



Gembloux Agro-Bio Tech
Université de Liège

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE - GEMBLoux AGRO-BIO TECH

Etude de la biodégradation anaérobie des feuilles de *Mangifera indica* (manguier) et de *Manihot utilissima* (manioc)

Philippe MAMBANZULUA NGOMA

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique

Promoteurs: Marc ONGENA

Co-promoteur: Philippe THONART

2015

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de ladite loi et des modifications ultérieures.

Philippe MAMBANZULUA NGOMA (2015). Study of anaerobic biodegradation of *Mangifera indica* (mango) and *Manihot utilissima* (cassava) leaves. **Thèse de Doctorat.** Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique)

Abstract

The population growth of these last two decades led to an increase of waste in the City Province of Kinshasa (VPK), capital of the Democratic Republic of Congo. Deprived by an effective management system, the VPK produces essentially vegetal wastes that are constituted for the greater part of dead leaves. These wastes bother and pollute the environment. On another point of view, the Kinshasa households meet enormous difficulties for soil fertilization and to collect wood for energy. Its overexploitation of the wood entails the deterioration of the ecosystems and the public health. Therefore in order to contribute to the reduction of all these difficulties simultaneously, the aim of this thesis was to investigate the methanization of these wastes since this technique is relatively simple, fast and non expensive. So, the methanation was performed at 30°C on the leaves of *Mangifera indica* (MU, mango) and of *Manihot utilissima* (MI, cassava) that are the most accessible of the VPK. The biochemical methane potentials of the MU and MI leaves demonstrated that the MU leaves were favorable to the methanation due to their low content in bioactive substance (secondary metabolites) and their low C/N ratio. In addition, their digestates would be an effective fertilizing. By contrast, the MI leaves were unfavorable to the methanation since the methanogenesis was inhibited, probably because of their composition rich in carbon and secondary metabolites (lignine, polyphenols, saponines and anthraquinones). However, these metabolites would be beneficial for the methanation in lower contents than 0.3 g/l in the culture medium. The anaerobic co-digestion improved the daily methane yields of these two leaves. The biogas produced with this process would represent about 28 % of the wooden annual domestic consumption and its digestate would cover annually the all agricultural and forest degraded areas. So, the domestic methanation or on site or near the site of waste generation would be favored to avoid the cost of their transport and their industrial treatment. A promising pilot essay has been achieved.

Philippe MAMBANZULUA NGOMA (2015). Etude de la biodégradation anaérobie des feuilles de *Mangifera indica* (manguier) et de *Manihot utilissima* (manioc). **Thèse de Doctorat. Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique)**

Résumé

La croissance démographique de ces deux dernières décennies a entraîné une augmentation des déchets dans la Ville Province de Kinshasa (VPK), capitale de la République Démocratique du Congo. Dépourvue d'un système de gestion efficace, la VPK produit essentiellement les déchets végétaux constitués en majorité des feuilles mortes. À cet effet, ces déchets gênent et polluent l'environnement. D'autre part, les ménages kinois éprouvent d'énormes difficultés pour s'approvisionner en engrais et bois énergie. La surexploitation du bois énergie entraîne la détérioration des écosystèmes et de la santé publique. C'est ainsi que, en vue de contribuer à la réduction de toutes ces difficultés à la fois, cette thèse apporte une technique de méthanisation rapide, simple et peu dispendieuse. Pour ce faire, la méthanisation des déchets des feuilles de *Mangifera indica* (MI, mangue) et de *Manihot utilissima* (MU, manioc) a été étudiée à 30°C car elles sont les plus accessibles de la VPK. A travers leurs pouvoirs méthanogènes, les feuilles de MU étaient favorables à la méthanisation suite à leur faible teneur en substrats bioactifs (métabolites secondaires) et à leur rapport C/N bas ; ainsi leurs digestats seraient des fertilisants efficaces. Par contre, les feuilles de MI étaient défavorables à la méthanisation; la méthanogenèse étant inhibée à cause de leur composition riche en carbone et en métabolites secondaires (lignine, polyphénols, saponines et anthraquinones). Cependant, ces métabolites se montreraient bénéfiques pour la méthanisation à des teneurs inférieures à 0.3 g/l dans le milieu de culture. La co-digestion anaérobie a amélioré le rendement journalier de la méthanisation de ces deux feuilles. Le biogaz produit avec ce processus représenterait environ 28% de la consommation annuelle ménagère en bois énergie et ses digestats couvriraient annuellement toutes les superficies agricoles et forestières dégradées. Ainsi, la méthanisation ménagère, sur le site ou à proximité du site de génération des déchets serait privilégiée pour éviter le coût de leur transport et de leur traitement industriel. Un essai pilote prometteur a été réalisé.

Dédicace

Aux plus démunis de la République Démocratique du Congo, je dedie ce travail.

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de la Coopération Technique Belge (CTB), de la Commission universitaire pour le Développement (CUD)/AERS et de l'Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech.

Remerciements

J'adresse mes remerciements à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

J'adresse ma profonde gratitude au Professeur Marc Ongena, promoteur de cette thèse et à son prédécesseur le Professeur Philippe Thonart. Merci de m'avoir accueilli et fait confiance pour mener à bien ce doctorat ainsi que pour tous les conseils et l'encadrement scientifique prodigués durant ces quatre années de recherche en modifiant le sujet initial après le départ anticipé en retraite du promoteur initial le Professeur Marc Culot auquel je suis reconnaissant.

Mes pensées vont tout droit aussi au Docteur Serge Hiligsmann pour sa supervision efficace de cette thèse et pour son concours bibliographique.

Je remercie le Professeur Pierre Eric Sumbu Zola de l'Université de Kinshasa, pour avoir accepté d'être comme co-promoteur local et puis membre du jury. Je lui suis reconnaissant pour ses remarques et suggestions.

J'adresse mes vifs remerciements aux membres du Jury qui, malgré leurs multiples occupations, ont accepté d'apporter leurs contributions dans la réalisation de cette thèse. Je tiens donc à exprimer ma reconnaissance aux Professeurs Frédéric Francis, Marianne Sindic, Georges Lognay et Patrick Gerin.

Je serai ingrat si je ne pense pas à Monsieur le Professeur Philippe Jacques, Président du CWBI et à son équipe. Je profite pour remercier le Professeur Franck Delvigne pour son cours « principes de base de l'épuration ».

J'adresse également mes remerciements à l'Ingénieur Thierry Fievez du LEMEE/ Gembloux Agro-Bio Tech pour ses conseils lors de la conception de certaines analyses physico-chimiques. Que le Professeurs Jean-Luc Vassel, le Destain, Biey, Musibondo, Kambu, Kabala, Bakana, Ndelo, Masiala, Noki, Kayembe Kalombo Francis Nsimba, Francine Nsuadi, Mariano Lusakimbanza, Crispin Mulaji, Nadège Kabamba, Docteurs Jérémie Mbinze, Jean Minengu, Bienvenu Kambashi, Cédric Tayere, Chefs de Travaux Robert Suami, trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout leur soutien scientifique moral et matériel pendant la réalisation de cette thèse.

Je suis reconnaissant à l'endroit de Madame Burny, à Monsieur l'abbé Etienne et à Patrice, Dieu seul sait combien je leur suis redevable.

Mon cœur déborde de reconnaissance à l'endroit de mes collègues Doctorants du CWBI, pour le soutien et l'appui apportés afin d'arriver au terme de cette thèse. Je pense à Parent, Irénée Kamdem, Wissal, Thibaut Masy, Mouri, Michel, Serge, Firmin, Anissa delepierre et à notre technicienne Chi.

Je garde aussi un sentiment de gratitude à l'endroit de mon épouse Emérence Matondo Bakuamisa, à mes enfants : Philoemera Mambanzulua, Paterné Ngoma, Emerphil Lungu, Clém Ngoma, Gloire à Dieu, à ma grand-mère Nsana Lungu, à mon père Mambanzulua, à ma tante Kialosa, mes oncles Boni et Fédé Kieselo, à mes frères sœurs, et ainsi qu'à mes cousins notamment Tito Mayenda pour leur soutien financier, moral et spirituel.

Enfin, cette page me fait penser à ma regrettée maman Clémentine Ngoma Lusala qui n'a pas pu voir ce jour, si longtemps attendu, paix à son âme.

Philippe MAMBANZULUA NGOMA

Lexique

Alo	Aloin from <i>Curacao aloe</i> (- 50%)
BMP	Biochemical methane potential
C/N	Carbon/nitrogen ratio
CPSM	Commercial plant secondary metabolite
GC	Gas chromatography
DAD	Diode array detector
DW	Dry weight
Gl	Glucose
HPLC	High performance liquid chromatography
MD	Mean deviation
MI	<i>Mangifera indica</i>
MU	<i>Manihot utilissima</i>
ND	Not determined
PSM	Plant secondary metabolite
Sal	Salicin (99%)
Sap	Saponin from <i>Quilaja molina pract</i>
Tan	Tannic acid
TKN	Total Kjeldahl nitrogen
TOC	Total organic carbon
UV	Ultraviolet
VFA	Volatile fatty acid
VS	Volatile solid

Liste des tableaux

Tableau 1 Compositions moyennes des ordures ménagères dans différents pays et villes (Mulaji, 2011; Biey, 2001; Lelo, 2008; Hiligsmann et al., 2006)	21
Tableau 2 Compositions chimiques sommaires des feuilles de MU et MI (Lebas, 2004).....	30
Tableau 3 Sources d'énergie utilisées pour la cuisson par le ménage dans la VPK (Shure et al., 2011)	32
Tableau 4 Pouvoirs calorifiques inférieurs de certains combustibles (Shuku, 2011; Pouzet, 2011).....	33
Tableau 5 Potentiels énergétiques totaux annuels estimés produits issus des feuilles ou consommés issus du bois énergie, du pétrole et de l'électricité dans la VPK.....	33
Tableau 6 Physico-chemical characterization of leaves of MU and MI: dry weight content (DW), ashes and organic matter or volatile solid (VS), total organic carbon (TOC), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and mineral elements.....	51
Tableau 7 Bioactive substances and specific and total polyphenols (equivalent gallic acid per g of leaves) in leaves of MU and MI	52
Tableau 8 Biogas and methane production yields after 230 days of BMP tests at 30°C with GI, MU and MI leaves at concentrations of 1.7 g/l to 54.4 g DW/l	55
Tableau 9 Energy amounts in the resulting biogas production from the anaerobic digestion of 1 kg of MU and MI leaves during 100 and 230 days. According to Shuku (2011), calorific power of methane is 37580 kJ/m ³	55
Tableau 10 TOC and TKN contents in the solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion in BMP test with 49.5 g MU/l and 54.4 g MI/l.....	58
Tableau 11 Water solubilities, molecular formulas, molecular weight and chemical structures of the different CPSMs tested.....	74
Tableau 12 Biogas and methane production yields after 230 days of BMP tests at 30°C of the different CPSM (Sap, or Tan, or Sal, or Alo) with and without GI addition and their inhibition degrees.....	82
Tableau 13 Glucose (Glu), succinate (Su), formate (Fo), acetate (Ac), propionate (Pro), ethanol (Eth) and butyrate (But) production during anaerobic digestion of the mixtures containing GI + CPSM at concentrations of 0.3 to 13.3 g/l after 7, 100 and 230 days	83
Tableau 14. Some essential components in the concentrations of MU and MI leaves alone and mixed	102
Tableau 15 Biogas and methane production yields after 230 days of BMP tests at 30°C with the mixtures of MU and MI leaves containing 25% MI, 50% MI and 75% MI control test (GI) with 1,7 g/l glucose.....	104
Tableau 16 Energy amount in the biogas produced from the anaerobic digestion of 1 kg of the mixtures of MU and MI leaves after 100 and 230 days	105
Tableau 17 TOC, TKN, P, K, and water-soluble total polyphenols contents and presence of saponins in the solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion in BMP test with the mixture of 50% MU and 50% MI	107
Tableau 18 Bilan carbone des essais de méthanisation des feuilles de MU et de MI	120
Tableau 19 Concentrations of essential components in different leaves mixtures concentrations.....	136
Table 20 Daily yields of biogas and methane, and energy amount of 1 kg of the mixture of 50% MU and 50% MI leaves with system without agitation according to the great period of production of 94 days.....	138
Table 21 Daily production yields of biogas and methane from 17 g/l of mixture containing MU and MI leaves (MU+MI) after 22 days in a bioreactor at 30°C.....	139
Tableau 22 TOC, TKN, P and K, water soluble total polyphenols and saponins in the residues produced after the anaerobic digestion of 26 g/l of mixture containing MU and MI leaves in a bioreactor.....	140

Liste des figures

Figure 1 Cartes de la VPK et de la RDC avec ses pays limitrophes (RDCongo, 2006).	18
Figure 2 Feuilles de MU (a) et de MI (b).	21
Figure 3 Cumulative production of biogas (ml \pm MD) during the anaerobic digestion of MU leaves alone (a), MI leaves alone (b) and MI leaves with glucose added after the 100th day to discover the reasons of the methanogenic inhibition observed (c) in BMP tests. Concentration of Gl sample was 1.7 g/l at the beginning and 3.3 g/l after the 100th day. The MD of the cumulative production of biogas for the MU leaves at concentration of 1.7g/l were generally of ± 4 ml before 100 days and ± 70 ml after the 100th day.....	53
Figure 4 Cumulative production of methane (ml \pm MD) during the anaerobic digestion of MU leaves alone (a), MI leaves alone (b) and MI leaves with glucose added after the 100th day to discover the reasons of the methanogenic inhibition observed (c) in BMP tests. Concentration of Gl sample was 1.7 g/l at the beginning and 3.3 g/l after the 100th day. The MD of the cumulative production of methane for the MU leaves at concentration of 1.7 g/l were generally of ± 0 ml before 100 days and ± 40 ml after the 100th day.	54
Figure 5 VFAs production during anaerobic digestion of leaves in different concentrations in dry matter; MU leaves: (a) 1.7 g/l, (b) 6.7 g/l, (c) 13.3 g/l, (d) 49.5 g/l and MI leaves: (e) 1.7 g/l, (f) 6.7 g/l, (g) 13.3 g/l, (h) 54.4 g/l and (i) glucose in BMP tests.	57
Figure 6 Maximum concentration of each metabolite produced by anaerobic digestion from different concentrations (1.7 to 54.4 g DW/l) of MU leaves (a) and MI leaves (b) in BMP tests.....	58
Figure 7 Molecular structures of sap (a), Tan (b), Sal (c) and Alo (d) and glycosyl groups surrounded	75
Figure 8 Cumulative biogas production (ml \pm MD) from the mixtures containing Gl + Sap (a), Gl + Tan (b), Gl + Sal (c), Gl + Alo (d) and Sap alone (e), Tan alone (f), Sal alone (g) where the meaning of O : 13.3 g CPSM/l, : 6.7 g CPSM/l, Δ : 3.3 g CPSM/l, *: 1.7 g CPSM/l, + : 0.3 g CPSM/l, : 3.3 g Gl/l and \diamond : Sludge. The volume of biogas produced from a CPSM was determined by subtracting from the whole volume of the mixture, the volume of biogas produced from Gl alone.....	80
Figure 9 Cumulative methane production (ml \pm MD) from the mixtures containing Gl + Sap (a) , Gl + Tan (b), Gl + Sal(c),Gl + Alo (d), Tan alone (e), Sal alone (f) where the meaning of O : 13.3 g CPSM/l, : 6.7 g CPSM/l, Δ : 3.3 g CPSM/l, *: 1.7 g CPSM/l, + : 0.3 g CPSM/l, : 3.3 g Gl/l and \diamond : Sludge. The volume of methane produced from a CPSM was determined by subtracting from the whole volume of the mixture, the volume of methane produced from Gl alone	81
Figure 10 Production of biogas (a) and methane (b) (ml \pm MD) during the anaerobic digestion of the mixtures of MU and MI leaves containing 25% MI, 50% MI and 75% MI in BMP tests	104
Figure 11 VFAs production during anaerobic digestion of the mixtures of MU and MI leaves containing 25% MI (b), 50% MI (c) and 75% MI(d)	106
Figure 12 Maximum concentration of each metabolite produced by anaerobic digestion from control sample and the mixtures of MU and leaves containing 25% MI, 50% MI and 75% MI	106
Figure 13 Valorisation des déchets organiques végétaux ménagers.....	124
Figure 14 Digesteur discontinu familial amovible	126
Figure 15 Biogas production during the anaerobic digestion of the mixture containing MU and MI leaves in the ratio of 1 in bioreactor test	137
Figure 16 Biogas (a) and methane production (b) from the digestates coming from of.....	138
Figure 17 VFAs production during anaerobic digestion from the mixtures containing MU and.....	139

Table des matières

Abstract	<i>i</i>
Résumé	<i>ii</i>
Dédicace	<i>iii</i>
Remerciements	<i>v</i>
Lexique	<i>1</i>
Liste des tableaux	<i>2</i>
Liste des figures	<i>3</i>
Table des matières	<i>4</i>
Chapitre I: Contexte général et objectifs	<i>8</i>
Chapitre II: Potentiel d'élimination des déchets végétaux (feuilles de <i>Mangifera indica</i> et de <i>Manihot utilissima</i>) par méthanisation dans la Ville Province de Kinshasa	<i>13</i>
Avant-propos	<i>13</i>
Résumé	<i>14</i>
1. Introduction	<i>15</i>
2. Déchets solides dans la VPK	<i>17</i>
2.1. Description de la VPK.....	<i>17</i>
2.2. Gestion des déchets solides ménagers et des marchés.....	<i>18</i>
3. Généralités sur la méthanisation des déchets végétaux	<i>22</i>
3.1. Définition et étapes de la méthanisation.....	<i>22</i>
3.2. Apport et maîtrise de la méthanisation à l'échelle industrielle.....	<i>24</i>
3.3. Potentialités de méthanisation des feuilles de MU et de MI.....	<i>27</i>
4. Mode de collecte adapté aux feuilles de MI et MU	<i>35</i>
5. Conclusion	<i>35</i>
6. Bibliographie	<i>37</i>
Chapter III: Comparative study of the methane production based on the chemical compositions of <i>Mangifera Indica</i> and <i>Manihot Utilissima</i> leaves	<i>43</i>
Avant propos	<i>43</i>
Abstract	<i>44</i>
1. Introduction	<i>45</i>
2. Materials and methods	<i>46</i>
2.1. Source and conservation of leaves.....	<i>46</i>
2.2. Physico-chemical analyses of leaves.....	<i>46</i>
2.3. Biogas and methane yields.....	<i>49</i>
2.4. Evolution of glucose, ethanol and VFAs.....	<i>50</i>

2.5. Analysis of liquid and solid digestats	50
3. Results.....	50
3.1. Leaves characteristics	50
3.2. Evolution of the anaerobic digestion of MI and MU leaves	53
3.3. Solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion	58
4. Discussion.....	59
4.1. Biogas yields	59
4.2. Methane yields	59
4.3. Evolutions of glucose, ethanol and volatile fatty acids (VFAs)	61
4.4. Digestates	63
5. Conclusion	64
6. References	65
<i>Chapter IV: Impact of different plant secondary metabolites addition: saponin, tannic acid, salicin and aloin on glucose anaerobic co-digestion.....</i>	70
Avant propos.....	70
Abstract	71
1. Introduction.....	72
2. Materials and methods	74
2.1. Characters of substrates.....	74
2.2. Identification of saponins, tannins and total polyphenols in Alo	75
2.3. Biogas and methane	76
2.4. Analysis of glucose, ethanol and volatile fatty acids (VFAs)	77
3. Results.....	78
3.1. Saponins, tannins and total polyphenols in Alo	78
3.2. Biogas production from mixtures containing GI and CPSM and CPSMs alone.....	78
3.3. Hydrogen and methane production from the mixtures containing GI and CPSM and CPSMs alone....	78
3.4. Biogas and methane yields produced from the mixtures containing GI and CPSM or CPSMs alone and evaluation of inhibitory effects of CPSMs	82
3.5. Analysis of the residual glucose, ethanol and VFAs in the mixtures containing GI and CPSM	83
4. Discussion.....	84
4.1. Biogas yields of the mixtures containing GI and CPSMs or CPSMs alone.....	84
4.2. Methane yields of the mixtures containing GI and CPSM and CPSMs alone	87
4.3. Evolution of glucose, ethanol and VFAs) in the mixtures containing GI and CPSM	89
5. Conclusion	92
6. References.....	93
<i>Chapter V: Anaerobic co-digestion for improvement of methane production from Mangifera indica and Manihot utilissima leaves</i>	97
<i>Prepared for submission to Biodegradation.....</i>	97
Avant propos.....	97
Abstract	98

1. Introduction.....	99
2. Material and methods.....	100
2.1. Source and conservation of leaves and physico-chemical analyses of leaves	100
2.2. Biogas and methane yields.....	100
2.3. Analysis of glucose, ethanol and VFAs	102
2.4. Analysis of liquid and solid digestion products	102
3. Results.....	102
3.1. Characteristics of leaves mixtures	102
3.2. Evolution of the anaerobic digestion of the mixtures of MI and MU leaves.....	103
3.3. Solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion	107
4. Discussion.....	107
4.1. Biogas yields	107
4.2. Methane yields	108
4.3. Glucose, ethanol and VFAs production	109
4.4. Digestates	110
5. Conclusion	111
6. References.....	112
<i>Chapitre VI: Discussion générale, conclusion et perspectives.....</i>	<i>118</i>
1. Discussion générale.....	118
1.1. Synthèse des résultats.....	118
1.2. Projection à l'échelle de la VPK.....	122
2. Conclusion et perspectives	127
3. Bibliographie	128
<i>Annexe: Anaerobic co-digestion of Mangifera indica and Manihot utilissima leaves in bioreactor for the methane production</i>	<i>131</i>
Avant propos.....	131
Abstract	132
1. Introduction.....	132
2. Materials and methods	133
2.1. Source, conservation and physico-chemical analyses of leaves.....	133
2.2. Biogas and methane yields.....	133
2.3. Glucose, ethanol and VFAs evolution.....	135
2.4. Analysis of digestates	135
2.5. Description and tightness of bioreactor	135
3. Results.....	135
3.1. Evolution of the anaerobic digestion of the mixtures containing MI and MU leaves	135
3.2. Digestates	140
4. Discussion.....	140
4.1. Biogas production.....	140
4.2. Methane production	141
4.3. VFAs and other metabolites production	142

4.4. Digestates	143
5. Conclusion	143
6. References.....	144
<i>Productions scientifiques</i>	<i>149</i>

Chapitre I: Contexte général et objectifs

L'exode rural croissant et les déplacements des populations des zones des conflits armés sévissant à l'Est de la République Démocratique du Congo (RDC) vers la Ville Province de Kinshasa (VPK), y compris la croissance démographique autochtone ont conduit à une augmentation rapide et inattendue de la population kinoise. Dès lors, le lotissement anarchique dans les espaces verts périurbains et les consommations des biens et de l'énergie ont accru. Par conséquent, on assiste à une augmentation de la production des déchets inadéquatement gérés. A ce phénomène s'ajoute la crise socioéconomique multiforme qui touche la RDC depuis plusieurs décennies dues aux pillages. Cette crise est caractérisée par une paralysie quasi-totale des services socio-économiques, occasionnant ainsi le chômage, la pauvreté, l'insalubrité et la dégradation sanitaire. Même le réseau de distribution de l'électricité n'est pas épargné; il est peu développé et est insuffisamment fiable. D'où la fourniture de l'énergie électrique est irrégulière ou inexistante surtout dans la périphérie de la VPK. Ces contraintes poussent la population kinoise à utiliser le bois comme source d'énergie avec une exploitation abusive de ses forêts périurbaines et celles de provinces environnantes. Cela aboutit à une déforestation qualifiée d'hécatombe écologique par Shuku (2011). Cette déforestation est aussi due à la pratique de l'agriculture itinérante sur brûlis puisque plus de 80% de la population de Kinshasa vit au moins en partie de l'agriculture basée sur le maraîchage pour lutter contre la pauvreté, le chômage et l'insécurité alimentaire selon Mulaji (2011). Ce maraîchage familial est pratiqué sur un sol acide et pauvre en matière organique (Mulaji, 2011). Ce sol est fertilisé soit avec les engrais verts, soit chimiques, soit les deux à la fois; lesquels sont appliqués sans maîtrise. Cela entraîne ainsi la pollution des couches souterraines aquifères. En outre, ces engrais chimiques sont importés et onéreux. En conséquence, ils grèvent le budget familial déjà modique.

Les multiples problèmes évoqués précédemment peuvent être résolus partiellement par la méthanisation ou la biométhanisation, de par sa multifonctionnalité. Bien que très mal connue en général en RDC et en particulier dans la VPK, la technologie de la méthanisation n'est pas nouvelle en RDC. A ce sujet, les essais pilote sont signalés depuis 1925 à Bukavu et jusqu'à ce jour, cette technologie se situe encore au stade expérimental sous forme de projets privés ou étatiques (Anonyme, 1998; Badila, 1995; Monzambe, 2002; UNEP Risø, 2013). C'est une technique de transformation par voie biologique des déchets organiques en substances utiles.

