistent with the butyric acid and H_2 production that was observed.

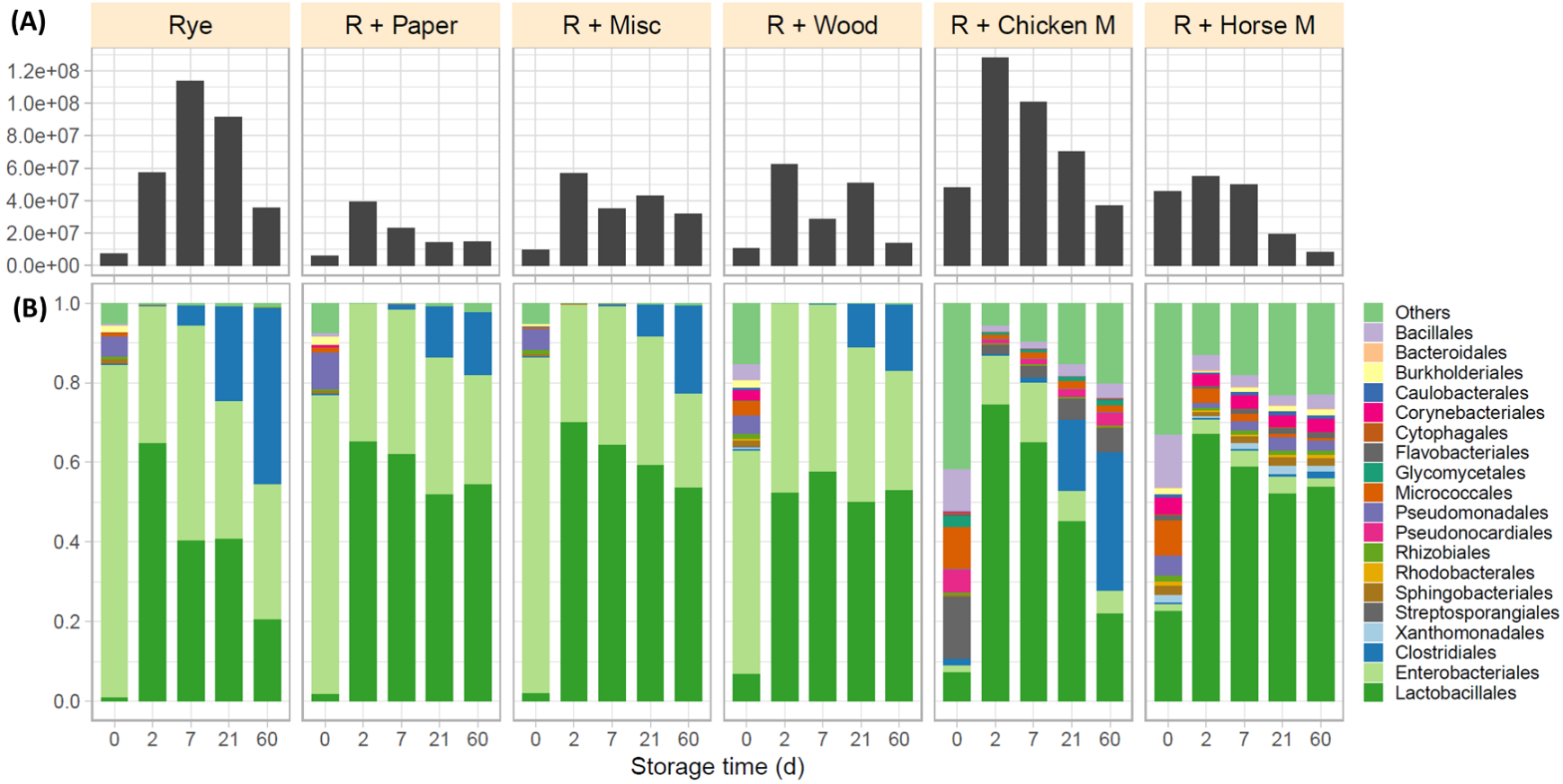

Figure 4-9: (A) Variation of total microbial abundance during storage (16S rRNA gene copy number . g_{FM}^{-1}); (B) Relative composition of microbial community at the order level.

The microbial abundances of chicken and horse manures were much higher than the other co-substrates, with $2.7 \cdot 10^8$ and $1.1 \cdot 10^8$ rRNA gene copy number$\cdot g_{FM}^{-1}$, respectively. Within the bacteria orders that are expected to drive silage fermentations, a high amount of Enterobacteriales, Lactobacilles and Clostridiales was present. Consequently, the microbial communities of the pre-silage mixtures were strongly impacted by the addition of these co-substrates. The initial abundances of Enterobacteriales, Lactobacilles and Clostridiales were $8.5 \cdot 10^5$, $3.9 \cdot 10^6$ and $2.4 \cdot 10^6$ in R + Chicken Manure and $9.5 \cdot 10^5$, $1.2 \cdot 10^7$ and $5.9 \cdot 10^5$ in R + Horse M, respectively. The ratio between Lactobacillales and Enterobacteriales was thus reversed after adding manures. Clostridiales abundance was also increased. The initial Lactobacillales to Enterobacteriales seemed to still play a role all over the storage duration, since the proportion in Enterobacteriales remained much lower in R + Chicken M and R + Horse M than in the 4 other co-ensiling experiments. However, due to the difference in acidification kinetics, the development of Clostridiales could not be avoided in R + Chicken M, which led to the dominance of this bacterial order after 60 days of storage. On the contrary, Lactobacillales largely dominated the microbial community of R + Horse M, as the low pH prevented the development of other bacteria (Gharechahi et al., 2017). Due to the relatively similar microbial communities at the order level in R + Chicken M and R + Horse M, the difference in fermentation mechanisms that occurred during storage may therefore be due to different chemical properties between these two co-ensiling conditions. In particular, the difference in buffering capacity and nitrogen content may have played a critical role.

Impact of fresh mixture properties on fermentation and microbial populations

In order to assess the impact of the initial properties of the co-ensiling mixtures on fermentation, a matrix of Pearson's correlations was calculated and is presented in Figure 4-10. The impact of physico-chemical properties (TS, WSC, BC and C/N) had a weak influence on the fermentations contrary to what could be expected. This may be explained by the weak heterogeneity of these parameters in the various tested conditions. Interestingly, despite the results the literature for the ensiling of wilted and unwilted crops, initial TS was not negatively correlated with butyric fermentation nor Clostridiales growth (Borreani et al., 2009). This result points out that increasing TS by adding a co-substrate may have a different impact on fermentation than harvesting a crop at a high TS or applying field-wilting. Since the inhibition of clostridial growth is related to the water activity (a_w) of the medium, the influence of a co-substrate addition on a_w should be further studied.

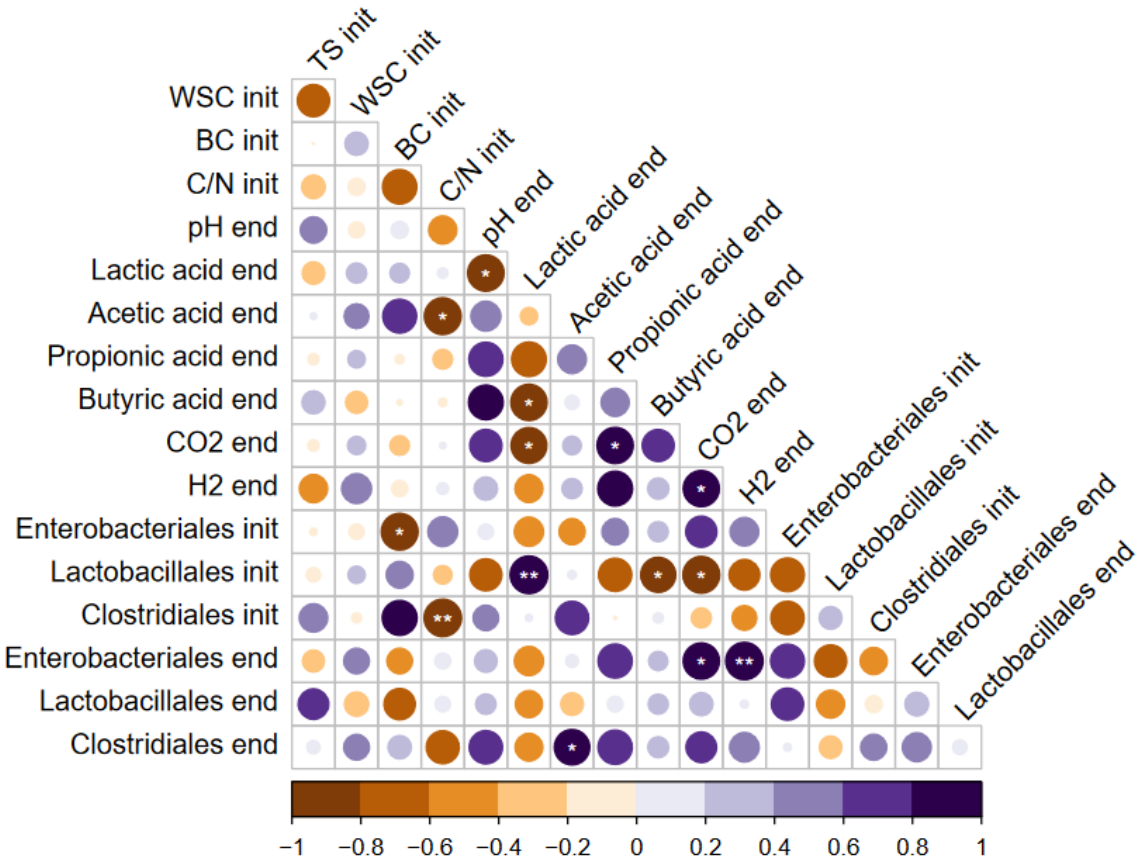

*Figure 4-10 : Matrix of Pearson's correlation with the main bacterial orders for all ensiling and co-ensiling experiments of rye. **: Significant with p-palvue <0.01, *: Significant with p-value <0.05*

About initial microbial properties of samples, it can be seen that the initial amount of Lactobacillales was strongly correlated with lactic acid production, and a negative correlation was established between initial content of Lactobacillales and the production of butyric acid and CO_2. If a silage fermentation dominated by lactic acid production is expected, a co-substrate with a high amount of lactic acid bacteria is thus recommended. The presence of a high quantity of Enterobacteriales at the end of storage was correlated with CO_2 and H_2 production, while Clostridiales were correlated with a higher concentration in acetic acid. However, the study of the fermentation kinetics and microbial population variation presented in Figure 4-6 and Figure 4-9 clearly shows that H_2 production coincided with the development of Clostridiales. However, a large amount of Enterobacteriales was still present at the end of the storage period in Rye, R + Paper, R + Misc and R + Wood where a significant H_2 production occurred, which may have influenced the output of the correlation matrix.

4.3.3.3.5 Impact of fermentation on mass and methane potential preservation during co-ensiling

The gas production that occurred during silage fermentation caused mass losses in all conditions. For Rye, R + Paper, R + Misc, R + Wood, R + Chicken M and R + Horse M, 11.3, 7.4, 6.4, 8.0, 9.1 and 1.9 % of initial VS of each mixture were lost during storage, respectively, mostly under the form of CO_2. Since different absorbent loading were applied, the VS losses were also reported to the initial VS of rye. Following this calculation method, 11.3, 9.0, 9.2, 11.2, 11.9 and 2.3 % of initial VS of Rye were lost. It is important to stress that mixtures with similar fermentation pathways (Rye, R + Paper, R + Misc, R + Wood and R + Chicken M) led to close VS losses (i.e., 9.0 – 11.9%) reported to the initial VS of rye despite of different co-substrate loadings, suggesting that VS from rye were mostly lost. This hypothesis is consistent with the fact that the easily degradable compounds, e.g. WSC, were mainly originated from rye. For the mixture R + Horse, VS losses were much lower than in any other co-ensiling condition, due to the homolactic fermentation pathway that prevailed (Kreuger et al., 2011).

BMP tests were carried out on raw substrates and after 60 days of storage to evaluate the impact of storage on the methane potential (Figure 4-11). In most conditions, no significant BMP variations were found to take place during storage, except in R + Wood where a significant decrease in BMP of 18 and 24% was observed when reporting BMP to added VS or initial VS, respectively. This difference in BMP preservation between R + Wood and all other co-ensiling conditions is surprising, since no difference in mass losses, fermentation properties nor gas production was observed. Consequently, this difference may be due to sampling issues due to the heterogeneity of the co-ensiling mixture. Since wood chips presented the lowest BMP among all co-substrates, a small difference in the catch crop/co-substrate ratio in sampling for BMP measurement may influence greatly the measured BMP value. Indeed, the BMP measured for fresh R + Wood (330 ± 36 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$) is higher than the theoretical BMP calculated as the weighted average between rye and wood chips (267 $NmLCH_4 \cdot g_{VS}^{-1}$). The BMP of fresh R+ Wood was thus probably overestimated. Even if butyric fermentation and the related hydrogen production during occurred during most of storage conditions, hydrogen production did not exceed 15 $NL.kg_{VS}^{-1}$, which theoretically induced BMP losses of about 4 $NmL.g_{VS}^{-1}$. However, this value is very low compared to those of the raw substrates, which explains the small difference between the methane potential before and after silage.

Limited differences were found between BMP reported to added and initial VS in all conditions, which was due to the fact that VS loss were relatively small. When higher VS losses occurred, a larger difference between these two BMP values was found, as BMP was concentrated in the remaining matter

as WSC were converted into more energetically dense compounds like butyric acid during fermentation while CO_2 was released (Kreuger et al., 2011; Van Vlierberghe et al., 2021).

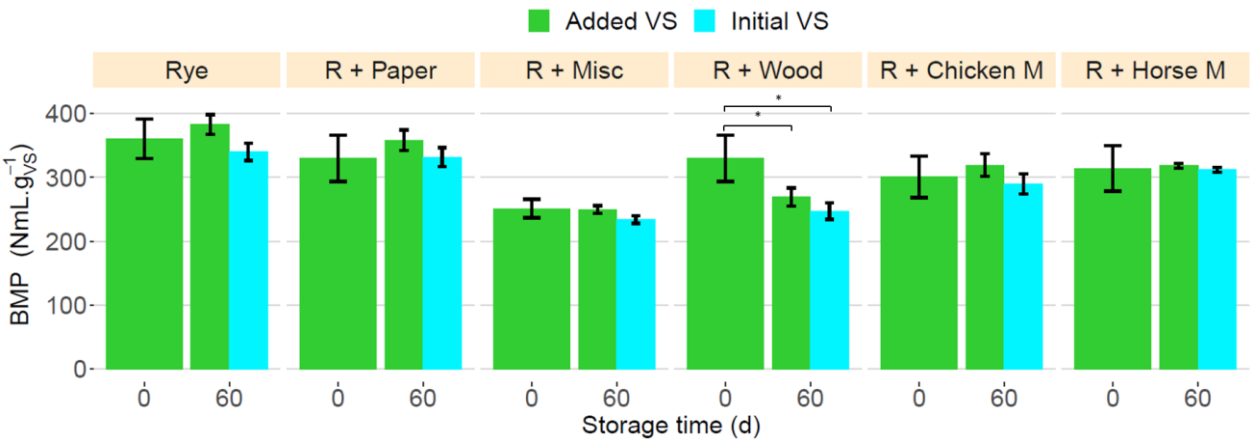

*Figure 4-11: Impact of storage under the different co-ensiling conditions on methane production per unit of VS of mix (cover crop + co-substrate). BMP reported to added VS represent the crop biodegradability after storage, and BMP reported to initial VS reflects the global impact of storage on methane potential. *: significant difference two BMP values for a given storage condition (p<0.05).*

As a consequence, this study shows that the co-silage of a wet cover crop with an absorbent co-substrate allows an efficient storage before anaerobic digestion, avoiding also the production of a liquid effluent. In addition to the preservation of catch crops itself, co-ensiling may be considered as a conservation method of manures, since this type of substrate is known to lose methane potential during storage (Teixeira Franco et al., 2018). A synergistic effect can thus be achieved, with the crop providing the necessary WSC for silage fermentations and the manure avoiding effluent production. Teixeira Franco et al. (2018) recommended an initial WSC content of 166 g.kg$_{VS}^{-1}$ for an efficient ensiling of cattle manure , which is a higher but close to initial value of the present experiment (126 ± 21 and 115 ± 5 g.kg$_{VS}^{-1}$, for R + Horse M and R + Chicken M, respectively).

4.3.4 Conclusion

Co-ensiling was shown to be an appropriate method for the ensiling of wet cover crops and allowed a drastic reduction of silage effluent volume. An appropriate dosing method of absorbent based on WHC was found. The chemical and microbial composition of co-substrates were shown to drive fermentation in some cases, particularly when the epiphytic microflora of the crop was replaced and the mixture properties were compatible with lactic-dominant silage fermentation. Finally, a synergic effect between cover crops and horse manure was demonstrated. Co-ensiling crops with manures may constitute an interesting option for increasing the storage of these two substrates.

4.3.5 Acknowledgements

National Research and Technology Association (ANRT) is gratefully acknowledged for the PhD grant allocated to Clément Van Vlierberghe under CIFRE convention N° 2018/0706. The authors thank Eglantine Pagola from "RAGT", and Bérenger Carrier from "Biométhagri" for providing the cover crops samples. All experiments and physical-chemical analysis were performed at the Bio2E platform (doi:10.5454/1.557234103446854E12).

4.4 A retenir

Les résultats de ce chapitre montrent que l'élévation du taux de matière sèche par l'addition d'un co-substrat n'a pas le même effet sur la fermentation d'ensilage que le préfanage. Le co-ensilage avec des substrats tels que la paille de blé, les papiers et cartons souillés, les tiges de miscanthus et les copeaux de bois n'a pas modifié les propriétés de fermentation de façon significative. En revanche, le préfanage permet de réduire l'apparition de fermentations secondaires. Cette différence semble mettre en évidence que les deux techniques n'ont pas le même impact sur l'activité de l'eau du substrat, un paramètre ayant une influence importante sur la capacité de bactéries comme les clostridies à se développer. L'addition d'un co-substrat qui comporte une grande concentration de certains microorganismes comme les bactéries lactiques ou les clostridies peut en revanche avoir une influence significative sur le déroulement de la fermentation dans le cas où la flore microbienne endogène du co-substrat prend le dessus sur celle de la CIMSE à ensiler. Plusieurs cas de figure peuvent alors rencontrés. Un co-substrat apportant des bactéries lactiques homolactiques ou hétérolactiques peut avoir un effet intéressant sur la fermentation d'ensilage. L'apport de clostridies semble quant à lui ne pas impacter les performances de stockage. En revanche, une attention particulière doit être portée aux archées méthanogène. En effet leur développement pourrait engendrer la production de méthane directement dans les silos, ce qui engendrerait des pertes énergétiques importantes et l'émission de gaz à effet de serre.

Les expérimentations ont également permis d'apporter des éléments d'optimisation pour le dosage du co-substrat en utilisant sa capacité de rétention en eau comme critère. L'application de cinq co-substrats dosés selon ce critère a permis une rétention efficace des effluents dans tous les cas testés. Le co-ensilage s'est ainsi illustré comme étant une technique efficace pour éviter la génération d'effluents d'ensilage lors du stockage de CIMSE humides et une bonne alternative au préfanage.

Dans certains cas de figure, un effet de synergie peut être obtenu entre les deux biomasses, la CIMSE apportant les sucres solubles nécessaires à l'acidification par fermentation du mélange, et le co-substrat (i.e., fumiers) permettant d'agir comme un activateur de fermentation grâce à sa flore endogène et de capter les effluents d'ensilage. Un tel effet pourrait être utilisé afin d'optimiser le stockage et l'utilisation en méthanisation de CIMSE et de fumiers secs, en préparant la ration du méthaniseur dès la confection des silos d'ensilage.

Le co-ensilage s'est révélé être une méthode efficace de conservation des CIMSE. En plus de la fonction de stockage, un additif d'ensilage permettant d'obtenir un effet de prétraitement en facilitant l'accès des

microorganismes aux sucres de la lignocellulose pourrait permettre d'améliorer significativement el potentiel méthanogène. Cette thématique est abordée dans le chapitre suivant.

5 Etude du stockage et prétraitement alcalin de CIMSE

5.1 Introduction

Ce chapitre présente des expériences menées afin d'étudier un procédé permettant de remplir les fonctions de stockage et de prétraitement grâce à l'ajout d'un réactif alcalin : la chaux vive (CaO). Ce chapitre est rédigé sous la forme de deux articles scientifiques décrivant des essais distincts de stockage alcalin.

Un premier article décrit les premiers essais de stockage alcalin de CIMSE. Cette expérience vise à observer les transformations du substrat pouvant avoir lieu lors du stockage alcalin à long terme des CIMSE, étant donné que ce procédé n'est que très peu étudié dans la littérature scientifique. Cette étude a donc consisté à appliquer un prétraitement alcalin à deux échantillons de CIMSE (seigle et avoine) avec une charge de CaO de 60 $g.kg_{MS}^{-1}$, une valeur identifiée comme étant un bon compromis entre efficacité de prétraitement et consommation de réactif dans la littérature. La chaux a été ajoutée sous forme de poudre directement sur les échantillons broyés, puis le suivi des réacteurs de stockage a été réalisé pendant 6 mois.

Ce premier travail a mis en évidence que l'efficacité du procédé de prétraitement alcalin pouvait être compromise par la déstabilisation du pH du milieu. L'origine de cet abaissement de pH n'ayant pu être identifiée avec certitude, des expériences supplémentaires ont été menées et sont présentées dans le second article de ce chapitre. Il vise tout d'abord à distinguer les mécanismes biotiques (fermentation microbienne) et abiotiques (désacétylation des hémicelluloses) pouvant être à l'origine de la chute du pH et à comprendre les conditions permettant la stabilité des conditions alcalines au cours du stockage. Des expériences de stockage à long terme ont été réalisées avec une charge de CaO de 100 $g.kg_{MS}^{-1}$, cette valeur ayant été identifiée comme suffisante pour obtenir des conditions alcalines stables. La chaux a alors été ajoutée selon deux protocoles différents : sous formes de poudre sèche, et sous forme de mélange humide eau + CaO afin d'étudier l'impact de la teneur en matière sèche sur les performances du prétraitement.

5.2 Long term alkaline storage and pretreatment process of cover crops for anaerobic digestion

C. VAN VLIERBERGHE[1,2], R. ESCUDIE[1], N. BERNET[1], S. FREDERIC[2], H. CARRERE[1]

[5] *INRAE, Univ. Montpellier, LBE, 102 Avenue des étangs, F-11100, Narbonne, France.*

[6] *GRDF, 9 rue Condorcet, F-75009, Paris, France*

Cet article a été publié en mars 2021 dans la revue *Bioresource technology* sous la référence : *Van Vlierberghe, C., Escudie, R., Bernet, N., Frederic, S., Carrere, H., 2021. Long term alkaline storage and pretreatment process of cover crops for anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 330, 124986. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124986*

Abstract

The aim of this work was to study an innovative alkaline process on two cover crops. CaO load of 60g.kgTS^{-1} was implemented to combine the functions of storage and pretreatment. Lab-scale reactors were monitored for 180 days to assess the effect of this process on the physico-chemical properties of the biomass. From the first days, pH was not maintained in an alkaline zone and microbial fermentation activity was observed with the degradation of available carbohydrates and production of metabolites, CO_2 and H_2. High butyric acid accumulation was observed and mass losses of 18.1% and 9.0% of initial VS occurred for oat and rye, respectively. However, no methane potential loss was recorded in the short and long term and the crops were efficiently preserved. The pretreatment had no major impact on fiber solubilization, and no increase in BMP was obtained, which was attributed to the short duration of the alkaline conditions.

Keywords

Biomethane; Biogas; Cover crops storage; Pretreatment; Silage fermentation

5.2.1 Introduction

The production of biomethane by anaerobic digestion (AD) is likely to increase greatly in the coming years, as it is expected to replace part of the natural fossil gas. A large variety of organic wastes can be valorized such as sewage sludge, biowastes, manure and crop residues. Additionally, in order to supply a sufficient biomass to meet the demand for biogas, crops are also grown to feed agricultural biogas plants. These crops are interesting substrates for AD since they have a high CH_4 yield and allow a secure feed stock for the biogas plants. However, the cultivation of energy crops is in competition for arable land with food crops, which questions their sustainability as a substrate for AD (Jury et al., 2010). Therefore, cover crops (CC), also called catch crops, are receiving an increasing interest as an alternative to energy crops. These crops are not being grown in place of food/feed crops, but during the intercultural period of their crop rotations. Thus, they avoid the bare soil period that may happen between two food crops cultivation. The use of cover crops in farming practices has both agricultural and environmental benefits, since it allows to avoid erosion and nutrient leaching (Igos et al., 2016; Jian et al., 2020b; Sapkota et al., 2012), improves the accumulation of organic matter in the soil (Jian et al., 2020b) and facilitates the control of undesirable weeds (Büchi et al., 2020). However, the use of CC for biogas production still faces some difficulties. First, the harvest only takes place once or twice a year, while the digesters are fed continuously. CC are often grown during short and unfavorable periods, and consequently their biomass yields are variable and unpredictable from one year to another. These two aspects make an efficient storage of the harvested crops a mandatory key point in their use for AD.

Currently, the storage step is performed by ensiling, a process widely used for forage storage for cattle feeding since the end of the 19th century (Goffart, 1877) . Ensiling relies on the spontaneous fermentation of the substrate under anaerobic conditions, allowing the release of organic acids (mostly lactic acid) and acidification of the medium (Elferink et al., 1999; Weinberg and Ashbell, 2003). The low pH under anaerobic conditions inhibits the microbial activity, thus ensuring the substrate stability over several months (Pahlow et al., 2003). When executed properly, ensiling allows a long-term preservation of the biomass energy potential, but various degradations may occur, depending on a large panel of parameters from the crop characteristics to the silo conception (Teixeira Franco et al., 2016). If this process has been optimized for animal feeding for decades, its application to anaerobic digestion is still relatively new and may be improved. New storing methods may also be developed, specifically designed for anaerobic digestion.