En effet, la VPK comme les autres centres urbains des pays en développement produit plus de 40% de déchets organiques, essentiellement végétaux (Pangu, 1999; Hiligsmann et al., 2006; Vögeli et al., 2014). Ces déchets constituent un important gisement « gratuit » méthanogène, autrement dit une matière première pour la méthanisation. Ils procurent par cette voie des fertilisants en plus de l'énergie renouvelable sous forme de biogaz. Le biogaz obtenu par cette voie est un des biocarburants de la deuxième génération. Il est plus avantageux que les biocarburants de la première et de la troisième génération (Moletta, 2011). A cet effet, la méthanisation permet de trouver des solutions peu dispendieuses en énergie, de résoudre des questions environnementales concernant l'élimination des déchets et celles des engrais au moyen des digestats (Moletta, 2011).

En effet, dans un pays comme la RDC où la crise économique est sévère, la production autonome d'énergie par la méthanisation des déchets organiques sur le site même de génération est susceptible:

- d'être réalisée à température ambiante suite au climat chaud de la VPK;
- de substituer l'utilisation du biogaz à la consommation du bois énergie et d'autres sources énergétiques et de faciliter le développement de la petite motorisation agricole (meunerie, pompage, réfrigération, irrigation etc.) (Monzambe, 2002);
- d'améliorer la fertilité des sols par l'apport de matières organiques résiduelles issues de la méthanisation;
- de contribuer à la réduction de la charge polluante de l'environnement et des substances olfactives (Van Velsen, 1977; Monzambe, 2002) sans produire de boues excédentaires comparativement aux traitements aérobies des eaux résiduaires (Mc Carty, 1964; Monzambe, 2002);
- de garantir l'économie en temps, en main d'œuvre et en transport jadis dépensée dans l'abattage, la préparation du bois énergie et du charbon de bois et leur acheminement à la VPK;
- de lutter contre le changement climatique et la déforestation.

Hormis les avantages de la multifonctionnalité, la méthanisation comporte certains inconvénients:

- la production de biogaz est délicate car elle nécessite une meilleure connaissance en la matière et une surveillance continue du digesteur;

- le mélange air-biogaz peut s'enflammer et exploser en présence d'une flamme nue ou d'une étincelle dans une enceinte insuffisamment ventilée.

La VPK produit essentiellement les déchets organiques végétaux dont les feuilles mortes prédominent (Pangu, 1999; Nzuzi, 2008). Les feuilles mortes les plus visibles sont celles de *Mangifera indica* (MI, manguier) et de *Manihot utilissima* (MU, manioc). Mais, il n'y a aucune publication scientifique consacrée à la biodégradation anaérobie de ces feuilles pour la production de méthane. Pourtant, Mulaji (2011) a rapporté que les apports des composts de biodéchets ménagers au sol sableux de la VPK, ont amélioré tous les paramètres biochimiques de la fertilité en fonction des doses appliquées. Alors, l'utilisation des digestats de la méthanisation pour la fertilisation des sols kinois serait plus efficace puisque la méthanisation produit d'excellents fertilisants en y immobilisant toute la matière importante pour le sol dans un vase clos et en plus de l'énergie sous forme du biogaz. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif général de cette thèse qui est d'étudier la biodégradation anaérobie des feuilles de MU et MI en vue de la production du méthane. Pour ce faire, les facteurs influençant la digestion anaérobie de ces feuilles ont été identifiés afin de mettre au point une technique simple et moins coûteuse de méthanisation rapide de ces feuilles. Ce faisant, cette thèse apporte une contribution concrète à la résolution des problèmes relatifs à l'approvisionnement en énergie, en engrais et à l'élimination des déchets organiques dans la VPK.

Pour atteindre les objectifs assignés, cette investigation a démarré par une revue bibliographique sur le potentiel d'élimination des déchets végétaux (feuilles de MI et de MU). Elle consistait à spéculer sur le potentiel énergétique et fertilisant des ces déchets à partir des données existantes dans la littérature. Après cette réflexion, une série d'expérimentations thématiques ont été réalisées sur:

- La détermination des compositions chimiques de feuilles de MU et de MI, et du potentiel de biométhanisation des feuilles de MI et de MU avec identification des facteurs limitants liés à leur méthanisation afin d'envisager une amélioration,
- Des essais de biométhanisation des substances bioactives commerciales similaires à celles contenues dans les feuilles en co-digestion avec le glucose afin de bien comprendre leur impact sur la biodégradation anaérobie,
- Des essais d'optimisation de la biométhanisation des feuilles de MI et de MU par co-digestion anaérobie,

- Un essai-pilote de biométhanisation des feuilles de MI et de MU par co-digestion anaérobie dans un bioréacteur agité de 30 l afin d'envisager une méthanisation à une échelle plus large (document en annexe).

Ces résultats font l'objet d'une discussion générale orientée de manière à prévoir une application de la biodégradation anaérobie des feuilles de MU et MI pour la production de méthane dans la VPK.

Enfin, une conclusion générale ainsi que des perspectives pour des recherches ultérieures sont exposées pour terminer la thèse.

Bibliographie

- Anonyme, (1998) Projet de schéma directeur de développement énergétique national. Atelier de consultation d'experts pour l'élaboration de la politique énergétique nationale. Ministère de l'Énergie, Kinshasa (RDC).
- Badila L (1995) L'exploitation de biogaz au Zaïre. Réunion d'experts nationaux en hydrologie et énergies nouvelles et renouvelables, organisée par le Conseil National de l'Énergie. Colloque du 03 au 04/07/1995. Kinshasa (RDC).
- Hiligsmann S, Lardinois M., Diabaté SI, Thonart P (2006) Guide pratique sur la gestion des déchets ménagers et des sites d'enfouissement technique dans les pays du sud. Québec. IEPF.
- Mc Carty PL (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals 1: Chemistry and Microbiology. Public Works: 95-107.
- Moletta R (2011) Méthanisation. Tec & Doc.
- Monzambe M (2002) La problématique de la biométhanisation en République démocratique du Congo, [ligne] URL : http://classiques.uqac.ca/collection_sciences_developpement/monzambe_mapunzu/biomethanisation/biomethanisation.pdf. Consulté 05/01/2015.
- Mulaji KC (2011) Utilisation des composts de biodéchets ménagers pour l'amélioration de la fertilité des sols acides de la Province de Kinshasa (Rép. Dém. du Congo). Thèse de Doctorat, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Gembloux, Belgique.
- Lelo N (2008) Kinshasa: Ville et environnement. Édition Harmattan, Paris.
- Pangu SZ, Shidi G, Kabuyaya MV (1999) Problématique de l'enlèvement des déchets solides à Kinshasa : les moyens mis en œuvre. Med Fac Landbouww Univ Gent 64(1): 273-289.

- Shuku NO (2011) Impact de l'utilisation de l'énergie-bois dans la ville province de Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC). Mémoire. Université du Québec, Montréal.
- UNEP RISØ (2013) Emissions Reduction Profile - Democratic Republic of Congo. [en ligne] URL: <http://www.acp-cd4cdm.org/publications/publication-archive/2013/06/emissions-reduction-profile---democratic-republic-of-congo.aspx>, Consulté le 10 février 2015.
- Van Velsen AFM. (1977) Anaerobic digestion of piggery waste 1. The influence of detention time and manure concentration. *Neth J Agric Sci*25: 151-169.
- Vögeli Y, Lohri CR, Gallardo A, Diener S, Zurbrügg C (2014) Anaerobic Digestion of Biowaste in Developing Countries: Practical information and case studies. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). Dübendorf, Switzerland.

Chapitre II: Potentiel d'élimination des déchets végétaux (feuilles de *Mangifera indica* et de *Manihot utilisima*) par méthanisation dans la Ville Province de Kinshasa

Article publié dans la revue *Vertigo* Vol 15 no1

Philippe Mambanzulua Ngoma^{ab}, Serge Hiligsmann^a, Eric Sumbu Zola^c, Marc Ongena^a, Philippe Thonart^a

a: Walloon Center of Industrial Biology (CWBI), Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030, Gembloux, Belgium

b: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 212, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

c: Faculty of Agricultural Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 117, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

Avant-propos

Les feuilles mortes représentent l'essentiel des déchets organiques polluant la VPK mais leur quantité n'est pas connue. Elles constituent une ressource valorisable pour produire de l'énergie et des fertilisants. Parmi elles, les feuilles de MU et MI sont les plus visibles mais leurs potentialités méthanogènes ne sont pas connues à l'heure actuelle. Ce chapitre consiste en une étude sur la possibilité d'éliminer ces feuilles par méthanisation.

Suite à l'absence des données précises concernant les feuilles de MU et de MI, l'étude préliminaire réalisée dans ce premier chapitre se base sur des données disponibles dans la littérature relatives à leurs compositions chimiques sommaires, au pouvoir méthanogène moyen des feuilles et à la quantité des déchets produits par la VPK. Le but est d'estimer les potentiels énergétiques et fertilisants respectivement des biogaz et des digestats qui seraient produits par la méthanisation de ces feuilles.

Après ces calculs, les potentiels énergétiques totaux de ces feuilles sont comparés à celui du bois énergie. De même à partir des données de la littérature, la surface que couvriraient les

digestats par épandage est évaluée et puis comparée à celle des forêts dévastées et à celle occupée par les champs.

Les résultats attendus sont que les potentiels énergétiques du biogaz résultant de ces feuilles pourraient réduire la consommation de bois énergie dans le ménage kinois ou la remplacer. Par ailleurs, les digestats pourraient couvrir une petite partie des surfaces champêtres de la VPK et des forêts détruites. Enfin, un système de gestion de ces déchets est aussi présenté.

Résumé

La République Démocratique du Congo produit annuellement environ 2,2 millions de tonnes de déchets dans sa capitale, la Ville Province de Kinshasa. Ces déchets sont constitués de 66% de matières organiques dans lesquelles, 94% sont des déchets végétaux et la majorité des feuilles mortes. Parmi ces feuilles, celles de *Mangifera indica* et *Manihot utilissima* sont les plus accessibles. Elles sont générées via les ménages et les marchés mais ne sont pas recyclées convenablement. Certains maraîchers les utilisent irrationnellement comme engrais et n'obtiennent pas les résultats attendus. Ces déchets gênent et polluent l'environnement. D'autre part, les ménages kinois éprouvent d'énormes difficultés pour s'approvisionner en énergie. La surexploitation du bois énergie entraîne la détérioration des écosystèmes et de la santé publique. Ces méfaits seraient réduits simultanément et durablement par l'exploitation rationnelle de la bioénergie et des biofertilisants résultant de la digestion anaérobie ou biométhanisation des déchets végétaux. En supposant que cette biomasse végétale est constituée uniquement des feuilles de *Mangifera Indica* et de *Manihot Utilissima*, le pouvoir énergétique du biogaz émanant de leur biométhanisation réduirait respectivement la consommation en bois énergie de 39% et 134%. Par ailleurs, la quantité de digestats produits couvrirait par épandage une superficie proche de celle de la déforestation. Ces estimations montrent un potentiel de valorisation de ces déchets végétaux intéressant pour l'assainissement, les besoins énergétiques, l'afforestation et l'agriculture. De ce fait, ils seraient gérés directement dans leurs lieux de génération pour minimiser les coûts de transport et de traitement industriel.

Mots clés. Elimination, déchets végétaux, *Mangifera indica*, *Manihot utilissima*, méthanisation, fertilisants

1. Introduction

La gestion des déchets dans les pays africains n'est pas organisée de manière intégrée et durable (Amegnran, 2009). La République Démocratique du Congo (RDC), située au cœur de l'Afrique est aussi concernée. Sa capitale, la Ville Province de Kinshasa (VPK), la plus peuplée de ses provinces, ne parvient pas à gérer convenablement ses déchets. Ces déchets ne sont pas traités et valorisés rationnellement. Ils sont déversés dans les abords des rues, dans les caniveaux et dans les cours d'eau par des riverains. Le pouvoir public par sa voirie locale essaie de venir à bout de ces déchets mais sans grand résultat car ne disposant pas d'équipements suffisants. Il ne couvre qu'une petite partie de la ville et aussi d'une manière irrationnelle. Cette insuffisance se traduit par des nuisances et par un état d'insalubrité dont les conséquences sont les inondations destructrices, l'apparition de diverses maladies mortelles sévissant parmi la population et la prolifération des vecteurs de maladies (OMS, 1994; Bagalwa, 2013). Ces déchets sont plus d'origine végétale (Pangu et al., 1999). Les maraîchers essayent de valoriser ces déchets végétaux comme engrais verts par l'enfouissement. Mais, les résultats ne sont pas meilleurs suite au temps de décomposition. En outre, la technique d'enfouissement de déchets telle qu'appliquée est moins contrôlable et rend le sol acide. C'est ainsi que les maraîchers recourent encore aux engrais chimiques qui sont chers et exigent une certaine maîtrise dans l'utilisation. En même temps que la VPK connaît le problème d'élimination des déchets, elle est confrontée aussi aux difficultés d'approvisionnement en engrais et en énergie électrique avec les interruptions et les délestages intempestifs attribuables à la vétusté des lignes électriques et de la défaillance de la Société Nationale d'Electricité (SNEL) (Shuku, 2011). Par conséquent, l'accès à l'énergie électrique est très limité, voire inexistant.

On estime à 12 à 15%, la population kinoise qui a accès à l'énergie de la SNEL (Kitenge, 1988; Lelo, 2008). La croissance démographique accélérée par les déplacements de populations liés aux conflits congolais, l'expansion urbaine anarchique hors des circuits de distribution énergétique, ainsi que la pauvreté généralisée ont accéléré la quête de biomasse-énergie sous forme de bois de chauffe ou de charbon de bois, entraînant à son tour une pression accrue sur les écosystèmes forestiers en périphérie de Kinshasa. En effet, d'après Lelo (2008) et Schure et al. (2011), 85 à 90% de la population urbaine de la RDC recourent au bois de chauffage. Shuku (2011) renchérit que presque tous les kinois utilisent du bois issu de la déforestation pour satisfaire leurs besoins énergétiques. Ces bois proviennent

essentiellement des provinces voisines du Bas-Congo et Bandundu. En 2007, l'Hôtel de Ville de Kinshasa a précisé qu'il y avait disparition de la couverture végétale sur un rayon de 180 km autour de la Ville de Kinshasa (Shuku, 2011).

Les enjeux suscités exigent des solutions qui devront répondre au développement durable pour ne pas compromettre l'avenir des générations futures. Une des solutions serait l'élimination des déchets végétaux par digestion anaérobie ou biométhanisation pour produire à la fois de l'énergie verte et des biofertilisants. C'est ainsi que ce travail envisage d'évaluer le potentiel énergétique et fertilisant, respectivement pour le biogaz et les digestats qui seraient issus de la méthanisation optimale des feuilles mortes de *Manihot utilissima* (MU) ou feuilles de manioc et de *Mangifera indica* (MI) ou feuilles de manguier. Ces feuilles sont les plus disponibles dans la VPK. Les premières proviennent surtout des habitations et les secondes des marchés (Tollens, 2004). Une enquête effectuée dans la commune de Limete (Makumbelo et al., 2002) a révélé que *Mangifera indica* est l'arbre fruitier le plus planté soit 184 arbres par km² et que *Manihot glaziovii* (feuilles de faux manioc) est le deuxième légume le plus cultivé dans les parcelles kinoises soit 68 jardins par km² (Makumbelo et al., 2002). Les feuilles de *Manihot glaziovii* et de MU sont produites conjointement à Kinshasa. Cependant, les secondes sont les plus communément retrouvées, à la fois à Kinshasa (Tollens, 2003) et dans tout le Congo. On les retrouve aussi dans de nombreux pays d'Afrique, d'Amérique du Sud, etc. En 1998, la RDC était le deuxième pays producteur africain de MU après le Nigeria (Rannou, 2000). La méthanisation de ces matières organiques à température ambiante peut être envisagée au niveau familial ou municipal et devrait apporter une solution simultanée aux problèmes d'assainissement, d'énergie, d'engrais ou de fertilité des sols. Le biogaz peut être utilisé comme carburant ou combustible par les familles ou la municipalité. Les digestats ont des potentialités intéressantes pour la fertilisation des jardins familiaux, le reboisement et la restauration des terrains dégradés. D'autres retombées positives peuvent également être liées à la création d'emplois, la réduction de la pauvreté et de la déforestation, la restauration des forêts et la sécurité alimentaire. Ce mode de valorisation des déchets végétaux contribue par conséquent à la fois à la protection de l'environnement et au développement durable. Cette étude commence par une présentation de la VPK avant de se consacrer à la gestion des déchets végétaux. Elle décrit ensuite les potentialités de production de méthane et d'engrais biologiques à partir des feuilles de MU et de MI par comparaison aux besoins kinoises. Enfin, elle s'achève par une conclusion incluant les recommandations.

2. Déchets solides dans la VPK

2.1. Description de la VPK

La VPK s'étend sur une surface de 9 965 km². Elle est située à l'Ouest de la RDC en Afrique Centrale (Figure 1), entre 4°18' et 4°25' de latitude Sud et entre 15°15' et 15°22' de longitude Est. Elle est limitée au Nord-Est par la province de Bandundu, au Sud par celle de Bas-Congo, au Nord-Ouest et à l'Ouest par la République du Congo Brazzaville, via une frontière naturelle formée par une partie du Fleuve Congo (Mulaji, 2011). La périphérie de Kinshasa comprend tous les alentours de la partie urbanisée de la ville où se déroulent une intense activité agricole et des activités d'exploitation du bois énergie. En effet, la ville de Kinshasa, avec environ 7,5 millions d'habitants selon le recensement administratif de 2005, pourrait avoir atteint plus de 10 millions d'habitants en 2015 (Lelo, 2008; Kassay, 2010). Dans son ensemble, le climat de la VPK est du type Aw4 suivant la classification de Koppen : climat tropical humide soudanien avec deux saisons, une saison sèche qui s'étend de la mi-mai à la mi-septembre et une saison humide qui débute à la mi-septembre pour s'achever à la mi-mai (Compère, 1970; Mulaji, 2011). La saison des pluies voit une diminution des précipitations en janvier-février (la petite saison sèche). Les précipitations annuelles moyennes sont de 1 400 mm, et la température moyenne annuelle est de 25°C (Mulaji, 2011). Les variations annuelles de température dans la région de Kinshasa sont d'environ 13 degrés Celsius. Au niveau géologique, les sols de la VPK présentent une texture sableuse, grumeleuse très fine, une coloration ocre-jaune, une consistance meuble à l'état sec, et une teneur en argile généralement inférieure à 20%. La teneur en matière organique et le degré de saturation du complexe adsorbant y sont faibles (Sys et al., 1961; Mulaji, 2011). Deux types de végétation naturelle prédominent sur les sols: les galeries forestières et les savanes (Baert et al., 1991).



Figure 1 Cartes de la VPK et de la RDC avec ses pays limitrophes (RDCongo, 2006).

2.2. Gestion des déchets solides ménagers et des marchés

2.2.1. Etat des lieux et production

La VPK déborde d'activités de différentes sortes et de diverses origines liées aux ménages, au commerce (marchés), à l'agriculture, à l'urbanisation, ainsi qu'à l'industrialisation. Ces activités génèrent des déchets solides. Ce sont les marchés qui produisent beaucoup de déchets solides (Lelo, 2008). De tous ces déchets, les plus accessibles sont ceux des ménages et des marchés. Ils sont parfois jetés en pêle-mêle. L'analyse faite par Hiligsmann et al. (2006) a montré qu'une prise de conscience se dégage actuellement sur la nécessité d'un assainissement urbain efficace et permanent dans les pays en développement. Cependant, dans la VPK, l'autorité urbaine éprouve d'énormes difficultés pour les évacuer et seulement le centre-ville et les communes environnantes sont assainis, mais irrationnellement. L'insalubrité qui en résulte détériore l'hygiène environnementale avec augmentation des maladies telles que le paludisme, la poliomyélite, la typhoïde, la méningite, la dysenterie amibienne, la vermineuse, la filariose et les maladies respiratoires. Il y a aussi prolifération des vecteurs de maladies de l'insalubrité comme les rats, les cancrelats, les moustiques, les larves, les puces, etc. (Lelo, 1999; Mafwila, 1999). Entre-temps, les populations de la périphérie se débrouillent

pour éliminer leurs déchets urbains. Dans beaucoup de cas, leurs modes d'évacuation des déchets ne sont pas hygiéniques.

De ce fait, la ville de Kinshasa connaît tous les problèmes qu'on retrouve dans des grandes villes du Tiers-Monde, en particulier la défaillance du système de gestion de l'environnement urbain, qui se traduit entre autres, par une diversité de pollutions urbaines. Singulièrement, ces pollutions sont très marquées dans les quartiers et communes populaires à forte densité de concentration humaine et dans des foyers économiques du type des marchés (Kassay, 2010). Selon les informations obtenues auprès du Programme National de l'Assainissement (PNA) en 2009, la production annuelle des déchets dans la VPK est de 0,6 kg de déchets/habitant/jour soit 217 kg/habitant/an. Cette donnée est dans la marge de la production annuelle moyenne de déchets par un habitant dans des villes des pays en développement. Elle se situe entre 180 et 240 kg/habitant/jour (Hiligsman et al., 2006). La production des déchets ménagers par exemple, a été évaluée par type de quartier par habitant par jour à 0,7 kg, 0,5 kg et 0,3 kg, respectivement pour les quartiers résidentiels, anciens populaires et quartiers nouveaux populaires (Nzuzi, 2008).

Le PNA qui s'occupait de l'assainissement de l'ensemble de la république n'a plus d'équipements. Actuellement, il n'existe que de nom. Il est remplacé par la Régie d'Assainissement et des Travaux Publiques de Kinshasa (RATPK) dans la ville de Kinshasa. La RATPK a été créée en 2008. Elle a pour objectif: l'assainissement de la ville de Kinshasa. Elle n'est plus active que dans la commune de Gombe et ses environs. Ses activités consistent principalement aux balayages, à la collecte et au transport des déchets du marché central de Kinshasa, de l'Hôpital Général de Kinshasa et des autres marchés environnants vers le centre d'enfouissement technique. La RATPK ne couvre que 14 communes sur 24 et elle est secondée par les Organisations Non Gouvernementales (ONG).

2.2.2. Composition des déchets solides des ménages et des marchés dans la VPK

Les déchets solides des ménages et des marchés sont composés en général de détritiques organiques, de végétaux et de matières putrescibles (66%) (Lelo, 2008). Les poubelles parcellaires de Kinshasa sont en gros constituées de plus de 60% des résidus organiques végétaux (Lelo, 2008). Les déchets ménagers contiennent toujours une portion importante des déchets agricoles en termes de feuilles, de tiges et de racines non consommées des légumes et

d'autres résidus végétaux (Mafwila, 1999). Les déchets solides de la VPK ont été comparés à d'autres déchets urbains (Tableau 1) (Mulaji, 2011; Biey, 2001; Lelo, 2008; Hiligsmann et al., 2006). Comparativement à des pays du Nord, les déchets produits dans la VPK et d'autres villes ou pays africains sont pour plus de 55% des déchets organiques. Selon Hiligsmann et al. (2006), la teneur moyenne en matières organiques dans les déchets solides des pays en développement varie entre 40-45%.

La composition de déchets ménagers du Tableau 1 est similaire à celle donnée par la RATPK en 2013. Selon PNA 2005, les poids volumique des ordures ménagères humides et sèches sont d'environ 500 kg/m³ et 350 kg/m³, respectivement (Lelo, 2008). Les déchets organiques kinois sont majoritairement (94%) constitués de déchets végétaux (Pangu et al., 1999) dont les plus disponibles sont les feuilles de MI et de MU (Figure 2). Les feuilles mortes de MI proviennent des jardins d'habitations, des jardins locaux ou des champs périphériques de la ville appartenant à des familles. Les feuilles de MU sont surtout générées en grande quantité par les marchés. Il se pose dès lors, le problème de gestion d'ordures dans la VPK: comment les trier, les traiter et les éliminer pour qu'elles ne polluent pas la nature.

2.2.3. Élimination des déchets végétaux

La gestion des déchets solides à Kinshasa ne suit pas formellement la logique TRIVAC, c'est-à-dire Trier, Recycler, Incinérer, Valoriser et Communiquer, comme cela se fait dans les pays du Nord (Lelo, 2008). Le cycle de gestion des déchets solides municipaux à Kinshasa se présente de la manière suivante: le Kinois vide rapidement sa poubelle parcellaire dans une décharge non contrôlée à cause de la putréfaction rapide de ses déchets biodégradables. C'est par manque d'un système organisé de gestion des déchets qu'il ne choisit pas où évacuer les ordures. Si ces déchets sont récupérés par les chiffonniers, ils suivent la filière normale jusqu'au centre d'enfouissement technique. Il n'y a qu'un seul centre d'enfouissement situé à la périphérie Est de la ville. Les pouvoirs publics ne parviennent pas jusqu'à présent à organiser un système planifié de ramassage des ordures. Cette collecte s'effectue généralement soit par les services privés, soit par les entreprises publiques, soit encore par les associations sans but lucratif. Toutes les enquêtes indiquent que les déchets solides sont évacués par incinération ou brûlage, par enfouissement, par jet sur la voie publique, dans les cours d'eau, dans les décharges non contrôlées (Lelo, 2008). Les déchets végétaux sont parfois séparés des non biodégradables et transformés en compost informellement. Ils sont

aussi utilisés directement par épandage ou par enfouissement comme engrais vert après quelques temps de décomposition dans des parcelles d'habitations.

Tableau 1 Compositions moyennes des ordures ménagères dans différents pays et villes (Mulaji, 2011; Biey, 2001; Lelo, 2008; Hiligsmann et al., 2006)

Principaux composants des déchets ménagers (% pondéral)						
	Fermentescibles	Papiers-cartons	Verres	Plastiques	Métaux	Autres
Wallonie (Belgique)	41	12	3	13	1,7	29
France	29	25	13	11	4	18
Allemagne	32	22	8	5	10	23
Grèce	50	20	5	10	5	15
USA	28	34	7	9	8	14
Ghana (Accra)	85	5	2	3	3	2
Nigeria (Ibadan)	56	13	2	6	-	-
Villes des pays en développement	40-45	5-10	1-3	2-11	2-4	16-44
VPK	66	6,4	1,4	13	3	10



Figure 2 Feuilles de MU (a) et de MI (b).

Élimination des feuilles mortes de MU et MI dans la VPK

Aucune étude n'a été réalisée sur la composition des déchets végétaux à Kinshasa. D'après PNA en 2009, les déchets végétaux de la VPK sont constitués en majorité des feuilles mortes. Les feuilles les plus visibles sont celles de MU et MI. Bien que les feuilles de MU soient riches en protéines, elles sont peu consommées par l'homme à travers le monde (Dahouda et al., 2009). Cependant à Kinshasa, MU est le premier légume le plus consommé (Tollens, 2003) et le deuxième le plus planté dans les parcelles kinoises (Makumbelo et al., 2002). Dans les communes périphériques non gérées par la RATPK, les feuilles de MU non consommées sont soit abandonnées dans les décharges incontrôlées des marchés ou des quartiers, soit jetées mélangées à d'autres déchets solides comme par exemple les feuilles de MI dans des ravins, dans des caniveaux et dans des cours d'eau. Les amoncellements de ces ordures causent des inondations lors des pluies diluviennes. MI est le plus cultivé des arbres fruitiers à cause de son fruit (la mangue) le plus apprécié par les Kinois mais ses feuilles mortes sont souvent abandonnées. Les feuilles de MI se décomposent difficilement à l'air libre. C'est ainsi qu'elles sont souvent incinérées après séchage à l'air libre dans les parcelles d'habitations. Par contre, les feuilles de MU se décomposent facilement et sont parfois transformées en compost. Les deux types de feuilles sont souvent enfouis dans le sol comme engrais vert.

Une autre forme de récupération des déchets végétaux consiste à les utiliser pour nourrir les animaux. Dans les milieux périurbains, les feuilles de MU sont utilisées pour alimenter des bétails, surtout les chèvres. Selon Lebas (2014), les feuilles de MI et de MU seraient aussi des fourrages potentiels pour le lapin dans les régions tropicales. En outre, les feuilles de MU seraient un aliment potentiel pour la pintade dans les pays à faible revenu (Dahouda et al., 2009).

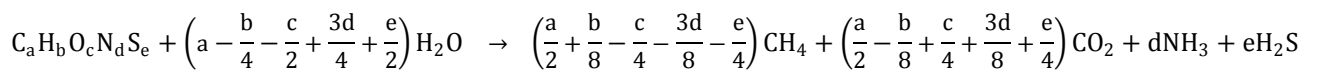
3. Généralités sur la méthanisation des déchets végétaux

3.1. Définition et étapes de la méthanisation

La méthanisation ou digestion anaérobie stricte a été mise en évidence par Volta en 1776 (Buffiere et al., 2007). C'est un procédé biologique de dégradation de la matière organique par une flore microbologique complexe se déroulant en milieu aqueux dissous ou solide et en absence d'oxygène. Il se réalise naturellement sous l'eau (dans les marais et lacs) et dans le

gros intestin de l'homme et des animaux... et artificiellement dans les digesteurs ou réacteurs clos (John, 1977; Moletta, 2008_a). Au cours de la méthanisation, il y a production d'un gaz appelé biogaz constitué d'au moins 50% de méthane, de 20% dioxyde de carbone ou plus et parfois des traces de sulfure d'hydrogène, d'ammoniac, d'hydrogène et de vapeur d'eau, etc. Après méthanisation, il en résulte un résidu appelé digestat et selon l'endroit où elle s'est déroulée, on distingue parmi les résidus solides: la tourbe sous l'eau, les excréments dans le système digestif de l'homme ou des animaux et les boues digérées dans les digesteurs clos (Moletta, 2008_b).

La méthanisation peut être représentée par l'équation générale suivante :



Elle est souvent scindée en quatre étapes biochimiques différentes et successives:

- l'hydrolyse est l'étape la plus lente durant laquelle la matière organique ou substrat est progressivement désintégrée en présence d'eau en glucides, protéines et lipides et ces macromolécules organiques se transforment en monomères respectifs (monosaccharides, acides aminés et acides gras à longues chaînes) sous l'action des enzymes par des bactéries hydrolytiques (Espisito et al., 2008; Espisito et al., 2012; Vögeli et al., 2014).
- l'acidogénèse est la transformation des monosaccharides et des acides aminés en acides gras volatils (AGV, acides gras contenant au plus 6 carbones tels que les acides acétique, propionique, butyrique, valérique, etc...), alcools, dioxyde de carbone et hydrogène par des bactéries acidifiantes (et parfois même des champignons) qui sont anaérobies strictes ou facultatives (Moletta, 2002). La dégradation des acides aminés conduit aussi à la production de l'ammoniac et du sulfure d'hydrogène lesquels pourraient aussi provenir respectivement de la réduction de l'urée et du sulfate contenu dans l'eau. Cette étape se réalise rapidement, parfois en quelques heures (Moletta, 2002; Vögeli et al., 2014).
- L'acétogénèse est la transformation des acides gras à longues chaînes, des acides gras volatils et des alcools en acide acétique, dioxyde de carbone et hydrogène grâce notamment à trois groupes de bactéries: les acétogènes productrices obligées d'hydrogène (qui sont des bactéries syntrophiques ayant pour caractéristiques d'effectuer des réactions dont les variations d'enthalpie libre standard sont positives), les bactéries homo-acétogènes, et des sulfato-réductrices qui peuvent posséder une des

fonctions précédentes (Moletta, 2002). Il y a des homo-acétogènes produisant l'acétate à partir d'un substrat carboné et celles le produisant à partir de la réduction du dioxyde de carbone par l'hydrogène. La production d'hydrogène ne se poursuit que si les bactéries qui le consomment sont présentes (les bactéries homoacétogènes, méthanogènes hydrogénéophiles, sulfato-réductrices...) sinon, il y a inhibition (Moletta, 2002; Vögeli et al., 2014). Soulignons encore que les vitesses réactionnelles de l'acétogénèse sont lentes (Moletta, 2002; Vögeli et al., 2014).

- La méthanogénèse est la transformation biochimique qui mène à la production de méthane à partir de l'acide acétique ou acétates, ou du mélange hydrogène - gaz carbonique. La méthanogénèse est réalisée grâce aux archéobactéries méthanisantes ou méthanogènes dites acétoclastes ou hydrogénéotrophes, respectivement (Moletta, 2010). Les premières transforment l'acide acétique en méthane et en gaz carbonique et ont des croissances lentes de 0,5 à plusieurs jours. Généralement, environ 70% du méthane est produit par cette voie (Moletta, 2002). Par contre, les secondes qui transforment l'hydrogène et le gaz carbonique en méthane et en eau, aussi appelées hydrogénéophiles ont des temps de dédoublement de l'ordre de quelques heures (Moletta, 2002). Les archéobactéries méthanogènes sont des microorganismes anaérobies strictes très sensibles au changement du milieu et souvent considérées comme des extrémophiles en raison de leur grande différence physiologique par rapport aux bactéries de l'environnement (Moletta, 2010).

3.2. Apport et maîtrise de la méthanisation à l'échelle industrielle

La méthanisation est appliquée aux traitements des déchets organiques afin de les éliminer en produisant de l'énergie sous forme du biogaz ou des fertilisants ou pour atteindre simultanément tous les objectifs précités. Ainsi, les déchets végétaux peuvent être traités par cette voie. A cet effet, l'énergie et le fertilisant ainsi produits sont dits «verts» (Moletta, 2008_b). La digestion anaérobie, malgré sa cinétique lente, donne de bons résultats dans les digesteurs anaérobies au sens strict du terme (Vasel, 1992; Vasel, 2007; Moletta, 2008_a). Pour qu'une méthanisation s'effectue dans les bonnes conditions, il faut sélectionner les déchets, respecter et contrôler un certain nombre de paramètres physico-biochimiques, notamment la nature du substrat, les nutriments, la surface de contact, le pH, le pouvoir tampon,

l'anaérobiose, l'humidité, la pression, l'agitation, l'ensemencement, l'immersion du contenu du digesteur, les substances toxiques... Certains de ces paramètres sont décrits ci- après:

- La nature du substrat et nutriments : théoriquement, toute matière organique peut se décomposer en méthane et dioxyde de carbone, mais en pratique la lignine et autres métabolites secondaires végétaux (les saponines et les tannins) surtout s'ils contiennent des cycles aromatiques, etc. sont toxiques aux méthanogènes et ne se décomposent pas en digestion anaérobie (Chen et al., 2008; Mata-Alvarez, 2003; Vögeli et al., 2014). Toutefois, les saponines à faibles doses peuvent stimuler la méthanisation (Patra et al., 2012). En plus des substrats organiques qui serviront de sources d'énergie pour la croissance, les micro-organismes ont besoin de macroéléments comme l'azote, le phosphore, le soufre... et d'oligoéléments (micronutriments) comme des vitamines, l'iode ou des métaux nécessaires aux fonctionnements des coenzymes (Fe, Co, Mn, Cu, Zn, Al, Mo, B, Ni, W, Se...) à des teneurs généralement inférieures au milligramme par litre (Moletta, 2008_a). En général, on considère que pour une bonne mise en œuvre de la digestion anaérobie, la DCO et les teneurs en azote et phosphore doivent être dans un rapport d'environ 600/7/1 (Mata-Alvarez, 2003; Moletta, 2008_a). On parle aussi très fréquemment du rapport entre le contenu en carbone et en azote (C/N) dont la marge pour une biométhanisation optimale diverge: 16 à 25 selon Deublein and Steinhauser (2011) cité par Vögeli et al. (2014) ou 20 à 30 selon Mital (1996) cité par Kamdem et al.(2013). L'activité méthanogène reste cependant tout à fait acceptable lorsque ce rapport est situé entre 15 et 35 (Frédéric et Lugardon, 2007).
- La surface de contact: pour une méthanisation optimale, la surface de contact entre les microorganismes et le substrat doit être la plus élevée possible. Cependant, pour des raisons technico-économiques le broyage du substrat à l'échelle industrielle se limite généralement à un diamètre maximal des particules de l'ordre de 5 cm (Vögeli et al., 2014).
- Le pH et le pouvoir tampon: le pH opérationnel pour la microflore méthanogène doit se situer entre 6,7 et 7,6 (Kroeker et al., 1979; Chen et al., 2008). Le milieu est stabilisé proche de la neutralité par un mélange tampon souvent une solution de phosphate et de carbonate. A défaut et quand il y a beaucoup plus de bactéries acidifiantes que méthanisantes, il y a accumulation d'acides gras volatils entraînant une baisse de pH et menant à un blocage de la production du gaz au pH inférieur à 6,7.

Pour éviter ce problème, on ajoute une base diluée (la soude ou la potasse ou le carbonate de sodium) au milieu pour ajuster le pH proche de la neutralité. En milieu basique, la production parasite de l'ammoniac est favorisée au pH supérieur à 7,6. Si la production d'acides gras volatils ne parvient pas à maintenir le pH aux environs de 7, dans ce cas, le milieu sera acidifié par exemple par l'acide phosphorique (Moletta, 2008_a).

- L'alcalinité et les AGV: L'alcalinité mesure le pouvoir tampon du milieu et donc sa capacité de maintenir le pH stable. Le carbonate joue non seulement le rôle de pouvoir tampon mais contribue aux équilibres des diverses formes du gaz carbonique dissous (Moletta, 2008_a). L'alcalinité d'un milieu dépend de la concentration en AGV, en bicarbonates et parfois en ammonium (Moletta 2008_b). Un substrat riche en azote organique produira dans le milieu de l'azote ammoniacal contribuant à la génération de l'alcalinité et permettant la stabilité du milieu (Moletta, 2008_a, Moletta 2008_b). Dans tous les cas, la plus grande part de l'alcalinité est assurée par le bicarbonate. Cette alcalinité doit être relativement élevée de l'ordre de 1000 à 4000 mg CaCO₃/l pour une bonne méthanisation (Moletta, 2008_a; Moletta, 2008_b, Korres et al., 2013). Les alcalinités sont partielles (pH final: 5,8) et totale (pH final: 4,3) et sont mesurées par titrimétrie au moyen de l'acide chlorhydrique.
- Les AGV sont détectables qualitativement et quantitativement, soit hors-ligne par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou liquide de haute performance (HPLC), soit par des capteurs en ligne permettant une mesure indirecte par titrimétrie ou par spectrométrie infrarouge (Moletta, 2008_b). L'accumulation des AGV dans le milieu, traduit l'inhibition de la méthanisation (Moletta, 2008_b).
- L'humidité: Pour un bon développement des bactéries, l'humidité du milieu doit être au moins de 50%. Cette humidité est acquise grâce à l'ajout de l'eau.
- La température: l'activité enzymatique dépend de la température. Les bactéries psychrophiles croissent entre 0 C et 20 C avec un optimum entre 12 C et 15 C; les bactéries mésophiles croissent entre 20 C et 40 C avec un optimum entre 32 C et 37 C et les bactéries thermophiles croissent entre 40 C et 65 C avec un optimum entre 50 C et 55 C.

La stabilité de la température est très importante. Le changement de plus de 2 C/jour peut être fatal pour la stabilité de l'activité méthanogène.

- L'anaérobiose et le potentiel d'oxydoréduction: les bactéries méthanogènes sont strictement anaérobies (archéobactéries). Elles sont peu nombreuses, car leur développement est lent et extrêmement sensible à la présence de l'oxygène. Par contre, les bactéries acidifiantes sont anaérobies strictes ou facultatives. Ces bactéries présentes dans l'inoculum permettent de créer l'anaérobiose en utilisant l'oxygène pour leur métabolisme respiratoire dans un digesteur hermétiquement fermé dans les premiers jours de la méthanisation (période latente) (Mambanzulua et al., 1999). Cette anaérobiose est quantifiable grâce à la mesure du potentiel d'oxydoréduction qui doit se situer à des valeurs négatives très basses inférieures à -250 mV et peut baisser jusqu'à -600 mV dans certaines conditions (Moletta, 2002, Moletta, 2008_a, Moletta, 2010); puisque la formation de méthane à partir des matières organiques est une réaction de réduction. Le carbone est alors à son étage d'oxydation le plus bas (-4) dans le méthane.
- La pression: l'augmentation de la pression dans le digesteur défavorise la méthanisation. Une légère surpression dans le digesteur est très importante pour que l'air n'y pénètre pas.
- L'agitation: l'agitation du contenu du digesteur assure une solubilisation rapide du substrat, un transfert rapide de l'oxygène dans le liquide, un bon contact entre les bactéries et le substrat et une homogénéité de la température. Elle empêche, en outre, la formation de la croûte en surface et facilite la libération de gaz.
- L'ensemencement: le démarrage de la méthanisation se fait presque toujours par ajout des bactéries méthanisantes contenues dans les lisiers, fumiers, boues de lacs ou de marais... (Mambanzulua et al., 1999).

3.3. Potentialités de méthanisation des feuilles de MU et de MI

Les feuilles mortes constituent une partie importante de biodéchets solides de Kinshasa. Les plus visibles et les plus accessibles sont les feuilles de MU et MI. En dépit des inhibiteurs potentiels qu'elles contiennent, elles peuvent être éliminées par méthanisation pour la production d'énergie verte et d'un engrais biologique. Les déchets végétaux contiennent typiquement une teneur en composés lignocellulosiques élevée, ayant souvent un rapport C/N défavorable ou une teneur élevée en lignine. Par conséquent, la production du biogaz est généralement faible durant la méthanisation de végétaux seuls ou on assiste progressivement à

un ralentissement de la méthanisation (Chen et al., 2008; Hernandez et al., 2008). Une des premières étapes importantes est donc de connaître le rapport C/N du substrat végétal à méthaniser. Les données du Tableau 2 montrent que les feuilles de MI seraient riches en carbone et celles de MU riches en azote. Ainsi, les premières auraient un rapport C/N plus élevé que les secondes. En outre, pour permettre leur croissance et leur métabolisme les bactéries comme tous les autres microorganismes requièrent des éléments nutritifs essentiels. Heureusement, la plupart de ces éléments (Na, K, Ca, Cu, Fe, Co...) se trouvent en quantité suffisante dans la plupart des végétaux pour permettre une activité biologique normale (Moletta, 2008_a). Le Tableau 2 montre que les teneurs en cendres (ensemble d'éléments minéraux) des feuilles de MI et MU seraient dans le même ordre.

Pour mener à bien la méthanisation de végétaux particuliers il est également crucial de bien prendre conscience que les microorganismes ne peuvent que se développer dans une gamme de conditions physico-chimiques bien définies. Ils sont perturbés voire détruits si un produit est en trop forte quantité ou manque, ou s'ils sont en présence d'une molécule toxique qui agit à de très faibles concentrations. Cette toxicité ou inhibition se traduit le plus souvent par les caractéristiques classiques de déstabilisation des digesteurs par l'accumulation d'hydrogène et des acides gras volatils. Cette accumulation entraîne une chute du pH (Moletta, 2002). En effet, lorsque tous les paramètres relatifs aux conditions optimales, sont fixés, la lenteur et ou l'inhibition lors de la méthanisation des déchets végétaux peut être attribuée à certaines substances gênantes initialement présentes dans les déchets végétaux ou issues du métabolisme de certaines microflore. Ces substances peuvent être organiques ou minérales. Des substances organiques telles que la graisse, la lignine, la résine ou autres substances organiques présentes dans les végétaux ayant des propriétés antimicrobiennes peuvent également être responsables de la lenteur de la méthanisation (Vasel, 1992; Vasel, 2007; Chen et al., 2008; Kamdem et al., 2013). Les effets retard ou effets inhibiteurs peuvent être liés à la fois aux teneurs et à la synergie des substances bioactives (Chen et al., 2008; Gerardi, 2003).

Des études anciennes ont montré que les feuilles de MI ont une activité antimicrobienne et contiennent des saponines, des tannins et la lignine (el-Sissi et al., 1970; el-Sissi et al., 1971; Zhu et al., 1993; Patel et al., 1988; Kamra et al., 2008; Barreto et al., 2008; Masibo et al., 2009; Nyamangara et al., 2009). Par leur composition, les feuilles de MI sont des inhibiteurs potentiels de la méthanisation. Les concentrations des feuilles de MI méthanisables peuvent toutefois être déterminées grâce au test de potentiel de biométhanisation. De plus, la

méthanisation peut être améliorée par acclimatation ou adaptation des microorganismes en utilisant comme inoculum la boue résultant de la précédente opération de méthanisation (Mambanzulua et al., 1999). Par ailleurs, la littérature montre que les végétaux difficilement biodégradables peuvent être dégradés par voie verte soit en co-digestion soit en digestion en deux étapes. La co-digestion vise principalement à améliorer le rapport C/N mais permet également la dilution des substances inhibitrices (Mata-Alvarez et al., 2000; Chen et al., 2008). La digestion bi-étagée scinde la succession des quatre processus biochimiques en un premier étage hydrolytique et un second méthanogène (Raynal et al., 1998).

A côté des feuilles de MI, les feuilles de MU sont bien connues pour contenir des protéines, des lipides, des glucides (essentiellement d'amidon), des fibres, des cendres, des sels minéraux (Ca, P, Fe, etc.), de la vitamine A, de la thiamine, de la riboflavine et de la niacine. En outre, elles sont particulièrement riches en acides aminés essentiels (isoleucine, leucine, lysine, méthionine et cystéine, phénylalanine et tyrosine, thréonine, tryptophane, valine) (Rannou, 2000). Ces feuilles sont potentiellement favorables pour la méthanisation. Par conséquent, elles pourraient être associées à celles de MI pour obtenir une composition équilibrée du contenu du digesteur pour un développement bactérien adéquat. Dans ce sens, les feuilles doivent également être broyées pour avoir une grande surface de contact avec les microorganismes. Le broyage des feuilles à la taille du centimètre est rationnel économiquement (Chynoweth et al., 1993). Il permet d'épargner l'énergie de broyage jusqu'au millimètre car il a été prouvé que le rendement de méthanisation des feuilles réduites en poudre n'apporte pas de plus-value (Chynoweth et al., 1993). La température des digesteurs connus internationalement est très souvent fixée à 30 ou 35 °C. Cela autorise une mise en œuvre à température ambiante dans les régions à climat chaud telles que la VPK. En outre, il a été prouvé que la méthanisation à la température ambiante moyenne de 26 °C est faisable en utilisant des lisiers comme inoculum; le lisier de vache étant le plus actif (Mambanzulua et al., 1999).

Notons encore que des prétraitements acide ou basique des matières végétales sont souvent utilisés ou envisagés avant la digestion anaérobie pour faciliter l'hydrolyse et augmenter le rendement du biogaz. Cependant, les dérivés du traitement (furfural, hydroxyméthyl furfural, acides formique et levulinique) sont d'autres inhibiteurs potentiels. Des microorganismes peuvent éventuellement s'adapter ou dégrader ces dérivés inhibiteurs, mais les cinétiques des processus seront inévitablement affectées (Chen et al., 2008).

Tableau 2 Compositions chimiques sommaires des feuilles de MU et MI (Lebas, 2004)

Feuilles	Principaux constituants des feuilles (%MS)				
	Celluloses brutes	Lipides	Protéines brutes	Cendres	Autres
MI	30	5	10	12	43
MU	26	6	30	9	39

3.3.1. Potentiel énergétique des feuilles de MU et MI

Le biogaz est utilisé comme combustible dans les réchauds à gaz, dans les fours, dans les incinérateurs, dans les chaudières, dans l'éclairage, même en présence d'acide sulfhydrique si sa concentration est toutefois inférieure à 10 ppm (Moletta, 2008_a). Il est aussi utilisé comme carburant pour des moteurs à combustion interne des moulins, des motopompes, des véhicules et des groupes électrogènes. Ce travail s'intéresse sur la valeur énergétique qui représente actuellement une urgence sociale à Kinshasa. La RDC reste l'un des rares pays au monde doté d'importantes ressources hydroélectriques; son potentiel exploitable est évalué à 774 000 GWh, soit 35% du potentiel du continent africain et 8% du potentiel annuel mondial (Schuru et al., 2011). Ce potentiel se traduit par une puissance exploitable connue de 88 400 MWh dont près de 44 000 MWh sont concentrés sur le barrage d'Inga sur le fleuve Congo (Kasemuana, 2007; Schuru et al., 2011). Cependant, ce barrage opère à 40% de sa capacité et la plupart de sa production est exportée au lieu de servir les besoins nationaux. En outre, la SNEL connaît de grandes difficultés de maintenance des installations pour la production, le transport et la distribution de l'électricité (AfDB/OECD, 2008; Schuru et al., 2011). Le taux d'accès à l'électricité dans le pays est estimé à une moyenne de 6%, dont 1% pour les zones rurales et 5% pour les zones urbaines (RDC, 2006; Schuru et al., 2011).

En 2010, la VPK a consommé au total 490 000 tonnes de charbon de bois, soit environ 4,7 millions m³ de bois et 60 384 tonnes de bois de chauffe ou 85 700 m³ de bois (Schure et al., 2011). Ainsi, la quantité totale de bois énergie consommée à Kinshasa pour l'année 2010 est ainsi estimée à près de 4,8 millions m³ de bois. Après transformation, cela représente 550 384 tonnes de bois énergie, soit une valeur de 118 milliards de franc congolais (143 millions de dollars américains). La ventilation des sources d'énergie consommées par le ménage kinois est reportée dans le Tableau 3 (Schure et al., 2011). Dans la VPK, presque tous les habitants consomment le bois énergie. Cette consommation est qualifiée d'hécatombe écologique, car le

déboisement provoqué par les besoins annuels en combustible ligneux à Kinshasa sont très élevés. Ces besoins engendrent une dégradation annuelle de forêts qui correspondrait aux données suivantes: pour le bois de chauffe, les superficies de la forêt claire, la forêt claire muhuluteuse, la forêt dense et sèche déboisées annuellement sont respectivement 204,5 km², 272,7 km² et 511,3 km² (Shuku, 2011). D'autre part, concernant la consommation en charbon de bois, la déforestation annuelle correspondante est de 485,2 km² de forêt claire, 485,2 km² aussi pour la forêt claire muhuluteuse et 942,8 km² de forêt dense et sèche (Shuku, 2011). La forêt déjà dégradée, quant à elle, est amputée annuellement de 58 439 ha pour les besoins en bois de chauffe et de 18 857 ha pour les besoins en charbon de bois. En réalité, de tels rythmes annuels représenteraient rapidement une catastrophe pour les écosystèmes forestiers de la région de Kinshasa et ceux du Bas-Congo et de Bandundu qui, d'ailleurs, subissent déjà cette agression de manière croissante depuis plus d'un siècle. Mais hélas, sans aucun programme de suivi et de soutien à l'aménagement forestier, il est quasi impossible de contrer ou de réduire la vitesse avec laquelle se fait le déboisement de la ceinture verte (Shuku, 2011 et Kassay, 2010). Le seul moyen pourrait être la valorisation des énergies renouvelables moins coûteuses. Pour ce faire, une transformation de la biomasse bon marché ou gratuite en l'occurrence les déchets les plus accessibles en une forme énergétique facilement utilisable. Ainsi, nous avons les déchets végétaux dont les plus disponibles sont les feuilles de MI et de MU qui pourraient être transformées en énergie par production du biogaz.