Another limit in the use of CC for AD is related to their physicochemical characteristics. The cell walls are composed of a complex lignocellulosic matrix made of cellulose, hemicellulose and lignin. This structure

limits the access of the microorganisms to the highly degradable carbohydrates of the cellulose and hemicellulose, lowering the yield and the kinetic of the crop conversion into methane (Monlau et al., 2013b). In order to enhance the anaerobic digestion of such lignocellulosic matrix, many types of pretreatment processes have been reported in the literature and their actions on lignocellulose have been well described. Among the different technologies, alkaline pretreatments are particularly relevant since alkaline conditions are highly effective in solubilizing lignin (Carrere et al., 2016). High increases in biochemical methane potential (BMP) were obtained by applying intensive conditions of pretreatments such as high temperature (Sambusiti et al., 2012a) or high chemical concentration (Jiang et al., 2017). In addition, significant improvements in BMP were also observed in mild conditions, using NaOH, CaO or KOH, allowing much lower energy consumption (Khor et al., 2015; Thomas et al., 2018). In these conditions, the extension of the duration had a positive effect on the pretreatment effectiveness, and the treatment duration appeared, under certain conditions, to be more favorable than the reactive concentration (Thomas et al., 2018). Despite its lower efficiency when compared to other alkaline compounds like NaOH and KOH, lime presents the advantage to be less expensive. Additionally, CaO is already used on agricultural sites for soil liming to control acidity. Consequently, on an agricultural biogas plant, the use of lime is much more compatible with the use of digestate as a fertilizer than NaOH that causes an increase in the soil salinity due to sodium.

If alkaline pretreatments may constitute an interesting option for lignocellulosic biomass such as cover crops, applying them on stored silage does not constitute an adequate solution because of their high concentrations in acidic compounds such as lactic and acetic acids. A large amount of alkaline chemical would be necessary to neutralize the acids and increase the pH. For this reason, the implement of the alkaline pretreatment just after harvesting and extension of the pretreatment reaction time up to several months may constitute an alternative to ensiling for the storage of cover crops, while maximizing the alkaline treatment action. Compared to silage, which leads to a drop in pH in acidic regions (pH=4), microbial inhibition, which is necessary to maintain the methanogenic potential of the substrate, can be ensured by maintaining alkaline conditions.

However, as the addition of an alkaline agent is currently mostly used for pre-treatment process purposes and not for storage purposes, the duration of the treatment reported in the bibliography usually ranges from a few hours to 1 or 2 days and very few studies investigated longer duration of up to 7 days (Atelge et al., 2020). Digman et al. (2010) reported an alkaline pretreatment + anaerobic storage process of switchgrass and reed canarygrass using CaO for ethanol production. Several CaO loadings from 14.6 to

100g.kg^{-1} were applied with storage durations ranging from 30 to 180 days. The authors reported a good preservation of the substrate in all cases, even if no global energy balance including mass losses was calculated. In this study, the pretreatment efficiency increased together with lime loading and the highest ethanol yields were obtained with 85 and 100g.kg^{-1} CaO. However, the two studied solid content were very high (43 and 66%TS) and it was observed that moisture content had a positive effect on the pretreatment efficiency. This may suggest that interesting results with lower CaO loading can be obtained in wetter conditions. Finally, even if a correlation between the added CaO amount and the final pH of the silos was reported, no signs of undesirable fermentations were stressed. However, no dynamic monitoring of the variation of the physico-chemical characteristics was made, making difficult the interpretation of the possible metabolic pathways that took place and fine understanding of the process.

The aim of this study is to evaluate the mechanisms involved during a long-term alkaline storage (i.e., CaO) of two cover crops, and its impact on the conservation/improvement of the energy potential in anaerobic digestion. The operating conditions were chosen to limit the pretreatment cost, following a procedure similar to ensiling, except the CaO addition as a dry powder before closing the silo. The conditions were set at ambient temperature. The main novelty of this work is the high solid content of the alkaline pretreatment, and the extended reaction duration until fulfilling the storage function. The dynamical changes in the physico-chemical characteristics of the substrate were observed over a six-month period as well as the impact on the methane potential.

5.2.2 Materials and Methods

5.2.2.1 Feedstock

Two cover crops were used for this experiment. An oat sample (*Avena sativa*) was collected on an experimental agricultural site (Arvalis, Montardon 64121, France) and a rye sample (*Secale cereale*) on another agricultural site (Biométharn, Aiguefonde 81200, France). Both crops were grown as winter cover crops, sowed in mid-October and harvested in the very last days of April at maturity stage BBCH 60 (beginning of flowering) and BBCH 59 (end of heading) for oat and rye, respectively. The crops were hand-harvested at approximate cutting height of 10 cm and stored overnight in sealed plastic bags as whole plants at 4°C before use.

5.2.2.2 Alkaline storage conditions

Prior to the experiment, the crops were chopped into 1-2 cm pieces using a garden shredder (AXT 2550TC, Bosch GmbH). Then, the alkaline reagent CaO was added as a dry powder and was homogenized manually. A CaO loading of 60g.kg$_{TS}^{-1}$ was chosen as a compromise between pretreatment efficiency and reactive

cost according to the literature. Jiang et al. (2017) found the most interesting lime load for 70 $g.kg_{TS}^{-1}$ $Ca(OH)_2$ (equivalent to 53 $g.kg_{TS}^{-1}$ CaO) while Thomas et al. (2018) and Khor et al. (2015) obtained significant BMP improvement for 50 $g.kg_{TS}^{-1}$ CaO and 75 $g.kg_{TS}^{-1}$ $Ca(OH)_2$ (equivalent to 57 $g.kg_{TS}^{-1}$ CaO) respectively. The storage experiments were conducted in 2.6 L glass flasks sealed with air-tight lids equipped with a rubber septum that allows gas sampling, pressure measurement and pressure release. The experimental setup was inspired by the one used by Hillion (2017), which provided a high repeatability. For each crop, 5 replicates were prepared to be sacrificed after 2, 7, 21, 60 and 180 days to monitor the impact of the pretreatment on biomass conservation and the variation of the physico-chemical properties. 700 g of samples were introduced in each flask just after mixing with CaO, and packed manually until a density of 500 $gFM.L^{-1}$. The flasks were finally flushed with N_2, sealed and stored in a dark place at 22°C until their opening.

5.2.2.3 Silo monitoring and sampling

Gas production and mass losses were monitored regularly all over the experiment. The volumetric gas production was measured by a pressure difference method. Gas sampling and pressure release were made as often as necessary depending on the gas production kinetics. The pressure was measured through the septum with a manometer (Keller LEO 2). Gas was released when pressure exceeded 1.2 bar, and the flask was weighted. The volume of gas inside the flasks (headspace + pore space) was calculated by subtracting the volume of added substrate to the flask volume. The volume of the substrate was calculated using the theoretical density equation adapted from McNulty *et al.* (1982) (5-14):

$$\rho_t = (1 - C)\,[(M/\rho_l) + (1 - M)/\rho_s] + C/\rho_{CaO} \qquad (5\text{-}1)$$

where M = fractional moisture content related to fresh matter (FM); C = CaO content related to fresh matter; ρ_l = water density = 1000 $kg.m^{-3}$; ρ_s = dry matter density = 1421 $kg.m^{-3}$ and ρ_{CaO} = CaO density = 3345 $kg.m^{-3}$. The gas composition was analyzed using a gas chromatography (Perkin Elmer Clarus 580) as described in section 2.4.

For each sampling date, one flask was opened after measuring final gas volume and composition and weight. The whole sample was homogenized and mixed using a knife mill (Pulverisette 11, Fritsch). Samples were prepared and stored for BMP test by freezing around 2 g_{TS} of matter at -20°C. Total solids (TS) and volatile solids (VS) were measured directly on the samples in triplicate. Water extraction was performed for the measurement of pH, water-soluble carbohydrates (WSC), volatile fatty acids (VFA) and other metabolites. 30 gFM of sample were steeped in 150 mL of deionized water for 18 h at 4°C in sealed

plastic pots in triplicate, as suggested by Porter & Murray (2001). Each liquid extract was used separately for pH and soluble compounds analysis. pH was measured directly after extraction on the mixture. Then, the liquid phase was separated by centrifugation (18750 g, 20 min, 4°C) and frozen in air-tightly closed tubes for further WSC, VFA and metabolites analysis.

5.2.2.4 Physicochemical analysis

TS were measured in triplicate by drying 30 g of sample at 105°C for 24 h. Volatile Solids (VS) were then measured by calcination of the dry residue (550°C, 3 h). Pretreated substrates can contain volatile fatty acids (VFA), lactic acid (LA) and some alcohols that may evaporate during oven drying, causing underestimation of TS and VS. For this reason, the TS content value measured by oven drying was corrected using the equation proposed by Porter & Murray (2001) (5-2):

$$TS_C = TS_M + 0.375\,LA + 0.892\,VFA + 0.975\,Alcohols \qquad (5\text{-}2)$$

where TS_C = corrected TS; TS_M = measured TS; LA = lactic acid concentration; VFA = total VFA concentration; Alcohols = total alcohols concentration. All concentrations are in $g.gFM^{-1}$.

pH was measured in triplicate directly on the extraction mixture using a WTW® SenTix® 41 probe on a WTW® inoLab® pH7110. WSC and concentration of metabolites (i.e., lactic acid (LA), acetic acid (AA), propionic acid (PA), butyric acid (BA) and ethanol (EtOH)) were measured from the centrifuged liquid phase after filtering (0,2 µm nylon filter) by High Performance Liquid Chromatography on Aminex 4PX-87H column (Bio-Rad) at 45°C. Sulfuric acid (0,005 M; 0,3 $mL.min^{-1}$) was used as mobile phase. WSC content was calculated as the sum of glucose, fructose, xylose and arabinose. Ammonia concentration was measured on liquid extract by titration with boric acid using a Gerhardt® Vapodest 50s® carousel. The gas composition was analyzed by gas chromatography (Perkin Elmer Clarus® 580). The volume of the gas sample was 200 µL and argon was used as carrier gas (350 kPa at 34 mL min^{-1}). After injection, CO_2 was separated from other gas by a capillary R-Q-bond column (30 m x 0.32 mm). H_2, O_2, N_2 and CH_4 were separated on a Rt-Molsieve 5 Å capillary column (30 m x 0.32 mm). Injector and thermal conductivity temperatures were set at 250 °C and 150 °C, respectively.

Fiber distribution was analyzed in triplicate using the Van Soest and Wine method (1967) from freeze-dried samples crushed to 1mm theoretical particle size. Water extract (W.EX), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL) and calcination residue (CAL) content were determined. Water-soluble compounds (W.SOLU), neutral detergent soluble compounds (SOLU),

hemicellulose (HEMI), cellulose (CELL) and lignin content (LIGN) were calculated as follow : W.SOLU = 1 – W.EX; SOLU = WEX – NDF; HEMI = NDF – ADF; CELL = ADF – ADL; LIGN = ADL – CAL. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test the difference in mean value between the different fiber fractions.

The total carbon (TC) and total nitrogen (TN) were determined via an elemental analyzer (FlashSmart®, Thermo Fisher Scientific®) on finely grounded freeze dried samples. TC and TN analysis were not replicated.

5.2.2.5 Biochemical Methane Potential Test

BMP was measured in batch assay. Samples were digested in 550 mL flasks with a working volume of 400 mL. Each flask is filled with 5 $gTS.L^{-1}$ of substrate, 5 gVS of anaerobic inoculum (UASB granular sludge), $NaHCO_3$ buffer ($50g.L^{-1}$), and macro- and microelement solutions as described by Monlau (Monlau et al., 2012). Before being closed, the flasks were flushed with N_2 to obtain anaerobic conditions. Triplicate bottles were incubated at 35°C. Controls containing only inoculum, buffer and macro- and microelement solutions were prepared in order to subtract the endogenous methane production of the inoculum from the one due to the samples digestion. The methane production was measured using an automatic batch test system (AMPTS® II, Bioprocess Control®, Sweden). Methane potentials are expressed as the volume of methane produced per amount of VS added for the BMP test, or per initial amount of VS estimated after taking into account the mass losses. BMP expressed in $NmLCH_4.gVS_{added}$ is useful to estimate substrate degradability after storage, while BMP expressed in $NmLCH_4.gVS_{initial}$.is mandatory to evaluate the global balance of the alkaline pretreatment process. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test the difference in mean value between BMP of fresh and stored samples.

5.2.2.6 Theoretical gas production calculation

In addition to the measured volume by pressure difference and gas chromatography, the cumulated gas production at 180 days of CO_2 and H_2 was estimated from the associated metabolites. Since most of the microbial fermentations are accompanied by CO_2 and H_2 production, their respective stoichiometric reactions were used in the following equations (5-3) and (5-4), adapted from Hillion et al. (2018):

$$Cumulated\ CO_2 = Acetic\ acid + Ethanol + Propionic\ acid + 2\ Butyric\ acid + Isobutyric\ acid + Valeric\ acid + Isovaleric\ acid + Caproic\ acid \quad (5\text{-}3)$$

$$Cumulated\ H_2 = 2\ \times [Acetic\ acid + Butyric\ acid + Isobutyric\ acid + Valeric\ acid + Isovaleric\ acid] \quad (5\text{-}4)$$

where cumulated CO_2 and H_2 are expressed in mmol.kgVS$_{init}^{-1}$ and all metabolites concentrations are expressed in mmol.kgVS$_{add}^{-1}$.

5.2.3 Results and Discussion

5.2.3.1 Raw material characterization

The main characteristics of the oat and rye fresh samples are summarized in Table 5-1. Both crops show a relatively low TS content when compared to other forage crops for silage making, whose optimal TS at harvest is around 30% (Teixeira Franco et al., 2016). These values are representative of what is expected for cover crops. Molinuevo-Salces et al. (2013) reported an average TS value of 17 ± 5 % and a variation from 10 to 29%TS for 20 different experimental cover crop assays. Cover crops usually have a low TS at harvest since they are cut before the optimal growth stage. However, since no water was added for the alkaline storage process, the TS value is high when compared to other alkaline pretreatment conditions in the literature, where TS is usually less than or equal to 10% (Khor et al., 2015; Monlau et al., 2013a, 2012; Thomas et al., 2018). Both crops had a low nitrogen content, with C/N ratios of 59 and 38 for oat and rye, respectively. Cereals are reported to have a lower nitrogen content than legumes or grasses in the literature (Kaiser et al., 2004).Water-soluble carbohydrates (WSC) were mostly composed of fructose and glucose, which are the principal primary soluble sugars found in temperate forage grass (Downing et al., 2008b). Initial concentrations in WSC of 131 g.kgVS^{-1} and 66 g.kg$_{VS}^{-1}$ were measured for oat and rye, respectively. These are considered as medium (oat) to low (rye) when compared to other crops forages in temperate climate, whose WSC content varies from 50 to more than 300 g.kg$_{VS}^{-1}$ (Kaiser et al., 2004). However, if a high WSC amount is essential to ensure a good quality of lactic fermentation in silage making, these soluble sugars can be used as easily accessible and biodegradable substrates for undesired fermentations in the present process. Fermentative metabolites such as VFA, lactic acid or ethanol were not detected in the raw samples, indicating the absence of fermentative activity during harvesting and storage prior to the start-up of the experiments. Both crops present similar composition in fiber constituents in the range of commonly encountered values in cover crops, with relatively high hemicellulose content (Molinuevo-Salces et al., 2013).

Table 5-1: Physicochemical characteristics of the catch crops

	Oat	**Rye**
pH	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
TS (%FM)	21.8 ± 0.01	24.9 ± 0.03
VS (%FM)	20.8 ± 0.01	23.7 ± 0.03
TN (%VS)	0.7	1.1
TC (%VS)	41.4	42.1
VFA ($g.kg_{VS}^{-1}$)	< d. l.	< d. l.
Fructose ($g.kg_{VS}^{-1}$)	76.6 ± 0.8	34.0 ± 0.4
Glucose ($g.kg_{VS}^{-1}$)	54.7 ± 0.7	31.4 ± 0.1
WSC ($g.kg_{VS}^{-1}$)	131 ± 1	66 ± 0
EtOH ($g.kg_{VS}^{-1}$)	< d. l.	< d. l.
W.SOLU (%TS)	39.6 ± 0.7	27 ± 1.4
SOLU (%TS)	1.1 ± 0.8	2.4 ± 1.2
HEMI (%TS)	26.3 ± 0.7	29.4 ± 1.5
CELL (%TS)	29.3 ± 0.2	34.9 ± 0.9
LIG (%TS)	4.1 ± 0.8	6.8 ± 0.5

5.2.3.2 Evolution of the chemical characteristics

The parameters allowing to follow the possible microbial activity and fermentative pathways involved during storage were monitored all along the experiments. Table 5-2 presents the variation of pH and ammonia concentration over storage period. Figure 5-1 shows the profile of the main analyzed components at different studied storage times and the cumulated gas production. Figure 5-2 shows the distribution of the energy potential of the main analyzed compounds (WSC, metabolites and gases) expressed in COD equivalent.

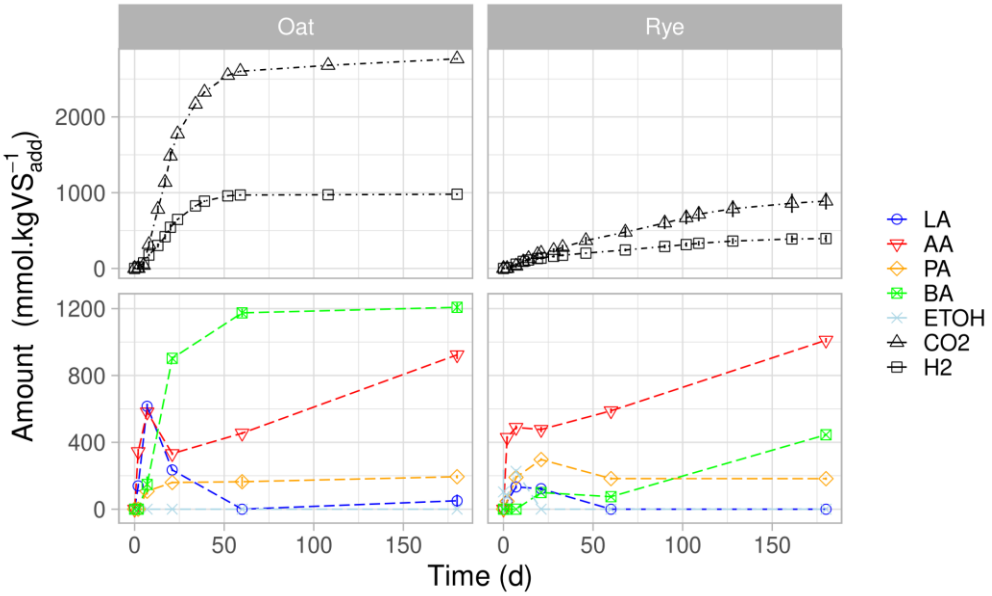

Figure 5-1: WSC, gas and metabolites variation during storage. Lactic acid (LA), Acetic acid (AA), Propionic Acid (PA), Butyric acid (BA) and Ethanol (ETOH) are expressed in mmol.kgVS$_{add}^{-1}$. CO_2 and H_2 are expressed in cumulated mmol/kgVS$_{init}^{-1}$. The error bars indicate standard deviation.

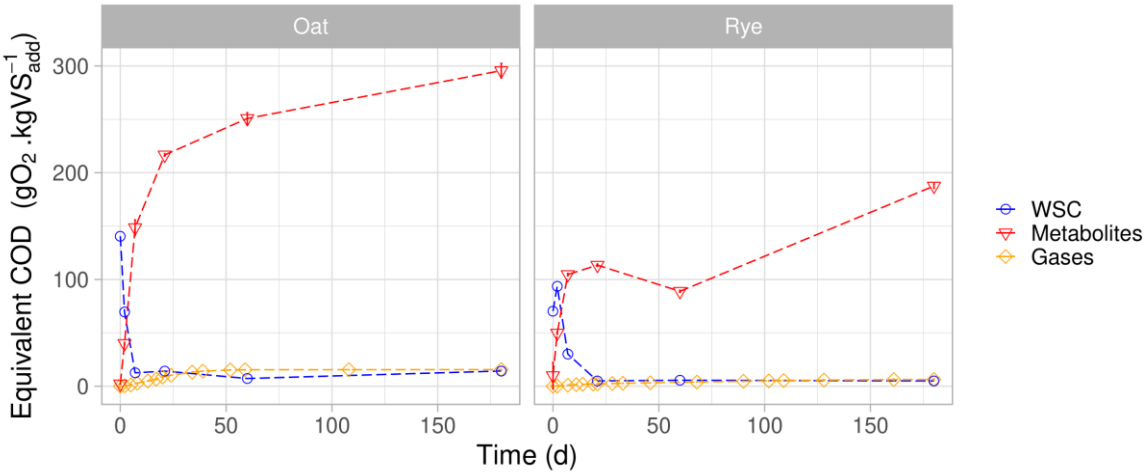

Figure 5-2: Variation of the COD repartition between WSC, soluble metabolites and gases. The error bars indicate standard deviation.

Unexpectedly, the pH dropped very quickly after closing the flasks and reached the neutrality in less than one week. At the same time, increasing concentrations of organic acids were recorded. The loss of the alkaline conditions was coupled to a quick WSC fermentation to VFA, lactic acid, CO_2 and H_2 (Figure 5-1 and Figure 5-2). From the very first days of the storage, different metabolic pathways occurred one after the other and were associated with the accumulation and/or consumption of different kinds of

metabolites (Figure 5-1). Depending on the type of crop, even if some differences in the profile of metabolite concentrations were observed, four main phases can be identified.

Table 5-2: pH and NH4-N variation during storage.:

	Time (d)	0	2	7	21	60	180
Oat	*pH*	11.9 ± 0.1	10.5 ± 0.0	6.6 ± 0.1	7.1 ± 0.1	7.5 ± 0.0	6.9 ± 0.0
	NH4-N ($g.kgVS_{add}^{-1}$)	0,2 ± 0	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Rye	*pH*	12 ± 0.1	9.8 ± 0.0	7.2 ± 0.0	7.2 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.7 ± 0.1
	NH4-N ($g.kgVS_{add}^{-1}$)	0,3 ± 0	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0	2,7 ± 0,1

During the first two days, a fast and strong accumulation of acetic acid was measured, up to concentration as high as 20.7 $g.kgVS_{add}^{-1}$ and 25.8 $g.kgVS_{add}^{-1}$ for oat and rye, respectively. Interestingly, this production of acetic acid was not accompanied by any significant gas production, and occurred at a high pH (between 12 and around 10). If this pH range is not favorable to most of fermentative bacteria, examples of the literature reported high acetic acid fermentation rates at elevated pH of 10 in mesophilic conditions (Dai et al., 2018; Ma et al., 2017) and even 11 at 22°C (Yuan et al., 2006). It was shown that most bacteria could not survive to the alkaline environment (Ma et al., 2017) and the cited works used inoculum from waste water treatment plants or anaerobic reactors with a high initial microbial diversity, which was not the case in the present work. A well-known abiotic chemical reaction, the deacetylation of hemicellulose, could thus be implicated in alkaline conditions. Alkaline deacetylation of lignocellulosic biomasses such as rice straw (Castro et al., 2017) and corn stover (Chen et al., 2014) using a dilute NaOH pretreatment resulted in the release of up to 24 $g.kgVS^{-1}$ acetic acid by solubilizing the acetyl groups from xylans of hemicellulose. This deacetylation reaction was carried out at high temperature (50 to 80°C), with medium to high reagent concentration (20 to 80$g.kg_{TS}^{-1}$ NaOH), with short reaction time of less than two hours, making obvious the absence of microorganism action in the process. The acetic acid release is strongly associated to the fast pH drop during the first two days of the storage.

From day 2 to day 7, whatever the substrate, different soluble fermentative metabolites accumulated, and in particular lactic and propionic acids (oat and rye), acetic acid (oat) and ethanol (rye). The evidence of fermentative activities is also confirmed by the degradation of glucose and fructose with a major decrease of their initial concentration. An increase in CO_2 and H_2 production rates was observed. The nature of the consumed sugars and produced metabolites, including gases, indicate that heterolactic fermentation occurred, following one or the other of the simplified reactions (5-5) and (5-6) (Hillion et al., 2018):

$$Glucose \rightarrow Lactic\ acid + Ethanol + CO_2 \quad (5\text{-}5)$$

$$Fructose \rightarrow Lactic\ acid + acetic\ acid + CO_2 \quad (5\text{-}6)$$

Heterolactic fermentations are commonly met in silage fermentation. However, the optimal pH range for the growth of the involved lactic acid bacteria is in the range of 5 to 6, and their growth rate is often reduced if the pH of the crop to be ensiled is equal to or greater than 7 (Pahlow et al., 2003) even if some lactic fermentations were reported with a starting pH of 9.5 using selected *Lactobacillus* strains as inoculum. This may evidence the existence of heterogeneous zones in the substrate with a lower pH than the measured value, allowing the development of lactic acid bacteria. The pH heterogeneity was probably due to the application of CaO as a dry powder and/or the acetic acid release during the deacetylation phase.

From the second week of storage until day 60 (oat) or 180 (rye), acetic acid concentrations were increasing, while certain metabolites accumulated after one week of storage were completely (lactic acid, ethanol) or partially (acetic acid, propionic acid) converted into butyric acid. During this period, residual glucose and fructose were completely consumed. High gas production was observed during this phase, and the ratio between CO_2 and H_2 production flow rates remained stable at $CO_2/H_2 = 2.5$. Butyric fermentation is due to bacteria of the *Clostridium* genus, which commonly grow in insufficiently acidified silages. They grow on soluble carbohydrates (Eq. (5-7), (Hillion et al., 2018)) and organic acids by a fermentation pathway that can be considered as the sum of Eq. (5-8) and (5-9) (Pahlow et al., 2003).

$$Glucose \rightarrow Butyric\ acid + 2\ CO_2 + 2H_2 \quad (5\text{-}7)$$

$$Lactic\ acid \rightarrow Acetic\ acid + CO_2 + 2H_2 \quad (5\text{-}8)$$

$$Lactic\ acid + Acetic\ acid \rightarrow Butyric\ acid + CO_2 \quad (5\text{-}9)$$

In storage processes for anaerobic digestion, clostridial fermentations are considered as undesired, since they lead to the production of H_2 that escapes from the silo and induces losses of methane potential (Kreuger et al., 2011; Teixeira Franco et al., 2016).

In the present case, the total consumption of the previously produced lactic acid indicates that, at least, clostridial fermentations of lactic acid occurred. However, regarding the balance between degraded COD from initial WSC and cumulated metabolites (Figure 5-2), the observed sugar consumption could not explain alone the accumulation level of primary metabolites (LA, AA, PA, EtOH) and their further conversion into BA. This indicates that more complex carbohydrates were constantly degraded and released soluble sugars. These released WSC, mostly xylose, glucose and arabinose from the hemicellulose, may have been continuously converted into lactic acid (Eq. (5-5) or (5-10)) (Hillion et al., 2018)) and then into butyric acid (Eq. (5-8)and (5-9)), or directly degraded into butyric acid following Eq. (5-7).

$$Arabinose/Xylose \rightarrow Lactic\ acid + Acetic\ acid \qquad (5\text{-}10)$$

The clostridial activity may also be evidenced by the fermentation of amino acids and amines into ammonia (Hillion et al., 2018). Table 5-2 shows a constant increase in ammonia concentration in rye, reaching 22% of initial TN after 180 days of storage. Surprisingly, a much lower ammonia accumulation was observed in oat, despite an important butyric fermentation. This could be explained by the fact that butyric fermentation started earlier in oat, with BA apparition before 7 days of storage, when pH was still lowering from 10.5 to 6.6. In these conditions of high pH, a large fraction of the ammonia may have undergone a faster volatilization in the form of NH_3. Total Nitrogen analysis could help to conclude on this hypothesis, but no such measurements were performed on stored samples in the present work.