Le biogaz est essentiellement constitué du méthane ayant un pouvoir calorifique exploitable comme les bois et autres énergies fossiles. Selon Gunaseelan (2004), les pouvoirs méthanogènes des feuilles exprimés en volume de méthane (CH₄) par rapport au solide volatil (SV) varient de 0,12 à 0,43 m³ CH₄/kg SV selon leurs compositions chimiques. Les feuilles renfermant des quantités élevées de composés antimicrobiens possèdent des pouvoirs méthanogènes bas (Gunaseelan, 1997). Les Tableaux 2 et 4 nous montrent respectivement les compositions chimiques sommaires des feuilles de MI et de MU et les pouvoirs calorifiques des différents combustibles (Shuku, 2011). En effet, la production annuelle de méthane à partir des feuilles et son pouvoir calorifique inférieur peuvent être estimés en se basant sur les valeurs disponibles. Ainsi, les feuilles de MU considérées comme favorables à la méthanisation auraient comme pouvoir méthanogène 0,43 m³ CH₄/kg SV tandis que les feuilles de MI auraient 0,12 m³ CH₄/kg SV. En supposant que les déchets végétaux sont constitués uniquement des feuilles de MU ou MI, celles-ci représenteraient 94% des déchets organiques. A l'échelle de la ville, sachant que selon les informations fournies dans la section

«gestion des déchets» les déchets organiques représentent 66% de déchets solides et qu'une personne produit journallement 600 g de déchets contenant 70% de matière sèche selon les informations fournies dans le sous-titre «gestion des déchets». Alors, en 2015, la ville produirait par an (366 jours) environ 1,4 million de tonnes de déchets des feuilles mortes brutes, soit environ 1 million de tonnes de déchets secs. La production annuelle des déchets ainsi estimée, la consommation annuelle du bois énergie estimée donnée précédemment dans ce sous-titre et les données des Tableaux 2, 3, et 4 ont permis de déterminer les pouvoirs calorifiques inférieurs (PCI) totaux annuels des feuilles, du bois énergie, du pétrole et de l'électricité reportés au Tableau 5, en supposant que le bois énergie n'est consommé que par le ménage.

Ainsi, il ressort que le potentiel énergétique annuel des déchets végétaux de la VPK est estimé à $372\,619 \times 10^7$ kJ et $1\,291\,200 \times 10^7$ kJ en considérant uniquement les feuilles de MI et de MU, respectivement. Ces valeurs représenteraient 39% et 134% de la consommation annuelle du bois énergie, respectivement pour les feuilles de MI et MU. Les feuilles de MU possèderaient un potentiel énergétique supérieur à celui des feuilles de MI et qui dépasserait de 16% la consommation énergétique totale du ménage kinois issue de différentes sources d'après les Tableaux 3 et 4. La valeur énergétique de MU ou MI ainsi estimée est quelque peu surévaluée ; la valeur exacte peut être calculée à partir du potentiel méthanogène expérimental et de la teneur exacte des feuilles de MI ou MU dans les déchets.

Tableau 3 Sources d'énergie utilisées pour la cuisson par le ménage dans la VPK (Shure et al., 2011)

Source d'énergie	Consommation en % par ménage kinois
Charbon de bois	75
Bois de chauffe	12
Electricité	12
Pétrole	1

Tableau 4 Pouvoirs calorifiques inférieurs de certains combustibles (Shuku, 2011; Pouzet, 2011)

Combustibles	Pouvoir calorifique
Bois (kJ/kg)	18 828
Charbon de bois (kJ/kg)	28 033
Mazout (kJ/kg)	46 024
Pétrole (kJ/kg)	48 116
Essence (kJ/kg)	48 116
lignines (kJ/kg)	26 640
Alcool à brûler (kJ/kg)	25 104
Gaz naturel (kJ/m ³)	58 576
Hydrogène (kJ/m ³)	12 552
Méthane (kJ/m ³)	35 780
Biogaz contenant 60% de méthane (kJ/m ³)	21 460

Tableau 5 Potentiels énergétiques totaux annuels estimés produits issus des feuilles ou consommés issus du bois énergie, du pétrole et de l'électricité dans la VPK

Sources d'énergie	PCI total annuel (kJ)
Méthane de MU	1 291 200 x 10 ⁷
Méthane de MI	372 619 x 10 ⁷
Bois énergie	963 029 x 10 ⁷
Pétrole	11 068 x 10 ⁷
Electricité	132 832 x 10 ⁷

3.3.2. Valorisation des digestats de la méthanisation

La question des engrais chimiques a été étudiée pendant plus de dix ans dans les années 1980 par le Programme National Engrais (PNE) soutenu par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) sur financement belge et le Service National de Fertilisants et Intrants Connexes (SENAFIC) (Tollens, 2004). Pour la plupart des cultures, une bonne réponse aux applications d'engrais a été trouvée. Mais, le coût des engrais chimiques pose des problèmes. Leur importation au Congo ainsi que leur acheminement auprès des utilisateurs sont très onéreux. D'autre part, le secteur privé est peu ou pas intéressé par ce commerce, le marché étant trop restreint et trop instable. Comme l'application d'engrais s'avère rentable dans les cultures maraîchères, on peut utiliser les engrais biologiques au profit d'une agriculture écologique familiale intensive. La réalisation de ce projet est possible grâce aux avantages naturels que la VPK dispose tels que le climat et la biomasse végétale gratuite. Les résidus issus de la méthanisation de la biomasse végétale seront valorisés. Ces résidus appelés digestats constituent d'excellents engrais organiques plus riches que les

composts. En effet, ils possèdent une action du type engrais minéral du fait de la minéralisation de la matière organique et par la fraction d'azote disponible (Moletta, 2008_b). Ils peuvent ou non être séparés en liquide et solide. Dans ce cas, ils sont utilisés par épandage sur le sol à fertiliser. La quantité de digestat produite après la méthanisation des feuilles de MU ou de MI est estimée en soustrayant de la masse sèche initiale celle qui correspond au potentiel de biogaz produit. Elles s'élèveraient à 524 069,3 tonnes et 829 700,6 tonnes de matières sèches respectivement pour les feuilles de MU et MI. Bahri et Houmane (1987) ont prouvé qu'on peut épandre par an sur un sol pauvre acide jusqu'à 30 tonnes de matières sèches de boues par hectare. En procédant de la sorte, les digestats des feuilles de MU et MI couvriraient annuellement respectivement 17 469,9 et 27 656,7 hectares soit environ 175 et 277 km². Ainsi, ces valeurs représenteraient respectivement pour les digestats des feuilles de MU et MI presque 4,8% et 7,5% de la superficie totale des forêts détruites par la consommation du bois énergie (Shuku, 2011). Par contre, ces digestats pourraient être épandus en excès sur la surface agricole totale de VPK estimée à 5 511 ha ou 55,11 km² et comprenant: 3 000 ha d'étendue totale de la ferme présidentielle ou ex-Domaine Agropastoral et Industriel Présidentiel de la N'Sele (DAIPN) (Primature, 2014), 720 ha d'espace total des vallées aménagées pour le maraichage à travers toute la VPK et 1791 ha de superficie totale des jardins parcellaires des habitations (en admettant que chaque ménage kinois est formé de 6,7 membres et possède 24 m² de plate-bande pour le maraichage selon les objectifs du projet de l'ONG «Jardins et Élevages de Parcelle, JEEP en sigle») (Mbuangi et al., 2005; Makungu, 2006). L'apport des digestats contribuerait à maintenir la biomasse microbienne, le stock de matières organiques et minérales dans le sol acide de la VPK. En se basant sur la composition de chacune des feuilles, les digestats des feuilles de MU fourniraient un fertilisant riche en azote tandis que ceux des feuilles de MI serait pauvre en azote. Dans ce cas, il pourrait être utilisé en association avec un fertilisant azoté ou seul pour la biorestauration de sites dégradés ou contaminés et pour la stabilisation des pentes, comme milieu filtrant (Charland et al., 2001; Mulaji, 2011).

Les digestats des feuilles de MI seraient riches en carbone et en lignine; déshydraté et séché serait un combustible de moindre qualité, alternatif au bois énergie. Généralement, un digestat solide possède un pouvoir calorifique supérieur à celui du substrat d'où il est issu. En outre, la lignine potentiellement présente dans les feuilles de MI possède un pouvoir calorifique élevé comparativement à ceux d'autres polymères végétaux. Ce pouvoir est supérieur à celui du bois et correspond en masse équivalente à 60% de l'énergie du pétrole (Tableau 4).

4. Mode de collecte adapté aux feuilles de MI et MU

La collecte des feuilles de MI et MU ne serait pas compliquée puisque leurs sources de production à grande échelle sont différentes et identifiées. Il y a déjà naturellement une ségrégation évidente. Les feuilles de MI sont surtout générées dans les jardins et dans les parcelles d'habitations. Par contre, les feuilles de MU proviennent des marchés et des ménages. Même si dans certaines circonstances les deux déchets pourraient provenir des parcelles d'habitation, la séparation est facile à réaliser car les feuilles de MI tombent de l'arbre tandis que celles de MU résultent du rebut lors de leur cuisine. En outre, elles sont facilement distinguables et leur proportion est facilement estimable pour une codigestion par exemple. Il est important aussi que les lieux de génération présentent très peu de risque de contamination en substances toxiques. Ainsi, pour atteindre les objectifs de la valorisation, la ségrégation à la source entre les feuilles et d'autres déchets est primordiale. Les autres déchets organiques pourraient être associés après avoir vérifié leurs potentiels de méthanisation. Une séparation manuelle ou par technique simple et spécifique (aimantation,...) est aussi requise pour enlever les inertes (plastique, caoutchouc, pierre, sables, métaux...) dans le cas des mélanges des déchets organiques avec d'autres. Ces feuilles pourraient être stockées, étalées à l'air libre dans un endroit sec ou le cas échéant introduites directement dans un digesteur après broyage. Pour réduire les difficultés économiques et la pollution dues aux transports motorisés, la collecte, le traitement et l'utilisation des produits se réaliseraient à proximité de leurs lieux de génération.

5. Conclusion

Il découle de ce travail qu'il serait possible de convertir par méthanisation les déchets végétaux produits annuellement dans la VPK en énergie renouvelable non polluante. Toutefois, vu la composition des feuilles de MI présentant un potentiel d'inhibition des processus biochimiques, il est souhaitable de les gérer en co-digestion avec les feuilles de MU qui sont potentiellement favorables à la méthanisation.

L'énergie qui pourrait être générée serait capable de réduire de 39% à 100% la consommation annuelle en bois énergie ou de couvrir la consommation énergétique totale issue des différentes sources dans le ménage kinois. De plus, les digestats issus du processus de

méthanisation constituent un excellent engrais utile pour la mise en place d'une éco-agriculture familiale intensive périurbaine ou urbaine. Ces allégations se justifient par le fait que les digestats seraient en quantité suffisante pour fertiliser annuellement par épandage l'ensemble de superficies champêtres et une partie des étendues déboisées. Les utilisations potentielles du digestats sont multiples, outre les applications agronomiques, ils peuvent aussi être utilisés dans la biorestauration de sites dégradés ou contaminés et dans la combustion. Cela prouve que même la valorisation rationnelle des feuilles mortes des forêts périurbaines pour produire du méthane et des fertilisants pourrait bien contribuer à éviter ou à réduire leur destruction et à restaurer leurs parties dévastées. Or, dans l'évaluation des déchets végétaux produits par la VPK, les déchets forestiers périurbains ne sont pas pris en compte. Ainsi, des études peuvent être menées pour apprécier les déchets méthanisables engendrés par des exploitations forestières.

Ces estimations nous révèlent que le retour au sol des déchets végétaux et la production énergétique simultanément, constituent probablement la plus logique de leur élimination en raison de leur valeur agronomique et énergétique. Cependant, l'innocuité de ces produits doit être garantie comme critères de qualité en terme de concentrations en polluants et indésirables tel qu'exigé dans les réglementations mises en place dans beaucoup de pays du Nord. Pour des pays en développement comme la RDC, il est important d'adapter leurs systèmes de gestion des déchets aux conditions locales en utilisant les instruments de gestion simples mais efficaces. Ainsi, l'incitation au tri à la source et éventuellement à la valorisation à domicile des déchets par méthanisation peut se montrer globalement plus efficace par rapport au tri et à la méthanisation industriels. Cette possibilité conduirait à l'assainissement de l'environnement, réduirait les risques des maladies, répondrait partiellement aux problèmes liés à la pauvreté, à la sécurité alimentaire et à la protection durable de la forêt.

6. Bibliographie

- AfDB/OECD (2008) African Economic Outlook: Democratic Republic of Congo. AfDB/OECD.
- Amegnran YC (2009) Problématiques de la gestion des déchets solides en Afrique: 26 octobre 2009 Formation sur la gestion des déchets dans les villes Africaines: 26 - 30 octobre 2009 à Ouagadougou.
[En ligne] URL:http://www.cifalouaga.org/pres_dechets/Module/prob_crepa. Consulté le 7 octobre 2013.
- Baert G, Embrechts J, De Dapper M, Mapaka M (1991) Cartographie des sols, évaluation des terres. Feuille de Kinshasa. Etude de la reconnaissance au 200.000 ème. Texte explicatif n°7. Région : Kinshasa, Sous-région : Lukaya, Catarctes. Université de l'Etat de Gand (ITC), A.G.C.D.
- Bagalwa M, Karume K, Mushagalusa NG, Ndegeyi K, Birali M, Zirirane N, Masheka Z, Bayongwa C (2013) Risque Potentiels des déchets domestiques sur la santé des populations en milieu rural: cas d'Irhambi Katana (Sud-Kivu, République Démocratique du Congo). *Vertigo* 13 (2).
[En ligne] URL:<http://vertigo.revues.org/14085>; doi: 10.4000/vertigo.14085. Consulté le 20 janvier 2014.
- Bahri A, Houmane B (1987) Effet de l'épandage des eaux usées traitées et des boues résiduelles sur les caractéristiques d'un sol sableux de Tunisie. *Science du sol Plaisir-France* 25 (4): 267-278.
- Barreto JC, Trevisan MTS, Hull W E, Erben G, de Brito ES, Pfundstein B, Würtele G, Spiegelhalder B, Owe RW (2008) Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 56 (14): 5599-5610.
- Biey ME (2001) Small-scale biotreatment of domestic refuse, Thesis doctor in applied biological sciences, Faculteit Landbouwkundje en Toegepaste Biologische Wetenschappen. Universiteit Gent.
- Buffiere P, Carrere M, Lemaire O, Vasquez J (2007) Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides: Projet METHAPI-Expertise. Centre de Recherche Propreté & Energie.
[Enligne]URL:http://ec.europa.eu/.../project/Projects/index.cfm?...rep...Methapi_Guide. Consulté 20 janvier 2014.

- Charland M, Cantin S, Pierre MA St, Côté L (2001) Recherche sur les avantages à utiliser le compost. Dossier CRIQ 640-PE27158 (R1). Rapport final, Recyc-Quebec.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS, (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99: 4044–4064.
- Chynoweth DP, Turick CE, Owens JM, Jerger DE, Peckq MW (1993) Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 5: 95-111.
- Compère P (1970) Cartes des sols et de la végétation du Congo, du Rwanda et du Burundi, Bas-Congo. B, Notice explicative de la carte de la végétation. I.N.E.A.C., Bruxelles.
- Dahouda M, Toleba SS, Youssao AKI, Mama Ali AA, Ahounou S, Hornick JL (2009) Utilisation des cossettes et des feuilles de manioc en finition des pintades (*Numida meleagris*, L): performances zootechniques, coûts de production, caractéristiques de la carcasse et qualité de la viande. *Ann Méd Vét* 153: 82-87.
- Deublein D, Steinhauser A (2011) Biogas from waste and renewable resources: an introduction. Wiley -VCH Verlag GmbH & Co, KGaA.
- El-Sissi H, Ishak MS, el-Wahid MS, el-Ansari MA (1971) The gallotannins of *Rhus Coriaria* and *Mangifera india*. *Planta-Medica* 19(4): 342-351.
- El-Sissi HI, Saleh NA (1970) Phenolic components of *Mangifera indica*. IV *Planta Med* 18(1): 73-78.
- Esposito G, Frunzo LA, Panico, d'Antonio G (2008) Mathematical modelling of disintegration-limited co-digestion of OFMSW and sewage sludge. *Water Sci Technol*: 58:1513–1519.
- Esposito G., Frunzo L, Liotta F, Panico A, Pirozzi F (2012) BMP tests to measure the biogas production from the digestion and co-digestion of Complex organic substrates. *Open J Environ Eng* 5:1–8.
- Frédéric S, Lugardon A (2007) Méthanisation des effluents industriels liquides. *Techniques de l'ingénieur*.
- Fry JL (1977) Méthane : Générateur à gaz méthane. Rongement, Suisse.
- Gerardi MH (2003) *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Willey et Sons, Inc.
- Gunaseelan VN (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review; *Biomass and Bioenergy* 13: 83-114.
- Gunaseelan VN (2004) Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks *Biomass and Bioenergy* 26: 389–399.

- Hernandez JE, Edyvean RGJ (2008) Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* 160: 20–28.
- Hiligsmann S, Lardinois M, Diabaté SI, Thonart P (2006) Guide pratique sur la gestion des déchets ménagers et des sites d'enfouissement technique dans les pays du sud. Québec. IEPF.
- Kamdem I, Hiligsmann S, Vanderghem C, Bilik I, Paquot M, Thonart P, (2013) Comparative biochemical analysis during the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass from six morphological parts of Williams Cavendish banana (Triploid Musa AAA group) plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29: 2259- 2270.
- Kamra DN, Patra AK, Chatteerjee PN, Ravindra Kumar, Neeta Agarwal, Chaudhary LC (2008) Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal Experimental Agriculture* 48 :175-178. doi:10.1071/EA07268.
- Kasemuana S (2007) Synthèse du rapport : Renforcer la résilience des systèmes énergétiques et des écosystèmes en République Démocratique du Congo, Observatoire de la viabilité énergétique.
- Kassay JN (2010) La politique publique de la gestion des espaces verts par l'hôtel de ville de Kinshasa. *Afrique et Développement* 35(3): 13 – 46.
- Kitenge L (1988) Les industries alimentaires et textiles de Kinshasa et leurs aires d'influence, mémoire de licence, Institut Pédagogique National, Kinshasa.
- Korres NE, O'Kiey P, Benzie JAH, West JS (2013) *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using agriculture biomass and organic wastes*. Routledge, New York and London.
- Kroeker EJ, Schulte DD, Sparling AB, Lapp HM (1979) Anaerobic treatment process stability. *J. Water Pollut. Control Fed* 51: 718– 727.
- Lebas F (2014), *Méthodes d'élevage du lapin : Fourrages tropicaux utilisables pour les lapins*, [en ligne] <http://www.cuniculture.info/Docs/Elevage/Tropic-05-Chap3.htm>. Consulté le 22 janvier 2014.
- Lelo N (1999) La gestion des déchets domestiques : bilan annuel d'une expérience pilote de l'hôtel de ville de Kinshasa. *Med Fa.c Landbouww Univ Gent* 64(1):107-114.
- Lelo N (2008) *Kinshasa: Ville et environnement*. Édition Harmattan, Paris.

- Makumbelo E, Lukoki L, Paulus JSj, Luyindula N, (2002) Inventaire des espèces végétales mises en culture dans les parcelles en milieu urbain. Cas de la commune de Limete - Kinshasa - R. D. Congo. *Tropicultura* 20(2): 89-95.
- Mafwila M (1999) La problématique des déchets agricoles dans la ville de Kinshasa. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 64(1): 41-44.
- Makungu MN (2006) Le volet «développement» dans une action humanitaire: une expérience à Kinshasa (République Démocratique du Congo), [En ligne] URL: <http://www4.uqo.ca/observer/DevLocal/Initiatives/Internationales/Kinshasa.pdf>. Consulté le 14 décembre 2014.
- Mambanzulua N, Kayembe K, Noki V (1999) Détermination des activités méthanogéniques spécifiques des lisiers dans le traitement anaérobie des déchets. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 64(1): 183-188.
- Masibo M, He Q (2009) In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*. 5(2): 73-80.
- Mata-Alvarez, Macé J S, Llabrés P (2000) Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74: 3-16.
- Mata-Alvarez J (2003) Fundamentals of the anaerobic digestion process. *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. IWA publishing:1-20.
- Mbuangi ML, Senda L, ND Komba (2005) Monographie de Kinshasa. [En ligne] URL : http://ruralcongo.cd/minider/images/pdf/kinshasa_monographie.pdf.
- Mital KM (1996) *Biogas systems: principles and applications*. New Age International Publishers Limited, New Delhi.
- Moletta R (2002) La méthanisation de la matière organique, Aspects généraux, [en ligne] URL: <http://rene.moletta.perso.sfr.fr/>. Consulté le 25 septembre 2013.
- Moletta R (2008_a) Méthanisation de la biomasse. *Techniques de l'Ingénieur*. Editions T.I., Paris.
- Moletta R (2008_b) *La méthanisation* Editions Tec et Doc Paris.
- Moletta R, (2010) Méthanisation de la biomasse. *Techniques de l'Ingénieur*. Editions T.I., Paris.
- Mulaji KC (2011) Utilisation des composts de biodéchets ménagers pour l'amélioration de la fertilité des sols acides de la Province de Kinshasa (Rép. Dém. du Congo). Thèse de Doctorat Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Gembloux, Belgique.
- Nyamangara J, Mtambanengwe F, Musvoto C (2009) Carbon and nitrogen mineralization from selected organic resources available to smallholder farmers for soil fertility

- improvement in Zimbabwe, African Journal of Agricultural Research Vol. 4 (9), pp. 870-877, [online] <http://www.academicjournals.org/AJAR>. Consulté 29 décembre 2013.
- OMS (1994) La lutte contre les insectes et les rongeurs par l'aménagement de l'environnement. OMS, Genève.
- Pangu SZ, Shidi G, Kabuyaya MV (1999) Problématique de l'enlèvement des déchets solides à Kinshasa: les moyens mis en œuvre. Med Fac Landbouww Univ Gent 64(1): 273-289.
- Patel VK, Venkatakrisna BH (1988) Folklore therapeutic indigenous plants in periodontal disorders in India (review, experimental and clinical approach), International Journal-OF-Clinical-Pharmacology-Therapy-Ano-Toxicology 26(4): 176-184.
- Patra AK, Stiverson J, Yu Z (2012). Effects of quillaja and yucca saponins on communities and select populations of rumen bacteria and archaea, and fermentation in vitro, Journal of Applied Microbiology 113:1329-1340.
- Pouzet D (2011) Production durable de biomasse - La lignocellulose des poacées, [En ligne] URL: [http:// books.google.be/books?isbn=2759209458](http://books.google.be/books?isbn=2759209458). Consulté le 8 décembre 2014.
- Primature de la RDC (2014) <https://www.primature.cd/public/securite-alimentaire-gouvernement-et-lr-group-signent-deux-contrats-pour-relancer-le-daipn>. Consulté, le 11 décembre 2014.
- Rannou MJN (2000) Les richesses du sol, les plantes à racines et tubercules en Afrique : une contribution au développement des technologies de récolte et d'après-récolte DES, GTZ, Feldafing Allemagne.
- Raynal J, Delgenks JP, Moletta R (1998) Two-phase anaerobic digestion of solid wastes by a multiple liquefaction reactors process. Bioresource Technology 65: 97-103.
- RDC (2006) Document de la stratégie de croissance et de réduction de la pauvreté (DSRP). République Démocratique du Congo.
- Schure J, Verina I, Mayimba AC (2011) Bois énergie en RDC: Analyse de la filière des villes de Kinshasa et de Kisangani. Projet Makala/CIFOR. [En ligne] URL: <http://www.gembloux.ulg.ac.be/newsletter/newsletter10/img/Makala>, consulté le 25 septembre 2013.
- Shuku NO (2011) Impact de l'utilisation de l'énergie-bois dans la ville province de Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC). Mémoire. Université du Québec, Montréal.
- Sys C, Van Wambeke A, Frankart J (1961) La cartographie des sols au Congo. Ses principes et ses méthodes. Publi. INEAC, Série Scient 66.