During the last phase of the process, the microbial activity was considerably reduced, except an acetic acid production that continued following a slow kinetic. Oat samples reached this relative steady state 3 times faster than rye samples after only 60 days and the final concentration in BA was twice higher, what may be explained by the higher initial amount of WSC in oat. Interestingly, this state of relative stability began after BA reached a threshold value of 100g.gVS_{add}^{-1}, after what no further BA production was observed. BA may therefore have an inhibitory effect. However, the fact that rye samples also seem to reach a similar stable state at the end of the experiment from day 108, even with a 2.7 times lower BA amount, indicates that the decrease of the microbial activity is more probably due to the depletion of the accessible fermentation substrates.

5.2.3.3 Process impact on Fiber distribution, VS and BMP preservation.

The pretreatment effect on the fiber distribution of the crops was studied, and the results are presented inFigure 5-3. In Oat samples, the three most accessible fractions significantly varied, from 39.6 to 31.6%TS_{init} (W.SOLU), 1.1 to 4.3%TS_{init} (SOLU) and 26.3 to 11.8%TS_{init} (HEMI) fractions significantly varied

($p < 0.05$). Rye samples undergone a lower transformation, with significant changes ($p < 0.05$) for SOLU (27.0 to 25.3%TS_{init}) and HEMI (29.4 to 17.7%TS_{init}) fractions only. In both cases, no solubilization of the cellulose and lignin fractions were observed. The hemicellulose was greatly reduced, and easily accessible carbohydrates were released, mostly xylose, glucose and arabinose. This WSC release explains the difference in the balance between the consumed COD of the initial WSC and the accumulated COD of the metabolites (section 3.2 and Figure 5-2). Nonetheless, since no effect on cellulose and lignin were observed, the pretreatment action of CaO was seemingly limited, and the long-term effect of the pretreatment on lignin wasn't obtained.

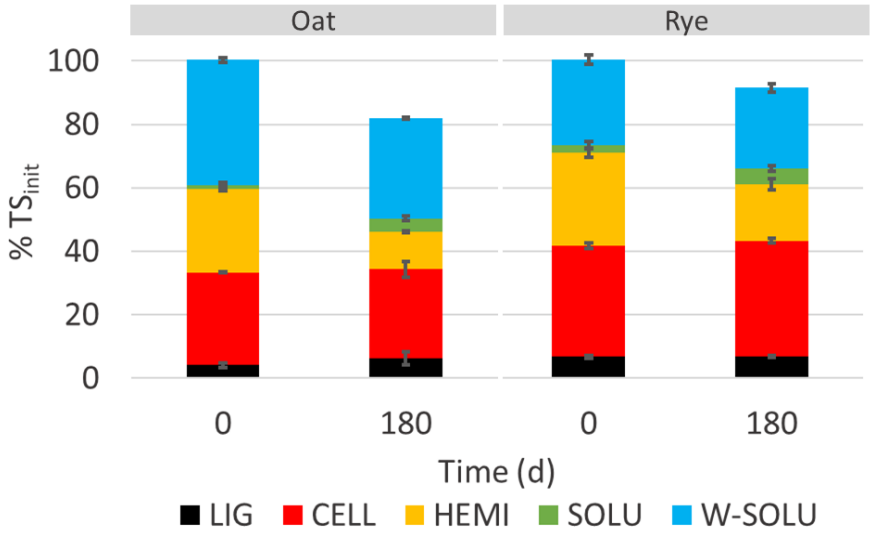

Figure 5-3 : Alkaline storage effect on fiber distribution. The error bars indicate standard deviation.

Figure 5-4 shows the dynamics of mass losses for both crops over the whole storage period. The gas production related to microbial fermentations was responsible for significant VS losses of 18.1% and 9.0% respectively for oat and rye during the experiment. The measured values were higher (oat) or comparable (rye) to the ones that are commonly observed in ensiling, where 5 to 12% TS losses occur during the fermentation of properly managed silages (Kaiser et al., 2004). The VS losses were mostly due to CO_2 production. Mass losses and cumulated CO_2 production followed the same behavior (Figure 5-1 and Figure 5-4). Considering mass balance during alkaline pretreatments, mass losses computed on the base of the mass of gas release were 123 and 40 $g.kgVS_{init}^{-1}$ for oat and rye respectively and were significantly lower than direct mass measurement of the jars (181 and 90 $g.kgVS_{init}^{-1}$) respectively. This may evidence the presence of gas leaches on the experimental setup over the 6-month period, as direct weighting of jar is a more reliable method. Considering the theoretical gas production based on the accumulated metabolites

calculated as presented in section 5.2.2.6, cumulated CO_2 and H_2 should theoretically be of 3572 and 4341 mmol.kgVS$_{init}^{-1}$ for oat, 2207 and 3158.4 mmol.kgVS$_{init}^{-1}$ for rye.

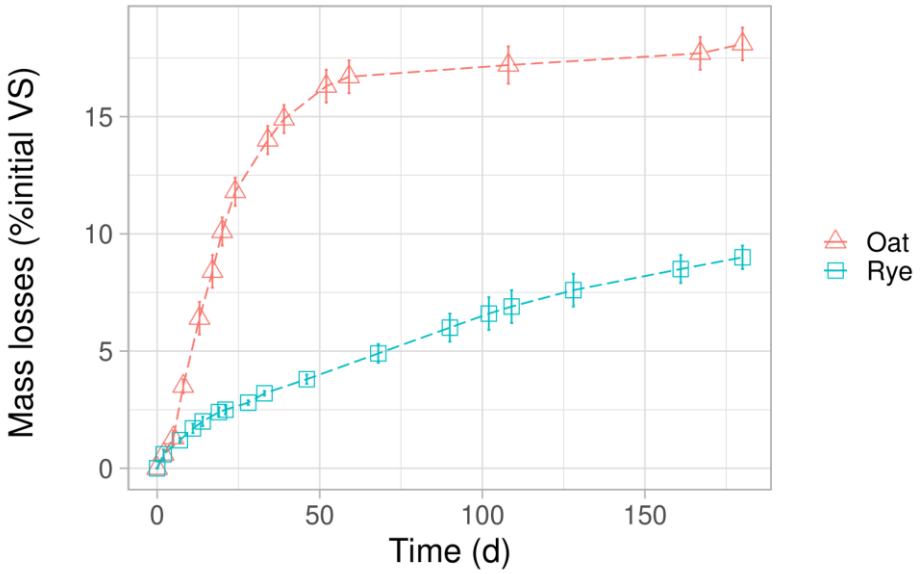

Figure 5-4: Dynamics of mass losses. The error bars indicate standard deviation.

The significant difference between these values and the measured ones presented in Figure 5-1, particularly considering the CO_2/H_2 ratio, may also indicates that in-situ gas consumption like homoacetogenesis took place, converting H_2 and CO_2 into acetic acid (Eq. (5-11), (Hillion et al., 2018)).

$$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow Acetic\ acid + 2\,H_2O \qquad (5\text{-}11)$$

This phenomenon occurs in dark fermentation, where in-situ H_2 consumption by homoacetogenic bacteria is reported, particularly at pH close to 7 (Saady, 2013). Consequently, the effective energy losses due to H_2 production were low.

BMP tests were carried out on the raw substrates and on substrates stored for 7, 60 and 180 days. Figure 5-5 summarizes the methane potential expressed in NmLCH$_4$.gVS$_{add}^{-1}$ and NmLCH$_4$.gVS$_{init}^{-1}$, as detailed in section 5.2.2.5. The raw oat and rye samples BMP were respectively 294 ± 3 and 348 ± 11 NmLCH$_4$.gVS$_{init}^{-1}$. These values are comparable to other BMP of cereal cover crops that commonly vary from 200 to 400 NmLCH$_4$.gVS^{-1} in the literature (Molinuevo-Salces et al., 2013).

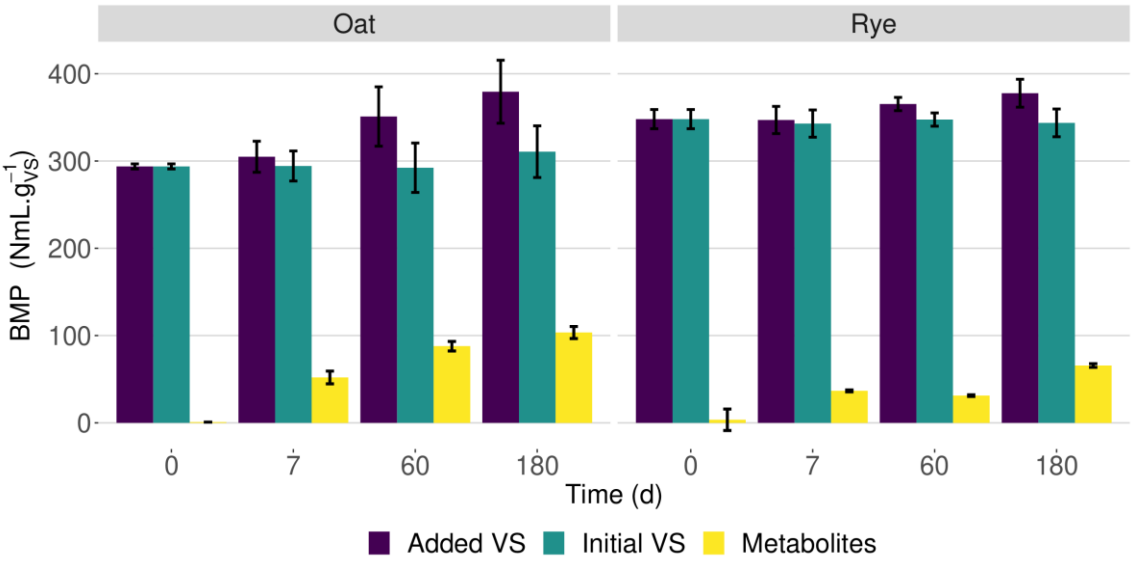

Figure 5-5: Impact of storage duration on methane potential. BMP ($NmLCH_4.gVS_{added}^{-1}$) and BMP ($NmLCH_4.gVS_{initial}^{-1}$) represent pretreated crop biodegradability and methane potential reported to the VS amount before pretreatment, respectively. $BMP_{metabolites}$ represent the contribution of soluble metabolites in BMP ($NmLCH_4.gVS_{initial}^{-1}$). The error bars indicate standard deviation.

Whatever the cover crop, the degradability of the substrate increased during the alkaline pretreatment storage by 29% (oat) and 8.5% (rye) after 180 days, suggesting at first glance a significant ($p = 0.015$ and 0.056, respectively) action of the pretreatment on the lignocellulosic biomass. However, after taking into account the mass losses during the storage, the methane potential only varied by +6% and -1% for oat and rye, respectively, which indicates no significant difference from the BMP of the fresh substrates ($p = 0.355$ and 0.676, respectively).

During the storage period, the production of H_2 can be the cause of an energy loss, and thus of the reduction of the methane potential. This loss was estimated by calculating the COD of H_2 produced (Figure 5-2) and it represented 5.4 and 2.2 $NmLCH_4.gVS^{-1}$ for oat and rye, respectively 1.8 and 0.6% of initial BMP. This theoretical value is very low compared to that of the BMP of the fresh substrate, which may explain why no loss of methane potential was experimentally observed during storage. In well-preserved silages, slightly higher energy losses from 2 to 4% happen during fermentation (Kaiser et al., 2004). Consequently, during the alkaline storage, because of the loss of mass of the substrate in the form of CO_2 and the conversion of the initial soluble carbohydrates (373 NmL $CH_4.g^{-1}$) into more energetic compounds such as butyric acid that were released (636 $NmLCH_4.g^{-1}$), the methane potential was concentrated in the

remaining dry matter. Figure 5-5 presents the estimated BMP of the present metabolites in the substrates, in $NmLCH_4.gVS_{add}^{-1}$. The increase of the BMP of the metabolites was strongly linked to the increase of the substrate degradability and mass losses, showing the concentration of the BMP of the crop in the remaining biomass after storage.

Thus, negligible BMP losses occurred considering the whole process, and the initial methane potential of the harvest was efficiently preserved, despite microbial reactions considered as highly undesirable in crop storage processes such as butyric fermentation. By extension, this work brings interesting data for understanding the impact of ensiling on crops for biogas production. In fact, the substrate characteristics along with the microbial fermentation pathways that took place after the first days (pH close to neutrality and important butyric fermentation) is highly comparable to a silage fermentation considered as of a very poor quality. The quality of silage for animal feeding fulfills the following criteria: pH < 4.5, lactic acid > $30g.kgTS^{-1}$, butyric acid < 10% of total VFA (Bureenok et al., 2016), while the present stored substrate is far from these characteristics, showing that ensiling for biogas production has very different purposes than for animal feed. This suggests that the ideal silage characteristics for anaerobic digestion are not well defined yet, and future researches may address this subject.

Considering the initial pretreatment objective of the process, it can be concluded that the alkaline conditions were not maintained long enough to obtain the expected long-term pretreatment and increase the BMP. However, even if a significant increase is not already reached, the elevated pH (pH 7) of the stored crop could lower the detrimental effect of organic acids on the concrete walls of the silo, which is a reported problem with acid silages (pH 4) (Koenig and Dehn, 2016). Research needs to be undertaken in order to reach the optimal conditions of operation by focusing on the initial characteristics like the alkaline reactive nature and load, global TS and the presence of available substrates for microbial fermentation, with the purpose of maintaining the alkaline conditions for a sufficient time in order to increase the pretreatment efficiency.

5.2.4 Conclusions

A succession of abiotic and biotic reactions induced a fast and sharp pH drop from 12 to 7, and thus compromised the long-term action of the alkaline agent. Despite undesirable fermentations and high mass losses, no significant effect on the methane potential was observed during the storage process. Alkaline storage, however, induced an increase in specific biodegradability which is associated with mass loss. This study clearly demonstrates that the methanogenic potential of the two selected cover crops was

maintained for more than 6 months. An optimized process under stable alkaline conditions could therefore allow a better pretreatment efficiency.

5.2.5 Acknowledgements

The authors thank “Arvalis” and “Biométharn” for providing the cover crops samples. National Research and Technology Association (ANRT) is gratefully acknowledged for the PhD grant allocated to Clément Van Vlierberghe under CIFRE convention N° 2018/0706. All experiments and physical-chemical analysis were performed at the Bio2E platform (doi:10.5454/1.557234103446854E12)

5.3 Conditions for efficient alkaline storage of cover crops for methane production

C. VAN VLIERBERGHE[1,2], R. ESCUDIE[1], N. BERNET[1], G. SANTA-CATALINA[1], S. FREDERIC[2], H. CARRERE[1]

[7] *INRAE, Univ. Montpellier, LBE, 102 Avenue des étangs, F-11100, Narbonne, France.*

[8] *GRDF, 9 rue Condorcet, F-75009, Paris, France*

Cet article a été publié en mars 2021 dans la revue *Bioresource technology* sous la référence :

Van Vlierberghe, C., Escudié, R., Bernet, N., Santa-Catalina, G., Frederic, S., Carrere, H., 2022. Conditions for efficient alkaline storage of cover crops for biomethane production. Bioresour. Technol. 348, 126722. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126722

Abstract

An innovative process aiming to combine storage and alkali pretreatment of cover crops was investigated using lime as a low cost and environmental friendly reactant. Different lime loading and Total Solids concentrations (TS) allowed to highlight the abiotic mechanisms of deacetylation during the early stages of the process. Long-term storage experiments of rye and sunflower cover crops at 100 $g.kgTS^{-1}$ lime loading allowed to evaluate the fermentation kinetics and to compare performances in dry and wet conditions to classicalf silage storage. The dry condition allowed an efficient alkaline storage and up to a 15.7% Biochemical Methane Potential (BMP) increase, while the wet condition underwent a succession of fermentations with a high butyric acid accumulation and H_2 production, leading to a 13% BMP loss. Silage experiments allowed an efficient preservation of the BMP, with no significant variation over the 6-month storage duration.

Keywords

Intermediate crops; Anaerobic digestion; Silage fermentation; Pretreatment of lignocellulose; Biogas

5.3.1 Introduction

In order to face the increasing demand in renewable energies, extensive research and investments are currently made to develop new modes of production of clean and sustainable energies. Resulting from the degradation of a large panel of sewage, effluents, biowastes and agricultural residues, production of methane by anaerobic digestion (AD) processes provides a sustainable alternative to natural gas allowing significant reductions in greenhouse gases emissions when substituted to natural gas or other fossil fuels.

AD of waste-like substrates allows to produce a renewable fuel while valorizing a large variety of by-products. However, a larger amount of biomass is required to substitute the present natural gas consumption in France and worldwide. For this reason, energy crops were grown in various countries to provide a larger amount of biomass for anaerobic digestion. As energy crops have a high biomass yield per hectare and a high CH_4 yield, they allow to secure the intake supply of biogas plants. In Germany, about 78% of total energy production by AD referred to energy crops in 2016 (Daniel-Gromke et al., 2018), *i.e.* 25 TWh. However, despite these advantages, energy crops compete for arable land with food crops and the benefits of their use as a sustainable intake for AD are questioned. As an alternative to energy crops, cover crops (CC), also called intermediate crops, allow to produce biomass for AD without increasing the demand in arable land. CC are grown during the intercultural period of food or feed crop rotations. In addition, their use brings agro-ecological advantages, allowing to avoid erosion and nutrient leaching (Igos et al., 2016), facilitate the control of self-propagating plants (Büchi et al., 2020) and accumulate organic matter in the soil (Jian et al., 2020a). However, the cost-effectiveness of the cultivation of CC has to be improved to ensure the economical relevance of their use for AD. If it mostly depends on the harvest yield that has to compensate the cultivation costs, the potential of the crop still has to be efficiently stored and preserved until its use in the anaerobic digester. The storage of wet harvested crops (in opposition to haymaking) is generally performed by ensiling. This process relies on the spontaneous lactic fermentation and acidification of the biomass under anaerobic conditions by the action of endogenous bacteria that ferment the accessible sugars contained in the plant into lactic acid and other compounds such as acetic acid and ethanol (Elferink et al., 1999). Once a low pH corresponding to acidic conditions is reached, the microbial activity can be inhibited over several months until the silo opening. Ensiling has been shown to be an efficient conservation method of crops for AD, but its success depends on several parameters, and significant degradations can occur in non-optimal conditions (Teixeira Franco et al., 2016).

Because of their fibrous composition, the degradability of CC into methane can however be low. The accessibility of the microorganisms involved in the anaerobic digestion to the fermentescible carbohydrates of hemicellulose and cellulose is limited by the complex structure of the lignocellulosic

matrix, which lowers both yield and kinetic of biogas production from crops (Monlau et al., 2013b). A large variety of pretreatment technologies has been reported in the literature in order to increase the degradability of lignocellulosic biomasses into methane. Due to their high efficiency to degrade lignin, the alkaline pretreatment constitutes a promising option for an application on lignocellulosic biomasses (Carrere et al., 2016). Significant improvements of the degradability of lignocellulosic biomasses into methane were obtained, even in mild conditions with low energy and reactive requirements (Khor et al., 2015; Thomas et al., 2018). In mild conditions, the extension of the pretreatment duration was shown to have a beneficial impact, allowing to compensate the slower kinetic of the reaction (Thomas et al., 2018). Considering the alkaline reagents, NaOH, KOH and CaO are among the most studied for alkaline pretreatment. However, NaOH and KOH are expensive and NaOH can additionally cause an increase in the digestate salinity, which may be harmful to the soil in the case of the use of the digestate as a fertilizer (Shahid et al., 2018). In contrast, CaO is already used in agriculture to control soil acidity with soil liming and presents the advantage to be less expensive. CaO is also available in high quantity as it is produced from the calcination of limestone, an abundant component of the earth crust. For these reasons, CaO constitutes an interesting option as a reagent for alkaline pretreatment, despite its lower efficiency when compared to NaOH and KOH (Jiang et al., 2017).

Since CC are commonly stored by ensiling for anaerobic digestion, applying an alkaline pretreatment after storage would no represent an optimized solution. Indeed, a larger amount of reagent would be necessary to elevate the pH of silage, which is rich in organic acids and buffered around pH 4. In order to bypass this problem, the alkaline pretreatment of crops could therefore be applied directly after harvesting. By extending the pretreatment duration until several months, a combined storage and pretreatment process could thus be developed, allowing to take advantage of the long term action of the alkaline pretreatment. Few examples of alkaline storage of crops are reported in the literature. Pakarinen et al. (2011) experimented the use of urea (30 and 60 $g.kg_{TS}^{-1}$) as an alkaline reagent on hemp for ethanol and biogas production over a 4 and 8 months storage period. Despite a final pH of 8.7 which is a low value in the context of alkaline pretreatment, significant increase of the enzymatic hydrolysability (+46%) and BMP (+21%) were found. However, the same increase was measured in the silage experiment with no additive and no mass balance was calculated during this alkaline storage experiment, which makes difficult to interpret such energy potential variations. Digman et al. (2010) studied an alkaline storage process for ethanol production using lime in anaerobic conditions on switchgrass and reed canarygrass. The CaO loading varied from 14.6 to 100 $g.kg_{TS}^{-1}$, with storage durations from 30 to 180 days. The authors found that all storage conditions allowed an efficient preservation of the biomass, even if no global energy

balance including mass losses was evaluated. The best pretreatment efficiency was found with the highest lime loadings of 85 and 100 $g.kg_{TS}^{-1}$. The results also showed that only these high lime concentrations allowed to maintain a high pH of 9.1 ± 0.9 and 10.1 ± 0.4, respectively, until the end of the storage. Final pH was highly correlated with the CaO loading (r = 0.97) and with the efficiency of the pretreatment (r = 0.82). Interestingly, no correlation was found between the pretreatment duration and its efficiency. In addition, both chemical and microbial mechanisms involved during storage were not clarified. In a recent work, Van Vlierberghe et al. (2021) showed a fast pH decrease from 12 to 7 after a few days, using a relatively low CaO loadings (60 $g.kg_{TS}^{-1}$). The pH destabilization was attributed to two possible phenomena both abiotic (chemical deacetylation of hemicellulose) and biotic (microbial fermentation) phenomena. The deacetylation reaction consists in the solubilization and removal of the acetyl groups that are covalently bonded to the xylan backbone of hemicellulose (Chen et al., 2012), releasing acetic acid in the medium. In lignocellulosic materials like corn stover, acetyl groups esterified to the hemicellulose structure represent in average 2.2% of TS and were shown to increase the biomass recalcitrance (Humbird et al., 2011). Dilute alkaline pretreatments were shown to be efficient at solubilizing the acetyl groups of hemicellulose in mild conditions (Chen et al., 2014), making probable the occurrence of this phenomenon in alkaline storage. Considering the microbial fermentation, lactic, acetic and butyric fermentations were involved (Van Vlierberghe et al., 2021). However, the understanding of the contribution of both mechanisms was limited. In addition, even if the methane potential of the crops was efficiently preserved, the expected positive effect of the pretreatment was not achieved, which was attributed to the fact that the lignocellulosic substrate was not exposed to an alkaline pH for a sufficient period of time. Maintaining a high level of pH during the whole storage duration was consequently identified to be necessary for both inhibitions of undesirable microbial activity and increase of the pretreatment action on lignocellulose.

The present work aims to give an insight of the very short and long-term mechanisms involved in alkaline storage of crops with lime. In the very first stage of storage, the chemical deacetylation of hemicellulose and its contribution to the pH change were studied during the first hours of alkaline storage. In addition, the effect of the storage conditions on the physico-chemical characteristics of the crops were identified during the whole storage duration of six months, along with the evolution of the microbial communities present on the substrate which had never been studied to the authors' knowledge. A direct comparison of the energy potential balance between different alkaline storage conditions and the conventional silage process is discussed, in order to conclude on the relevance of alkaline storage process.

5.3.2 Material and Methods

5.3.2.1 Feedstock

Three cover crops were used as a substrate. For the first experiment which evaluated chemical deacetylation, a sample of rye (*Secale cereale, Rye 1*) harvested at BBCH59 (end of heading stage) and cultivated as a winter cover crop on an agricultural site in France (Biométhagri, Florensac, 34101, Hérault, France) was used. The rye was shredded using a garden shredder (AXT 2550TC, Bosch GmbH) directly after harvesting and stored at -20°C until the experiment.

Two other cover crops harvested on another agricultural site (Biométharn, Aiguefonde 81200, Tarn, France) were used to evaluate the long-term alkaline storage during the second set of experiments. One sample of rye (*Secale cereale, Rye 2*) cultivated as a winter cover crop, harvested at BBCH 73 (early milk stage) and one sample of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivated as a summer cover crop and harvested at maturity stage BBCH 88 (end of the ripening stage). The two crops were stored overnight as a whole plant at 4°C in sealed plastic bags, avoiding moisture change before use, and used directly after for storage experiment.

5.3.2.2 Experimental set-up

Before all experiments, the crops were chopped using a garden shredder (AXT 2550TC, Bosch GmbH) until homogeneous particle size of approx. 1-2 cm was reached and further passed through a knife shredder (BB230, BLiK®) for better longitudinal cut of the crop pieces. The different experiments described below were made using the following setup. 2.6L glass flasks sealed with air-tight lids equipped with a rubber septum that allows pressure measurement and gas sampling were used. Replicates were prepared for each storage condition to be sacrificed after the determined durations to monitor the impact of different storage conditions on biomass conservation and on fermentation kinetics. 700g of sample were packed into the flasks which were then flushed with N_2, sealed and stored in a dark room.

5.3.2.3 Short-term experiment

The deacetylation experiment was divided into two stages. The first one aimed to evaluate the acetic acid production kinetic. The TS of the crop was adjusted to 25% by oven drying at 40°C, and a lime loading of 100g.kg_{VS}^{-1} was applied. Several replicates were prepared to be sacrificed after 2, 4, 8, 24 and 168 hours of storage (3 replicates for each storage time). The flasks were stored at 4°C in order to inhibit the microbial activity. This method was preferred to others, such as thermal treatment, in order to minimize the side effects on the substrate characteristics. The second stage focused on the influence of lime loading and moisture content on the acetic acid release during the first hours of the process. Four conditions were tested following a 2x2 factorial design. The different conditions are summarized in Table 5-3. TS values of

10 and 40% were chosen, as these extreme values can be found for cover crops at harvest time. The TS value of the crop was adjusted by adding distillated water or by oven drying at 40°C. CaO loadings of 25 and 200 $g.kg_{TS}^{-1}$ were applied. The lower level was chosen as one of the lowest amounts found in the literature. The higher level was set as a large excess of CaO whose value is usually less than or equal to 100 $g.kg_{TS}^{-1}$ (Digman et al., 2010; Khor et al., 2015).

Table 5-3: Pretreatment conditions applied for the second phase of deacetylation experiment and effect on pH

TS (%FM)	Loading ($g.kg_{VS}^{-1}$)	Initial pH	Final pH
10	25	10.7 ± 0.0	9.9 ± 0.1
10	200	13.2 ± 0.0	13.2 ± 0.1
40	25	9.8 ± 0.0	8.4 ± 0.1
40	200	13.1 ± 0.0	13.1 ± 0.1

5.3.2.4 Long-term experiment

A lime loading of 100 $g.kg_{TS}^{-1}$ was selected according to the results of Digman *et al.* (2010) and the deacetylation experiment presented above. Alkaline storage was applied on two different cover crops (i.e., sunflower and rye). For both crops, a "dry" alkaline storage was achieved by applying a dry powder of CaO directly, reaching a TS content of the mixture of 41 and 47% TS for rye and sunflower, respectively. For rye samples, an additional "wet" condition was experimented, as Digman *et al.* (2010) showed that a higher moisture content increased the pretreatment action. Deionized water was gradually sprayed on the mixture during homogenization in order to increase the lime diffusion into the biomass and adjust TS, until a total TS of 29% was reached. Water addition was limited to this extent because higher moisture are reported to cause undesirable effluent production in bunker silo during storage (Teixeira Franco et al., 2016). Ensiling assays were conducted as controls, since silage is still the most common method for crop storage prior to anaerobic digestion. The same storage protocol was used for silage experiments, except that no chemical additives were added. For each storage condition, five replicates were prepared to be sacrificed and analyzed after 2, 7, 21, 60 and 180 days of storage. The flasks were stored in a dark place where temperature was controlled at 22°C.

5.3.2.5 Silo monitoring and sampling

After the flasks were closed, gas production and weight losses were regularly monitored until flask opening. Volumetric gas production was quantified by pressure difference. The pressure was measured using a manometer (Keller LEO® 2) and gas was released when pressure exceeded 1.2 bar, after what the

flasks were immediately weighted. The volume of gas inside the flask (headspace + pore space) was calculated by subtracting the volume of added substrate to the total volume of the flask. The volume of substrate was calculated using its theoretical density calculated as follows, adapted from McNulty *et al.* (McNulty and Kennedy, 1982) (5-12):

$$\rho_t = (1 - C)\,[(M/\rho_l) + (1 - M)/\rho_s] + C/\rho_{CaO} \qquad (5\text{-}12)$$

where M = fractional moisture content related to fresh matter (FM); C = fractional CaO content related to fresh matter; ρ_l = liquid or water density = 1000 kg/m^3; ρ_s = dry matter density = 1421 kg/m^3 and ρ_{CaO} = CaO density = 3345 kg/m^3. The composition of the gas was analyzed using a gas chromatography (Perkin Elmer Clarus 580) with a Rt-U-bond column (30m x 0.32mm x 10µm) for CO_2 separation, and a Rt-Molsieve 5Å column (30m x 0.32mm x 10µm) for H_2, O_2, N_2 and CH_4 separation. Argon was used as vector gas (350 kPa, 34 mL/min). Injector and detector temperature was set on 200°C, and oven temperature on 65°C. Detection was made by thermic conductivity. For each planned storage duration, one flask was opened after final gas and weight measurement. The whole sample was then crushed using a knife mill (Pulverisette 11, Fritsch). Total solids (TS) and volatile solids (VS) were measured immediately. Water extraction was performed for pH, water soluble carbohydrates (WSC), volatile fatty acids (VFA) and other metabolites measurements. 30 g of fresh sample were soaked in 150 mL of deionized water for 16 h to 20 h at 4°C in sealed plastic pots in triplicate, similarly as proposed by Porter & Murray (Porter and Murray, 2001). pH measurement was made directly after extraction on the mixture. Then, the liquid phase was separated by centrifugation (18750 g, 20 min, 4°C) and frozen in air-tightly closed tubes for further WSC, VFA and metabolites analysis. A fraction of the samples was separated and stored at -20°C for further BMP measurement. Finally, aprox. 100 g of fresh sample were freeze-dried and milled using a 1mm grid for fiber distribution analysis.

5.3.2.6 Physicochemical analyses

TS were measured in triplicate by drying 30 g of sample at 105°C for 24 h. Volatile Solids (VS) were then measured by calcination of the dry residue (550°C, 3 h). Silage and other substrates obtained from crops transformation may content volatile fatty acids (VFA), lactic acid (LA) and diverse alcohols that evaporate during oven drying causing underestimation of TS. For this reason, the TS content value measured by oven drying was corrected using the equation proposed by Porter and Murray (2001) (5-13):

$$TS_C = TS_M + 0.375\,LA + 0.892\,VFA + 0.975\,Alcohols \qquad (5\text{-}13)$$

where TS_C = corrected TS; TS_M = measured TS; LA = lactic acid concentration; VFA = total VFA concentration; Alcohols = total alcohols concentration. All concentrations are in g/gFM. TS_C was further used for VS calculation.

pH was measured in triplicate using WTW® SenTix® 41 probe on a WTW® inoLab® pH7110. WSC and metabolites concentration was measured from the centrifuged liquid phase after filtering (0.2 µm nylon filter) by High Performance Liquid Chromatography on Aminex 4PX-87H column (Bio-Rad) at 45°C. Sulfuric acid (0.005 M; 0.3 mL/min) was used as mobile phase. WSC content was calculated as the sum of glucose, xylose, arabinose, fructose. Fiber distribution was analyzed in triplicate on previously freeze dried and milled samples using Van Soest method (Van Soest and Wine, 1967). Water extract (*W.EX*), neutral detergent fiber (*NDF*), acid detergent fiber (*ADF*), acid detergent lignin (*ADL*) and calcination residue (*CAL*) contents were determined. Water soluble compounds (*W.SOLU*), neutral detergent soluble compounds (*SOLU*), hemicellulose (*HEMI*), cellulose (*CELL*) and lignin content (*LIGN*) were calculated as follow : *W.SOLU* = 1 – *W.EX* ; *SOLU* = *WEX* – *NDF* ; *HEMI* = *ND*F – *ADF* ; *CELL* = *ADF* – *ADL* ; *LIGN* = *ADL* – *CAL*. Prior to the fiber extraction, a preliminary extraction of fat was performed on sunflower samples, as recommended by Van Soest *et al*. Lipids were extracted with an ASE instrument (Dionex ASE-200) with heptane:ethanol (2:1, vol:vol) for solvent, as described by Yang *et al.* (Yang et al., 2019). No fat extraction was made on rye samples, whose lipid content was expected to be negligible (Herrmann et al., 2011a). The total carbon (TC) and total nitrogen (TN) were measured with an elemental analyzer (FlashSmart®, Thermo Fisher Scientific®) on finely grounded freeze dried samples. TC and TN analyses were not replicated. BMP measurements were made following the recommendations of Holliger et al. (2016) . Samples were previously prepared for BMP test by freezing a certain amount of substrate containing around 2 g_{TS} of sample (exact TS and VS were calculated later) soaked in $NaHCO_3$ buffer. The buffer was added to minimize the difference of pH between ensiled and alkali-stored samples, avoiding additional pretreatment effect of alkaline conditions before BMP test. Gas measurement was made using an automatic batch test system (AMPTS II, Bioprocess Control, Sweden). The methane potential value was expressed as the volume of methane produced per initial amount of VS estimated after taking into account the mass losses that occurred during storage. This was made to evaluate the global energy balance of the different storage processes. The generated sequencing datasets are registered in the Sequence Read Archive (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) under the BioProject accession number PRJNA788459.

5.3.2.7 Microbial community analysis

For each sampling time of the storage experiment, a 300 mg sample was collected and stored into a 2 mL sterile Eppendorf tube and stored at -20°C until DNA extraction. DNA extraction, sequence data analysis

and quantitative PCR were performed as described by Dauptain et al. (2020). Sequencing was made at the technology platform Genome and Transcriptome (GeT) of the Génopole Toulouse, France. Only OTUs with a relative abundance of 1.5% or more in at least one sample were selected for further data analysis.

5.3.2.8 Statistical data analysis

One-way analysis of variance was performed on fiber distribution and BMP after verifying normality (Shapiro-Wilk test) and variance homogeneity (Levene test) with R package "rstatix". Pair-wise t-test adjusted with Bonferroni correction was further performed to assess the significance of the difference in mean between two samples. The package "ggplot2" was used for all graphical representations.

5.3.3 Results and discussions

5.3.3.1 Raw material characterization

The main characteristics of the different crops are presented in Table 5-4. The higher maturity crops (i.e., rye 2 and sunflower) were characterized by higher solid content and lower water-soluble carbohydrates (WSC). Cover cops are usually characterized by a TS value lower than 30%, with an average of 17 ± 5 (Molinuevo-Salces et al., 2013). The TS content at harvest greatly depends on the crop maturity stage, related to sowing and harvesting dates, climate and crop species (Kaiser et al., 2004). WSC were mostly composed of fructose and glucose, the main primary soluble carbohydrates in temperate forages (Downing et al., 2008b). These carbohydrates are essential for the lactic fermentation and acidification of silages (Elferink et al., 1999), but also represent a high amount of easily accessible carbohydrates for undesirable fermentation in alkaline storage.The three crops had C/N ratios of 50, 54 and 23 for rye 1, rye 2 and sunflower, respectively, which corresponds to low (rye) and medium (sunflower) values when compared to other crops (Molinuevo-Salces et al., 2014). Sunflower samples were characterized by a higher lignin content than in rye samples. Rye samples presented a higher hemicellulose content, that is a more easily accessible fiber for biogas production (Monlau et al., 2013b).

5.3.3.2 Short-term experiment

The first short-term experiment allowed to investigate the kinetics of acetic acid production that occurs during the early stages of the alkaline storage (Figure 5-6). Despite the reaction temperature (4°C) which strongly limits the microbial fermentation activity, a large amount of acetic acid (AA) was produced immediately after the lime addition. After only 2 h, 80% of the final AA concentration had already been released. The maximum value of 24 $g.kg_{VS}^{-1}$ was reached after 4 h and remained stable for one week. In the literature, similar amounts of acetyl groups were released for lignocellulosic biomasses. Humbird et al (2011) reported an average value of 22 $g.kg_{VS}^{-1}$ in corn stover, while Castro et al. (2017) and Chen et al. (2014) measured acetyl content of 26 and 27 $g.kg_{VS}^{-1}$ in rice straw and corn stover, respectively, which

suggests that a high deacetylation yield was obtained in these experiments. In addition, the AA production was not associated to WSC consumption nor fermentation gas production or other accumulation of metabolites. The pH was maintained at a value of 12.8 during this period. As a consequence, the production of AA during the first hours of alkaline treatment (lime loading of 100 $g.kg_{VS}^{-1}$) is related to a chemical deacetylation mechanism.

Table 5-4 : Main physicochemical characteristics of the studied cover crops. n.d. : not determined; <d.l. : below the detection limit

	Rye 1	**Rye 2**	**Sunflower**
TS (%FM)	21.8 ± 0.0	37.1 ± 0.1	42.5 ± 0.5
VS (%FM)	20.4 ± 0.0	35.9 ± 0.1	40.1 ± 0.2
TN (%VS)	0.9	0.8	1.9
TC (%VS)	44.6	43.3	44.8
pH	6.2 ± 0.0	6.0 ± 0.1	6.8 ± 0.0
VFA ($g.kg_{VS}^{-1}$)	< d.l.	< d.l	< d.l
Fructose ($g.kg_{VS}^{-1}$)	79.3 ± 11.5	33.6 ± 2.8	44.8 ± 0.2
Glucose ($g.kg_{VS}^{-1}$)	60.1 ± 6.5	20.4 ± 1.4	21.9 ± 0.4
WSC ($g.kg_{VS}^{-1}$)	147.0 ± 13.3	54.0 ± 3.1	66.9 ± 0.7
EtOH ($g.kg_{VS}^{-1}$)	< d.l.	3.1 ± 0.3	< d.l
Lipids ($g.kg_{VS}^{-1}$)	n.d.	n.d.	5.6

The effect of lime loading and TS content on the final AA accumulation and pH was investigated in a second set of experiments. The reaction duration was set at 48 h. Since deacetylation kinetics have been shown to be rapid, a longer experimental time is not necessary to investigate this phenomenon. The main effects of CaO and TS are shown in Figure 5-7. Results from the first experiment (lime loading of 100 $g.kg_{VS}^{-1}$) after 24h of reaction were also added for comparison. The CaO loading was shown to have the highest effect since the AA release doubled between lime loadings of 25 and 200 $gCaO.kg_{TS}^{-1}$. Interestingly, few additional AA was released for the highest load of 200 $gCaO.kg_{TS}^{-1}$ in comparison to the previous experiment (100 $gCaO.kg_{TS}^{-1}$). This may be explained by the fact that high deacetylation yield was already obtained at a lime loading of 100 $gCaO.kg_{TS}^{-1}$. Consequently, it is not expected that an increase of lime loading over 100 $gCaO.kg_{TS}^{-1}$ induces an additional effect on pretreatment efficiency, since previous studies showed that when enough lime has been added to remove acetyl groups, further lime addition is not beneficial to pretreatment action on lignocellulosic biomass (Chang et al., 1998).

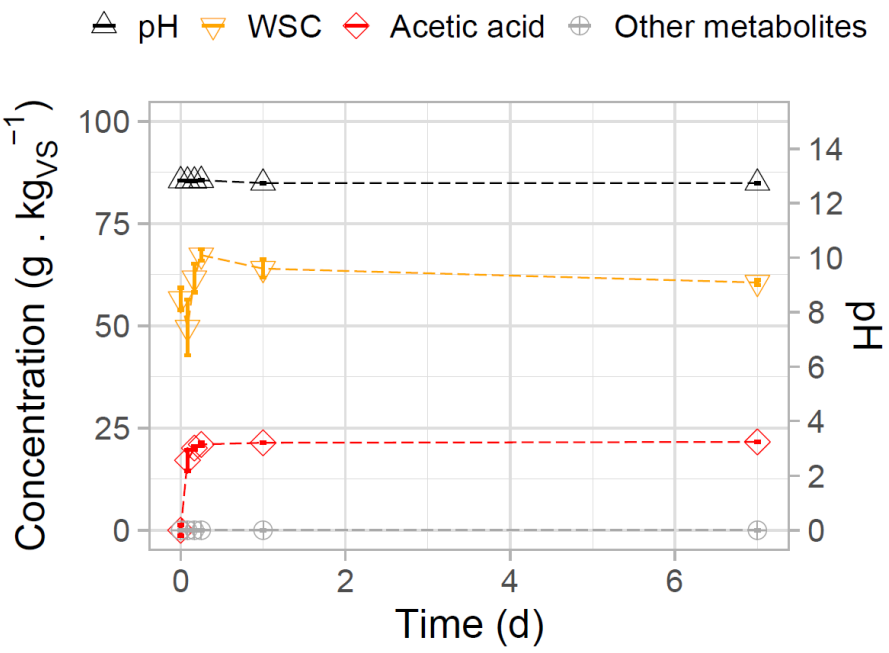

Figure 5-6: Variation of acetic acid, WSC and pH during the first days of alkaline storage. Dots represent averaged values of the sacrificed triplicates. Error bars indicate standard deviation within triplicates.

The moisture content was also shown to have an effect on deacetylation yield, which is in agreement with the results of Digman *et al.* (2010) who observed a higher pretreatment effect in wet conditions. The higher deacetylation efficiency in wet conditions may be explained by the better solubilization and diffusion on CaO in the medium.

Lime loading had an important effect on initial and final pH (Table 5-3). At lime loading of 25 gCaO.kg$_{TS}^{-1}$, the initial pH was close to 10, while higher values of 13 were found with lime loadings of 100 and 200 gCaO.kg$_{TS}^{-1}$. Most importantly, the lowest lime loading was not sufficient to ensure a high pH stability, since pH drops of of 0.8 and 1.4 were observed for TS content of 10 and 40%, respectively. In such storage environments the microbial activity would not have been totally inhibited, and undesirable fermentations could start (Van Vlierberghe et al., 2021). The final pH for two highest lime loading of 100 and 200 gCaO.kg$_{TS}^{-1}$ were similar and stable at a value of 13, and thus no beneficial effect on pH was found when increasing the lime loading over 100 gCaO.kg$_{TS}^{-1}$.

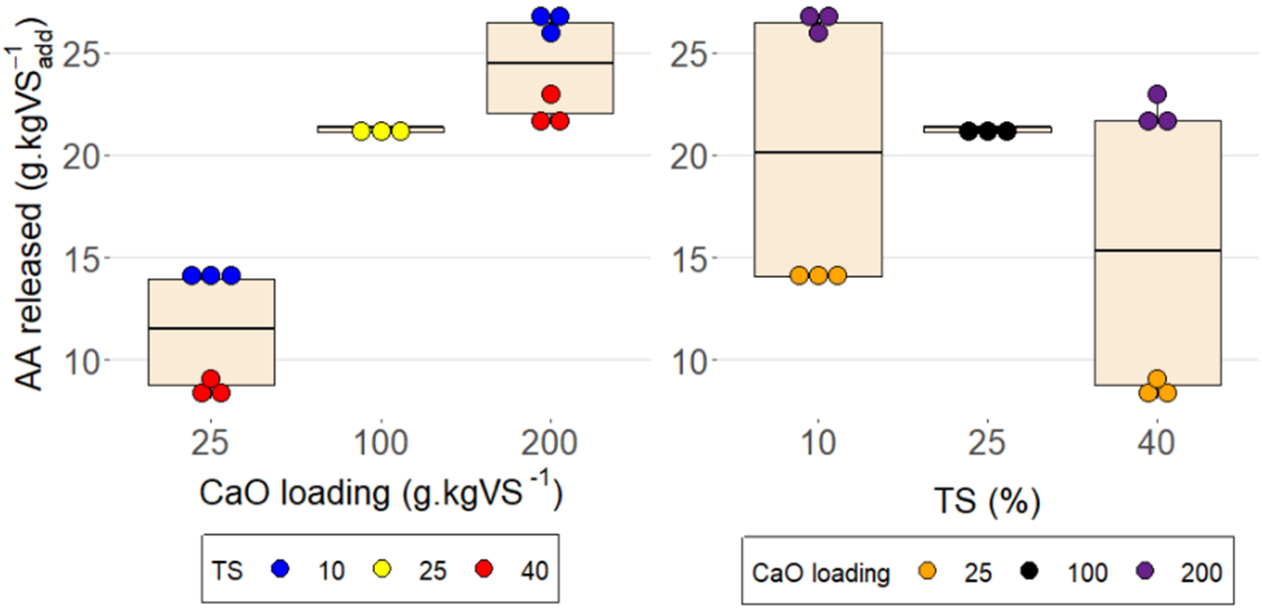

Figure 5-7: Effect of CaO loading and MS on acetic release after 2 days of reaction. Each dot represent a value from a single replicate.

The short-term experiment confirmed the hypothesis of the chemical deacetylation of hemicellulose to be responsible for the AA production at the beginning of alkaline storage. However, if the acetic acid release seems to have an effect on pH at a low lime loading, no effect on pH related to this phenomenon was observed for a CaO loading higher than 100 g.kg$_{VS}^{-1}$ even after a week of storage at 4°C, suggesting that this lime loading was sufficient to maintain a high pH in absence of microbial fermentation and to reach a high deacetylation rate.

5.3.3.3 Long-term experiment

During the whole storage experiment, replicates were periodically sacrificed and analyzed in order to monitor the evolution of biomass transformation over the storage period. pH, metabolites accumulation and gas production (Figure 5-8) together with identification of the microbial populations (Figure 5-9) allowed to understand the mechanisms involved during alkaline storages of 180 days. Depending on the cover crops and storage conditions (alkali-stored and ensiled samples), three main steps can be identified and are described below. In addition, the analysis of the microbial populations indicated that different microorganisms were involved in each step.

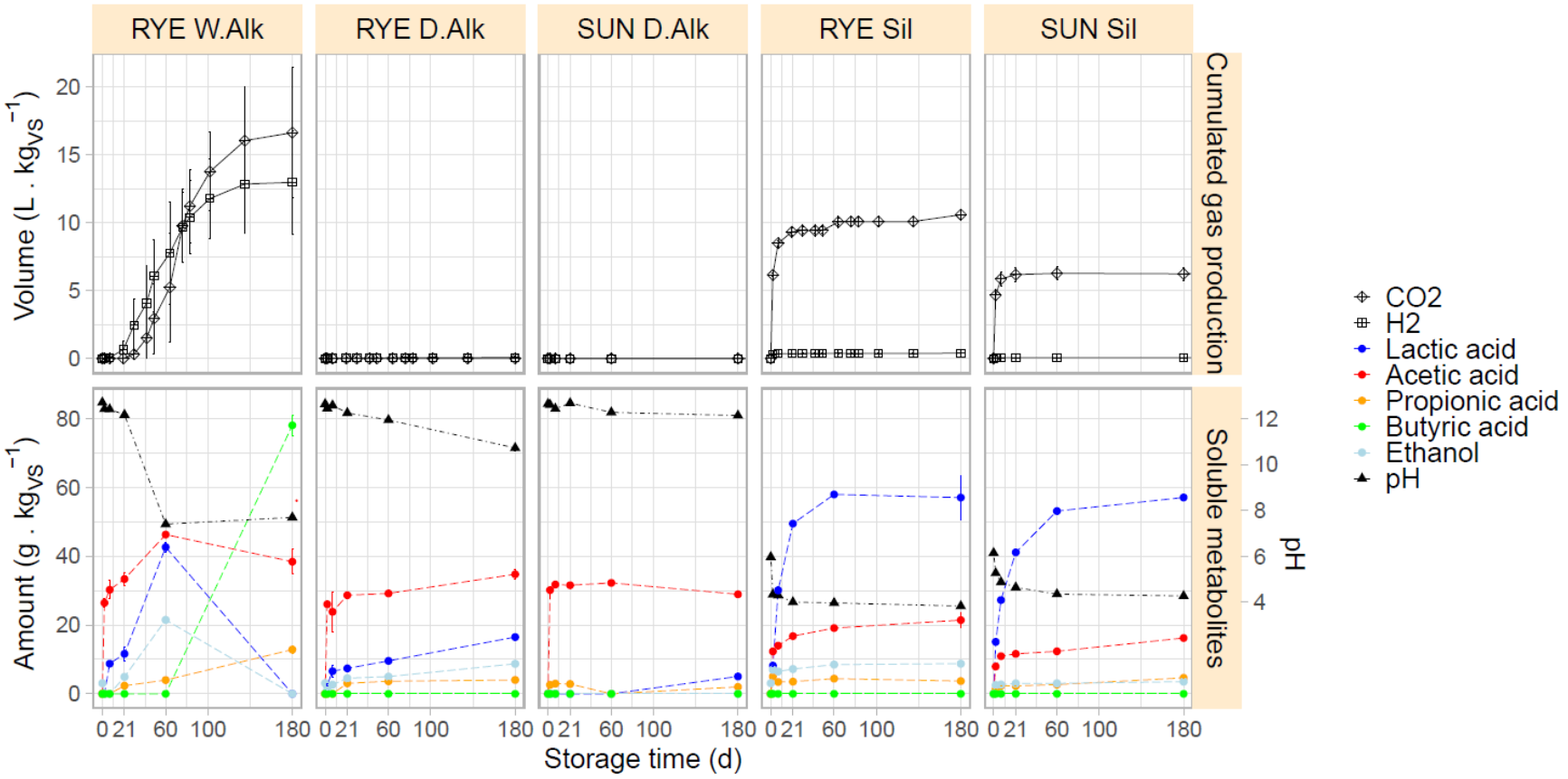

Figure 5-8: pH, metabolites and gaz variation during storage. CO2 and H2 are expressed in cumulated $L.kg_{VSinit}^{-1}$. Metabolites are expressed in $g.kg_{VSadded}^{-1}$. W.Alk, D.Alk and Sil stand for wet alkaline, dry alkaline, respectively. SUN stand for sunflower.

5.3.3.3.1 Dynamical changes during storage

First phase (0 to 21 days)

In all alkaline storage experiments, high pH of 12.6 ± 0.1 were reached just after the addition of lime to the shredded crop. These values are comparable to those observed in the previous section (Figure 5-6 and Table 5-3). By applying a CaO load of 100 $g \cdot kg_{VS}^{-1}$, pH was therefore maintained in an alkaline range, since pH did not vary significantly during this phase. It is noteworthy that, at a lower CaO load of 60 $g \cdot kg_{VS}^{-1}$, Van Vlierberghe *et al.* (2021) reported a significant pH drop during the same period from 12 to 7 in less than one week. Acetic acid concentrations of 26 and 30 $g.kg_{VS}^{-1}$ were released from the hemicellulose of rye and sunflower, respectively, suggesting that a high rate of deacetylation occurred. Low productions of other metabolites and fermentation gases were measured, suggesting an absence or low microbial activities. In fact, during the first three weeks of storage, microbial abundance remained low in the alkaline samples, due to the inhibitory action of high pH (Figure 5-9). During the same period, for silage conditions, a lactic fermentation was responsible for the acidification of the medium and the pH dropped quickly from 6.0 (rye) and 6.8 (sunflower) to 4.0. This fermentation is also obviously linked to a strong production of CO_2. Both crops underwent a conventional silage fermentation pathway and presented the characteristics of high quality silages according to Bureenok et al. (2016) with a pH lower than 4.5, a lactic acid concentration higher than 30 $g \cdot kg_{TS}^{-1}$ and butyric acid concentration representing less than 10% of total VFA concentration. In silage samples, a bacterial growth was observed and the initial abundances were multiplied by 19 and 5.2, growing from $1.05 \cdot 10^9$ to $2.10 \cdot 10^{10}$ and from $1.08 \cdot 10^9$ to $6.74 \cdot 10^9$ 16S rRNA gene copy number$\cdot g_{FM}^{-1}$ for rye and sunflower, respectively. This bacterial growth was mostly composed of bacteria from Lactobacillales and Enterobacteriales orders. Among the most represented lactic acid bacteria (LAB) after 2 days of fermentation, *Weissella sp.* (OTU5) and *Leuconostoc sp.* (OTU3) were dominant for rye while *Weissella* and *Lactococcus* (OTU10) prevailed for sunflower. These heterofermentative bacteria are known to be predominant in the epiphytic microflora of plants and to be responsible of a fast lactic acid production during the early fermentation phase (Gharechahi et al., 2017). From day 2 to 21, *Weissella*, *Leuconostoc* and *Lactococcus* decreased and were progressively replaced by different OTU of more acid tolerant *Lactobacillus* sp., as commonly observed in silage fermentation (Gharechahi et al., 2017). Additionnaly, *Enterobacteriaceae* (OTU4) were observed during this early phase. *Enterobacteriaceae* are commonly considered as undesirable in silage fermentation since they ferment amino acids into NH_3, compete with LAB for nutrients and reduce WSC into acetic acid and components that do not decrease pH. Below 4.5, pH prevented *Enterobacteriaceae* multiplication, consequently their

number was considerably reduced as the medium acidified. During this phase, mostly lactic acid was produced, suggesting predominant homofermentation mechanisms.