- Tollens E (2003) Sécurité alimentaire à Kinshasa un face à face quotidien avec l'adversité
Katholieke Universiteit Leuven Faculté des Sciences Agronomiques et de la Biologie
Appliquée Working Paper.
- Tollens E (2004) Les défis: sécurité alimentaire et cultures de rente pour l'exportation –
principales orientations et avantages comparatifs de l'agriculture en R.D. Congo
Katholieke Universiteit Leuven Faculté des Sciences Agronomiques et de la Biologie
Appliquée. Working Paper.
- Vasel JL (1992) La fosse septique, les dispositifs d'épuration Tribune de l'eau
560(45): 23-46.
- Vasel JL (2007) Evolution de l'assainissement individuel: perspectives et questions en
suspens. Tribune de l'eau 641(60): 3-16.
- Vögeli Y, Lohri CR, Gallardo A, Diener S, Zurbrügg C (2014) Anaerobic Digestion of
Biowaste in Developing Countries: Practical information and case studies, Swiss
Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). Dübendorf,
Switzerland.
- Zhu XM, Song JX, Huang ZZ, Wu YM, Yu MJ (1993) Antiviral activity of mangiferin
against herpes simplex virus type 2 in vitro. *Chung-Kuo-Yao-Li-Hseh-Pao-Acta-
Pharmacologica-Sinica* 14(5): 52-454.

Chapter III: Comparative study of the methane production based on the chemical compositions of *Mangifera Indica* and *Manihot Utilissima* leaves

Mambanzulua Ngoma et al. (2015) SpringerPlus DOI 10.1186/s40064-015-0832-y

Philippe Mambanzulua Ngoma^{ab}, Serge Hiligsmann^a, Eric Sumbu Zola^c, Marc Culot^d, Thierry Fievez^d, Philippe Thonart^a

a: Walloon Center of Industrial Biology (CWBI), Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030, Gembloux, Belgium

b: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 212, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

c: Faculty of Agricultural Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 117, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

d: Laboratory of Microbial Ecology and Water Purification, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, B52, 27 Maréchal Juin, B-5030 Gembloux, Belgium

Avant propos

L'approche théorique précédente montre que la VPK peut à partir de ses déchets organiques ou végétaux couvrir une partie non négligeable de ses besoins en énergie et en fertilisants.

Pour ce faire, la biométhanisation apparaît comme une technologie de choix

Toutefois, avant de méthaniser un déchet à grande échelle il faut connaître son pouvoir méthanogène. Or, les potentiels méthanogènes des feuilles MU et MI sont inconnus. C'est ainsi que ce chapitre entamant les expérimentations, s'est consacré à la détermination des pouvoirs méthanogènes, des pouvoirs énergétiques du biogaz et des valeurs fertilisantes des digestats obtenus à partir de la digestion anaérobie des feuilles de MU et MI.

Au préalable, les compositions chimiques de ces feuilles sont déterminées. Ensuite, ces feuilles sont méthanisées dans des bouteilles de sérum en suivant la production du biogaz et du méthane par un dispositif d'absorption du gaz carbonique dans du KOH. L'évolution des

métabolites produits dans les milieux de culture est suivie par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). A la fin de la méthanisation, les digestats sont récupérés et séparés en phases liquides et solides puis analysés pour déterminer leurs rapports C/N. Ensuite, les rendements du biogaz et du méthane produits par les feuilles ainsi que leurs pouvoirs calorifiques sont calculés et comparés à celui du bois énergie.

L'enjeu est de valider les estimations réalisées dans le chapitre II au niveau du potentiel énergétique en biogaz produit à partir des feuilles de MU et MI et au niveau des potentialités fertilisantes des digestats issus de leur biométhanisation. Il s'agit également de détecter d'éventuelles inhibitions des processus biologiques liées à certains composés présents au sein de ces feuilles.

Abstract

Leaves of *Mangifera indica* (MI, mango leaves) and *Manihot utilissima* (MU, cassava leaves) are available in tropical regions and are the most accessible vegetal wastes of Kinshasa, capital of Democratic Republic of Congo. These wastes are not suitably managed and are not rationally valorized. They are abandoned in full air, on the soil and in the rivers. They thus pollute environment. By contrast, they can be recuperated and treated in order to produce methane (energy source), organic fertilizer and clean up the environment simultaneously. The main objective of this study was to investigate methane production from MI and MU leaves by BMP tests at 30°C. The yields achieved from the anaerobic digestion of up to 61.3 g raw matter in 1 l medium were 0.001 l/g volatile solids and 0.100 l CH₄/g volatile solids of MI and MU leaves, respectively. The yield of MU leaves was in the range mentioned in the literature for other leaves because of a poor presence of bioactive substrates, and low C/N ratio. This methane yield corresponded to 7% of calorific power of wood. By contrast, the methane yield from MI leaves was almost nil suggesting some metabolism inhibition because of their rich composition in carbon and bioactive substrates. By contrast classical acidogenesis and acetogenesis were recorded.

Therefore, methane production from the sole MI leaves seems unfavorable by comparison to MU leaves at the ambient temperature in tropical regions. Their solid and liquid residues obtained after anaerobic digestion would be efficient fertilizers. However, the methane productivity of both leaves could be improved by anaerobic co-digestion.

Keywords

Anaerobic digestion, Biogas, Methane, Leaves, *Mangifera indica*, *Manihot utilissima*

1. Introduction

Kinshasa (capital of Democratic Republic of Congo) has a tropical climate and the majority of wastes are of vegetal origin (Lelo, 1999; Biey, 2013, General Director of the “Régie d’Assainissement des Travaux Publics de Kinshasa”, Kinshasa/Lingwala, Democratic Republic of Congo, personal communication). These wastes are not suitably managed and are not rationally valued. They are abandoned in public trash cans, thrown in rivers or gutters, becoming thus the foyers of proliferation of microbes and the vectors of diseases. By contrast this biomass can be recovered and treated by anaerobic biodegradation for producing methane. The anaerobic digestion of vegetal wastes at ambient temperature could be a favorable treatment mode for the cleaning up of the Kinshasa environment. It would reduce energy consumption for heating the reactor and the costs of facilities (Mambanzulua et al., 1999; Kamdem et al., 2011). This biological process results in methane production as source of energy and residues or digestates as fertilizing matters.

According to many authors, solid wastes of vegetal origin represent a high potential energy resource if they can be properly and biologically converted to methane (Gunaseelan, 2004; Barakat et al., 2012; Chandra et al., 2012; Kamdem et al., 2013). They are renewable and therefore their net CO₂ contribution to the atmosphere is nil.

In this work, we are interested in the methane production from *Mangifera indica* (MI) and *Manihot utilissima* (MU) leaves since large amounts of this organic matter are available in Kinshasa and other African regions and moreover, up to date, they are about not valorized. Anaerobic digestion is less prevalent in all these regions according to Vögeli et al. (2014). Consequently, very few reports of the biomethanation of these leaves have been published. High-solids digestion experiments with mango leaves and cattle manure in 1.2 m³ batch digesters were achieved and the biogas yield of the blend was higher than cattle manure alone (Shyam and Sharma, 1994; Gunaseelan, 1997). Moreover, to the best of our knowledge, the biomethanation potentials of MU and MI leaves are not still known and there has been no comparative study of the methane production based on the chemical composition of these leaves. However, before all anaerobic digestion in large scale, the biomethanation potential of

feedstock must be known in order to determine the load rate, the retention time and the yield. In addition, biogas yield and its composition are greatly affected by the C/N ratio, the contents in mineral elements and in secondary metabolites in leaves (Mital, 1996; Macheboeuf et al., 2011; Patra and Saxena, 2010; Kamra et al., 2008).

Therefore, in this paper, a comparative biomethanation and biochemical analysis study was performed to better understand the anaerobic digestion process from MI and MU leaves and to assess their methane production potentials. The biochemical methane potential (BMP) assays were used in our experiments (Owen et al., 1979; Gunaseelan, 2004) and they were carried out with monitoring of biogases volumes and their compositions, and volatile fatty acids production. After BMP assays, the fertilizing values of biomethanation residues were determined by considering the C/N ratio.

2. Materials and methods

2.1. Source and conservation of leaves

The leaves of MU and MI were collected in Kinshasa, Democratic Republic of Congo at the Rond-point Ngaba market and at the Quarter 9 in Ndjili Commune, respectively. These leaves were identified by the Herbarium of Kinshasa at the Department of Biology, Kinshasa University in Democratic Republic of Congo. These samples were washed, dried at the ambient temperature, ground and stored at 4°C in plastic bags for analyses and tests.

2.2. Physico-chemical analyses of leaves

2.2.1. General characterization

The contents of dry matter, ash and organic matter were determined according to the standard methods (APHA, 1992). The dry weight was determined by drying the sample at 105°C until a constant weight. Then, the ash content was determined by heating the dry sample at 600°C until a constant weight. The content of organic matter or, volatile solid, was calculated by the difference between the dry weight and the ash weight. The contents in Ca, Mg, K, Cu and Zn were determined by an atomic absorption spectrophotometer Perkin Elmer AAnalyst 200 (Mbonigaba, 2007; Mulaji, 2011). The total P, the Fe and the Mn were determined by an UV-visible molecular absorption spectrophotometer Unicam Helios Alpha (NF T 90 – 024, 1963; APHA, 1992; Rodier, 1966). The total organic carbon (TOC) and the total Kjeldahl N (TKN)

were determined by titrimetry: TOC was determined by oxidization with potassium dichromate and concentrated sulfuric acid (Mulaji, 2011) and TKN by Kjeldahl method (Mze, 2008).

2.2.2. Bioactive substances, total and specific polyphenols in leaves

Bioactive substances

Except saponins, all the active chemical groups in the aqueous extracts of leaves were identified by qualitative colorimetry after the following reactions (Lusakibanza, 2012; Wagner and Bladt, 1966; Angenot, 1973; Vanhaelens, 1994). The aqueous extracts were obtained after steeping under magnetic agitation of 25 g of leaves gunpowder in 400 ml of distilled water during 30 minutes and filtration on membrane.

The saponins were determined by vigorously agitating 5 ml of aqueous extracts in a test tube and formation of persistent foam of at least 1 cm height during 15 minutes. This test is semi quantitative method (Multon, 1991).

The alkaloids were tested by adding some drops of Dragendorff reagent to 3 ml of aqueous extracts, slightly acidified. Positive test was indicated by apparition of an orange-red precipitate.

The flavonoids were identified by adding some drops of reagents of Shinoda, Mg powder and some drops of iso-amylic alcohol to 3 ml of aqueous extracts. The obtained mixture was agitated and let to rest. The presence of flavonoids was indicated by the purplish red color to the red cherry.

The anthraquinones (bound quinones) were identified by energetically mixing the reagent of Borntrager (NaOH 10%) with 3 ml of aqueous extract and apparition of a red color.

The tannins were determined by adding 1 ml of FeCl₃ 2% (Burton reagent) to 2 ml of aqueous extract and a greenish red coloration with or without precipitate, indicates the presence of tannins. The catechic tannins were tested by adding 2 ml of Stiasny reagent to 2 ml aqueous extract. The obtained mixture was heated for 30 minutes in water bath at 90°C. A brown precipitate indicated the presence of catechic tannins. The mixture was furthermore filtered

and saturated with crystals of CH_3COONa . The presence of gallic tannins was indicated by a blackish color after addition of 1 ml of FeCl_3 2%.

The anthocyanins were tested by adding 2 ml of HCl 20% to 3 ml aqueous extracts. Anthocyanin chlorides crystallize with a dark pink to purplish red coloration with increasing temperature.

The leuco-anthocyanins were determined by adding some drops of Shinoda reagent to 3 ml aqueous extracts, then a small quantity of iso-amyl alcohol to develop a purplish coloration in presence of the compound.

Total and specific polyphenols

The concentration of water soluble total polyphenols was determined according to a procedure derived from Singleton and Rossi (1965): in a 25 ml vial, 0.5 ml of aqueous extracts of leaves 1% reacted for 3 min with 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (VWR Prolabo). After addition of 4 ml sodium carbonate solution (1 M) the mixture was brought to 25 ml with demineralized water and homogenized. The absorbance was read at 765 nm after incubation at room temperature for 2 hours in the dark. Gallic acid was used as a reference standard. Some water soluble free polyphenols (pyrogallol, hydroxytyrosol, pyrocatechol and oleuropeine) were quantified by HPLC in the same solution.

HPLC analysis of monomer phenols were performed on a Varian 920 LC using a Varian Pursuit C18 column (125 × 4.6 mm, 5 μm) and a UV-DAD detector. The injection volume was 20 μl and elution was performed at a flow rate of 1.0 ml/min using 0.1% phosphoric acid (Merck) in water (solvent A) and 70% acetonitrile (Chemlab) in water (solvent B). The column temperature was maintained at 40° C. The gradient conditions were as follow: 0–25 min, 10–25% B; 25–35 min, 25–80% B; 35–37 min, 100% B and finally washing and reconditioning steps of the column (40–50 min, 100–10% B). The identification and quantification of phenolic compounds were based on their spectra, their retention times by comparison with phenolic standards (SIGMA) analyzed in the same conditions. The quantification wavelengths were: gallic acid (271 nm); hydroxytyrosol (280 nm); pyrocatechol (275 nm); pyrogallol (265 nm) and oleuropein (231 nm).

2.3. Biogas and methane yields

The BMP assays of leaves (MU or MI) were determined following the procedure described by Rodriguez et al. (2005) and Wang et al. (1994). The tests were carried out in duplicate in 250 ml sterile glass serum bottles filled with 150 ml of a mixture. This mixture consisted of 125 ml of phosphate – carbonate buffer solution (with the pH adjusted to 7.2 with KOH 5 N), 25 ml of anaerobic sludge inoculum and milled leaves. Leaves ground at 1 mm size were used for tests with 250 mg, 1000 mg, 2000 mg dry weight and shredded leaves at 2 cm size were used for the more concentrated test with 9200 mg raw matter. It is to note that the sludge was collected from a 20 liters stirred anaerobic digester used in Walloon Center of Industrial Biology for BMP assays of different agro-food organic wastes. This lab-scale digester was inoculated two years ago with a sludge collected from a full-scale anaerobic digester treating the activated sludge from a municipal waste water treatment plant. The minerals elements and vitamins were not added in the sample bottles considering that those substances should be present in the leaves. Each positive control sample consisted of 0.5 g of glucose monohydrate (GI) added in two times (0.25 g at the beginning and 0.25 g after the 100th day, by adding 2 ml of a 125 g/l aqueous solution by syringe injection through the septum) and 25 ml of inoculum in a 250 ml sterile glass serum bottle containing 125 ml of phosphate – carbonate buffer solution. It is to note that 2 ml of the same GI aqueous solution that the previous, was also added in the samples of MI leaves after the 100th day of the same manner that in positive control samples. This GI addition was a test to discover the reasons of the methanogenesis inhibition. Each blank sample consisted of 25 ml of the anaerobic sludge inoculum and 125 ml of phosphate – carbonate buffer solution. No energetic substrate was added to the blank samples.

When the sample bottles were filled, they were capped tightly with rubber septa and sealed with aluminum seals, and nitrogen was passed into the bottles to flush out air and other gases before the incubation (Hilgsmann et al., 2011). The bottles were then incubated at 30°C, and the composition and volume of biogas produced were periodically measured during 230 days according to the method of CO₂ absorption by KOH, described by Hilgsmann et al. (2011).

Biogas or methane yield was calculated by dividing the measured biogas or methane volume by the theoretical biogas or methane potential from the TOC content of each bottle. The maximum methane production rate was determined as the maximum slope from the cumulative methane production curve.

2.4. Evolution of glucose, ethanol and VFAs

The evolution of glucose, ethanol and VFAs concentrations in samples was analyzed by HPLC. The samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate, acetate, propionate, butyrate, lactate and succinate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as formerly described by Masset et al. (2010).

2.5. Analysis of liquid and solid digestats

After 230 days of anaerobic digestion, the contents of BMP tests were separated in liquid and solid residues by centrifugation and filtration on 0.2 µm cellulose acetate membrane. The solid residues were dried for TOC and TKN analyses. The TOC and the TKN were expressed relatively to the quantity of the digestates resulting from the inoculum or from the total digestates (inoculum and substrates) or from the substrates alone by considering the inoculum DW did not change after the digestion.

3. Results

3.1. Leaves characteristics

The results of physico-chemical analyses of leaves contents in dry weight, ash and organic matter, TOC, TKN and mineral elements are shown in Table 6. The C/N ratio was obtained from the ratio between the TOC and TKN contents and they were approximately of 7 and 48 for MU and MI leaves, respectively.

Tableau 6 Physico-chemical characterization of leaves of MU and MI: dry weight content (DW), ashes and organic matter or volatile solid (VS), total organic carbon (TOC), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and mineral elements

Components	Leaves	
	M U	M I
Dry weight (%)	80.8 ± 0.0	88.7 ± 0.4
Organic matter (% DW)	85.2 ± 0.3	90.3 ± 0.1
Ashes (% DW)	14.8 ± 0.3	9.8 ± 0.1
TOC (mg/g DW)	357.5 ± 14.3	411.6 ± 12.5
TKN (mg/g DW)	50.5 ± 0.8	8.45 ± 0.3
P (mg/g DW)	2.2	0.0
K (mg/g DW)	21.5	6.3
Ca (mg/g DW)	13.9	27.8
Mg (mg/g DW)	4.5	0.9
Fe (mg/g DW)	0.4	0.1
Cu (mg/g DW)	0.0	0.0
Mn (mg/g DW)	0.3	0.0
Zn (mg/g DW)	0.1	0.0

The results of qualitative identification of bioactive substances in aqueous extracts of leaves and further quantitative analysis of total polyphenols and some free specific polyphenols amounts are reported in Table 7. The saponins and 2 mg polyphenols (catechic tannins)/g were found in the MU leaves. No free polyphenol was present in MU leaves among those were analyzed. The MI leaves contained saponins, anthraquinones and 20 mg polyphenols/g like flavonoids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, gallic and catechic tannins. Among the analyzed free polyphenols only gallic acid, hydroxytyrosol, pyrogallol and pyrocatechol were present in MI leaves.

Tableau 7 Bioactive substances and specific and total polyphenols (equivalent gallic acid per g of leaves) in leaves of MU and MI

Components	Leaves	
	MU*	MI*
Saponins	++	+
Flavonoids	-	+
Alkaloids	-	-
Anthraquinones (bound quinones)	-	+
Catechic tannins	+	++
Gallic tannins	-	+
Anthocyanins	-	+
Leuco-anthocyanins	-	-
Total polyphenols (mg/g DW)	2.0	20.0
Gallic acids (mg/g DW)	0.0	5.8
Hydroxytyrosol (mg/g DW)	0.0	0.6
Pyrogallol (mg/g DW)	0.0	9.2
Pyrocatechol (mg/g DW)	0.0	0.4
Oleuropeine (mg/g DW)	0.0	0.0

* - : absence; +: presence; ++: considerable presence.

3.2. Evolution of the anaerobic digestion of MI and MU leaves

3.2.1. Biogas and methane yields

The evolution of the biogas production was monitored in BMP tests carried out to assess anaerobic digestion of MU and MI leaves. The results are presented in Figure 3. No biogas was detected for blank samples. After 230 days of anaerobic digestion, the total volumes of biogas were 206 ± 10.5 ml for the GI samples at concentration of 3.4 g/l, from 40.5 ± 17.5 to 1091.0 ± 5.8 ml for MU leaves at concentrations of 1.7 g/l and 49.5 g/l, respectively and from 0.0 ± 0.0 to 213.0 ± 35.0 ml for MI leaves at concentrations of 1.7 g/l and 54.4 g/l, respectively (Figure 3a, b).

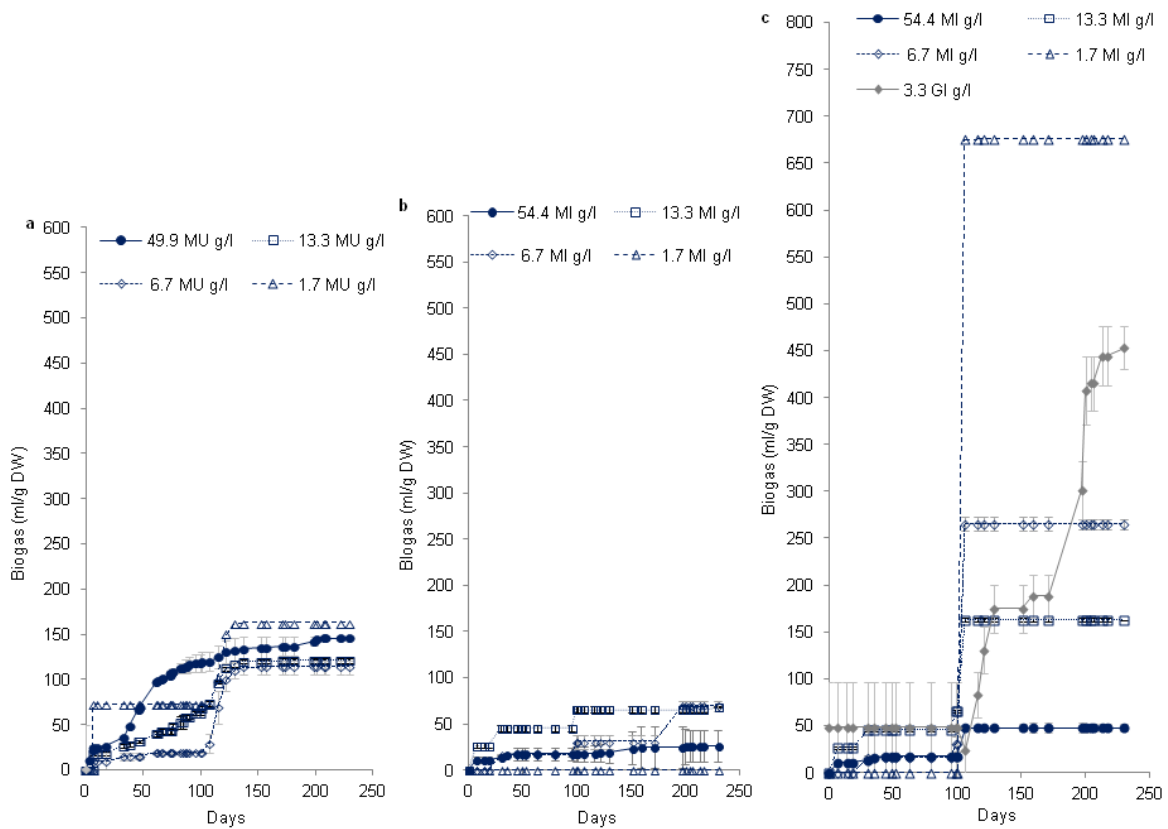


Figure 3 Cumulative production of biogas (ml \pm MD) during the anaerobic digestion of MU leaves alone (a), MI leaves alone (b) and MI leaves with glucose added after the 100th day to discover the reasons of the methanogenic inhibition observed (c) in BMP tests. Concentration of GI sample was 1.7 g/l at the beginning and 3.3 g/l after the 100th day. The MD of the cumulative production of biogas for the MU leaves at concentration of 1.7g/l were generally of ± 4 ml before 100 days and ± 70 ml after the 100th day.

The biogas production after the addition of Gl in the MI leaves samples after the 100th day were from 158.8 ± 6.8 to 243.3 ± 1.6 ml for the mixtures (MI + Gl) at concentrations of (1.7 g MI/l + 1.7 g Gl/l) and (54.4 g MI/l + 1.7 g Gl/l), respectively (Figure 3c).

The results of methane production are shown in Figure 4. No methane was detected for blank samples. The total volumes methane were 85.8 ± 7.2 ml for Gl samples at concentration of 3.4 g/l, from 9 ± 10 to 658 ± 6 ml for MU leaves at concentrations 1.7 g/l and 49.5 g/l, respectively and from 0 ± 0 to 16 ± 7 ml for MI at concentrations of 1.7 g/l and 54.4 g/l, respectively (Figure 4a, b).