Second phase (21 to 60 days)

After the third week of storage, silage conditions were stabilized and few additional fermentative microbial activity was observed. Almost no additional accumulation of metabolite nor gas production occurred. The total bacterial abundance was strongly reduced due to the acid conditions. $1.04 \cdot 10^9$ and $1.75 \cdot 10^9$ rRNA gene copy number$\cdot g_{FM}^{-1}$ were measured for silage of rye and sunflower, respectively.

In alkali-stored conditions, two different behaviors took place. For the two experiments performed under dry conditions (41 and 47 %TS for rye and sunflower, respectively), the stable state obtained in phase 1 was maintained. The absence of fermentative activity can be identified by the lack of gas and metabolites production, which is confirmed by the low bacterial abundance (Figure 5-8 and Figure 5-9). In the wet condition however, a destabilization of the alkaline condition occurred after the third week of storage. Indeed, an heterolactic fermentation suddenly started and induced a pH drop down to 7.4. In this storage condition, WSC were consumed and converted into lactic acid, acetic acid, propionic acid and ethanol that accumulated in the medium. Fermentation gases (CO_2 and H_2) were also released. Unlike in silage conditions, a significant production of H_2 occurred. During this fermentation step in wet alkaline rye, H_2 production was likely linked to acetic and propionic fermentation (Hillion et al., 2018) since no butyric acid was found in the medium at this time. In storage processes prior to anaerobic digestion, H_2 production has to be avoided because of the high energy potential of this molecule (Kreuger et al., 2011). During this fermentation phase, the microbial concentration increased significantly from $1.28 \cdot 10^8$ to $9.60 \cdot 10^9$ rRNA gene copy number$\cdot g_{FM}^{-1}$ from day 21 to 60. The bacterial bloom was mostly due to the growth of Lactobacillales and Enterobacteriales in a similar way as during the early fermentation phase of silage. Clostridiales were also found in a smaller proportion. However, despite similarities in the order of the most represented bacteria in the fermentation of wet alkaline and ensiled samples, the actual microbial populations were different, as can be seen in Figure 5-9. In wet alkaline rye, the bacteria from Lactobacillales order were mostly composed of *Enterococcus sp.* (OTU6), with also *Carnobacterium sp.* (OTU8) present in a smaller proportion. *Enterococcus* bacteria are tolerant to pH until 9.6, but not below 4.5 (Cai, 1999). *Enterococcus* are mostly known as homofermentative bacteria. However high amounts of ethanol and acetic acid were found, indicating that other metabolic pathways took place.

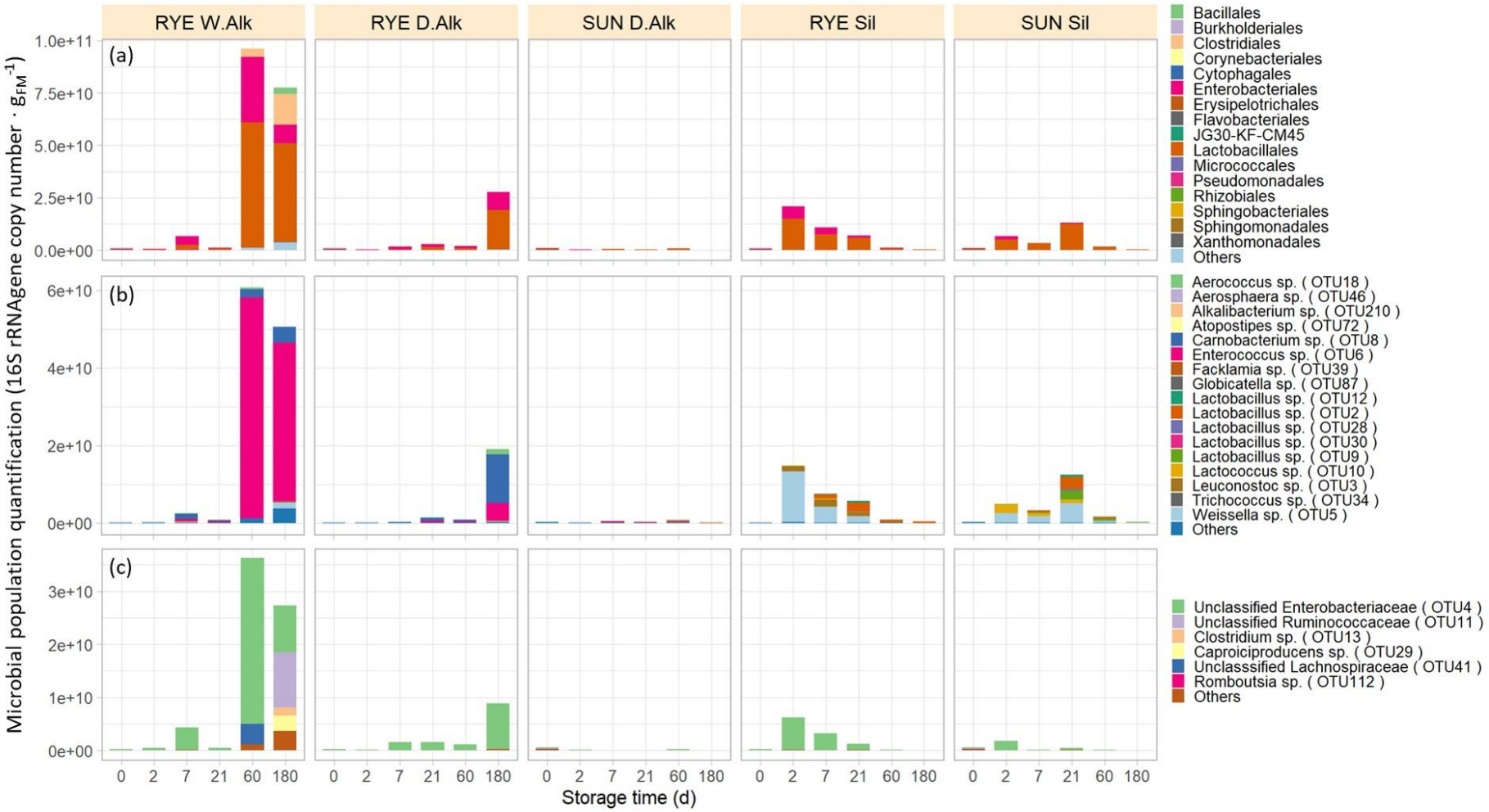

Figure 5-9: Major OTUs abundance (relative abundance >1.5% for at least one storage time) expressed in 16S rRNA gene copy.g_{FM}-1. (a): Principal orders, (b): bacteria affiliated to Lactobacillales order, (c): bacteria affiliated to Enterobacteriales and Clostridiales orders. W.Alk, D.Alk and Sil stand for wet alkaline, dry alkaline, respectively. SUN stand for sunflowe

Although being LAB, *Carnobacteria* grow at pH range of 7-9, and even until 10.4 for *Carnobacterium maltaromaticum* that are found in the cold and alkaline tufa columns (Leisner et al., 2007). This bacteria genus is mostly related to food spoilage of chilled fish, meat and dairy products (Lorenzo et al., 2018). However, C*arnobacteria* can also be found in silage and are reported to participate in the primary lactic acid fermentation following heterolactic mechanisms (Pahlow et al., 2003). Bacteria from the Enterobacteriales order were mostly represented by a member of *Enterobacteriaceae* family (OTU4). This *Enterobacteriaceae* may develop on WSC and amino acids to produce acetic acid and NH_3 in destabilized alkaline storage in the same way as in silage, however the absence of further acidification could not allow their inhibition. *Enterobacteriaceae* are also reported to be H_2 producers, which is consistent with the observations that were made from day 21 to 60 (Cabrol et al., 2017). Additionally, Clostridia from *Lachnospiraceae* family were observed (OTU41). Clostridia are highly reported as undesired in silage fermentation. Clostridia proliferate mostly at pH > 5 and grow on amino acids, sugars and lactic acid to produce mostly butyric acid, CO_2 and H_2; they thus cause BMP reduction (Kreuger et al., 2011; Pahlow et al., 2003; Teixeira Franco et al., 2016). More specifically, *Lachnospiraceae* bacteria are largely represented in the gut or rumen of mammals where pH conditions close to neutrality are met (Evans et al., 1988). They are able to ferment diverse plant carbohydrates to VFA (butyrate, acetate, propionate) and alcohols like ethanol (Vacca et al., 2020).

The transformations that occurred in wet alkaline rye during this storage phase shows the complexity of inhibition mechanisms in alkaline storage. Despite a seemingly previous stable period of three weeks, microbial bloom finally happened with fermentation patterns implying H_2 production and Clostridia development that may lead to energy loss during the rest of storage. This shows that, in addition to CaO loading and initial pH, moisture content of the medium plays a crucial role in alkaline stability.

Third phase (60 to 180 days)

During this last phase of storage, no changes were observed in the silage conditions, nor in the alkaline storage of sunflower in dry condition. In dry alkaline storage of rye, a slow heterolactic fermentation was observed, similar to the one that was observed previously in wet alkaline rye. OTU8, OTU6 and OTU4 grew and were responsible for a low heteroloactic fermentation, without causing a destabilization comparable to the one observed in wet condition during phase 2. The bacterial development was seemingly slowed down by the water availability that was lower than in wet alkaline samples. In wet alkaline storage of rye, a secondary butyric fermentation took place. Most of the metabolites (i.e. lactic acid, acetic acid and ethanol) released during the previous phase were converted into butyric acid until a high concentration of 78 $g \cdot kg_{VS}^{-1}$ was reached, similarly as observed by Van Vlierberghe et al. (2021). The butyric fermentation

was explained by a significant increase in the abundance of Clostridiales bacteria: *Caproiciducens sp.* (OTU29) and *Clostridium sp.* (OTU13), replacing OTU41 (*Lachnospiraceae*) that was found earlier. Concerning the bacteria from Lactobacillales order, no significant changes in abundance nor composition of their population was observed.

From day 100, gas production and mass losses kinetics started to slow down in wet alkaline storage, suggesting a decrease in the microbial activity. This final relative stable state could be explained by the very high concentration of butyric acid that accumulated in the medium and inhibited microbial activity. In wet alkaline rye, considering a pH 7.7 of the medium at this time, butyric acid was present at 99.9% in the dissociated form according to the Henderson-Hasselbalch equation (Equation (5-14)).

$$pH = pK_a + log\frac{A^-}{AH} \qquad (5\text{-}14)$$

where A^- = concentration of acid under its dissociated form, AH = concentration of acid under its undissociated form. Butyric acid is known to have a strong inhibitory effect on fermentation, mostly in its undissociated form that can cross the cell membrane. However, the dissociated form is also reported to have an inhibitory effect from a high concentration due to the ionic strength that may result in the cell lysis of hydrogen-producing bacteria (Van Niel et al., 2003). A strong inhibitory effect of butyrate on fermentation for hydrogen production was reported in diverse studies. Zheng and Yu (2005) observed an almost total inhibition of H_2 production with 25 $g{\cdot}L^{-1}$ butyrate at initial pH 6.0 (93% of dissociated form). Similar results were obtained in another study at 26.4 $g{\cdot}L^{-1}$ butyrate at initial pH 7.0 (99.3% of dissociated form) (Wang et al., 2008). In the present study, the final butyrate concentration of 78 $g{\cdot}kg_{VS}^{-1}$ is equivalent to 26.6 $\cdot g.L^{-1}$ when reported to the water fraction of the samples. The high amount of butyrate present in the medium at the end of wet alkaline storage could therefore be responsible for the inhibition of the microbial activity and final stabilization of the biomass.

Despite the similar initial properties of the different alkali-stored conditions, very different variations of the biomass properties occurred during storage as consecutive fermentations took place in some samples. This experiment confirmed that microbial fermentations were mostly responsible for the pH drop that can be observed in alkaline storage. Interestingly, if an elevated pH was shown to allow the inhibition of the microbial activity, the bacteria present in the medium were able to restart their activity from a high pH. As fermentation restarted, the pH decreased, which limited the inhibitory action of lime and allowed a fast bacterial growth. High pH (>12) and TS content (>40%) were shown to provide the best anaerobic alkaline stability. In silage experiment, the lactic fermentation allowed an efficient acidification of the substrate

that stopped the bacterial growth. As a result, no secondary fermentations occurred in silage. A third inhibition mechanism at neutral pH was observed, due to the high butyric acid concentration. This inhibition allowed to prevent further degradations of the substrate such as methanogenesis to happen, thus avoiding energy losses and greenhouse gas emissions during storage.

5.3.3.3.2 Impact of storage conditions on biomass characteristics and methane potential

The impact of storage conditions on fiber distribution characteristics was evaluated according to the Van Soest and Wine method (Van Soest and Wine, 1967) after 180 days of reaction (Table 5-5). The alkaline storage had mostly a strong impact on the hemicellulose fraction, that was significantly reduced by 53, 57 and 29% for rye storage in wet and dry conditions, and sunflower in dry condition, respectively. The hemicellulose reduction could not be only explained by the deacetylation mechanisms associated with the measured acetic acid release that represents 10% of the raw material hemicellulose content in wet and dry alkaline storage, and 19% in sunflower. Consequently, an actual dissolution of hemicellulose occurred due to the pretreatment action. As the hemicellulose was solubilized, both soluble fractions W-SOLU and SOLU increased. Alkaline storage had little effect on cellulose that was significantly different only between the dry alkaline conditions and the silage of the same crop. These results are in agreement with other experiments from the literature, where lime pretreatment was shown to partly solubilize hemicellulose, while the cellulose was not degraded (Kim and Holtzapple, 2005). Considering the lignin fraction, a reduction of 10% and 21% was measured in dry alkaline storage of rye and sunflower, respectively. However, due to the high variability of the raw material characteristics, these changes were not considered as significant by the pair-wise t-test adjusted with Bonferroni correction. In the literature, alkaline pretreatment with lime is reported to partly solubilize lignin. Delignification rates until 30-50% can be obtained with non-oxidative lime pretreatments at mild temperature (25 to 55°C) (Kim and Holtzapple, 2006; Wyman et al., 2005). The limited delignification obtained in the present experiments may be explained by the low moisture content applied combined with the use of CaO as a dry powder. Due to the low solubility of CaO (1.65 $g \cdot L^{-1}$ at 20°C), only a small fraction of the added lime may have been solubilized and was actually available for the pretreatment. In silage experiments, no significant changes in the share between the different fractions were observed. As reported in the literature, the lignocellulosic matrix undergoes few modifications in well preserved silages (Feng et al., 2018).

Table 5-5: Fiber distribution of the fresh and 180d stored crops expressed in %VSinit. Within each column, different letters (abc) express a statistical difference between two samples of the same crop species stored under different conditions.

		W-SOLU	SOLU	HEMI	CELL	LIG
Rye	Fresh	29.5 ± 0.9^{a}	3.3 ± 1.1^{ac}	26.1 ± 1.5^{a}	31.6 ± 3^{a}	9.2 ± 3.6^{a}
	Wet Alkaline	29.4 ± 4.5^{a}	8.5 ± 1.3^{b}	12.2 ± 1.7^{b}	33 ± 0.9^{a}	9 ± 0.9^{a}
	Dry Alkaline	40.6 ± 7.8^{b}	5.8 ± 3.2^{ab}	11.2 ± 1.2^{b}	30.1 ± 0.9^{a}	8.3 ± 1^{a}
	Silage	29 ± 2.1^{a}	0.4 ± 1.3^{c}	22.8 ± 1.8^{a}	35.9 ± 3.1^{a}	10 ± 2.4^{a}
Sunflower	Fresh	21.4 ± 5.5^{a}	13 ± 4.6^{ab}	15.6 ± 0.2^{a}	27.8 ± 1.7^{ab}	16.5 ± 2.9^{a}
	Dry alkaline	23 ± 0.5^{a}	19.7 ± 1.2^{a}	11 ± 0.4^{b}	24.8 ± 0.1^{a}	13.1 ± 0.7^{a}
	Silage	20.7 ± 0.4^{a}	11.7 ± 0.4^{b}	13.5 ± 1.4^{a}	29.8 ± 1^{b}	15.2 ± 0.7^{a}

The gas production related to the different fermentation phases induced mass losses, mostly related to the production of CO_2. For rye, mass losses of 7.2 ± 0.6, 0.5 ± 0.1 and 2.9 ± 0.1 % of initial VS were measured in wet alkaline, dry alkaline and silage, respectively. For sunflower, the VS losses were limited to 0.3 ± 0.0 and 1.9 ± 0.1 % in dry alkaline and silage, respectively. Similar VS losses from 2 to 4% are normally observed in well preserved silage fermentation (Kaiser et al., 2004; Kreuger et al., 2011).

BMP tests were performed on the fresh rye and sunflower used in storage experiment, along with samples stored during 7, 60 and 180 days. The results are presented in Figure 5-10. In most conditions, the biomass was efficiently stored and no significant BMP reduction was found after storage, excepted in wet alkaline rye. The unstable wet alkaline storage of rye caused a significant BMP loss of 13%, probably due to H_2 production (Kreuger et al., 2011), unlike previously observed by Van Vlierberghe et al. (2021) where the gas productions did not cause any measurable BMP loss, even with a 70% higher H_2 production due to fermentation.

The stable alkaline storage experiments (e.g. dry alkaline rye and sunflower) induced a BMP increase of respectively 10 and 21%. These changes were however considered as non-significant by the pair-wise t-test adjusted with Bonferroni correction, probably due to the high variability of BMP test. A significant increase of 15.7% was only observed between dry alkaline sunflower and sunflower silage. The results show that a slight increase in BMP was obtained due to the long-term action of the pretreatment, since a growing trend in BMP was only observed after 60 (sunflower) to 180 days (rye).

In the literature, BMP improvements of 17 to 37% (Thomas et al., 2018), 4 to 37% (Khor et al., 2015) and 7 to 34 % (Jiang et al., 2017) were obtained by pretreating similar lignocellulosic biomasses in mild conditions. The lower methane yield obtained in this experiment could be explained by the fact that drier

conditions were applied, since moisture was pointed to have an impact on pretreatment efficiency (section 5.3.3.2 and (Digman et al., 2010)). TS of 29 to 47% were used here, while more wet conditions (around 10 %TS) were set in the literature. For both crops, silage storage allowed an efficient storage of the energy potential of the crop, showing the relevance of this process for crop storage for anaerobic digestion. As shown in the literature, a good management of silage allows to preserve efficiently the methane potential of crops (Teixeira Franco et al., 2016; Villa et al., 2020).

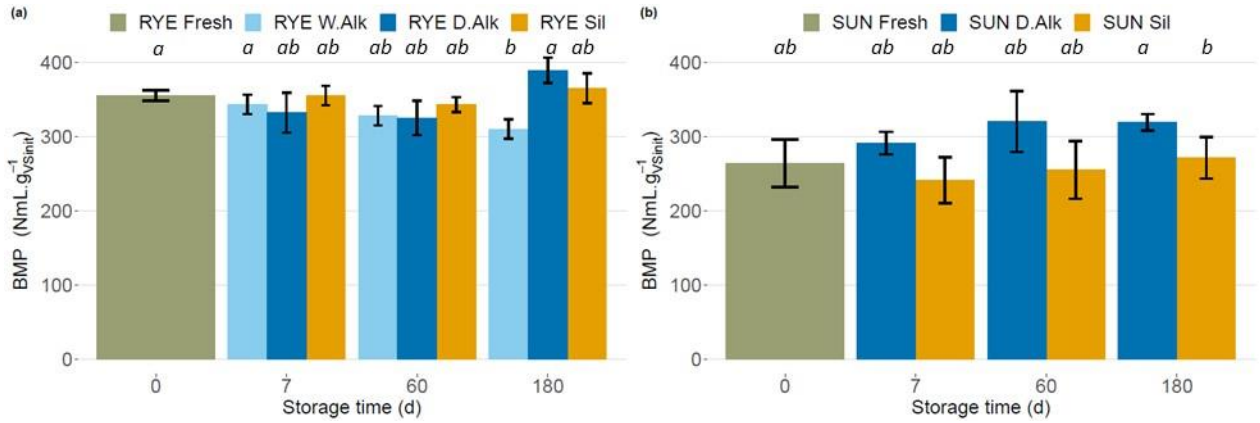

Figure 5-10: Impact of storage condition and duration on BMP. The error bars indicate standard deviation. W.Alk, D.Alk and Sil stand for wet alkaline, dry alkaline, respectively. SUN stand for sunflower.

When stable alkaline conditions were obtained, alkaline storage showed a potential to provide a higher BMP of the crop, in comparison with storage by ensiling. However, a large amount of lime was required to obtain alkaline stability and may compromise the economical balance of the process. In a previous study, Jiang et al. (2017) found a positive net benefit of pretreatment when applying an alkaline pretreatment at 70 and 120 g $Ca(OH)_2$.$kgTS^{-1}$ (eq. 68 and 90 g CaO.$kgTS^{-1}$). Since alkaline stability is reached more easily at high TS, lower CaO loadings may be applied on dry crops like sunflower, which could increase the process sustainability. In order to conclude on the relevance of alkaline storage, the overall impact of lime addition on biomass valorization including aerobic stability at silo opening and continuous digestion of the crop should be investigated.

5.3.4 Conclusion

Both alkaline and acid pH related to alkaline storage and silage allowed to inhibit the microbial activity over a long period. In alkaline storage, besides the initial lime loading, moisture was shown to influence storage stability. Despite of a stability period of 3 weeks, the bacteria present in the wet condition were able to restart their activity from an elevated pH of 12, causing a drop in pH and allowing a succession of

fermentations to take place and limited but significant BMP losses. In successful alkaline storage, the long term pretreatment action allowed a BMP increase until nearly 16%.

5.3.5 Acknowledgements

National Research and Technology Association (ANRT) is gratefully acknowledged for the PhD grant allocated to Clément Van Vlierberghe under CIFRE convention N° 2018/0706. The authors thank “RAGT”, “Biométhagri” and “Biométharn” for providing the cover crops samples. All experiments and physical-chemical analysis were performed at the Bio2E platform (doi:10.5454/1.557234103446854E12).

5.4 A retenir

Les travaux présentées dans ce chapitre ont montré que le stockage alcalin peut constituer une solution efficace pour allier stockage et prétraitement de biomasses lignocellulosiques telles que les CIMSE. L'augmentation du potentiel méthanogène par l'action à long terme du prétraitement semble toutefois limitée et conditionnée par des conditions alcalines stables au cours du stockage. L'obtention de ces conditions nécessite l'ajout d'une importante quantité de chaux qui peut remettre en question la pertinence de l'application de ce procédé à une échelle industrielle.

La déstabilisation du pH peut être causée par des mécanismes abiotiques, cependant une concentration en chaux suffisante comprise entre 60 et 100 $g.kg_{MS}^{-1}$ semble permettre de contrebalancer cet effet. En revanche, les résultats ont montré que certains microorganismes étaient capables de maintenir une activité fermentaire dans un milieu possédant un pH de l'ordre de 12, et de produire des acides organiques causant l'acidification jusqu'à une valeur proche de la neutralité. La capacité des microorganismes à se développer dans ces conditions semble dépendre du taux de matière sèche du milieu, une humidité élevée favorisant leur croissance. L'analyse des résultats de ce chapitre montre que que le stockage alcalin est plus adapté aux récoltes de CIMSE les plus matures. La teneur en matière sèche de ces plantes est généralement élevée, ce qui facilite l'obtention de conditions alcalines stables au cours du stockage. Elles présentent généralement une structure lignocellulosique plus complexe que les plantes récoltées précocement, ce qui rend également l'application d'un prétraitement plus intéressante.

Les expériences de ce chapitre ont également permis d'apporter d'autres éléments de compréhension de l'impact de la fermentation d'ensilage sur la préservation du potentiel méthanogène. Dans le cas où une déstabilisation du pH a été constatée, des conditions a priori très défavorables à la bonne préservation du potentiel méthanogène se sont mises en place avec un pH proche de la neutralité et une forte fermentation butyrique entraînant la production d'hydrogène. Pourtant, des pertes de BMP nulles ou minimes ont été mesurées, et aucune activité méthanogène n'a été constatée au cours du stockage. Les cas de stockage alcalin ayant subi une déstabilisation peuvent par conséquent être considérés comme des expériences réussies de stockage de CIMSE.

6 Conclusion générale et perspectives

6.1 Résultats marquants et discussion générale

Le secteur de la méthanisation agricole est actuellement en plein développement et de nombreux efforts sont réalisés par les acteurs de la filière pour améliorer le procédé et tendre vers un modèle de méthanisation toujours plus vertueux d'un point de vue environnemental et économique. Parmi les différents axes d'amélioration, la gestion optimale des gisements disponibles avant leur méthanisation revêt une importance particulière. Les intrants de méthanisation sont désormais considérés comme des ressources précieuses devant être valorisées efficacement. Ce constat est d'autant plus vrai pour les CIMSE. Même si elles sont également produites pour leurs services agronomiques, leur conduite et leur récolte requiert travail, investissement et consommation de ressources. La valorisation optimale des CIMSE en méthanisation ne peut être envisagée sans une étape optimale de stockage des récoltes étant donnée la saisonnalité de leur production. En plus de la préservation efficace du potentiel méthanogène des CIMSE au cours du stockage, cette étape peut être mise à profit pour appliquer un prétraitement à long terme permettant d'améliorer la dégradabilité de la biomasse et son rendement méthane. Les travaux de cette thèse ont porté sur les problématiques de stockage et de prétraitement des CIMSE avant méthanisation. Le terme « CIMSE » désigne une large variété d'espèces végétales cultivables aux propriétés variées. Pour cette raison, une attention particulière a été portée à l'étude du stockage de différentes plantes aux propriétés variées afin de s'intéresser aux différentes problématiques pouvant être rencontrées. Pour garantir la comparabilité et la généricité des résultats obtenus lors des différentes expériences, une caractérisation fine des substrats utilisés a été réalisée. Le stockage par ensilage des CIMSE qui constitue la technique la plus employée à l'heure actuelle a été étudié pour améliorer la compréhension de son impact sur la préservation de la biomasse et identifier les voies d'optimisation du procédé. Deux aspects principaux de l'ensilage ont été approfondis : l'étape de fermentation anaérobie et la problématique de la production des effluents. Ces thématiques ont été choisies car elles sont particulièrement impactées par une caractéristique commune à de nombreuses CIMSE lors de leur récolte : un taux d'humidité élevé. Concernant la recherche d'un procédé combinant les fonctions de stockage et de prétraitement, le choix de l'utilisation de la chaux pour réaliser un stockage par voie alcaline a été fait. Ce réactif a été sélectionné pour sa capacité à délignifier la lignocellulose, pour son coût limité et pour sa compatibilité avec l'épandage de digestat sur les surfaces agricoles.