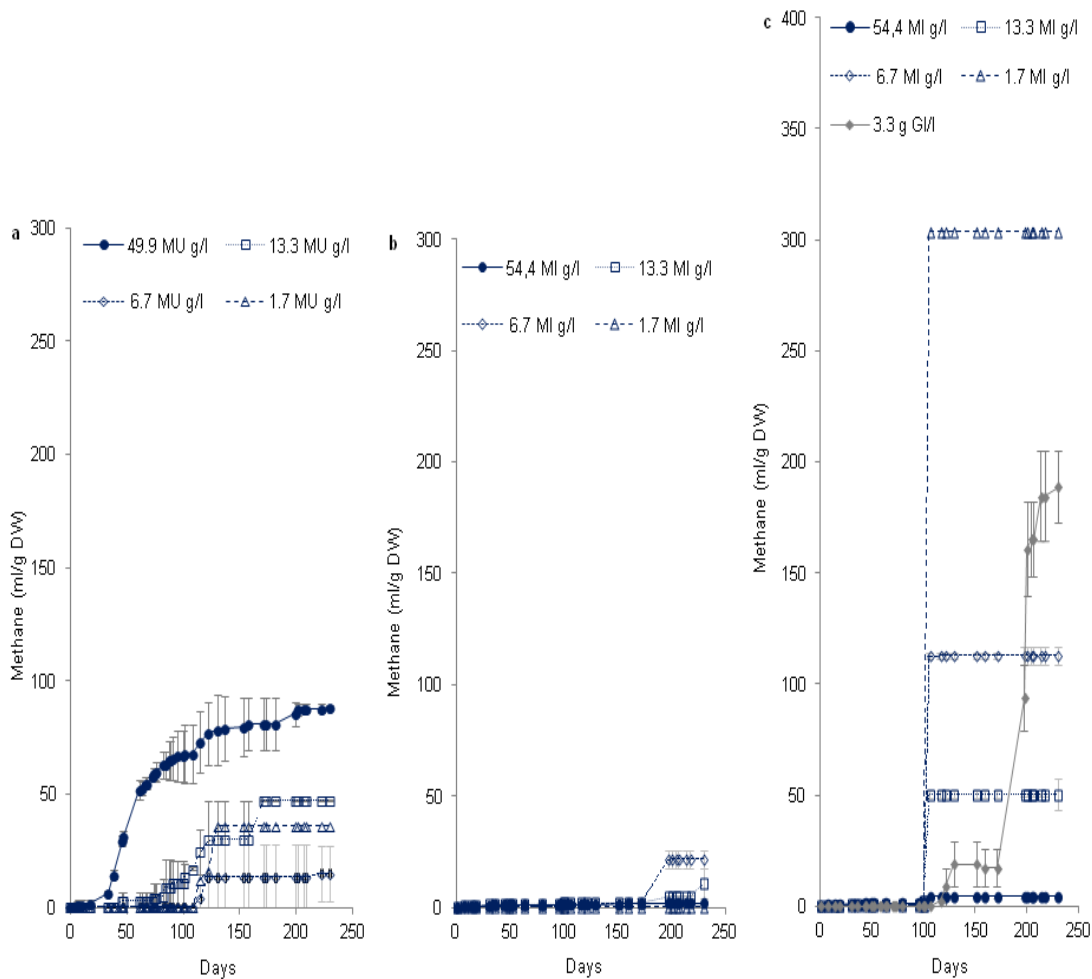


Figure 4 Cumulative production of methane (ml \pm MD) during the anaerobic digestion of MU leaves alone (a), MI leaves alone (b) and MI leaves with glucose added after the 100th day to discover the reasons of the methanogenic inhibition observed (c) in BMP tests. Concentration of Gl sample was 1.7 g/l at the beginning and 3.3 g/l after the 100th day. The MD of the cumulative production of methane for the MU leaves at concentration of 1.7 g/l were generally of ± 0 ml before 100 days and ± 40 ml after the 100th day.

The methane production after the addition of GI in the MI samples after the 100th day were from 75.9 ± 9.9 to 24.8 ± 1.6 ml for the mixtures (MI + GI) at concentrations of (1.7 g MI/l + 1.7 g GI/l) and (54.4 g MI/l + 1.7 g GI/l), respectively (Figure 4c).

The volumetric biogas and methane production were expressed in terms of yields related to the initial TOC of the leaves and are reported in Table 8. The maximum methane production rates calculated for the different concentrations of MU leaves were: 0.39, 0.96, 1.00 and 12.15 ml/day at concentrations of 1.7, 6.7, 13.3 and 49.5 g/l, respectively. The energy amounts available in the biogas calculated from the calorific energy of methane produced from 1 kg of leaves are reported in Table 9.

Tableau 8 Biogas and methane production yields after 230 days of BMP tests at 30°C with GI, MU and MI leaves at concentrations of 1.7 g/l to 54.4 g DW/l

Samples concentrations	Biogas yields (ml/g TOC)	Methane yields (ml/g TOC)
3.3 g GI/l	1203	517
1.7 g MU/l	453	101
6.7 g MU/l	297	92
13.3 g MU/l	338	131
49.5 g MU/l	411	248
1.7 g MI/l	0	0
6.7 g MI/l	167	50
13.3 g .MI/l	81	25
54.4 g MI/l	62	5

Tableau 9 Energy amounts in the resulting biogas production from the anaerobic digestion of 1 kg of MU and MI leaves during 100 and 230 days. According to Shuku (2011), calorific power of methane is 37580 kJ/m^3

Samples concentrations	Methane yields for 100 days (l/g SV)	Methane yields for 230 days (l/g SV)	Energies for 100 days (kJ)	Energies for 230 days (kJ)
3.3 g GI/l	0.000	0.206	0.0	3506.4
1.7 g MU/l	0.000	0.042	0.0	1357.0
6.7 g MU/l	0.000	0.036	0.0	1163.1
13.3 g MU/l	0.023	0.055	743.1	1777.0
49.5 g MU/l	0.100	0.104	3230.9	3360.2
1.7 g MI/l	0.000	0.000	0.0	0.0
6.7 g MI/l	0.000	0.023	0.0	703.2
13.3 g MI/l	0.004	0.012	122.3	366.9
54.4 g MI/l	0.001	0.002	30.6	61.1

3.2.3. Analysis of glucose, ethanol and volatile fatty acids (VFAs)

Concentrations of VFAs, glucose and ethanol in the culture media were measured by HPLC. The VFAs (succinic, formic, acetic, lactic, propionic and butyric acids), glucose and alcohol were released from leaves biodegradation. The glucose, ethanol, succinic and lactic acids were absent in the media.

No VFA was detected in the blank samples. The maximum concentrations of VFAs reached to 1.5 g/l for test with GI, from 0.2 to 6.5 g/l for MU leaves at concentrations of 1.7 g/l and 49.5 g/l, respectively and 0.3 to 10.3 g/l for MI leaves at concentrations of 1.7 g/l and 54.4 g/l, respectively (Figure 5). After 230 days, the concentrations of VFAs were 0 for all concentrations of MU leaves and both the lower concentration of MI leaves. By contrast, they were of 0.2 g/l for the positive test with GI and of 1.4 and 10.3 g/l for MI leaves at concentrations of 13.3 g/l and 54.4 g/l, respectively (Figure 5). Acetic acid was the only one present VFA in GI after 230 days.

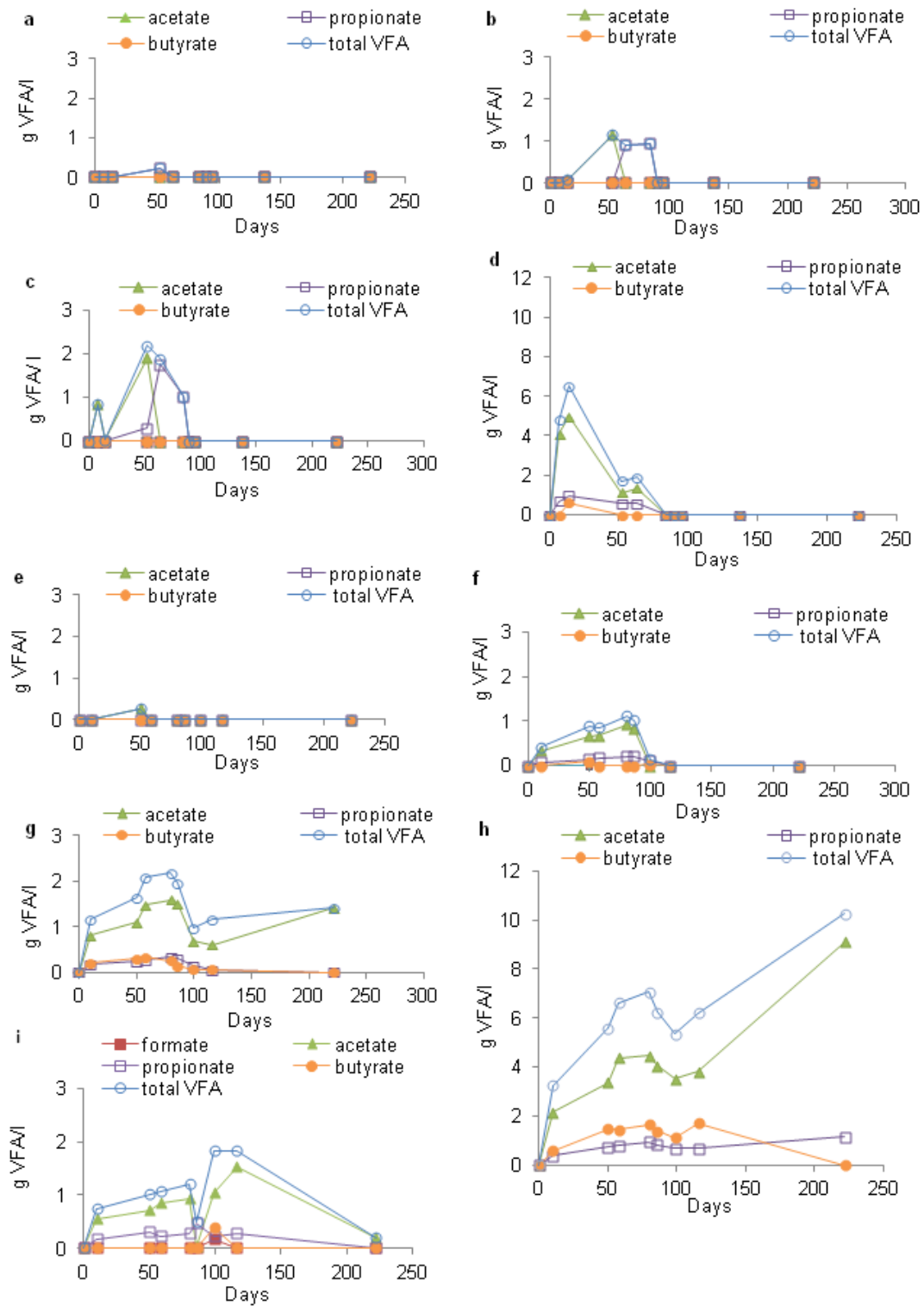


Figure 5 VFAs production during anaerobic digestion of leaves in different concentrations in dry matter; MU leaves: (a) 1.7 g/l, (b) 6.7 g/l, (c) 13.3 g/l, (d) 49.5 g/l and MI leaves: (e) 1.7 g/l, (f) 6.7 g/l, (g) 13.3 g/l, (h) 54.4 g/l and (i) glucose in BMP tests.

The maximum amounts of the acetic acid were 1.5 g/l for GI samples, from 0 to 5 g/l for MU leaves at concentrations of 1.7 g/l and 49.5 g/l, respectively and from 0.3 to 9.1 g/l for MI leaves at concentrations of 1.7 g/l and 54.4 g/l, respectively (Figure 6).

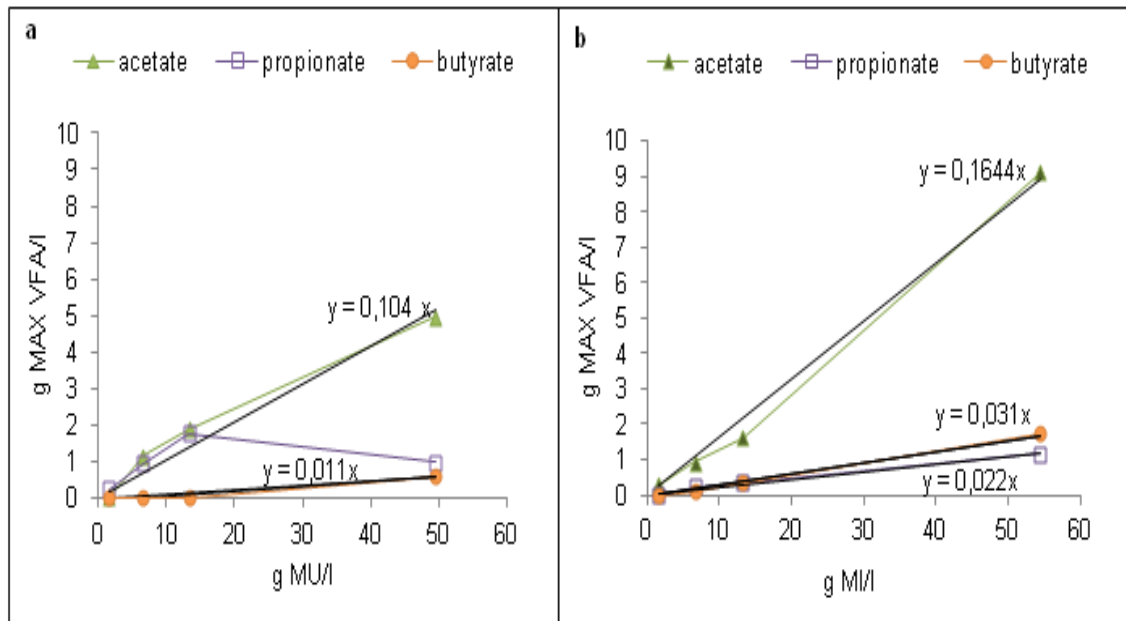


Figure 6 Maximum concentration of each metabolite produced by anaerobic digestion from different concentrations (1.7 to 54.4 g DW/l) of MU leaves (a) and MI leaves (b) in BMP tests.

3.3. Solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion

After the anaerobic digestion, the residues were separated and their TOC and TKN were determined. C/N ratio of the residues were 0.7, 3.2, 1.6, 11.8, 63.6, 48.1, 1.7, 12, ∞ (infinity) and 52.5 for liquid residue of blank sample, solid residue of blank sample, total liquid residue of MU leaves, total solid residue of MU leaves, total liquid residue of MI leaves and total solid residue of MI leaves, respectively (Table 10).

Tableau 10 TOC and TKN contents in the solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion in BMP test with 49.5 g MU/l and 54.4 g MI/l

Components	Digestates states		Total digestates				Substrates alone			
	Liquid inoculum	Solid Inoculum	Liquid MU	Solid MU	Liquid MI	Solid MI	Liquid MU	Solid MU	Liquid MI	Solid MI
TOC (mg/g)	25.0 ± 1.7	56.7 ± 3.0	29.9 ± 0.3	428.5 ± 0.0	62.1 ± 0.0	420.0 ± 0.0	28.7 ± 0.1	425.5 ± 0.0	61.0 ± 0.0	417.5 ± 0.0
TKN (mg/g)	35.2 ± 0.0	17.8 ± 2.2	18.0 ± 0.3	36.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	8.73 ± 0.0	16.8 ± 0.0	35.5 ± 0.0	0	8.0 ± 0.0
C/N	0.7	3.2	1.6	11.8	63.6	48.1	1.7	12.0	∞	52.5

4. Discussion

4.1. Biogas yields

The total biogas volumes produced after 230 days of incubation increased with leaves concentrations (Figure 3). This trend was confirmed by the yields (Table 8) which were from 310 to 411 ml/g TOC for MU leaves and from 0 to 62 ml/g TOC for MI leaves. They represented about 17 to 22% of the theoretical yields for MU leaves. That corresponded to the production of half a mole of methane and half a mole of carbon dioxide from one mole of TOC. By contrast, the yields recorded for MI leaves represented about 9% of the theoretical yield at a concentration of 6.7 g leaves/l and not more than 3% at higher concentrations. A delay before start of biogas production should also be linked to leaves concentration. Indeed, the biogas production in BMP tests with 13.3 and 49.5 g MU/l produced biogas rapidly after inoculation whereas the experiments with lower DW contents began to produce biogas after nearly 3 months of incubation although pH conditions were suitable, between 6.5 and 7.2. These results showed that leaves specific size of 2 cm in the test with 49.5 g/l for MU leaves and also 1 mm in the tests with lower concentrations had no effect on the biogas production and confirmed the hypothesis that particle sizes in the millimeter to centimeter range would not significantly expose more surface area and would thus exhibit similar kinetics (Chynoweth et al., 1993). It should also be noticed that for MI leaves no biogas production was recorded at concentration of 1.7 g/l. Moreover, the cumulative biogas curve with 6.7 g MI/l overlapped that with 13.3 g/l after 197 days of digestion.

4.2. Methane yields

Regarding cumulative methane production depicted in Figure 4, only a few CH₄ could be produced from 1.7 g MU/l, 6.7 g MU/l and the experiments with MI leaves. Moreover, CH₄ was only detected in biogas from the 6th and 46th day of culture for the MU leaves at concentrations of 13.3 and 49.5 g/l, respectively while biogas production has started from the beginning of incubation. These results suggest that about 1.7 g MU/l and 6.7 g MU/l are needed to enable sufficient growth and respiration (producing mainly CO₂) of microflora before methane production if any from still available carbon. By contrast, the high methane production rate of 1.6 ml/g.day measured at concentration of 49.5 g MU/l suggests that a highly efficient anaerobic digestion occurred without limitations although the leaves were not

fine shredded and their C/N ratio of about 7 (Table 6) was significantly different regarding the range from 20 to 30 commonly recommended for optimal anaerobic digestion (Mital, 1996). Therefore, these results would suggest that a lack of suitable environmental conditions for methanogenesis was evidenced in the BMP tests with MU leaves at concentrations lower than 13.3 g DW/l or with MI leaves at any concentrations. The methane yields reported in Tables 8 and 4 confirmed this hypothesis since when comparing to the biogas yield of about 20%, related to theoretical biogas production, only the experiment with MU leaves at concentration of 49.5 g/l reaches a similar level of 27% CH₄ yield related to theoretical methane production. Even the BMP test with MU leaves at 13.3 g/l achieved a quite low relative CH₄ yield of 14%. By comparison to other leaves mentioned in the literature according to Gunaseelan (2004), only the yield at the concentration of 49.5 g MU/l was in the range but it was slightly low.

Although leaves of MI had similar organic matter content than leaves of MU (Table 1), they have produced a quite lower biogas volume for 230 days of anaerobic biodegradation. The extensive investigation of the leaves composition showed that the MI leaves contained lower amounts of nitrogen, mineral elements in general and microelements in particular and high presence of various bioactive components when comparing to MU leaves (Tables 6 and 7). Except for calcium that was half of the calcium content of MI leaves (Table 6). In addition to these substances identified in this work, MI leaves contain too the lignin (Nyamangara et al., 2009). Many papers had shown that lignin affects the digestibility and biogas production performance (Oliveira et al., 2007; Kamdem et al., 2013). Biogas production in GI samples indicated that the inoculum contained nutrients capable to start the methanization. Indeed, the C/N ratio of 48 of MI leaves is high, comparatively to the ratios between 20 and 30 required for optimal anaerobic digestion (Mital, 1996). However, these characteristics should not prevent methanogenic biodegradation to develop. This argument was confirmed by methane production from GI and MI leaves at low concentrations for example at 6.7 g/l because maybe the C/N ratio in the culture media was 18 near of the optimal value thank to the low inoculum C/N ratio of 2.6 (Figure 4b, c). It is necessary to note that the inoculum-to-culture medium ratio was 1/6 (v/v). The low biogas or methane production from 6.7 g MI/l in relationship to its TOC content could be explained by the effects of saponins, anthraquinones and polyphenols (20 mg/g). These substances contain hydrocarbon chain and cycle and, benzene rings that are difficult to be degraded by microorganisms; except, by specific microorganisms which seem not to be present in the inoculum or in the suitable conditions (e.g. aerobes). The methane yields for 100 days expressed according to Owen et al. (1979)

and Gunaseelan (2004) for MI leaves are reported in Table 9. These yields would explain the low degradation kinetics or the low gas production but not the total inhibition of the methanogenesis from MI leaves after a very few methane production (Figure 4b, c). After the 100th, GI would also enable growth and metabolism of specific microorganisms able to further degrade MI leaves compounds or it would release nutrients enabling microorganisms to degrade MI leaves. In spite of it, the methane yields of MI leaves at different concentrations recorded were the lowest of those of known leaves. According to the review of Gunaseelan (2004), leaves with high yields of methane achieve about 0.430 l/g VS added and in general, the CH₄ yields of leaves are in the range from 0.120 to 0.430 l/g VS. By comparison, Mahamat et al. (1989) reported methane yield of about 0.280 l/g VS for Calotropis, a plant from Sahel. They argued that this low yield would be due to the presence of some toxic compounds such as a strong cardiotoxic that may partly inhibit the digestion process (Gunaseelan, 1997).

By comparison to MI leaves, MU leaves produced biogas with a high energy amount at high concentrations representing up 7% of the calorific power of wood after 100 days (Table 9). By contrast, MI leaves produced a biogas with a weak energy amount at low concentrations nearly 2% of the calorific power of wood after 230 days (Table 9). It should be known that according to Shuku (2011), calorific powers of methane and wood are 37580 kJ/m³ and 16736 kJ/kg, respectively.

4.3. Evolutions of glucose, ethanol and volatile fatty acids (VFAs)

In general, the total quantities of VFAs increased with the leaves amounts in the bottles. The concentrations were similar in the BMP tests carried out with the same leaves contents of MU or MI leaves. This suggests that hydrolysis and acidogenesis processes were efficient whatever the organic matter. This is confirmed by Figure 9 since, except for propionate produced by MU leaves, the maximum concentration of each VFA measured in the different BMP tests, was proportional to initial substrate concentration and similar trends were recorded for MU and MI leaves. The concentrations of MU or MI leaves (1.7 and 6.7 g/l) further were converted to biogas. Therefore, these results show that the low yields and conversion rates of MI leaves to methane would especially be due to the concentrations and

the synergism of their bioactive compounds (Chen et al., 2008) and probably to carbon conversion for all biomass formation.

A few negative effects appeared in the MU leaves at low concentrations for instance at 6.7 g/l where the VFAs maximum production was low (Figures 5a, b and 6a). It was observed an increase of the pH from 7.4 to 7.9 that could be explained by the release of the ammonia in the culture medium thus also leading to a slow methane production (Figure 4a) and a low methane yield. The effect of free ammonia would become 0 at 13.3 and 49.5 g MU/l and there was an increase of the pH from 6.8 to 7.9. It is necessary to know that the instability process due to ammonia often results in VFAs accumulation, which again leads to a decrease in pH and thereby declining concentration of free ammonia. Wherefore the interaction between free ammonia, VFAs and pH may lead to an “inhibited steady state”, a condition where the process is running stably but with lower methane yield (Chen et al., 2008; Angelidaki and Ahring, 1993; Angelidaki et al., 1993). Furthermore, the propionate profile for MU leaves with a lower maximum production at 49.5 g/l than at 13.3 g/l (Figure 6) suggests the presence of improving substances for propionate conversion to acetate. Thus, all volatile fatty acids produced from MU biomass were converted to biogas even at the very high leaves concentration of 49.5 g/l although, by comparison to MI leaves, the leaves of MU contained a considerable amount of saponins and a total polyphenols content of 2 mg/g. According to Multon (1991), the saponins are minor compounds of plants.

By contrast, acetate accumulation was observed in the bottles containing MI leaves at 13.3 g/l and 54.4 g/l (Figure 5g, h). After 90 days of incubation, in the media of MI leaves at 13.3 g/l and 54.4 g/l, some amounts of acetate were consumed without significant production of neither CH₄ and nor CO₂. That could be related to the metabolic pathway of reversible homoacetogenic bacteria that are frequently detected in anaerobic digesters however their activity is not yet well understood (Luo et al., 2011; Wang et al., 2013). Accumulation of propionate in the bottles of MI leaves at 54.4 g/l was also recorded. Thus, there was not acetogenesis, nor methanogenesis obvious for MI leaves at 54.4 and g/l 13.3 g/l, respectively (Figure 5g, h). That was observed from propionate accumulation. According to the literature, the accumulation of VFAs is an indicator of an inhibition (Chen et al., 2008). In our case, the accumulation of acetate and propionate would not be due to the high C/N ratio of MI leaves in these concentrations. The results obtained after the addition of glucose in the culture media after 100 days of incubation showed a further production of methane and biogas (Figures 3 c and 4 c). They demonstrate that these inhibitions were due not only to the high C/N ratio but

especially to the increase of contents in bioactive matters of MI leaves in the culture media and to their synergic effect. Indeed, the higher concentration of 10.3 g VFAs/l observed in Figure 5h, would not completely inhibit the methanization according to Buffiere et al., (2007). Furthermore, these inhibitions were partial. That could be explained by the presence of some resistant methanogenic bacteria in culture media such as methanobacterium formicium and methanococcus vannelli which transform H₂, CO₂ and formate into methane.

Consequently, only a little amount of the VFA produced from MI leaves were converted in methane comparatively to MU leaves. That might be correlated to the high content of MI leaves in various bioactive substances (saponins, anthraquinones, flavonoids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, gallic and catechic tannins) and especially in 20 mg total polyphenols/g DW. These bioactive substances are inhibitory of methanogenesis (Macheboeuf et al., 2011; Patra and Saxena, 2010; Kamra et al., 2008). Furthermore among the water-soluble polyphenols, MI contained a high quantity of pyrogallol (Table 2). This kind of monomeric phenols would be more inhibitive than the polymers (Hobson and Wheatley, 1993). The aqueous extracts of MI leaves were already reported to be rich in polyphenols and to possess an antimicrobial activity (Masibo and He, 2009; Nunez-Selles, 2005). Indeed, aromatic ring compounds, particularly polyphenols may exert toxicity at 700 mg/l (Gerardi, 2003). However, in this study, the tests of MI leaves at concentrations of 13.3 g/l and 54.4 g/l have given 267 mg/l and 1093 mg/l of polyphenols, respectively without taking into account other aromatic ring compounds such as the anthraquinones.

4.4. Digestates

At the end of anaerobic digestion, the contribution of the inoculum in components in the total residues was from 0.1 to 0.2%. Thus, the components contents in the total digestates and in the digestates resulting from the leaves alone were similar (Table 5). The nitrogen concentration in the total residual liquid solution of MU leaves was of 856 mg/l (13.0 mg/g) (Table 5); this concentration was lower than the inhibitory (1500 mg/l) at pH 6.5-7.2 reported by Gerardi (2003). That could explain why although the nitrogen content in MU leaves was high, there was no adverse effect (Gerardi, 2003). The liquid residue of MU leaves with a C/N ratio of 1.6 was rich in nitrogen and so it could be used as fertilizer for plants (Hobson and Wheatley, 1993). The solid residue of MU leaves had a C/N ratio of 11.8 that was similar to

10, considered as optimal for soil organisms and soil-conditioning (MCDF, 1993; Ducat and Bock, 1995; Davet, 1996; Mze, 2008). This C/N ratio would avoid competition between microorganisms and plants for their growths although the C/N ratio is not the index of the absolute quality of organic matter (Mze, 2008). In general, digested sludges of plant are generally decomposed in the soil slower than are the original materials. This slow decomposition has advantage as it preserves the fibers structure as soil conditioner and leaves readily available ammonia nitrogen to plants instead of its being used by microbes growing rapidly on sludge constituents (Hobson and Wheatley, 1993). Furthermore, these residues should contain mineral elements e.g. K (Table 6) and microorganisms able to boost the enzymatic and microbial activities in the soil. They would be good fertilizers for vegetables. They could be used without being separated by spreading them on the soil. By contrast, the solid residue of MI leaves with a C/N ratio of 48.1 and its liquid residue rich in carbon with a C/N ratio of 63.6 due to high content of VFAs (Figures 5 and 6) and inerte organic substances. These residues cannot be used as fertilizer since they would cause pollution (Anid, 1983; Hobson and Wheatley, 1993). By contrast, the residues of MI leaves at concentration of 6.7 g/l, exempt of VFAs were a poor and inadequate source of nitrogen for plant growth in the short term. They could contribute to soil organic matter build-up in the long-term. According to the organic resource data base developed by Palm et al. (2001), these materials should be mixed with nitrogen fertilizer before application to soil in order to reduce the negative effects of nitrogen immobilization (Nyamangara et al., 2009).

5. Conclusion

In this paper, BMP tests were carried out at mesophilic temperature (30°C) with leaves from two common tropical trees. The results proved that the methanogenic biodegradation of MU leaves alone is feasible for any amount of leaves up to 61.3 g/l shredded at 2 cm size or lower. Moreover, the methanogenic kinetic was very efficient at this amount and without addition of nutrients. However, the methane yield is relatively low, 0.1 l CH₄/g VS for 100 days of incubation when comparing to other leaves. It could probably be due to the low C/N value and inability of microorganisms to degrade the cycles or chain from complex molecules such as saponins and polyphenols. However, these bioactive organic molecules did not inhibit the anaerobic digestion process. Furthermore, the residues from anaerobic digestion of MU leaves could represent efficient fertilizers for the promotion of the biological vegetable garden.

Therefore, this study showed that it is possible to transform at the ambient temperature this waste biomass into biofuel and biofertilizer on the same time particularly in Kinshasa and generally in tropical regions. This could be beneficial in the context of eliminating the environmental pollution caused by this biomass. By contrast, whereas acidogenic biodegradation of MI leaves were observed at the concentrations of 13.3 g/l and 54.4 g/l including homoacetogenic metabolism. The methanogenesis seemed to be inhibited. Our results suggest that this inhibition did not depend on the high C/N ratio nor on the generally low content in mineral elements but especially on the content of bioactive compounds such as saponins, anthraquinones and polyphenols (flavonoids, anthocyanins, gallic and catechic tannins and other monomeric phenols indentified) and their synergic effect. At concentrations equal or higher than 13.3 g MI/l, the anaerobic digestion of MI leaves could be thus served to valorize the residual fluxes (volatile fatty acids and the aromatic compounds) of bio-cascading pathways. However, this work demonstrated the possibility to produce methane at concentrations less than 13.3 g/l of MI leaves without inhibition although with a low methane yield for example 0.023 l/g VS after 230 days. In this case, their residues were exempt of VFAs, poor in nitrogen and they would be better than compost of MI leaves and could contribute to soil build up organic matter or use in combination with other fertilizer. Further investigations will be carried out on the improvement of anaerobic degradation of MI leaves at concentrations higher than 13.3 g/l and on the specific effects of bioactive substances on methanogenic biodegradation in order to determine the real inhibitors of anaerobic digestion of MI leaves and the way to overlap it to optimize the biodegradation of both leaves in co-digestion.

6. References

- Angelidaki I, Ahring B (1993) Thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:560–564.
- Angelidaki I, Ellegaard L, Ahring BK (1993) A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: ocusing on ammonia inhibition. *Biotechnol Bioeng* 42:159–166.
- Angenot L (1973) Contribution à l'étude du strychnos usambarensisgilg, principal constituant d'un poison de chasse curarisant africain. Université de Liège, Thèse de doctorat.

- Anid PJ (1983) Contribution à la caractérisation des composts des déchets urbains: Evaluation de leur état de maturation et des risques éventuels de contamination métalliques des cultures. Thèse de doctorat, Gembloux, FUSA, Gembloux, Belgique.
- APHA (1992) Standard methods for the examination of water and waste water: method 4500 P-E- Heteropoly blue Method, 18th edn. Washington. Merck. Notice d'utilisation du kit Spectroquant Phosphates, Greenberg, Clesceri, Eaton Editors.
- Barakat A, Monlau F, Steyer JP, Carrere H (2012) Effect of lignin derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour Technol* 104:90–99.
- Buffiere P, Carrere M, Lemaire O, Vasquez J (2007) Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides : Projet METHAPI-Expertise, Centre de Recherche Propreté & Energie.
- Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T (2012) Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes. *Renew Sust Energ Rev* 16:1462–1476.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol* 99:4044–4064.
- Chynoweth DP, Turick CE, Owens JM, Jerger DE, Peckq MW (1993) Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass Bioenergy* 5: 95–111.
- Davet P (1996) Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris.
- Ducat N, Bock L (1995) Etat organique des terres agricoles en Hesbaye. In: Geypens Met Honnay JP (ed) *Matières organiques dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*. Comité de recherche sur la matière organique du sol, Bruxelles: I.R.S.I.A, pp 33–43.
- Gerardi MH (2003) *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Willey et Sons, Inc, p 107.
- Gunaseelan VN (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. *Biomass Bioenergy* 13: 83–114. Gunaseelan VN (2004) Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass Bioenergy* 26: 389–399.
- Hiligsmann S, Masset J, Hamilton C, Beckers L, Thonart P (2011) Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresour Technol* 102: 3810–3812.
- Hobson PN, Wheatley AD (1993) *Anaerobic digestion modern theory and practice*. Elsevier applied science, London and New York, pp 21–232.

- Kamdem I, Tomekpe K, Thonart P (2011) Production potentielle de bioéthanol, de biométhane et de pellets à partir des déchets de biomasse lignocellulosique du bananier (*Musa spp.*) au Cameroun. *Biotechnol Agron Soc Environ* 15(3): 461–473.
- Kamdem I, Hiligsmann S, Vanderghem C, Bilik I, Paquot M, Thonart P (2013) Comparative biochemical analysis during the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass from six morphological parts of Williams Cavendish banana (Triploid *Musa* AAA group) plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29(12): 2259–2270.
- Kamra DN, Patra AK, Chatteerjee PN, Kumar R, Agarwal N, Chaudhary LC (2008) Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal Experimental Agriculture* 48:175–178. doi: 10.1071/EA07268.
- Luo G, Karakashev D, Xie L, Zhou Q, Angelidaki I (2011) Long term of inoculums pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol Bioeng* 108: 1816–1827.
- Lusakibanza M (2012) Etude phytochimique et pharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle congolaise. Université de Liège, Thèse de doctorat, pp 130–135.
- Macheboeuf D, Bergeault R, Papon Y, Arturo-Schaan M (2011) Effets comparés de trois sources de saponines extraites de *Yucca schidigera*, *Quillaja Saponaria* ou *Trigonella foenum-graecum* sur les fermentations ruminales in vitro et les émissions de méthane. *Renc Rech Ruminants* 18: 135.
- Mahamat AY, Gourdon R, Leger P, Vermande P (1989) Methane recovery by anaerobic digestion of cellulosic materials available in Sahel. *Biological Wastes* 30: 181–197.
- Mambanzulua N, Kayembe K, Noki V (1999) Détermination des activités méthanogéniques spécifiques des lisiers dans le traitement anaérobie des déchets. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 64(1): 183–188.
- Masibo M, He Q (2009) In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology* 5: 73–80.
- Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, Beckers L, Franck F, Thonart P (2010) Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-production *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *Energy, International Journal of Hydrogen*.

- Mbonigaba MJJ (2007) Etude de l'impact des composts à base de biomasse végétale sur la dynamique des indicateurs physico-chimiques, chimiques et microbiologiques de la fertilité des sols: application sur trois sols acides tropicaux du Rwanda. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques Gembloux, Belgique, Thèse de doctorat.
- MCDF (1993) Memento de l'agronome Paris : 4ème éd (réimpression), collection techniques rurales en Afrique Ministère de la coopération et du développement (France).
- Mital KM (1996) Biogas systems: principles and applications. New Age International Publishers Limited, New Delhi.
- Mulaji KC (2011) Utilisation des composts de biodéchets ménagers pour l'amélioration de la fertilité des sols acides de la Province de Kinshasa (Rép. Dém. du Congo). Thèse de Doctorat, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Gembloux, Belgique.
- Multon JL (1991) Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Vol 4, analyses des constituants alimentaires. Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 370–380.
- Mze SP (2008) influence d'apports en matières organiques sur l'activité biologique et la disponibilité du phosphore dans deux sols de la région des grands lacs d'Afrique. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire de Sciences Agronomique de Gembloux, Belgique.
- NF T 90 – 024 (1963) Essais des eaux, dosage spectrophotométrique du manganèse, AFNOR, Paris.
- Nunez-Selles AJ (2005) Antioxidant Therapy: Myth or reality? Journal of Brazilian Chemical Society 16: 699–710.
- Nyamangara J, Mtambanengwe F, Musvoto C (2009) Carbon and nitrogen mineralization from selected organic resources available to smallholder farmers for soil fertility improvement in Zimbabwe. Afr J Agric Res 4: 870–877.
- Lelo N(1999) La gestion des déchets domestiques: bilan annuel d'une expérience pilote de l'Hôtel de Ville de Kinshasa. Med Fac Landbouww Univ Gent 64(1): 107–114.
- Oliveira L, Cordeiro N, Evtuguin DV, Torres IC, Silvestre AJD (2007) Chemical composition of different morphological parts from *Dwarf Cavendish* banana plant and their potential as non-wood renewable source of natural products. Ind Crops Prod 26: 163–172.
- Owen WF, Stuckey DC, Healey JB, Young LY, McCarty PL (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity, Water Res 13: 485-492.
- Palm CA, Gachengo N, Delve RJ, Cadisch G, Giller KE (2001) Organic inputs for soil fertility management in tropical agroecosystems: application of an organic resource database. Agric Ecosys Environ 83: 27–42.

- Patra AK, Saxena J (2010) A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71:1205–1217, 10.1016/j.phytochem.2010.05.010.
- Rodier J (1966) *Analyse de l'eau*. 8^e édition Dunod, Paris.
- Rodriguez C, Hiligsmann S, Ongena M, Charlier R, Thonart P (2005) Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation* 16: 415–422.
- Shuku NO (2011) Impact de l'utilisation de l'énergie-bois dans la ville province de Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC). Université du Québec. Montréal, Mémoire.
- Shyam M, Sharma PK (1994) Solid-state anaerobic digestion of cattle dung and agro-residues in small capacity field digesters. *Bioresour Technol* 48: 203–207.
- Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult University of California* 16(3): 144–158.
- Vanhaelen M (1994) Identification de matières premières d'origine végétale par chromatographie planaire et microscopie à l'usage du pharmacien d'officine. Rapport mi-projet.
- Vögeli Y, Lohri CR, Gallardo A, Diener S, Zurbrügg C (2014) *Anaerobic Digestion of Biowaste in Developing Countries: Practical information and case studies*, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). Dübendorf, Switzerland.
- Wagner H, Bladt S (1966) *Plant drug analysis*. Springer Verlag, Berlin.
- Wang YS, Byrd CS, Barlaz MA (1994) Anaerobic biodegradability of cellulose and hemicellulose in excavated refuse samples using a biochemical methane potential assay. *J Ind Microbiol* 13: 147–153.
- Wang J, Liu H, Bo F, Kewei X, Chen J (2013) Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. *Biochem Eng J* 70: 1–8.

Chapter IV: Impact of different plant secondary metabolites addition: saponin, tannic acid, salicin and aloin on glucose anaerobic co-digestion

In press in *Fermentation Technology*

Philippe Mambanzulua Ngoma^{ab}, Serge Hiligsmann^a, Eric Sumbu Zola^c, Marc Ongena^a,
Philippe Thonart^a

a: Walloon Center of Industrial Biology (CWBI), Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030, Gembloux, Belgium

b: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 212, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

c: Faculty of Agricultural Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 117, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

Avant propos

Il est démontré dans le chapitre précédent que la biodégradation anaérobie des feuilles de MI serait inhibée surtout par leurs métabolites secondaires ou substances bioactives plutôt qu'à cause de leur rapport C/N élevé. C'est ainsi que dans ce chapitre, un examen de l'influence de ces métabolites sur la méthanisation est mené en se servant du glucose comme substrat de contrôle. Cette étude est effectuée pour établir le lien entre les potentiels d'inhibition et les structures moléculaires des métabolites et évaluer les potentiels d'inhibition de chaque substance bioactive pour sa propre méthanisation et pour celle du glucose.

En effet, 4 groupes chimiques actifs ont été identifiés dans les feuilles par screening chimique précédemment. L'extraction et l'isolement de ces métabolites secondaires à partir des feuilles étant compliqués, 4 métabolites secondaires commerciaux similaires aux 4 groupes chimiques ont été utilisés comme modèles à leur place. Il s'agit de la saponine de *Quilaja saponaria molina pract*, l'acide tannique, la salicine et aloïne de *Curacao aloe*; représentant respectivement aux saponines, aux tannins, aux glucosides alcooliques et aux anthraquinones.

Pour les essais, chaque métabolite est mélangé avec le glucose en vue d'être converti en méthane dans une bouteille de sérum. La production du biogaz et du méthane émanant de ladite méthanisation est suivie dans le temps au moyen de la méthode d'absorption de CO₂ par

le KOH et la composition du biogaz est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. En outre, les concentrations du glucose, de l'éthanol et des acides gras volatils produits dans les milieux de culture sont dosés par HPLC pour suivre en fonction du temps les mécanismes de la biodégradation anaérobie de ces mélanges et déceler une quelconque inhibition. A la fin de l'incubation, le rendement de la production du biogaz ou du méthane de chaque métabolite est calculé ainsi que le degré ou le potentiel d'inhibition de la production du biogaz ou du méthane.

Abstract

Vegetal waste and some wastewater of agro-food industries contain plant secondary metabolites (PSMs).

It was shown in nutritional researches that these substances such as saponins and tannins reduce the methane production in the rumen. However, to our knowledge no study was done in the waste treatment domain to evaluate the inhibitory effect of the principal glycosidic metabolites from the wastewater or vegetal waste on their own methane-producing anaerobic digestion. Therefore in this paper BMP tests were carried out at 30°C with four commercial PSMs (CPSMs) in mixture with glucose monohydrate (Gl). BMP test with the sole glucose substrate was used as control sample. These CPSMs were saponin from *Quilaja Saponaria* Molina Pract (Sap), tannic acid (Tan), salicin (Sal) and aloin from *Curacao Aloe* (Alo) representing respectively saponins, tannins, alcoholic glycosides and anthraquinones sources. Acidogenesis and acetogenesis were recorded for all the mixtures of Gl and CPSMs however their conversion rates decreased with increasing concentrations of CPSMs. By contrast, the methanogenesis was inhibited at concentrations of CPSMs above 0.3 g/l. The inhibition degree for aromatic compounds on the anaerobic biodegradation of Gl seemed to depend directly on the concentration of benzene rings in the medium and the synergism between metabolites. Thus, the highest inhibition of biogas production from Gl was recorded for Alo,

followed by Sap, Tan and Sal. Regarding methane the order was different *i.e.* Sap, Alo, Tan and Sal respectively for decreasing inhibition level.

Therefore, the concentration of PSMs in mixture or alone in a digester should be below 0.3 g/l for a better methanization

Keywords: anaerobic digestion; biogas; methane; inhibition effect; plant secondary metabolite

1. Introduction

Plants produce different kind of secondary metabolites to protect themselves against microbial and insect attacks (Wallace, 2004; Patra and Saxena, 2010). These plant secondary metabolites (PSMs) considered as bioactive compounds were used for long times in medicine and preservation of foods (Patra and Saxena, 2010). As a consequence, these compounds can be present in wastewater coming from agro-food, pharmaceutical and chemical industries or in vegetal wastes. The water-soluble PSMs such as saponins, polyphenols, alcoholic glycosides and bound quinones (anthraquinones) may inhibit directly the microorganisms present in the effluents. Therefore, anaerobic biodegradation processes of these solid wastes and industrial effluents may be limited by inhibition of the methanogenic archaea since they are very sensitive to this molecule type. The production of biogas can be low or nil and the organic matter contained in the effluent is not reduced. Also, these compounds potentially reduce the ability to produce biofuels by biomass fermentation (Hernandez and Edyvean, 2008). These solids or effluents poured in the nature can be the basis of pollution.

The saponins, tannins and anthraquinones have been shown to be toxic for microorganisms and to suppress methane production in animal nutrition researches (Patra and Saxena, 2010; Beauchemin et al., 2008; Kamra et al., 2008; Macheboeuf et al., 2011) also in a recent study on the waste treatment achieved by Mambanzulua et al. (2015). However, to our knowledge, few works are published on the evaluation of methanogenic inhibition process by PSMs in anaerobic digestion processes treating wastes. Consequently, there is a lack of information about the toxic effects and about potential inhibition. Some publications about non glycosylated phenolic monomers are focused on the evaluation of the inhibitory effects of aromatic structure on methanogenesis (Hernandez and Edyvean, 2008; Kayembe et al., 2012;

Kayembe, 2013). There are also some inconsistencies about methane inhibition, for instance in studies on saponins (Patra and Saxena, 2010). Besides, the information available on the methanogenic fermentation of phenolic compounds is fragmented and sometimes contradictory, and lacks of consistent use of units for reporting biomass concentration. That does not allow comparing the anaerobic degradation of these compounds (Hernandez and Edyvean, 2008).

In the recent decade a limited number of studies has been published on the effect of PSMs on the enteric methanogenesis (Patra and Saxena, 2010). However, these studies have been based on the reduction of methane production by adding PSMs in diet. Less attention has been given to the correlation of PSMs structure and their toxic effects on the population of anaerobic bacteria. However, the knowledge of the PSMs structures on the inhibition effect on biogas biosynthesis is essential in predicting the impact of these xenobiotics on industrial methanization and wastewater treatment. Consequently in order to prevent potentially costly upsets of treatment plant operations, a better understanding of the structure-toxicity relationships is needed to enable the application of anaerobic digestion technologies to solid waste and wastewater containing PSMs.

The literature on anaerobic digestion shows considerable variation in the inhibition or toxicity levels reported for most substances. The major reason for these variations lies in the complexity of anaerobic digestion processes where factors such as nature of inoculum and substrate, and mechanisms such as antagonism, synergism, acclimation and complexation could significantly affect the inhibition phenomenon (Chen et al., 2008).

The present paper aims to study the impact of glycosidic PSMs on the anaerobic digestion with or without co-substrate glucose for methane production and also their effects on the biogas biosynthesis according to their chemical structures. Therefore biochemical methane potential (BMP) tests according to Owen et al. (Owen, 1979) have been carried out with four commercial PSMs (CPSMs): tannic acid, salicin and aloin, all being aromatic compound, and saponin, a non aromatic substance. Biogas volume and composition and volatile fatty acids (VFAs) productions were monitored in order to establish the link between chemical structures and biological processes of biogas production and methane synthesis.

2. Materials and methods

2.1. Characters of substrates

The saponin from *Quilaja saponaria molina pract* (Sap), tannic acid (Tan), salicin at 99% purity (Sal) and aloin from *Curacao aloe* at nearly 50% purity (Alo) were used as references for the saponins, tannins, alcoholic glycosides and anthraquinones, respectively. All the CPSMs were obtained from Sigma-Aldrich, St-Louis, USA; except, Sap that comes from Acros Organics, Geel, Belgium. Their solubilities in the water, their molecular formulas, their molecular weights and their chemical structures are reported in Table 11 and in Figure 7 (Sigma Aldrich, 2014; Acros, 2014; Pubchem, 2014).

Tableau 11 Water solubilities, molecular formulas, molecular weight and chemical structures of the different CPSMs tested

CPSM	Molecular formula	Molecular weight (g)	Water solubility (g/l)
Saponin	ND	ND	ND
Tannic acid	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆	1701.2	28.6
Salicin	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	286.3	40.0
Aloin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.4	ND

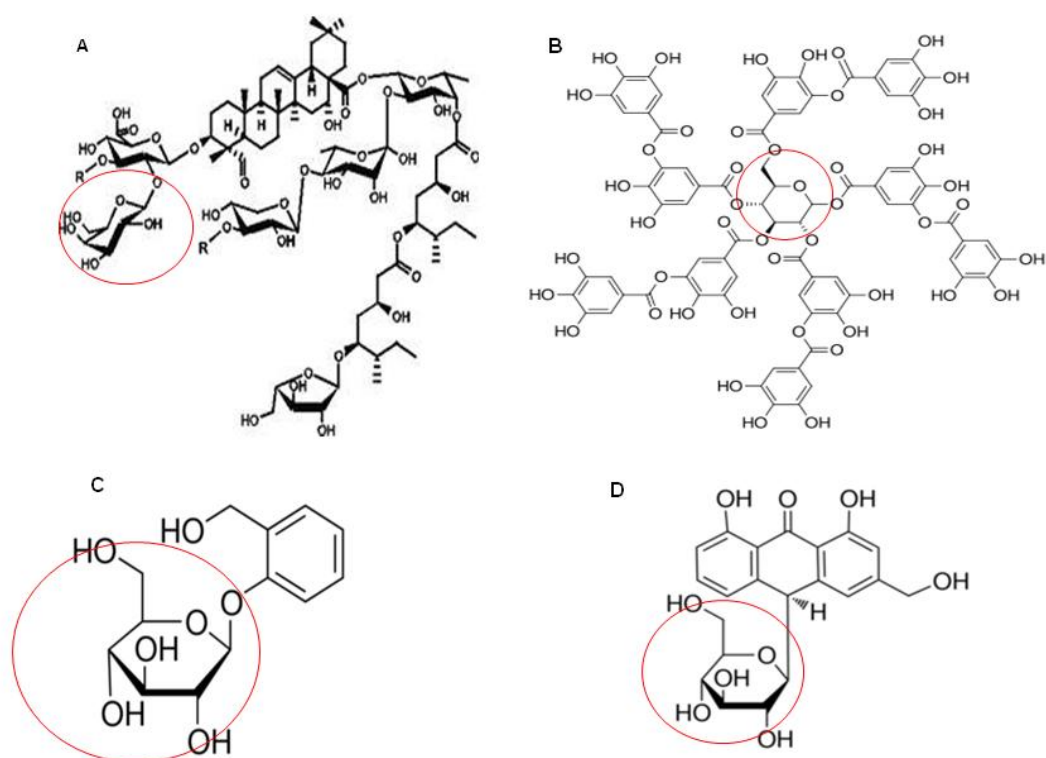


Figure 7 Molecular structures of sap (a), Tan (b), Sal (c) and Alo (d) and glycosyl groups surrounded

2.2. Identification of saponins, tannins and total polyphenols in Alo

The purity of Alo was poor. For that reason saponins, tannins and water-soluble total polyphenols were analyzed in this chemical. The tannins were qualitatively determined in the aqueous extracts of Alo by qualitative colorimetry after the following reactions (Lusakibanza, 2012; Wagner and Bladt, 1966; Angenot, 1973). The aqueous extracts were obtained after steeping under magnetic agitation of 1 g of Alo in 16 ml of distilled water during 30 minutes and filtration on membrane (Lusakibanza, 2012; Wagner and Bladt, 1966; Angenot, 1973). The presence of tannins was indicated by a greenish red coloration with or without precipitate after adding 1 ml of FeCl_3 2% (Burton reagent) to 2 ml of aqueous extracts.

The concentration of polyphenols was quantitatively determined according to a procedure derived from Singleton and Rossi (1965): in a 25 ml vial, 0.5 ml of 1% Alo aqueous extracts reacted for 3 min with 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (VWR Prolabo). After addition of 4 ml of sodium carbonate solution (1M), the mixture was brought to 25 ml with demineralized

water and homogenized. The absorbance was read at 765 nm after incubation at room temperature for 2 hours in the dark. Gallic acid was used as a reference standard.