Les principales conclusions et discussions relatives aux travaux menés dans ce doctorat sont présentées dans cette section. Les perspectives scientifiques et techniques identifiées comme importantes pour l'amélioration ultérieure du stockage et du prétraitement des CIMSE sont ensuite abordées.

Maîtrise de la problématique des effluents d'ensilage grâce au co-ensilage

L'impact de l'ajout d'un co-substrat absorbant sur la fermentation d'ensilage et la production d'effluents lors du stockage de CIMSE humides a été étudié. Le co-ensilage de CIMSE avec un substrat absorbant permet de modifier les propriétés physicochimiques du mélange à ensiler telles que le taux de MS, la concentration en sucres solubles et en azote, ainsi que le pouvoir tampon. Selon la nature du co-substrat, les propriétés microbiologiques peuvent également être affectées.

Les expériences étudiant la production d'effluents d'ensilage ont confirmé qu'un volume cumulé de plusieurs centaines de litres par tonne pouvait être fréquemment produit lors du stockage de CIMSE, étant donné leur taux d'humidité élevé. Ces effluents peuvent causer pollution et corrosion des installations. Ils contiennent également une grande quantité de matière organique à haut potentiel méthanogène. En effet lors de l'ensilage du tournesol, la CIMSE étudiée la plus humide dans ce doctorat, un équivalent de 18% de la valeur initiale du potentiel méthanogène s'est retrouvé dans l'effluent. Les travaux de co-ensilage ont permis de confirmer que cette pratique permet de maîtriser efficacement la production d'effluents. Une méthode permettant l'optimisation du dosage des co-substrats a également été développée. Elle est basée sur la capacité d'absorption en eau du co-substrat employé et sur la prédiction du volume d'effluent attendu lors du stockage de la CIMSE seule. Ces deux grandeurs peuvent être obtenues simplement et rapidement par une mesure (capacité d'absorption) ou grâce aux données de la littérature (volume prédit). L'utilisation de cette méthode de dosage permet l'emploi de co-substrats aux capacités de rétention en eau variées dans des conditions optimales.

Les travaux ont ensuite évalué l'effet de la modification des propriétés physico-chimiques du mélange sur la fermentation d'ensilage. Il a été démontré que l'augmentation du taux de MS par l'ajout d'un co-substrat ne permettait pas d'influencer le déroulement de la fermentation contrairement à la technique de préfanage plus communément utilisée. La fermentation n'a pas non plus été impactée par l'ajout de sucres solubles étant donné que les co-substrats employés n'en ont pas apporté, toutefois l'ajout de co-substrats sucrés permet d'influencer significativement la fermentation d'ensilage (Teixeira Franco et al., 2018). L'augmentation de la teneur en azote total et du pouvoir tampon pénalise en revanche l'acidification lors de la fermentation primaire. Les caractéristiques microbiologiques du co-substrat peuvent en revanche avoir un impact important sur la fermentation et certains substrats tels que les fumiers apportent une grande quantité de bactéries capables de prendre le dessus sur la flore microbienne épiphyte de la CIMSE, et ainsi diriger la fermentation. Grâce à ces mécanismes, certains co-substrats

pourraient également être utilisés en tant qu'additifs d'ensilage pour leurs propriétés microbiennes et/ou physico-chimiques.

Le co-ensilage de CIMSE peut également être envisagé comme une méthode permettant d'améliorer le stockage d'autres intrants comme les fumiers. La CIMSE permet alors d'apporter la quantité de sucres solubles nécessaire au stockage par ensilage des fumiers ce qui améliore grandement leur préservation.

Bien que ce cas n'ait pas été rencontré dans le cadre des travaux présentés, une attention particulière doit être portée à la possible incorporation de microorganismes méthanogènes dans le substrat et à la mise en place de conditions permettant leur développement. En effet, une activité méthanogène au sein du silo pourrait entraîner d'importantes pertes de potentiel énergétique ainsi que l'émission de gaz à effet de serre.

Stockage et prétraitement alcalin de CIMSE pour la méthanisation

Ce procédé a été étudié de façon dynamique pour la première fois dans le cadre des travaux de cette thèse. La stabilité du pH alcalin du procédé a été identifiée comme étant un paramètre déterminant sur l'efficacité du prétraitement. En effet, l'obtention d'une sévérité suffisante du prétraitement alcalin dépend du maintien d'un pH élevé pendant une durée de réaction suffisante. Le suivi dynamique du stockage alcalin a permis de mettre en évidence que l'action conjointe ou dissociée de mécanismes abiotiques (désacétylation des hémicelluloses) et biotiques (fermentation) pouvait causer une baisse de pH depuis sa valeur initiale (12) vers une valeur proche de la neutralité. Les résultats ont également montré que la déstabilisation du pH pouvait être rapide et s'effectuer en moins de deux semaines. En cas de déstabilisation, une importante activité fermentaire se met en place. Elle aboutit dans un premier temps à la production d'acide lactique, qui est ensuite converti en acide butyrique. Le pH se stabilise alors à une valeur proche de la neutralité.

L'impact des conditions de préparation des silos de stockage alcalin sur la stabilité du procédé a été étudié. Deux paramètres principaux ont été évalués : la charge de chaux appliquée et la teneur en matière sèche du mélange. Les résultats tendent à montrer que l'utilisation d'une dose de chaux supérieure permet d'améliorer la stabilité alcaline du substrat, tout comme l'augmentation du taux de matière sèche. Si la désacétylation des hémicelluloses semble pouvoir impacter la valeur du pH pour une concentration en chaux faible, la production de métabolites liée à l'activité microbienne est la principale responsable du phénomène d'acidification. Les résultats des travaux expérimentaux montrent que l'inhibition de l'activité microbienne en conditions alcalines est plus efficace lorsque l'humidité du milieu est faible. Par

conséquent, le stockage alcalin de CIMSE est moins adapté aux récoltes les plus immatures et humides puisque l'utilisation d'une quantité supérieure de chaux est alors requise. La comparaison des gains de potentiel méthanogène obtenus lors du stockage alcalin de seigle et de tournesol aboutit à une conclusion similaire. En effet, l'action du prétraitement sur le potentiel méthanogène est supérieure pour le tournesol dont la teneur initiale en lignine est 80% supérieure à celle du seigle. Etant donné que la complexité de la structure lignocellulosique et la lignification tendent à augmenter à mesure que la maturité d'une CIMSE augmente, le stockage alcalin est plus indiqué pour les CIMSE à la plus haute maturité. Cependant, la dose de chaux identifiée comme étant adaptée à un stockage alcalin stable (100g.kg_{MS}^{-1}) est une limite à l'application du stockage alcalin et l'optimisation postérieure du dosage devra permettre de limiter la charge de chaux à employer.

Importance de la fermentation lors du stockage anaérobie (ensilage, co-ensilage, stockage alcalin)

L'ensemble des travaux expérimentaux de la thèse a permis de réaliser le suivi dynamique sur 4 à 6 mois de 22 expériences de stockage anaérobies : 10 ensilages directs, 1 ensilage préfané, 6 co-ensilages et 5 stockages alcalins. Afin de porter un regard plus large sur l'impact de la fermentation sur le potentiel méthanogène, tous les résultats ont été analysés de façon croisée. En particulier, la relation entre les pertes de masse ayant lieu au cours du stockage, le volume d'hydrogène produit lors de la fermentation et la variation du BMP a été étudiée. Cette analyse est proposée dans la Figure 6-1.

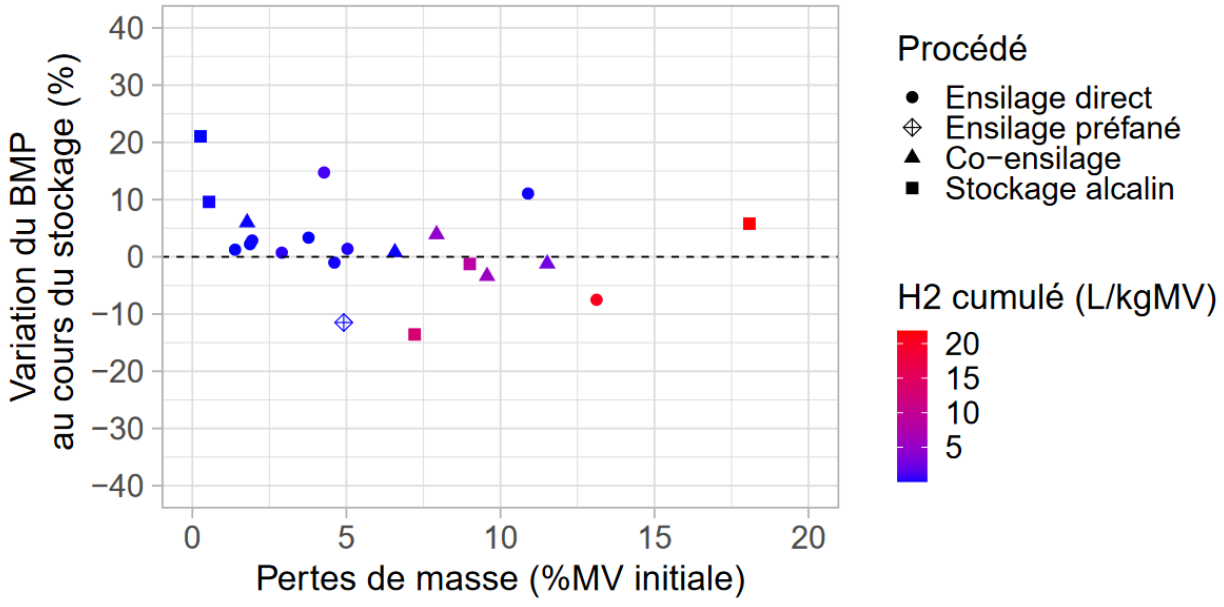

Figure 6-1 : Interaction entre pertes de masse, production d'hydrogène et variation du BMP lors du stockage anaérobie de CIMSE.

La projection des résultats selon ces variables ne montre visuellement pas de relation notable entre les pertes de masse et la variation du BMP, ni entre le volume cumulé de H_2 et la variation du BMP. Cette dernière est majoritairement contenue entre des valeurs de +/- 10% et la variabilité observée est probablement dûe à la précision du test BMP (Cresson et al., 2014). L'indépendance entre la variation du BMP et la production de H_2 s'explique par le fait que le volume produit d'hydrogène est faible et ne représente qu'une fraction minime du potentiel énergétique total des CIMSE. Une plus grande production d'hydrogène est constatée dans les cas des expériences ayant connu les pertes de masse les plus importantes. Cette tendance est due au fait que la production de H_2 est accompagnée de CO_2.

La matrice des corrélations entre les principaux paramètres de fermentation du stockage anaérobie et la préservation du BMP confirme cette tendance observable (Figure 6-2). Afin de pouvoir analyser conjointement des échantillons stockés en conditions alcalines et des échantillons ensilés, une variable supplémentaire a été prise en compte. Etant donné que les conditions acides et alcalines permettent l'inhibition de l'activité microbienne, l'écart entre la valeur de pH mesurée et la neutralité, |pH – 7|, a été utilisé.

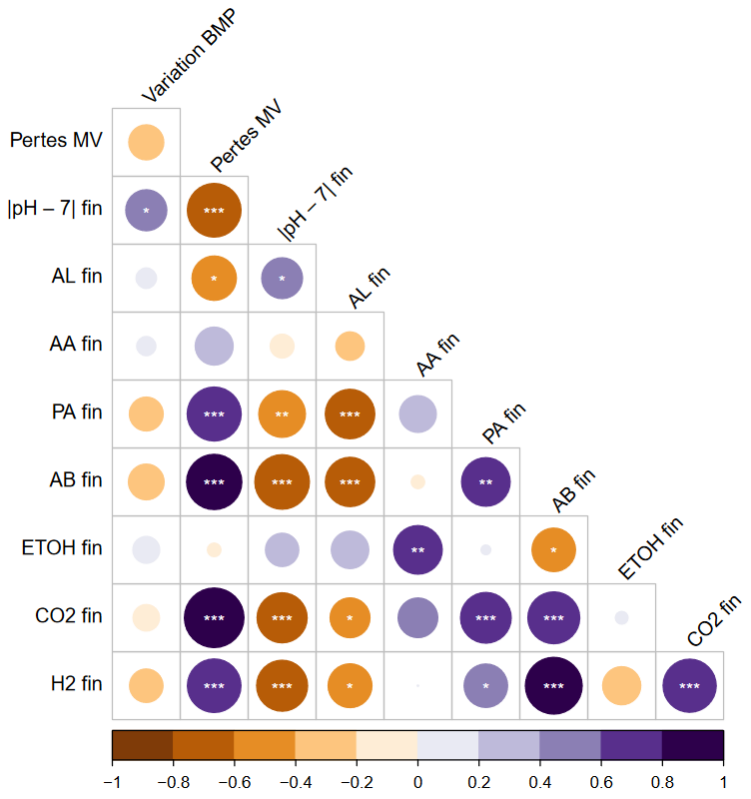

Figure 6-2 : Matrice de corrélation entre la préservation du BMP et les principales propriétés de fermentation pour l'ensemble des expériences de stockage anaérobie

La matrice confirme que les paramètres associés à un substrat ensilé de « mauvaise qualité » (i.e. pH proche de la neutralité et concentration en acide butyrique élevée) sont très fortement corrélés à la production d'un volume de gaz (CO_2 et H_2) important et à d'importantes pertes de masse. En revanche, aucun de ces paramètres n'est corrélé à une variation significative du BMP au cours du stockage. Cette analyse croisée permet de confirmer que, tant que les conditions anaérobies sont maintenues et que la réaction de méthanogénèse ne débute pas, le stockage des CIMSE en milieu anaérobie est efficace.

6.2 Perspectives

Les travaux de co-ensilage ont permis de montrer que l'augmentation du taux de matière sèche par l'addition d'un co-substrat ne permet pas à elle seule d'influencer le déroulement de la fermentation. En effet de nombreux co-substrats se comportent comme des matériaux inertes et ne modifient pas la cinétique de fermentation. Le mécanisme d'absorption par le co-substrat et son influence sur la disponibilité de l'eau pour la croissance des microorganismes devrait être étudié afin de comprendre ce phénomène. En effet selon la nature du co-substrat et son degré d'affinité pour les molécules d'eau, la disponibilité de cette dernière pour le développement des microorganismes pourrait être différente. La mesure de l'activité de l'eau du mélange permettrait d'évaluer sa disponibilité pour le développement des microorganismes et le degré de séquestration de l'eau par le co-substrat. En effet, ce paramètre est un déterminant important de la capacité des microorganismes à se développer (Pahlow et al., 2003).

La conduite du stockage des CIMSE humides a pu être améliorée grâce au co-ensilage qui a permis la réduction du volume d'effluent. Les travaux de la thèse ont également mis en évidence le lien entre la capacité d'absorption en eau théorique du co-substrat et la quantité d'effluent retenue. Pour cela, une mesure de la capacité de rétention en eau basée sur l'immersion du substrat suivie d'une centrifugation a été utilisée. Si cette méthode a été validée dans le cadre de silos à échelle laboratoire, son applicabilité à échelle industrielle reste à étudier. En effet, la pression de tassement des silos est généralement hétérogène, ce qui pourrait modifier le comportement d'absorption du co-substrat à différentes hauteurs du silo. Une compréhension plus fine du phénomène de production d'effluent en fonction de la teneur en MS de la CIMSE, du tassement et de la capacité de rétention du mélange permettrait d'optimiser la gestion des effluents d'ensilage. L'étude de l'impact de la finesse de broyage du co-substrat sur ses propriétés structurelles et la capacité de rétention en eau permettrait également d'adopter des pratiques de préparation optimales du co-ensilage.

En plus d'améliorer cet aspect du stockage, le co-ensilage peut également être perçu comme une opportunité de simplifier la gestion des biomasses sur un site de méthanisation. En effet la ration du

méthaniseur peut ainsi être préparée à l'avance en réalisant le mélange d'intrants en amont de leur stockage. La méthode permet ainsi d'optimiser les caractéristiques de la ration, comme le rapport C/N. Plusieurs CIMSE ont en effet un rapport au-dessus de la valeur optimale pour la méthanisation, qui peut être abaissé grâce à l'ajout de substrats comme les fumiers. Dans le cas particulier de ces substrats pour lesquels la méthode de stockage a un impact déterminant sur le potentiel méthanogène, le co-ensilage permet d'obtenir une amélioration mutuelle du stockage des deux intrants. Par extension, des procédés de stockage similaires pourraient être appliqués au stockage d'intrants humides riches en sucres solubles comme des bio-déchets ou des sous-produits d'industrie agroalimentaire mélangés à d'autres intrants absorbants secs.

Le choix du co-substrat doit cependant être réalisé avec soin et prendre en compte le procédé d'ensilage dans son intégralité. En plus de son impact sur la fermentation d'ensilage et la production d'effluent, le co-substrat peut également avoir un effet sur les propriétés structurantes et impacter le tassement des silos lors de leur confection. La densité de tassement pouvant fortement impacter la pénétrabilité de l'air à l'intérieur du silo, ce paramètre doit être considéré avec attention. En fonction de la nature du co-substrat et sa granulométrie, son addition peut également impacter la porosité du silo la capacité de l'air à pénétrer au sein de la biomasse. La compréhension de l'impact de l'addition d'un co-substrat sur les propriétés structurales des silos à échelle industrielle permettrait une sélection pertinente des co-substrats d'ensilage. La nature du co-substrat employé peut également impacter les propriétés rhéologiques du méthaniseur dans le cas où la méthanisation en voie humide est employée. L'addition de substrats tels que des pailles ou des copeaux de bois dont donc être considéré avec attention et une étape de prétraitement telle qu'un broyage peut être nécessaire avant insertion dans le méthaniseur.

Concernant l'activité microbiologique lors du co-ensilage, une attention particulière doit également être portée sur les populations microbiennes apportées par le co-substrat, étant donné que la flore initiale a un impact déterminant sur la fermentation. En particulier, la définition d'indicateurs permettant de prédire si une activité méthanogène est possible au sein des silos permettrait de maîtriser le risque de dégradation de la biomasse au cours du stockage.

Le procédé de stockage alcalin étudié au cours de la thèse semble constituer une solution potentiellement applicable à des CIMSE récoltées tardivement. Toutefois, en plus de son impact sur la lignocellulose, le potentiel méthanogène et la phase anaérobie du stockage, le stockage alcalin devra être étudié en prenant en compte l'intégralité de la chaîne de valorisation des CIMSE. L'ajout de chaux pourrait également avoir un impact non négligeable sur le béton utilisé pour la confection des silos de stockage, qui est

particulièrement sensible à la corrosion causée par l'acidité de l'ensilage. Le chaulage total ou partiel des silos de CIMSE devrait permettre de prolonger la durée de vie des silos en béton. L'impact comparé du stockage alcalin et de l'ensilage sur l'intégrité du béton des silos de stockage devrait être considéré pour permettre d'établir des conclusions plus précises sur la pertinence de ce procédé nouveau.

Les essais d'ensilage, de co-ensilage et de stockage alcalin ont mis en évidence un impact négligeable de la fermentation sur la préservation du BMP. Ceci peut être attribué au faible volume d'hydrogène qui a été produit. Pourtant, d'après la quantité finale de butyrate ayant été accumulée au cours de certaines expériences, le volume de H_2 théoriquement produit par une voie de fermentation butyrique aurait dû être supérieur (Chapitre 5). La différence entre le volume théorique et le volume mesuré pourrait s'expliquer par une réaction d'homoacétogénèse. La survenue de cette réaction au cours d'expériences d'ensilage pourrait être étudiée grâce à des ajouts contrôlés d'hydrogène dans les réacteurs d'ensilage à échelle laboratoire.

Les travaux de cette thèse ont principalement porté sur la phase anaérobie du stockage par ensilage ou voie alcaline. Pourtant, le procédé de stockage ne se limite pas à l'étape confinée et d'autres points clé ont une importance capitale sur les performances globales du stockage. En particulier, les dégradations aérobies ayant lieu lors de l'ouverture du silo peuvent avoir un impact significatif sur la perte de potentiel méthanogène. L'impact des dégradations aérobies peut être limité grâce à l'adoption de bonnes pratiques telles qu'une vitesse d'avance suffisante et le dimensionnement adéquat des silos. En plus de ces pratiques, les propriétés physicochimiques de la CIMSE stockée ont une influence prépondérante sur la stabilité aérobie. Par exemple, le pH, les métabolites majoritaires et la composition des populations microbiennes impactent fortement la capacité du substrat à résister aux dégradations post-ouverture. Etant donné que ces paramètres sont fortement liés avec le type de procédé de stockage employé (ensilage, co-ensilage ou stockage alcalin), l'impact de ces procédés sur la stabilité aérobie devrait être étudié. L'effet inhibiteur de la valeur du pH (acide ou alcalin) ainsi que des métabolites de fermentation et/ou de l'acide acétique libéré par désacétylation sur le développement des microorganismes aérobies devrait être étudié, en particulier dans le cas du stockage alcalin qui implique des conditions physico-chimiques peu étudiées dans la littérature. La prise en compte de la stabilité aérobie d'un ensilage (ou, par extension, d'un intrant issu d'un autre procédé de stockage anaérobie) à destination de la méthanisation permettrait de juger des performances du stockage avec une vision plus globale et pertinente.

Les CIMSE pouvant présenter des caractéristiques physico-chimiques variables à la récolte, différentes pratiques peuvent donc être adoptées en fonction de ces caractéristiques (Figure 6-3). En particulier le

taux de matière sèche a un impact déterminant sur le stockage et des problématiques différentes peuvent alors être rencontrées. Par exemple pour les récoltes les plus humides risquant de générer des effluents lors du stockage, le recours au préfanage, à la récupération des jus ou au co-ensilage pourra être considéré. Pour les récoltes les plus sèches et plus lignifiées, le stockage alcalin pourrait représenter une alternative sous réserve de son applicabilité à échelle industrielle et de son bilan environnemental.

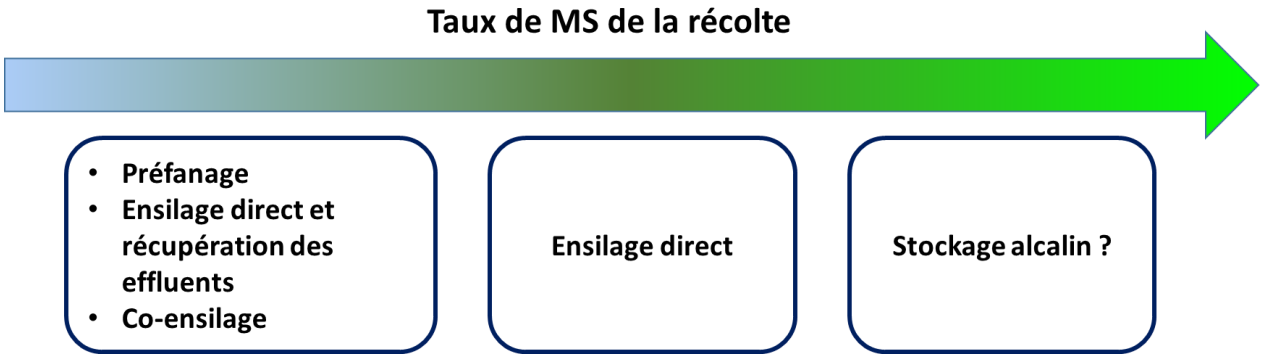

Figure 6-3 : Exemples de méthodes de stockage applicables selon le taux de MS d'une récolte de CIMSE

7 Références

A.J.M. Stams, S.J.W.H. Oude Elferink, P.W., 2003. Metabolic Interactions Between Methanogenic Consortia and Anaerobic Respiring Bacteria. Adv. Biochem. Eng. 81, 31–56.

Abraham, A., Mathew, A.K., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., Park, J.H., Sang, B.I., 2020. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 301, 122725. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122725

Adapa, P., Tabil, L., Schoenau, G., 2011. Grinding performance and physical properties of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw. Biomass and Bioenergy 35, 549–561. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.10.004

ADEME, 2018. Vers un gaz 100% renouvelable en France en 2050.

ADEME, 2016. Guide Pratique - Chaleur issue de la méthanisation.

ADEME Bourgogne, 2013. Méthanisation de fumiers bovin et volaille - Impact du stockage du fumier, Essais pilote et potentiel énergétique.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. Biotechnol. Adv. 29, 675–685. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.05.005

Ali, G., Ling, Z., Saif, I., Usman, M., Jalalah, M., Harraz, F.A., Al-Assiri, M.S., Salama, E.S., Li, X., 2021. Biomethanation and microbial community response during agricultural biomass and shrimp chaff digestion. Environ. Pollut. 278, 116801. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116801

Amin, F.R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S., Zhang, R., Liu, G., Chen, C., 2017. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. AMB Express 7. https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4

APHA, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. American Public Health Association.

Arvalis, 2020. Une interculture particulière pour produire de l'énergie [WWW Document]. URL https://www.arvalis-infos.fr/une-interculture-particuliere-pour-produire-de-l-energie-@/view-26937-arvarticle.html

Arvalis, 2011. Les territoires du maïs fourrage en France 8.

Atelge, M.R., Atabani, A.E., Banu, J.R., Krisa, D., Kaya, M., Eskicioglu, C., Kumar, G., Lee, C., Yildiz, Y., Unalan, S., Mohanasundaram, R., Duman, F., 2020. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. Fuel 270. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494

Banerjee, G., Car, S., Liu, T., Williams, D.L., Meza, S.L., Walton, J.D., Hodge, D.B., 2012. Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. Biotechnol. Bioeng. 109, 922–931. https://doi.org/10.1002/bit.24385

Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon, R.A.D., De Vries, H., Luque, R., 2014. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. RSC Adv. https://doi.org/10.1039/c4ra07568d

Barmaki, S., Alamouti, A.A., Khadem, A.A., Afzalzadeh, A., 2018. Effectiveness of chopped lucerne hay as a moisture absorbent for low dry-matter maize silage: Effluent reduction, fermentation quality and intake by sheep. Grass Forage Sci. 73, 406–412. https://doi.org/10.1111/gfs.12343

Bastiman, B., Altman, J.F.B., 1986. Losses at various stages in silage making. Res. Dev. Agric. 2, 19–25.

Bauer, A., Lizasoain, J., Theuretzbacher, F., Agger, J.W., Rincón, M., Menardo, S., Saylor, M.K., Enguídanos, R., Nielsen, P.J., Potthast, A., Zweckmair, T., Gronauer, A., Horn, S.J., 2014. Steam explosion pretreatment for enhancing biogas production of late harvested hay. Bioresour. Technol. 166, 403–410. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.025

Begum, S., Anupoju, G.R., Eshtiaghi, N., 2021. Anaerobic co-digestion of food waste and cardboard in different mixing ratios: Impact of ultrasound pre-treatment on soluble organic matter and biogas generation potential at varying food to inoculum ratios. Biochem. Eng. J. 166, 107853. https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107853

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renew. Sustain. Energy Rev. 36, 91–106. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047

Bichot, A., Lerosty, M., Méchin, V., Bernet, N., Delgenès, J.P., García-Bernet, D., 2021. Evaluation of chemical-free microwave pretreatment on methane yield of two grass biomass with contrasted parietal content. Energy Convers. Manag. 229. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113746

Bignon, L., Mika, A., Chaudeau, M., Dupin, M., Mercerand, F., Bouvarel, I., 2015. Caractérisation de différents types de litières et effets sur l'apparition et la sévérité et le comportement des poulets de chair à croissance rapide. Onzième Journées la Rech. Avic. Palmipèdes à Foie Gras, Tours, les 25 26 mars 2015 995–1000.

BIO-VALO, 2020. Semencive.

Bio2E, 2018. Environmental Biotechnology and Biorefinery Platform. https://doi.org/10.5454/1.557234103446854E12

Borges, F.C., Du, Z., Xie, Q., Trierweiler, J.O., Cheng, Y., Wan, Y., Liu, Y., Zhu, R., Lin, X., Chen, P., Ruan, R., 2014. Fast microwave assisted pyrolysis of biomass using microwave absorbent. Bioresour. Technol. 156, 267–274. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.038

Borreani, G., Chion, A.R., Colombini, S., Odoardi, M., Paoletti, R., Tabacco, E., 2009. Fermentative profiles of field pea (Pisum sativum), faba bean (Vicia faba) and white lupin (Lupinus albus) silages as affected by wilting and inoculation. Anim. Feed Sci. Technol. 151, 316–323. https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2009.01.020

Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., Muck, R.E., 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. J. Dairy Sci. 101, 3952–3979. https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13837

Böske, J., Wirth, B., Garlipp, F., Mumme, J., Van den Weghe, H., 2014. Anaerobic digestion of horse dung mixed with different bedding materials in an upflow solid-state (UASS) reactor at mesophilic conditions. Bioresour. Technol. 158, 111–118. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.034

Braun, F., Hamelin, J., Gèvaudan, G., Patureau, D., 2011. Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. Appl. Environ. Microbiol. 77, 8487–8493. https://doi.org/10.1128/AEM.05549-11

Braun, R., 2007. Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development, in: Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 335–416. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5486-0_13

Brémond, U., Bertrandias, A., Steyer, J.P., Bernet, N., Carrere, H., 2021. A vision of European biogas sector development towards 2030: Trends and challenges. J. Clean. Prod. 287.

https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125065

Brémond, U., de Buyer, R., Steyer, J.-P., Bernet, N., Carrere, H., 2018. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. Renew. Sustain. Energy Rev. 90, 583–604. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.103

Büchi, L., Wendling, M., Amossé, C., Jeangros, B., Charles, R., 2020. Field Crops Research Cover crops to secure weed control strategies in a maize crop with reduced tillage. F. Crop. Res. 247, 107583. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.107583

Bureenok, S., Sisaath, K., Yuangklang, C., Vasupen, K., Schonewille, J.T., 2016. Ensiling characteristics of silages of Stylo legume (Stylosanthes guianensis), Guinea grass (Panicum maximum) and their mixture, treated with fermented juice of lactic bacteria, and feed intake and digestibility in goats of rations based on these silages. Small Rumin. Res. 134, 84–89. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.006

Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G., Trably, E., 2017. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. FEMS Microbiol. Rev. 41, 158–181. https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043

Cai, Y., 1999. Identification and characterization of Enterococcus species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. J. Dairy Sci. 82, 2466–2471. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75498-6

Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., Ferrer, I., 2016. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. Bioresour. Technol. 199, 386–397. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.09.007

Castro, R.C. de A., Fonseca, B.G., dos Santos, H.T.L., Ferreira, I.S., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2017. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. Ind. Crops Prod. 106, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.053

Chang, V.S., Nagwani, M., Holtzapple, M.T., 1998. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol. 74, 135–159. https://doi.org/10.1007/BF02825962

Chen, X., Shekiro, J., Franden, M.A., Wang, W., Zhang, M., Kuhn, E., Johnson, D.K., Tucker, M.P., 2012. The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. Biotechnol. Biofuels 5. https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-8

Chen, X., Shekiro, J., Pschorn, T., Sabourin, M., Tao, L., Elander, R., Park, S., Jennings, E., Nelson, R., Trass, O., Flanegan, K., Wang, W., Himmel, M.E., Johnson, D., Tucker, M.P., 2014. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. Biotechnol. Biofuels 7. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-98

CIPF, La Clinique des Plantes, 2019. SILCOGREEN, Réduction de la consommation de plastiques en agriculture : Couverture végétale des silos d ’ensilage de maïs.

Clarke, S., Eng, P., DeBruyn, J., 2012. Vehicle Conversion to Natural Gas or Biogas.

Cresson, R., Pommier, S., F. Béline, T., Bouchez, C., Bougrier, P.Buffière, Cacho, J., Camacho, P., Mazéas, L., Pauss, A., Pouech, P., Ribeiro, T., Rouez, M., Torrijos, M., 2014. Etude interlaboratoires pour l ’ harmonisation des protocoles de mesure du potentiel bio-méthanogène des matrices solides hétérogènes 121.

Crookston, R.K., Kurle, J.E., 1988. Using the Kernel Milk Line to Determine When to Harvest Corn for Silage. J. Prod. Agric. 1, 293–295. https://doi.org/10.2134/jpa1988.0293

CTBM, A., 2020. Valorisation du CO2 de méthanisation - Guide technique.

Cui, X., Sun, H., Sobhi, M., Ju, X., Guo, J., Dong, R., 2020. Butyric Acid Fermentation during Ensiling of Wilted Maize Stover for Efficient Methane Production. ACS Sustain. Chem. Eng. 8, 6713–6721. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00633

da Silva, T.C., da Silva, L.D., Santos, E.M., Oliveira, J.S., 2017. Importance of the Fermentation to Produce High-Quality Silage, in: Fermentation Processes. InTech, pp. 3–22. https://doi.org/10.5772/64887

Daeschel, M.A., Andersson, R.E., Fleming, H.P., 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. FEMS Microbiol. Lett. 46, 357–367. https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90119-4

Dai, K., Zhang, F., Zhang, Y., Zeng, R.J., 2018. The chemostat metabolite spectra of alkaline mixed culture fermentation under mesophilic, thermophilic, and extreme-thermophilic conditions. Bioresour. Technol. 249, 322–327. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.035

Daniel-Gromke, J., Rensberg, N., Denysenko, V., Stinner, W., Schmalfuß, T., Scheftelowitz, M., Nelles, M.,

Liebetrau, J., 2018. Current Developments in Production and Utilization of Biogas and Biomethane in Germany. Chemie Ing. Tech. 90, 17–35. https://doi.org/10.1002/cite.201700077

Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., Braun, R., 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 69, 562–567. https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.562-567.2003

Dauptain, K., Trably, E., Santa-Catalina, G., Bernet, N., Carrere, H., 2020. Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. Bioresour. Technol. 313, 123665. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123665

Delfosse, P., 2010. Microbiologie de la digestion anaérobie.

Delgenes, J.P., Penaud, V., Moletta, R., 2003. Pretreatments for the Enhancement of Anaerobic Digestion of Solid Wastes. ChemInform 34. https://doi.org/10.1002/chin.200313271

Dennery G., Dezat E., R.N., 2012. Vers une gestion efficace des litières, de l'approvisionnement aux techniques d'élevage avicole 48.

Digman, M.F., Shinners, K.J., Casler, M.D., Dien, B.S., Hatfield, R.D., Jung, H.-J.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., 2010. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. Bioresour. Technol. 101, 5305–5314. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.014

Downing, T.W., Buyserie, A., Gamroth, M., French, P., 2008a. Effect of Water Soluble Carbohydrates on Fermentation Characteristics of Ensiled Perennial Ryegrass. Prof. Anim. Sci. 24, 35–39. https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30807-X

Downing, T.W., Buyserie, A., Gamroth, M., French, P., 2008b. Effect of Water Soluble Carbohydrates on Fermentation Characteristics of Ensiled Perennial Ryegrass. Prof. Anim. Sci. 24, 35–39. https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30807-X

Dubreuil, L., Dussault, M., Rodrigue, J., Bernard, H., 2004. Silo couloir.

Egg, R.P., Coble, C.G., Engler, C.R., Lewis, D.H., 1993. Feedstock storage, handling and processing. Biomass and Bioenergy 5, 71–94. https://doi.org/10.1016/0961-9534(93)90009-S

Elferink, S.J.W.H.., Driehuis, F., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., 1999. Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Plant Prod. Prot. Pap. 17–30.

Elsayed, M., Andres, Y., Blel, W., Gad, A., Ahmed, A., 2016. Effect of VS organic loads and buckwheat husk on methane production by anaerobic co-digestion of primary sludge and wheat straw. Energy Convers. Manag. 117, 538–547. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.03.064

Eurobserv'ER, 2020. Baromètre Biogaz 2020.

Evans, D.F., Pye, G., Bramley, R., Clark, a G., Dyson, T.J., Hardcastle, J.D., 1988. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. Gut 29, 1035–1041. https://doi.org/10.1136/gut.29.8.1035

Feng, L., Kristensen, E.F., Moset, V., Ward, A.J., Møller, H.B., 2018. Ensiling of tall fescue for biogas production: Effect of storage time, additives and mechanical pretreatment. Energy Sustain. Dev. 47, 143–148. https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.10.001

Feng, L., Perschke, Y.M.L., Fontaine, D., Ward, A.J., Eriksen, J., Sørensen, P., Møller, H.B., 2019. Co-ensiling of cover crops and barley straw for biogas production. Renew. Energy 142, 677–683. https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.04.138

Fransen, S.C., Strubi, F.J., 1998. Relationships Among Absorbents on the Reduction of Grass Silage Effluent and Silage Quality. J. Dairy Sci. 81, 2633–2644. https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75821-7

Galibardy, C., Loustale, C., Arribarrouy, E., 2009. Etude de caractérisation des fumiers de cheval issus de centres équestres afin d ' aider à la décision sur les possibilités de valorisation, APESA.

Gebrehanna, M.M., Gordon, R.J., Madani, A., VanderZaag, A.C., Wood, J.D., 2014. Silage effluent management: A review. J. Environ. Manage. 143, 113–122. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.012

Gerardi, M.H., 2003. The Microbiology of Anaerobic Digesters.

Gharechahi, J., Kharazian, Z.A., Sarikhan, S., Jouzani, G.S., Aghdasi, M., Hosseini Salekdeh, G., 2017. The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage. Microb. Biotechnol. 10, 1663–1676. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12751

Gissén, C., Prade, T., Kreuger, E., Nges, I.A., Rosenqvist, H., Svensson, S.E., Lantz, M., Mattsson, J.E., Börjesson, P., Björnsson, L., 2014. Comparing energy crops for biogas production - Yields, energy input and costs in cultivation using digestate and mineral fertilisation. Biomass and Bioenergy 64,

199–210. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.061

Goffart, A., 1877. Manuel de la culture et de l'ensilage de maïs et autres fourrages verts [Manual of the cultivation and siloing of maize and other green fodders]. Paris.

Gómez-Quiroga, X., Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C.J., Romero-García, L.I., 2022. Successful and stable operation of anaerobic thermophilic co-digestion of sun-dried sugar beet pulp and cow manure under short hydraulic retention time. Chemosphere 293, 133484. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.133484

GRDF, 2021. La vente du biométhane [WWW Document]. URL https://projet-methanisation.grdf.fr/la-methanisation/la-vente-du-biomethane (accessed 1.27.22).

GRDF, 2017. Contrat relatif a l'injection de biométhane dans le réseau de distribution de gaz naturel - Conditions générales.

Guilayn, F., Jimenez, J., Rouez, M., Crest, M., Patureau, D., 2019. Digestate mechanical separation: Efficiency profiles based on anaerobic digestion feedstock and equipment choice. Bioresour. Technol. 274, 180–189. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.090

Gunaseelan, V.N., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. Biomass and Bioenergy 13, 83–114. https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00020-2

Hafner, S.D., Howard, C., Muck, R.E., Franco, R.B., Montes, F., Green, P.G., Mitloehner, F., Trabue, S.L., Rotz, C.A., 2013. Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications. Atmos. Environ. 77, 827–839. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.04.076

Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., Lu, X., 2017. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. Renew. Sustain. Energy Rev. 76, 1485–1496. https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.184

Haigh, P.M., 1999. Effluent production from grass silages treated with additives and made in large-scale bunker silos. Grass Forage Sci. 54, 208–218. https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.1999.00172.x

Haigh, P.M., 1998. Incorporation of straw with grass at ensilage. J. Agric. Eng. Res. 70, 383–388. https://doi.org/10.1006/jaer.1998.0323

Hargreaves, J.C., Adl, M.S., Warman, P.R., 2008. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. Agric. Ecosyst. Environ. 123, 1–14. https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2007.07.004

Healy, M.G., Tighe, J.L., Allen, S.J., Smeed, M., 1997. Biosorbents for grass silage effluent retention. Stud. Environ. Sci. 66, 223–237. https://doi.org/10.1016/S0166-1116(97)80046-5

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 100, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027

Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C., 2011a. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. Bioresour. Technol. 102, 5153–5161. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.01.012

Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C., 2011b. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. Bioresour. Technol. 102, 5153–5161. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.012

Herrmann, C., Idler, C., Heiermann, M., 2015. Improving aerobic stability and biogas production of maize silage using silage additives. Bioresour. Technol. 197, 393–403. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.114

Hillion, M. Lou, 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. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.024

Hillion, M., 2017. Optimisation de la digestion anaérobie en voie sèche continue de résidus lignocellulosiques. PhD thesis, Montpellier Supagro.

Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.C., De Laclos, H.F., Ghasimi, D.S.M., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Horvath, I.S., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Pfund, F.R., Strömberg, S., Torrijos, M., Van Eekert, M., Van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. Water Sci. Technol. 74, 2515–2522. https://doi.org/10.2166/wst.2016.336

Holly, M.A., Larson, R.A., Cooley, E.T., Wunderlin, A.M., 2018. Silage storage runoff characterization: Annual nutrient loading rate and first flush analysis of bunker silos. Agric. Ecosyst. Environ. 264, 85–93. https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.05.015

Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D., Dudgeon, D., 2011. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover, Pharmaceutical Extrusion Technology. Golden, CO (United States). https://doi.org/10.2172/1013269

Hwang, M.H., Jang, N.J., Hyun, S.H., Kim, I.S., 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: The role of pH. J. Biotechnol. 111, 297–309. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.024

Igos, E., Golkowska, K., Koster, D., Vervisch, B., Benetto, E., 2016. Using rye as cover crop for bioenergy production: An environmental and economic assessment. Biomass and Bioenergy 95, 116–123. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.09.023

InfoMétha, n.d. Valorisation du digestat en France : aspects réglementaires [WWW Document]. URL https://www.infometha.org/pour-aller-plus-loin/reglementation-et-normes/valorisation-du-digestat-en-france-aspects (accessed 12.28.21).

Jansson, A.T., Patinvoh, R.J., Horváth, Ii.S., Taherzadeh, M.J., 2019. Dry anaerobic digestion of food and paper industry wastes at different solid contents. Fermentation 5, 1–10. https://doi.org/10.3390/fermentation5020040

Jian, J., Du, X., Reiter, M.S., Stewart, R.D., 2020a. A meta-analysis of global cropland soil carbon changes due to cover cropping. Soil Biol. Biochem. 143, 107735. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107735

Jian, J., Du, X., Reiter, M.S., Stewart, R.D., 2020b. A meta-analysis of global cropland soil carbon changes due to cover cropping. Soil Biol. Biochem. 143, 107735. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107735

Jiang, D., Ge, X., Zhang, Q., Zhou, X., Chen, Z., Keener, H., Li, Y., 2017. Comparison of sodium hydroxide and calcium hydroxide pretreatments of giant reed for enhanced enzymatic digestibility and methane production. Bioresour. Technol. 244, 1150–1157. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.08.067

Jones, R., Jones, D.I.H., 1996. The effect of in-silo effluent absorbents on effluent production and silage quality. J. Agric. Eng. Res. 64, 173–186. https://doi.org/10.1111/gfs.12343

Jurgutis, L., Šlepetienė, A., Amalevičiūtė-Volungė, K., Volungevičius, J., Šlepetys, J., 2021. The effect of digestate fertilisation on grass biogas yield and soil properties in field-biomass-biogas-field renewable energy production approach in Lithuania. Biomass and Bioenergy 153. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106211

Jury, C., Benetto, E., Koster, D., Schmitt, B., Welfring, J., 2010. Life Cycle Assessment of biogas production by monofermentation of energy crops and injection into the natural gas grid. Biomass and Bioenergy 34, 54–66. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.011

Kadziene, G., Suproniene, S., Auskalniene, O., Pranaitiene, S., Svegzda, P., Versuliene, A., Ceseviciene, J., Janusauskaite, D., Feiza, V., 2020. Tillage and cover crop influence on weed pressure and Fusarium infection in spring cereals. Crop Prot. 127, 104966. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104966

Kaiser, A.G., Piltz, J.W., Burns, H.M., Griffiths, N.W., 2004. Successful silage.

Kalač, P., 2011. The required characteristics of ensiled crops used as a feedstock for biogas production: a review. J. Agrobiol. 28, 85–96. https://doi.org/10.2478/v10146-011-0010-y

Keck, M., Mager, K., Weber, K., Keller, M., Frei, M., Steiner, B., Schrade, S., 2018. Odour impact from farms with animal husbandry and biogas facilities. Sci. Total Environ. 645, 1432–1443. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.182

Khor, W.C., Rabaey, K., Vervaeren, H., 2015. Low temperature calcium hydroxide treatment enhances anaerobic methane production from (extruded) biomass. Bioresour. Technol. 176, 181–188. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.11.037

Khorasani, G.R., Jedel, P.E., Helm, J.H., Kennelly, J.J., 1997. Influence of stage of maturity on yield components and chemical composition of cereal grain silages. Can. J. Anim. Sci. 77, 259–267. https://doi.org/10.4141/A96-034

Khorvash, M., Colombatto, D., Beauchemin, K.A., Ghorbani, G.R., Samei, A., 2006. Use of absorbants and inoculants to enhance the quality of corn silage. Can. J. Anim. Sci. 86, 97–107. https://doi.org/10.4141/A05-029

Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 199, 42–48. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.08.085

Kim, S., Holtzapple, M.T., 2006. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. Bioresour. Technol. 97, 778–785. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.002

Kim, S., Holtzapple, M.T., 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. Bioresour. Technol. 96, 1994–2006. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.01.014

Koenig, A., Dehn, F., 2016. Biogenic acid attack on concretes in biogas plants. Biosyst. Eng. 147, 226–237. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.03.007

Kothari, R., Pandey, A.K., Kumar, S., Tyagi, V. V., Tyagi, S.K., 2014. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. Renew. Sustain. Energy Rev. 39, 174–195. https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.07.011

Kreuger, E., Nges, I., Björnsson, L., 2011. Ensiling of crops for biogas production: Effects on methane yield and total solids determination. Biotechnol. Biofuels 4, 1–8. https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-44

Krooneman, J., Faber, F., Alderkamp, A.C., Oude Elferink, S.J.H.W., Driehuis, F., Cleenwerck, I., Swings, J., Gottschal, J.C., Vancanneyt, M., 2002. Lactobacillus diolivorans sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 639–646. https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-639

Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. J. Dairy Sci. 101, 4020–4033. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909

Kung, L., Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Bessett, C.A., Ranjit, N.K., Glancey, J.L., 1998. The Effect of Preservatives Based on Propionic Acid on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage and a Total Mixed Ration. J. Dairy Sci. 81, 1322–1330. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75695-4

Kung, L., Stokes, M.R., Lin, C.J., 2015. Silage additives. Silage Sci. Technol. 305–360. https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c7

Kusch, S., Schumacher, B., Oechsner, H., Schäfer, W., 2011. Methane yield of oat husks. Biomass and Bioenergy 35, 2627–2633. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.044

Larsen, S.U., Hjort-Gregersen, K., Vazifehkhoran, A.H., Triolo, J.M., 2017a. Co-ensiling of straw with sugar

beet leaves increases the methane yield from straw. Bioresour. Technol. 245, 106–115. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.117

Larsen, S.U., Hjort-Gregersen, K., Vazifehkhoran, A.H., Triolo, J.M., 2017b. Co-ensiling of straw with sugar beet leaves increases the methane yield from straw. Bioresour. Technol. 245, 106–115. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.117

Latsch, R., Sauter, J., 2014. Compactage de l'ensilage d'herbe en silo-couloir.

Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prévost, H., Drider, D., Dalgaard, P., 2007. Carnobacterium: Positive and negative effects in the environment and in foods. FEMS Microbiol. Rev. 31, 592–613. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x

Li, C., Tao, Y., Fang, J., Li, Q., Lu, W., 2020. Impact of continuous leachate recirculation during solid state anaerobic digestion of Miscanthus. Renew. Energy 154, 38–45.

Li, W., Khalid, H., Amin, F.R., Zhang, H., Dai, Z., Chen, C., Liu, G., 2020. Biomethane production characteristics, kinetic analysis, and energy potential of different paper wastes in anaerobic digestion. Renew. Energy 157, 1081–1088. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.035

Liu, C., Wang, J., Ji, X., Qian, H., Huang, L., Lu, X., 2016. The biomethane producing potential in China: A theoretical and practical estimation. Chinese J. Chem. Eng. 24, 920–928. https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.12.025

Lloyd, T.A., Wyman, C.E., 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Bioresour. Technol. 96, 1967–1977. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.01.011

Loow, Y.L., Wu, T.Y., Jahim, J.M., Mohammad, A.W., Teoh, W.H., 2016. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. Cellulose 23, 1491–1520. https://doi.org/10.1007/s10570-016-0936-8

Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J.A., Franco, D., 2018. Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description, Innovative technologies for food preservation: Inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0

Ma, H., Liu, He, Zhang, L., Yang, M., Fu, B., Liu, Hongbo, 2017. Novel insight into the relationship between

organic substrate composition and volatile fatty acids distribution in acidogenic co-fermentation. Biotechnol. Biofuels. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0821-1

Marsac, S., Heredia, M., Bazet, M., Delaye, N., Trochard, R., Lagrange, H., Quod, C., Sanner, E.-A., 2019a. Optimisation de la mobilisation de CIVE pour la méthanisation dans les systèmes d'exploitation.

Marsac, S., Trochard, R., Delaye, N., Peu, P., Pommier, S., Brosset, D., 2019b. Méthanisation par voie sèche à la ferme de résidus de culture, ADEME. https://doi.org/10.3406/tiers.1960.1203

Martínez-Gutiérrez, E., 2018. Biogas production from different lignocellulosic biomass sources: advances and perspectives. 3 Biotech 8, 0. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1257-4

Mayne, C.S., Gordon, F.J., 1986. Effect of harvesting system on nutrient losses during silage making. 2. In-silo losses. Grass Forage Sci. 41, 341–351. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1986.tb01824.x

McEniry, J., Allen, E., Murphy, J.D., O'Kiely, P., 2014. Grass for biogas production: The impact of silage fermentation characteristics on methane yield in two contrasting biomethane potential test systems. Renew. Energy 63, 524–530. https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.09.052

McNulty, P.B., Kennedy, S., 1982. Density Measurements of Grass by Toluene Displacement and Air Comparison Pycnometry. Irish J. Agric. Reserach 21, 75–83.

Meier, U., 2018. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants, BBCH Monograph. Open Agrar Repositorium. https://doi.org/10.5073/20180906-074619

Meier, U., 1997. Stades phénologiques des mono-et dicotylédones cultivées - BBCH Monographie, in: Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants. https://doi.org/10.5073/20180906-075455

Meyer, N., 2020. Evaluation de l'impact des cultures intermédiaires multi-services sur le bilan hydrique des sols : approche par expérimentation et simulation. Application au bassin Adour-Garonne. Université de Toulouse.

Mielenz, J.R. (Ed.), 2009. Biofuels, Journal of Chemical Information and Modeling, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8

Millati, R., Wikandari, R., Ariyanto, T., Putri, R.U., Taherzadeh, M.J., 2020. Pretreatment technologies for anaerobic digestion of lignocelluloses and toxic feedstocks. Bioresour. Technol. 304, 122998. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122998

Ministère de la transition écologique, 2021. Chiffres clés des énergies renouvelables.

Ministère de la Transition écologique, 2021. Bilan énergétique de la France pour 2019 [WWW Document]. URL https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/bilan-energetique-de-la-france-pour-2019 (accessed 1.27.22).

Minson, D.J., Lancaster, R.J., 1965. The Efficiency of Six Methods of Covering Silage. New Zeal. J. Agric. Res. 8, 542–554. https://doi.org/10.1080/00288233.1965.10419895

Moletta, R., 2015. La méthanisation (3° éd.).

Molinuevo-Salces, B., Fernández-Varela, R., Uellendahl, H., 2014. Key factors influencing the potential of catch crops for methane production. Environ. Technol. (United Kingdom) 35, 1685–1694. https://doi.org/10.1080/09593330.2014.880515

Molinuevo-Salces, B., Larsen, S.U., Ahring, B.K., Uellendahl, H., 2013. Biogas production from catch crops: Evaluation of biomass yield and methane potential of catch crops in organic crop rotations. Biomass and Bioenergy 59, 285–292. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.008

Monlau, F., Aemig, Q., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrère, H., 2013a. Application of optimized alkaline pretreatment for enhancing the anaerobic digestion of different sunflower stalks varieties. Environ. Technol. (United Kingdom) 34, 2155–2162. https://doi.org/10.1080/09593330.2013.808247

Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrere, H., 2012. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. Bioresour. Technol. 120, 241–247. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.040

Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2013b. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 43, 260–322. https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.P., Carrère, H., 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. Biotechnol. Adv. 32, 934–951. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007

Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. J. Appl. Bacteriol. 55, 453–460. https://doi.org/10.1111/j.1365-

2672.1983.tb01685.x

Murphy, J., Braun, R., Weiland, P., Wellinger, A., Bochmann, G., Weiland, P., Wellinger, A., 2011. Biogas from crop digestion. IEA bioenergy task 37 37, 1–23. https://doi.org/10.1016/S0140-6701(04)80256-X

National Lime Association, n.d. Properties of typical commercial lime products. Arlington, Virginia.

Nolan, P., Luostarinen, S., Doyle, E.M., O'Kiely, P., 2016. Anaerobic digestion of perennial ryegrass prepared by cryogenic freezing versus thermal drying methods, using contrasting in vitro batch digestion systems. Renew. Energy 87, 273–278. https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.026

Oelberg, T.J., Clark, A.K., McGuffey, R.K., Schingoethe, D.J., 1983. Evaluation of Covering, Dry Matter, and Preservative at Ensiling of Alfalfa in Bunker Silos. J. Dairy Sci. 66, 1057–1068. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81902-X

Okeke, I.J., Sahoo, K., Kaliyan, N., Mani, S., 2020. Life cycle assessment of renewable diesel production via anaerobic digestion and Fischer-Tropsch synthesis from miscanthus grown in strip-mined soils. J. Clean. Prod. 249, 119358. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119358

Okine, A., Yimamu, A., Hanada, M., Izumita, M., Zunong, M., Okamoto, M., 2007. Ensiling characteristics of daikon (Raphanus sativus) by-product and its potential as an animal feed resource. Anim. Feed Sci. Technol. 136, 248–264. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.005

Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, E.J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by Lactobacillus buchneri. Appl. Environ. Microbiol. 67, 125–132. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001

P. Savoie, A. Amyot, R. Thériault, 2002. EFFECT OF MOISTURE CONTENT, CHOPPING, AND PROCESSING ON SILAGE EFFLUENT. Trans. ASAE 45, 907–914. https://doi.org/10.13031/2013.9937

Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of Ensiling, in: Silage Science and Technology. pp. 31–93. https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2

Pakarinen, A., Maijala, P., Jaakkola, S., Stoddard, F., Kymäläinen, M., Viikari, L., 2011. Evaluation of preservation methods for improving biogas production and enzymatic conversion yields of annual crops. Biotechnol. Biofuels 4, 20. https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-20

Pakarinen, O., Lehtomäki, A., Rissanen, S., Rintala, J., 2008. Storing energy crops for methane production:

Effects of solids content and biological additive. Bioresour. Technol. 99, 7074–7082. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.01.007

Pečar, D., Goršek, A., 2020. Kinetics of methane production during anaerobic digestion of chicken manure with sawdust and miscanthus. Biomass and Bioenergy 143, 105820. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105820

Peyrelasse, C., Lalanne, M., Monlau, F., Buffière, P., Bayard, R., Teixeira, F., 2017. SAM - Bonnes pratiques pour le stockage de matiere. ADEME. 55 pages.

Playne, M.J., McDonald, P., 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. J. Sci. Food Agric. 17, 264–268. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170609

Popat, S.C., Yates, M. V., Deshusses, M.A., 2010. Kinetics of inactivation of indicator pathogens during thermophilic anaerobic digestion. Water Res. 44, 5965–5972. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.045

Porter, M.G., Murray, R.S., 2001. The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry-matter content estimated by different analytical methods. Grass Forage Sci. 56, 405–11. https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2001.00292.x

Rajput, A.A., Zeshan, Visvanathan, C., 2018. Effect of thermal pretreatment on chemical composition, physical structure and biogas production kinetics of wheat straw. J. Environ. Manage. 221, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.011

Ramirez-Garcia, J., Gabriel, J.L., Alonso-Ayuso, M., Quemada, M., 2015. Quantitative characterization of five cover crop species. J. Agric. Sci. 153, 1174–1185. https://doi.org/10.1017/S0021859614000811

Razak, O.A., Masaaki, H., Yimamu, A., Meiji, O., 2012. Potential water retention capacity as a factor in silage effluent control: Experiments with high moisture by-product feedstuffs. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 25, 471–478. https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11349

Rees, D.V.H., 1982. The aerobic deterioration of grass silage and its effect on the water-soluble carbohydrate and the associated heat production. J. Sci. Food Agric. 33, 499–508. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330602

Reyes, J., Toledo, M., Michán, C., Siles, J.A., Alhama, J., Martín, M.A., 2020. Biofiltration of butyric acid: Monitoring odor abatement and microbial communities. Environ. Res. 190.

https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110057

Rochette, P., 2012. Valorisation De L ' Azote : Des Effluents D ' Élevage Aux Systèmes De Cultures. Colloq. Restit. "Les flux d'azote liés aux élevages. Réduire les pertes, rétablir les équilibres" le 19 Janvier 2012 à Paris 229–294.

Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K.Y., Olabi, A.G., 2017. Pretreatment techniques used in biogas production from grass. Renew. Sustain. Energy Rev. 68, 1193–1204. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.02.022

ROMSAIYUD, A., SONGKASIRI, W., NOPHARATANA, A., CHAIPRASERT, P., 2009. Combination effect of pH and acetate on enzymatic cellulose hydrolysis. J. Environ. Sci. 21, 965–970. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62369-4

Ruark, M., Franzen, D., 2020. Nitrogen Availability from Cover Crops: Is It Always about the C:N Ratio? Crop. Soils 53, 3–7. https://doi.org/10.1002/crso.20003

Ruppert, H., Kappas, M., Ibendorf, J., 2013. Sustainable bioenergy production - An integrated approach. Sustain. Bioenergy Prod. - An Integr. Approach 9789400766, 1–451. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6642-6

Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. Int. J. Hydrogen Energy 38, 13172–13191. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122

Sagastume Gutiérrez, A., Van Caneghem, J., Cogollos Martínez, J.B., Vandecasteele, C., 2012. Evaluation of the environmental performance of lime production in Cuba. J. Clean. Prod. 31, 126–136. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.02.035

Sambusiti, C., Ficara, E., Malpei, F., Steyer, J.P., Carrère, H., 2012a. Influence of alkaline pre-treatment conditions on structural features and methane production from ensiled sorghum forage. Chem. Eng. J. 211–212, 488–492. https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.103

Sambusiti, C., Ficara, E., Rollini, M., Manzoni, M., Malpei, F., 2012b. Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production. Water Sci. Technol. 66, 2447–2452. https://doi.org/10.2166/wst.2012.480

Sapkota, T.B., Askegaard, M., Lægdsmand, M., Olesen, J.E., 2012. Effects of catch crop type and root

depth on nitrogen leaching and yield of spring barley. F. Crop. Res. 125, 129–138. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.09.009

Scarlat, N., Dallemand, J.F., Fahl, F., 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. Renew. Energy 129, 457–472. https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006

Schumacher, K., Schultmann, F., 2017. Local Acceptance of Biogas Plants: A Comparative Study in the Trinational Upper Rhine Region. Waste and Biomass Valorization 8, 2393–2412. https://doi.org/10.1007/s12649-016-9802-z

Service des données et études statistiques (SDES), 2021a. Tableau de bord : biométhane injecté dans les réseaux de gaz. Premier trimestre 2021 [WWW Document]. URL https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/publicationweb/364

Service des données et études statistiques (SDES), 2021b. Tableau de bord : biogaz pour la production d'électricité . Premier trimestre 2021 [WWW Document]. URL https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/publicationweb/363

Shahid, S.A., Zaman, M., Heng, L., 2018. Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem. Guidel. Salin. Assessment, Mitig. Adapt. Using Nucl. Relat. Tech. 43–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2

Sharma, R., Palled, V., Sharma-Shivappa, R.R., Osborne, J., 2013. Potential of potassium hydroxide pretreatment of switchgrass for fermentable sugar production. Appl. Biochem. Biotechnol. 169, 761–772. https://doi.org/10.1007/s12010-012-0009-x

Sherman, S.R., Goodell, J.J., Milliken, C.E., Morris, J.A., Gorensek, M.B., 2012. A new process developed for separation of lignin from ammonium hydroxide pretreatment solutions. Environ. Prog. Sustain. Energy 31, 130–138. https://doi.org/10.1002/ep.10544

Shinners, K.J., 2003. Engineering Principles of Silage Harvesting Equipment, in: Silage Science and Technology. pp. 361–403. https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c8

Sierra, R., Granda, C.B., Holtzapple, M.T., 2009a. Lime Pretreatment, in: Mielenz, J.R. (Ed.), Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 115–124. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8_9

Sierra, R., Granda, C.B., Holtzapple, M.T., 2009b. Lime Pretreatment. pp. 115–124.

https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8_9

Sousa, D.O., Hansen, H.H., Nussio, L.G., Nadeau, E., 2019. Effects of wilting and ensiling with or without additive on protein quality and fermentation of a lucerne-white clover mixture. Anim. Feed Sci. Technol. 258, 114301. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114301

Stronach, S.M., Rudd, T., Lester, J.N., 1986. Anaerobic Digestion Processes in Instdustrial Wastewater Treatment, Biotechnol. ed, Biotechnology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/978-3-642-71217-3

Surra, E., Bernardo, M., Lapa, N., Esteves, I., Fonseca, I., Mota, J.P., 2018. Maize cob waste pre-treatments to enhance biogas production through co-anaerobic digestion with OFMSW. Waste Manag. 72, 193–205. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.004

Sutter, A., 1957. Problem of waste effluent from silage making and feeding of silage. Eur. Prod. Agency Organ. Eur. Econ. Co-Oper. 307, 74–82.

Szerencsits, M., Weinberger, C., Kuderna, M., Feichtinger, F., Erhart, E., Maier, S., 2015. Biogas from Cover Crops and Field Residues : Effects on Soil , Water , Climate and Ecological Footprint. Int. J. Environ. Ecol. Eng. 9, 413–416.

Taherdanak, M., Zilouei, H., 2014. Improving biogas production from wheat plant using alkaline pretreatment. Fuel 115, 714–719. https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2013.07.094

Teixeira Franco, R., 2017. Optimisation des pratiques de gestion des déchets agricoles en lien avec leur valorisation par méthanisation.

Teixeira Franco, R., Buffière, P., Bayard, R., 2018. Co-ensiling of cattle manure before biogas production: Effects of fermentation stimulants and inhibitors on biomass and methane preservation. Renew. Energy 121, 315–323. https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.035

Teixeira Franco, R., Buffière, P., Bayard, R., 2017. Optimizing storage of a catch crop before biogas production: Impact of ensiling and wilting under unsuitable weather conditions. Biomass and Bioenergy 100, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.017

Teixeira Franco, R., Buffière, P., Bayard, R., 2016. Ensiling for biogas production: Critical parameters. A review. Biomass and Bioenergy 94, 94–104. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.014

Thomas, H., Seira, J., Escudié, R., Carrère, H., 2018. Lime Pretreatment of Miscanthus: Impact on BMP

and Batch Dry Co-Digestion with Cattle Manure. Molecules 23, 1608. https://doi.org/10.3390/molecules23071608

Tian, L., Shen, F., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., Li, X., 2014. Reducing agitation energy-consumption by improving rheological properties of corn stover substrate in anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 168, 86–91. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.023

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. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.026

Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F.M., Portincasa, P., Gobbetti, M., De Angelis, M., 2020. The controversial role of human gut lachnospiraceae. Microorganisms 8, 1–25. https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573

Van Niel, E.W.J., Claassen, P.A.M., Stams, A.J.M., 2003. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, Caldicellulosiruptor saccharolyticus. Biotechnol. Bioeng. 81, 255–262. https://doi.org/10.1002/bit.10463

Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds . IV . Determination of Plant Cell-Wall Constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50, 50–55.

Van Vlierberghe, C., Escudie, R., Bernet, N., Frederic, S., Carrere, H., 2021. Long term alkaline storage and pretreatment process of cover crops for anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 330, 124986. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124986

Venkiteshwaran, K., Milferstedt, K., Hamelin, J., Zitomer, D.H., 2016. Anaerobic digester bioaugmentation influences quasi steady state performance and microbial community. Water Res. 104, 128–136. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.012

Vicini, J.L., Bateman, H.G., Bhat, M.K., Clark, J.H., Erdman, R.A., Phipps, R.H., Van Amburgh, M.E., Hartnell, G.F., Hintz, R.L., Hard, D.L., 2003. Effect of Feeding Supplemental Fibrolytic Enzymes or Soluble Sugars with Malic Acid on Milk Production. J. Dairy Sci. 86, 576–585. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73636-4

Villa, R., Ortega Rodriguez, L., Fenech, C., Anika, O.C., 2020. Ensiling for anaerobic digestion: A review of key considerations to maximise methane yields. Renew. Sustain. Energy Rev. 134, 110401.

https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110401

Walter, I., Martínez, F., Cala, V., 2006. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. Environ. Pollut. 139, 507–514. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2005.05.020

Wang, B., Wan, W., Wang, J., 2008. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy 33, 7013–7019. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.027

Weinberg, Z.., Ashbell, G., 2003. Engineering aspects of ensiling. Biochem. Eng. J. 13, 181–188. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00130-4

Weissach, F., Strubelt, C., 2008. Correcting the Dry Matter Content of Maize Silages as a Substrate for Biogas Production. Landtechnik 63, 82–83.

Weissbach, F., 2011. The future of forage conservation, in: Proceedings of the II International Symposium on Forage Quality and Conservation, São Pedro, Brazil. pp. 319–369.

Wilkinson, J.M., Davies, D.R., 2013. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. Grass Forage Sci. 68, 1–19. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00891.x

Williams, A.G., 1994. The Permeability and Porosity of Grass Silage as Affected by Dry Matter. J. Agric. Eng. Res. 59, 133–140. https://doi.org/10.1006/jaer.1994.1070

Woolford, M.K., 1990. The detrimental effects of air on silage. J. Appl. Bacteriol. 68, 101–116. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x

Woolford, M.K., Pahlow, G., 1998. The silage fermentation, in: Microbiology of Fermented Foods. Springer US, Boston, MA, pp. 73–102. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_3

Woolford, M.K., Wilkinson, J.M., Cook, J.E., 1983. Investigations on the effect of sodium bentonite and other moisture absorbents on the production of effluent from grass silage. Anim. Feed Sci. Technol. 8, 107–118. https://doi.org/10.1016/0377-8401(83)90092-5

Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. Bioresour. Technol. 96, 1959–1966. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.01.010

Xu, J., 2015. Microwave Pretreatment, in: Pretreatment of Biomass. Elsevier, pp. 157–172. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00009-8

Yang, H.Y., Wang, X.F., Liu, J. Bin, Gao, L.J., Ishii, M., Igarashi, Y., Cui, Z.J., 2006. Effects of water-soluble carbohydrate content on silage fermentation of wheat straw. J. Biosci. Bioeng. 101, 232–237. https://doi.org/10.1263/jbb.101.232

Yang, Z., Piironen, V., Lampi, A.M., 2019. Epoxy and hydroxy fatty acids as non-volatile lipid oxidation products in oat. Food Chem. 295, 82–93. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.052

Yuan, H., Chen, Y., Zhang, H., Jiang, S., Zhou, Q., Gu, G., 2006. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. Environ. Sci. Technol. 40, 2025–2029. https://doi.org/10.1021/es052252b

Yuan, S., Ji, X., Ji, H., Tian, Z., Chen, J., 2019. An optimum combined severity factor improves both the enzymatic saccharification yield and the functional lignin structure. Cellulose 26, 4731–4742. https://doi.org/10.1007/s10570-019-02442-9

Zahan, Z., Georgiou, S., Muster, T.H., Othman, M.Z., 2018. Semi-continuous anaerobic co-digestion of chicken litter with agricultural and food wastes: A case study on the effect of carbon/nitrogen ratio, substrates mixing ratio and organic loading. Bioresour. Technol. 270, 245–254. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.010

Zebarth, B.J., Arsenault, W.J., Moorehead, S., Kunelius, H.T., Sharifi, M., 2009. Italian ryegrass management effects on nitrogen supply to a subsequent potato crop. Agron. J. 101, 1573–1580. https://doi.org/10.2134/agronj2009.0184

Zemo, K.H., Panduro, T.E., Termansen, M., 2019. Impact of biogas plants on rural residential property values and implications for local acceptance. Energy Policy 129, 1121–1131. https://doi.org/10.1016/j.enpol.2019.03.008

Zhang, H., Wu, J., Gao, L., Yu, J., Yuan, X., Zhu, W., Wang, X., Cui, Z., 2018. Aerobic deterioration of corn stalk silage and its effect on methane production and microbial community dynamics in anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 250, 828–837. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.149

Zhang, Y.C., Wang, X.K., Li, D.X., Lin, Y.L., Yang, F.Y., Ni, K.K., 2020. Impact of wilting and additives on fermentation quality and carbohydrate composition of mulberry silage. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 33, 254–263. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0925

Zhao, S., Yang, X., Zhang, W., Chang, J., Wang, D., 2019. Volatile sulfide compounds (VSCs) and ammonia emission characteristics and odor contribution in the process of municipal sludge composting. J. Air Waste Manag. Assoc. 69, 1368–1376. https://doi.org/10.1080/10962247.2019.1629356

Zhao, X., Liu, Jinhuan, Liu, Jingjing, Yang, F., Zhu, W., Yuan, X., Hu, Y., Cui, Z., Wang, X., 2017. Effect of ensiling and silage additives on biogas production and microbial community dynamics during anaerobic digestion of switchgrass. Bioresour. Technol. 241, 349–359. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.183

Zheng, X.J., Yu, H.Q., 2005. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. J. Environ. Manage. 74, 65–70. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.08.015

Ziganshina, E.E., Belostotskiy, D.E., Bulynina, S.S., Ziganshin, A.M., 2021. Effect of magnetite on anaerobic digestion of distillers grains and beet pulp: Operation of reactors and microbial community dynamics. J. Biosci. Bioeng. 131, 290–298. https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2020.10.003

A Annexe : Etude de la volatilisation des acides organiques lors de la détermination du taux de matière sèche par séchage

Des travaux annexes à ceux présentés dans le manuscrit ont porté sur la définition d'une équation de correction prenant en compte la volatilisation des certains métabolites lors de la mesure de la teneur en matière volatile lors du séchage au four. L'hypothèse initiale était que le taux de volatilisation des composés acides dépendait de la valeur du pH de l'échantillon. La valeur du pH détermine la quantité d'acide présent sous la forme libre [AH]. Cette forme est supposée volatile, contrairement à la forme dissociée [A^-]. La concentration de chacune des deux formes à un pH donné peut être calculé selon l'équation de Henderson-Hasselbach :

$$[AH] = \frac{C_T}{1 + 10^{pH-pKa}}$$

avec [AH] = concentration d'acide sous sa forme libre, C_T = concentration totale de l'acide (forme libre et dissociée).

Afin d'étudier l'influence du pH sur la volatilisation, des échantillons d'ensilage synthétique ont été préparés à partir de paille de blé broyée et d'une solution de concentration connue de l'acide étudié. Le pH de cette solution a été ajusté avec de l'acide sulfurique ou de la soude. Pour chaque mesure, 6 réplicats d'ensilage synthétique ont été réalisés : 3 ont été analysés immédiatement selon le protocole présenté dans le chapitre 2. Les 3 autres ont été séchés au four à 105°C pendant 24 h, puis ré-hydratés et analysés tel que présenté dans le chapitre 2. La différence de concentration en acide avant et après séchage a été utilisée pour calculer le taux de volatilisation. Cette expérience a été réalisée avec l'acide lactique (Figure A-1) et l'acide acétique (Figure A-2).

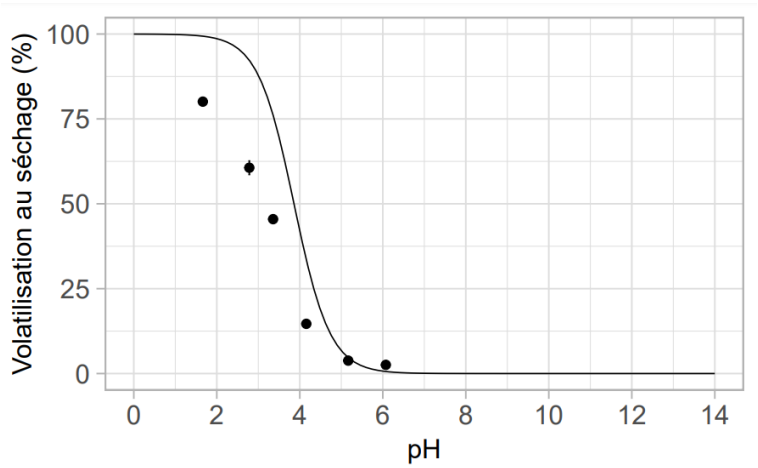

Figure A-1 : Volatilisation de l'acide lactique en fonction du pH, substrat synthétique. — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach

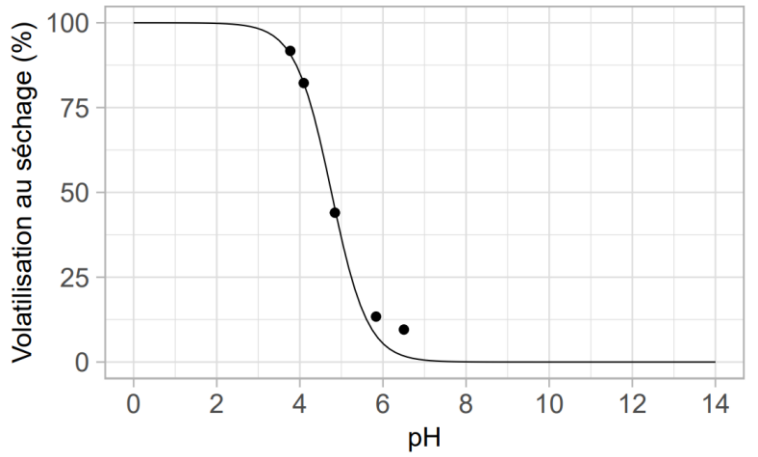

Figure A-2 : Volatilisation de l'acide acétique en fonction du pH, substrat synthétique. — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach

Ces résultats ont permis d'observer une corrélation nette entre le taux de volatilisation de l'acide et la proportion de cet acide sous forme [AH], calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach (trait plein). Devant ce constat, la même expérience a été répétée sur des substrats réels (ensilages et CIMSE stockées par voie alcaline) pour l'acide lactique (Figure A-3), l'acide acétique (Figure A-4) et l'acide butyrique (Figure A-5). Dans certains cas notamment lors de l'étude du taux de volatilisation de l'acide lactique, un taux de volatilisation négatif a été calculé. Ceci s'explique par une concentration initiale en acide lactique faible (de l'ordre de 5 $g.kg_{MS}^{-1}$ ou moins) combinée à l'incertitude de la mesure.

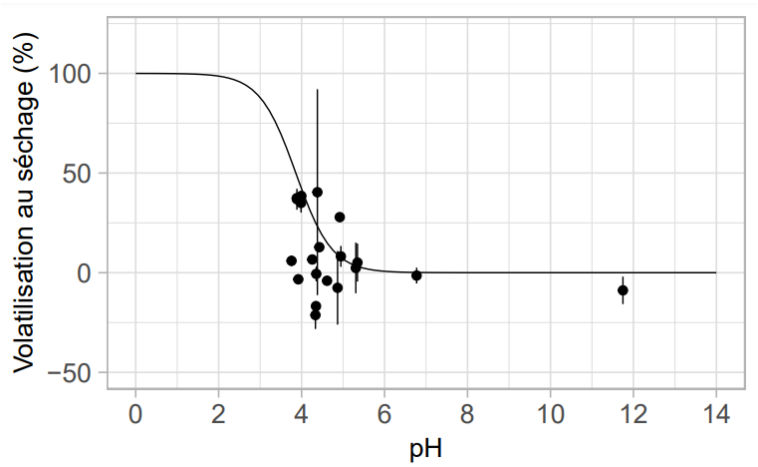

Figure A-3 : Volatilisation de l'acide lactique en fonction du pH, substrat réel — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach

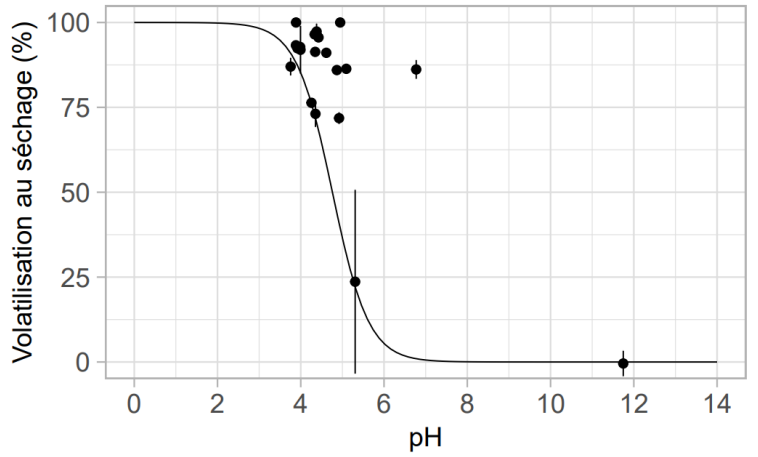

Figure A-4 : Volatilisation de l'acide acétique en fonction du pH, substrat réel. — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach

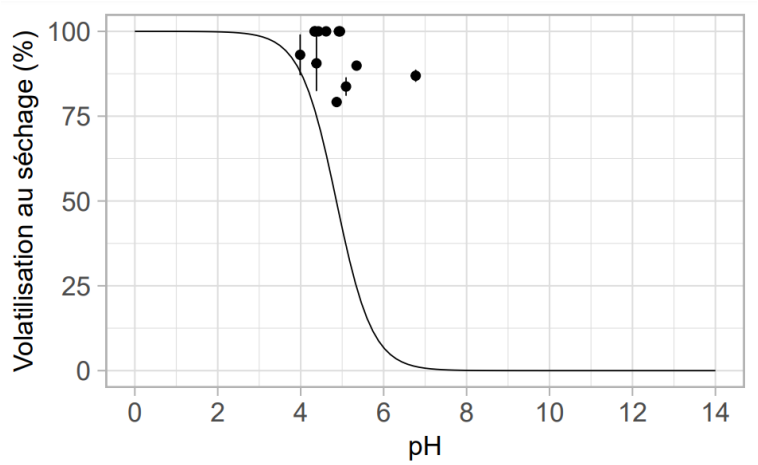

Figure A-5 : Volatilisation de l'acide butyrique en fonction du pH, substrat réel — : fraction de l'acide sous forme libre calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach

Les essais menés sur des substrats réels n'ont pas permis de montrer une relation aussi nette entre le taux de volatilisation de l'acide étudié et sa concentration sous forme [AH]. Une forte variabilité a été observée entre différents échantillons de pH voisins. Une nouvelle corrélation prenant en compte le pH dans le calcul de la volatilisation des différents acides n'a pas pu être définie à partir de ces résultats. Devant ce constat, l'équation de Porter et Murray (2001), répandue dans la littérature scientifique, a été utilisée :

$$MS_C = MS_{NC} + 0.375\ AL + 0.892\ AGV + 0.975\ Alcools$$