The saponins were determined by agitating vigorously 5 ml of aqueous extracts in a test tube and formation of persistent foam of at least 1 cm height during 15 minutes. This test is semi quantitative (Multon, 1991).

2.3. Biogas and methane

The BMP assays of the CPSMs were determined following the procedure described by Rodriguez et al. (2005) and Wang et al. (1994). The tests were carried out in duplicate in 250 ml sterile glass serum bottles filled with 150 ml of mixture. This mixture contained 125 ml of phosphate and carbonate buffer solution (pH adjusted to 7.2 with KOH 5N), 25 ml of sludge, 0.25 g of glucose monohydrate (GI) and the concerned CPSM at different concentrations. The different CPSMs were used for tests with 50 mg, 250 mg, 500 mg, 1000 mg and 2000 mg. The glucose monohydrate (GI) was used as a positive control sample and a second addition of 0.25 g was done after the 100th day, by adding 2 ml of a 125 g/l aqueous solution by syringe injection through the septum. It is to note that 2 ml of the same GI aqueous solution was also added by the same way in each BMP test with CPSM sample after the 100th day. This GI addition was done to confirm the biomethanization inhibition. Each blank sample consisted of 25 ml of the anaerobic sludge inoculum and 125 ml of phosphate – carbonate buffer solution. No energetic substrate was added to the blank samples. The minerals elements and vitamins were not added considering that those substances should be present in the sludge. This anaerobic sludge contained 14.18 g DW/l and had a C/N ratio of 2.6. It was the same than that used in chapter 3.

When the sample bottles were filled, they were capped tightly with rubber septa and sealed with aluminum seals, and nitrogen was passed into the bottles to flush out air and other gases before the incubation (Mambanzulua et al., 2015; Hiligsmann et al., 2011). The bottles were then incubated at 30°C. The composition and the volume of biogas produced were periodically measured during 230 days according to the method of CO₂ absorption by KOH, described by Hiligsmann et al. (2011).

The content of H₂ and CO₂ were simultaneously determined using a method described by Hamilton et al. (2010) and separation was achieved using a Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph (GC; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a 30 m long, 0.32 mm id Alltech GAS PRO GSC column (Grace, Deerfield, IL, USA) in series with a 20 m long, 0.25 mm id Chrompack CARBOPLOT P7 column (Agilent Technologies) and a thermal conductivity detector. The carrier and reference gas was N₂, and a mixture of H₂ (80%) and CO₂ (20%) was used to determine the fraction of H₂ in the biogas produced. The GC injection port, the thermal conductivity detector chamber, and the oven were maintained at 90, 110, and 55°C, respectively.

The volume of biogas or of methane produced from a CPSM was determined by subtracting from the whole volume of the mixture, the volume of biogas or of methane produced from GI alone. The yield of biogas or of methane of each bottle was calculated by dividing the measured volume of biogas or of methane by volatile solid of the CPSM.

The inhibition degree of biogas or of methane production of a CPSM was determined by comparing the volume of biogas or of methane produced from GI with that from the mixture containing GI and CPSM. For a CPSM achieving a production of biogas or of methane of A ml from its mixture with GI and B ml from the GI alone, the inhibition degree would be $[(A - B)/B] * 100\%$. A positive percentage means a gain of volume of biogas or of methane produced from the mixture containing GI and CPSM compared to that of GI.

2.4. Analysis of glucose, ethanol and volatile fatty acids (VFAs)

The evolution of glucose, ethanol and VFAs concentrations in the samples was analyzed by HPLC during the anaerobic digestion. The culture media of samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate, acetate, propionate, butyrate, lactate and succinate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as formerly described by Masset et al. (2010) .

3. Results

3.1. Saponins, tannins and total polyphenols in Alo

The chemical analysis of Alo sample showed that it contained tannins and 232 mg total polyphenols/g DW but no saponin was detected.

3.2. Biogas production from mixtures containing Gl and CPSM and CPSMs alone

The evolution of the biogas production was monitored in BMP tests carried out to assess anaerobic digestion of the mixtures containing Gl and CPSM or CPSMs alone. The results of experimentation after 230 days with addition of glucose in the samples after 100 days are presented in Figure 8. This addition was done in order to confirm the results recorded over the first period of 100 days. The total volumes of biogas after this first period were from 12.0 ± 7.8 ml for blank samples, 45.7 ± 27.1 ml for Gl samples, 81.9 ± 12.0 to 219.9 ± 20.0 ml, 45.7 ± 0.5 to 91.2 ± 8.0 ml, 48.4 ± 10.3 to 98.1 ± 0.0 ml, 99.7 ± 9.0 to 51.9 ± 3.3 ml for the mixtures containing 1.7 g/l Gl and 0.3 to 13.3 g/l of Sap, Tan, Sal and Alo, respectively. After 230 days of anaerobic digestion, the total volumes were 12.0 ± 7.8 ml for blank samples, 194.9 ± 42.7 ml for Gl samples and from 215.4 ± 14.8 to 256.3 ± 1.3 ml, 211.2 ± 33.5 to 112.7 ± 19.0 ml, 222.9 ± 5.5 to 165.4 ± 0.0 ml and 181.7 ± 5.5 to 105.9 ± 2.8 ml for the mixtures containing 3.3 g/l Gl and 0.3 to 13.3 g/l of Sap, Tan, Sal and Alo, respectively.

The results recorded after 230 days of anaerobic digestion of CPSMs alone are reported in Figure 8. The total volumes of biogas were from 20.5 ± 14.8 to 61.4 ± 1.8 ml, 24.9 ± 0.0 to 0.0 ± 0.0 ml and 28.0 ± 5.5 to 0.0 ± 0.0 ml for Sap, Tan and Sal at concentrations of 0.3 to 13.3 g/l of Sap, Tan and Sal, respectively. No biogas production was recorded for Alo alone.

3.3. Hydrogen and methane production from the mixtures containing Gl and CPSM and CPSMs alone

No hydrogen was detected in the biogas from all the samples after 16 days of incubation. The results of methane production from the different mixtures containing Gl and CPSM after 230 days of incubation are showed in Figure 9. The total volumes of methane produced during this period were 0.0 ± 0.0 ml for blank samples, 61.8 ± 24.1 ml for Gl and from 3.5 ± 3.4 to $3.5 \pm$

2.7 ml, 88.2 ± 24.3 to 0.0 ± 0.0 ml, 88.1 ± 7.9 to 34.9 ± 0.0 ml and 54.9 ± 3.0 to 0.0 ± 0.0 ml for the mixtures containing 3.3 g Gl/l of and 0.3 to 13.3 g/l of Sap, Tan, Sal and Alo, respectively.

The results of methane production from the CPSMs alone after 230 days of incubation are shown in Figure 9. The total volumes of methane produced were 0.0 ± 0.0 ml for Sap and Alo at all concentration, and from 0.0 ± 0.0 ml to 0.0 ± 0.0 ml, and 26.4 ± 7.9 to 0.0 ± 0.0 ml for Tan and Sal at concentrations of 0.3 to 13.3 g/l, respectively.

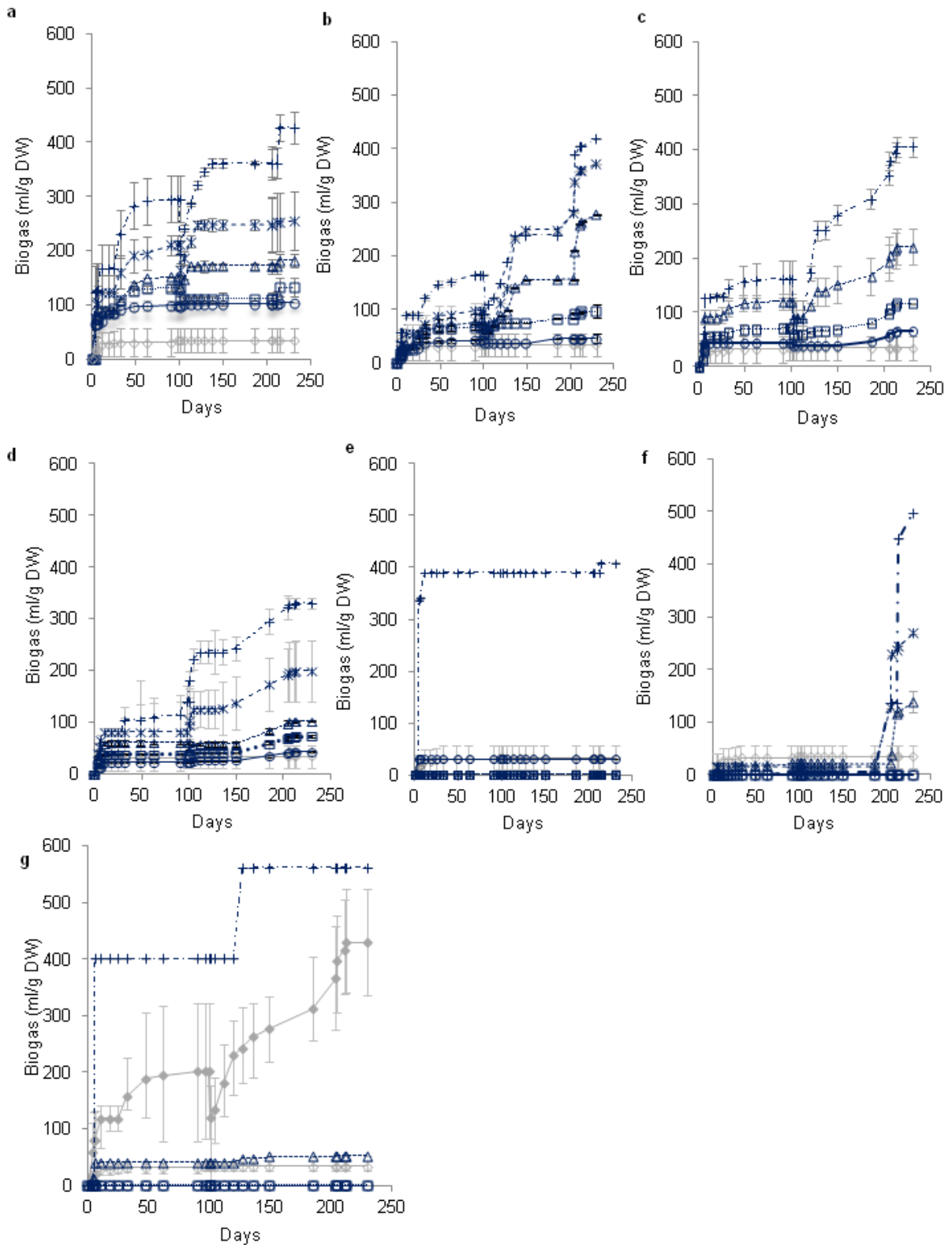


Figure 8 Cumulative biogas production (ml \pm MD) from the mixtures containing Gl + Sap (a), Gl + Tan (b), Gl + Sal (c), Gl + Alo (d) and Sap alone (e), Tan alone (f), Sal alone (g) where the meaning of O : 13.3 g CPSM/l, \square : 6.7 g CPSM/l, Δ : 3.3 g CPSM/l, * : 1.7 g CPSM/l, + : 0.3 g CPSM/l, \diamond : 3.3 g Gl/l and \diamond : Sludge. The volume of biogas produced from a CPSM was determined by subtracting from the whole volume of the mixture, the volume of biogas produced from Gl alone

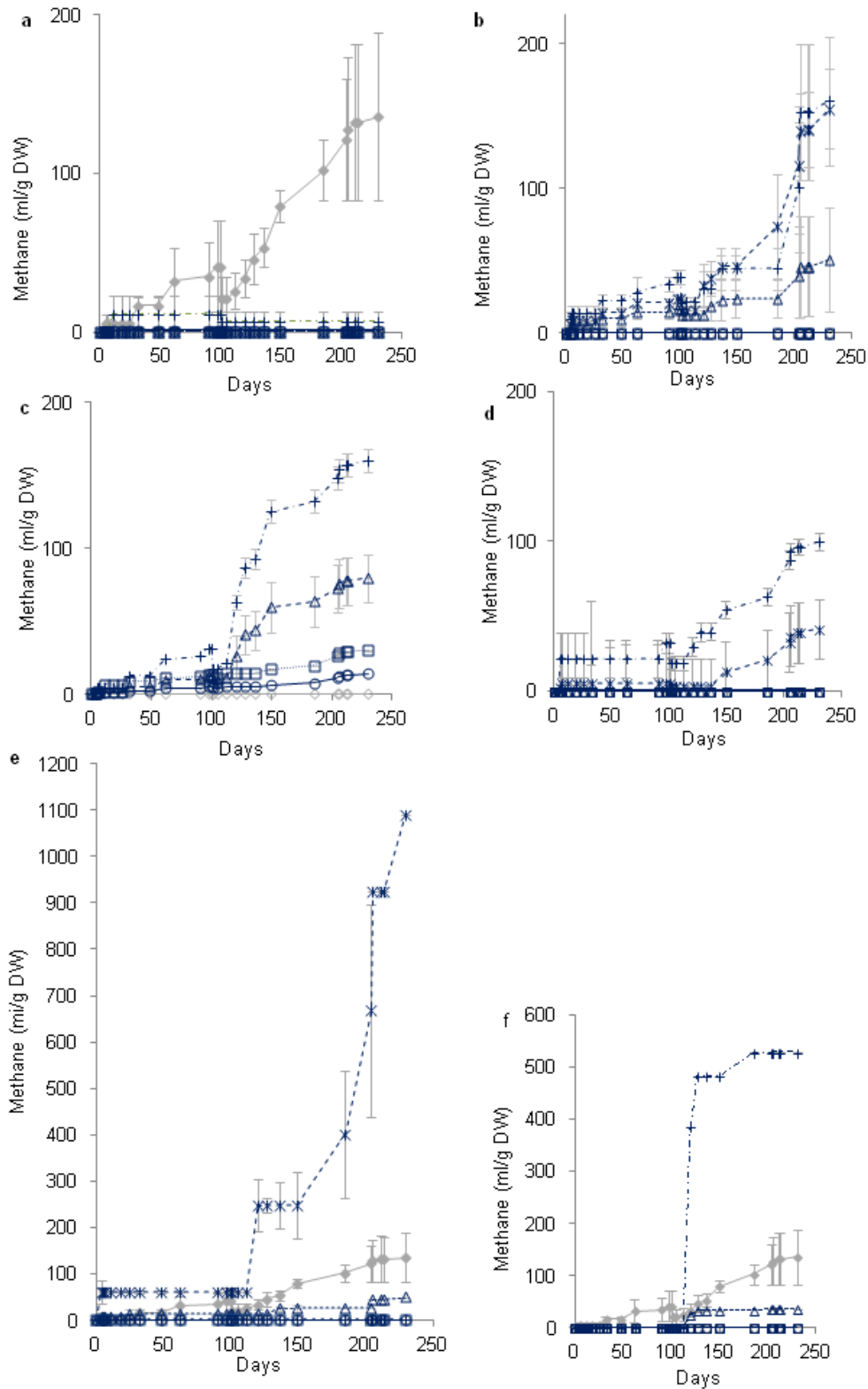


Figure 9 Cumulative methane production (ml \pm MD) from the mixtures containing Gl + Sap (a) , Gl + Tan (b), Gl + Sal(c),Gl + Alo (d), Tan alone (e), Sal alone (f) where the meaning of O : 13.3 g CPSM/l, \square : 6.7 g CPSM/l, Δ : 3.3 g CPSM/l, * : 1.7 g CPSM/l, + : 0.3 g CPSM/l, \diamond : 3.3 g Gl/l and \diamond : Sludge. The volume of methane produced from a CPSM was determined by subtracting from the whole volume of the mixture, the volume of methane produced from Gl alone

3.4. Biogas and methane yields produced from the mixtures containing Gl and CPSM or CPSMs alone and evaluation of inhibitory effects of CPSMs

The biogas and methane yields related to different mixtures of Gl and CPSM or of each CPSM are reported in Table 12. Also, the inhibition degrees of CPSMs on biogas or methane production are reported in Table 12.

Tableau 12 Biogas and methane production yields after 230 days of BMP tests at 30°C of the different CPSM (Sap, or Tan, or Sal, or Alo) with and without Gl addition and their inhibition degrees

		With 3.3 g Gl/l addition				Without Gl addition			
CPSMs concentrations	Carbon concentrations (g/l)	Production yields		Inhibition degree		Carbon concentrations (g/l)	Production yields		
		Biogas ml/g VS	Methane ml/g VS	Biogas %	Methane %		Biogas ml/g VS	Methane ml/g VS	
0.0	1.3	474.8	171.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
0.3 g Sap/l	ND	418.7	12.5	10.7	-94.3	ND	706.0	0.0	
1.7 g Sap/l	ND	290.5	0.0	-7.8	-100.0	ND	0.0	0.0	
3.3 g Sap/l	ND	185.7	0.0	-10.7	-100.0	ND	0.0	0.0	
6.7 g Sap/l	ND	145.5	0.0	-0.9	-100.0	ND	0.0	0.0	
13.3 g Sap/l	ND	103.0	11.7	31.6	-100.0	ND	31.7	0.0	
0.3 g Tan/l	1.5	444.9	204.5	8.4	42.7	0.2	497.5	0.0	
1.7 g Tan/l	2.2	375.6	182.4	34.4	88.1	0.9	347.0	300.2	
3.3 g Tan/l	3.1	316.7	86.7	35.6	-18.3	1.8	243.5	24.9	
6.7 g Tan/l	4.9	105.8	0.0	-28.1	-100.0	3.6	0.0	0.0	
13.3 g Tan/l	8.5	52.7	0.0	-42.2	-100.0	7.1	0.0	0.0	
0.3 g Sal/l	1.5	415.3	174.7	14.4	42.6	0.2	670.0	686.2	
3.3 g Sal/l	3.1	245.4	96.0	13.1	28.9	1.8	101.0	68.6	
6.7 g Sal/l	5.0	116.6	0.0	-10.9	-26.7	3.7	0.0	0.0	
13.3 g Sal/l	8.6	66.2	0.0	-15.1	-43.5	7.2	0.0	0.0	
0.3 g Alo/l	1.5	340.4	105.3	-6.8	-11.2	0.2	0.0	0.0	
1.7 g Alo/l	2.3	256.9	61.7	-23.5	-49.5	1.0	0.0	0.0	
3.3 g Alo/l	3.3	104.2	0.0	-47.4	-100.0	2.0	0.0	0.0	
6.7 g Alo/l	5.4	74.5	0.0	-44.4	-100.0	4.0	0.0	0.0	
13.3 g Alo/l	9.3	43.5	0.0	-45.6	-100.0	8.0	0.0	0.0	

3.5. Analysis of the residual glucose, ethanol and VFAs in the mixtures containing Gl and CPSM

The results of the concentrations of VFAs (succinic, formic, acetic, propionic and butyric acids), glucose and ethanol measured in the culture media after 7, 100 and 230 days of biodegradation are shown in Table 13.

Tableau 13 Glucose (Glu), succinate (Su), formate (Fo), acetate (Ac), propionate (Pro), ethanol (Eth) and butyrate (But) production during anaerobic digestion of the mixtures containing Gl + CPSM at concentrations of 0.3 to 13.3 g/l after 7, 100 and 230 days

With 3.3 g Gl/l addition	Metabolites (g/l) after 7 days							Metabolites (g/l) after 100 days							Metabolites (g/l) after 230 days						
CPSMs concentrations	Glu	Su	Fo	Ac	Pro	Eth	But	Glu	Su	Fo	Ac	Pro	Eth	But	Glu	Su	Fo	Ac	Pro	But	
0	0.0	0.0	0.1	0.4	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	
0.3 g Sap/l	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	
1.7 g Sap/l	0.0	0.0	0.0	1.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	0.2	0.0	
3.3 g Sap/l	0.0	0.0	0.2	1.1	0.5	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	1.6	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	0.3	0.0	
6.7 g Sap/l	0.0	0.4	0.0	1.8	1.3	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.3	0.0	
13.3 g Sap/l	0.0	1.0	0.0	2.1	0.4	0.8	0.6	0.0	0.0	0.0	2.1	0.5	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	8.2	1.2	0.2	
0.3 g Tan/l	0.0	0.0	0.0	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	
1.7 g Tan/l	0.0	0.2	0.6	0.5	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	
3.3 g Tan/l	0.0	0.2	0.7	0.5	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	0.5	0.1	
6.7 g Tan/l	0.3	0.2	0.9	0.6	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.4	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	6.0	0.8	0.7	
13.3 g Tan/l	0.0	0.2	1.1	0.7	0.8	0.5	0.0	0.0	0.2	0.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.8	1.4	0.8	0.6	
0.3 g Sal/l	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	
3.3 g Sal/l	0.0	0.0	0.2	0.7	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	1.2	0.1	0.0	
6.7 g Sal/l	0.0	0.0	0.8	1.1	0.4	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	1.8	0.6	0.4	
13.3 g Sal/l	0.0	0.3	1.4	1.4	0.2	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.4	9.3	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	1.2	2.3	
0.3 g Alo/l	0.0	0.0	0.6	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	
1.7 g Alo/l	0.0	0.0	0.5	0.6	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.5	0.2	
3.3 g Alo/l	0.0	0.2	0.5	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0.8	0.2	
6.7 g Alo/l	0.0	0.2	0.5	0.7	0.2	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	2.4	0.2	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	2.2	0.8	0.7	
13.3 g Alo/l	0.5	0.3	0.6	0.9	0.3	0.0	0.1	0.4	0.4	0.2	2.4	0.1	0.0	0.8	0.0	0.3	0.3	2.4	0.1	0.9	

4. Discussion

4.1. Biogas yields of the mixtures containing Gl and CPSMs or CPSMs alone

4.1.1. Generality

The biogas production from the blank samples, control samples and the mixtures containing Gl and CPSM started in the first four days of incubation. The biogas yields of the different mixtures of Gl and CPSM were lower than that of Gl at 100th day; except for the mixtures containing 1.7 g Gl/l and 0.3 g Sap/l or 0.3 g Alo/l (Figure 8). After the second addition of Gl at the 100th in the mixtures with CPSM day, the biogas yields of the different mixtures increased (Figure 8 and Table 12). That could be explained by a positive effect of the co-digestion of Gl and CPSM due to readily available substrate from Gl at this dose enabling the microbial population to degrade the CPSMs or/and Gl or promoting the growth and metabolism of certain microorganisms favored by this dose of Gl. In general, all the CPSMs exerted a beneficial effect on the biodegradation of Gl with a biogas gain only at low concentrations *i.e.* 0.3 g/l. By contrast, Alo inhibited the Gl degradation at all the concentrations utilized in this study and the mixture of Gl and Sap produced biogas again at 13.3 g/l (Table 12).

4.1.2. Biogas yields of the mixtures of Gl and Sap and Sap alone

During the first 100 days, the biogas yields decreased with the increase of Sap concentrations in different mixtures with Gl except at the highest concentration (13.3g/l) (Figure 8a). A similar trend was recorded after the second addition of Gl; however the yields of biogas after 230 days of incubation were higher than those measured at the 100th day. That could be interpreted as a progressive inhibitory effect of Sap (Bodas et al., 2012). However, when comparing to the results of the control experiment with Gl, it is to note that a biogas gains was recorded with the mixture of 3.3 g Gl/l and 13.3 g Sap/l after 230 days. That could be explained by a synergic effect of both substrates Gl and Sap for the growth stimulation of some bacteria species *e.g.* *Prevotella ruminicola* or the production of enzymes leading to partial degradation of improving Sap and/or Gl biodegradation (Bodas et al., 2012; Patra et al., 2012). Indeed, Patra et al., (2012) reported a positive effect on feed digestibility at the low dose of saponins *i.e.* 48 mg saponins/l present in 0.2 g *Quilaja* saponin/l. By contrast, in this experiment, Sap inhibited partially Gl biodegradation from 1.7 to 6.7 g/l. This partial

inhibition on the Gl digestion increased with the increase of Sap concentrations from 1.7 to 3.3 g/l then decreased for Sap concentrations increasing from 3.3 to 6.7 g/l (Table 12).

It is also to remark that the biogas yield related to Sap alone at 0.3 g/l was higher than that of Gl and that of Sap at 13.3 g/l. Sap inhibited totally its own digestion from 1.7 g/l to 6.7 g/l (Table 12). Indeed, it is to be noted that saponin of Quilaja is composed of 24.2% of sapogenin (aglycone) and 75.8% of glycone. By considering this composition in the incomplete molecular formula of Sap in Figure 7, the sole content to the glycosyl group could not exceed 10% since it represents about an eighth of its glycone *i.e.* most of the biogas supposed produce by Sap alone at 0.3 g/l would come totally from its glycone (saccharide residues). However, the biogas would be produced by Sap at 13.3 g/l would probably come from the glycosyl group of its glycone (Figure 7).

4.1.3. Biogas yields of the mixtures of Gl and Tan and Tan alone

As shown in Figure 8b and in Table 12, the biogas yields of the mixtures containing Gl and Tan decreased with the increase of Tan concentrations before the 100th day. After the second addition of Gl at the 100th day, the total biogas yields of different mixtures of Gl with Tan recorded after 230 days decreased also with the increase of the Tan concentrations proving a certain inhibition of biodegradation or proving that Tan decomposes with difficulty comparatively to Gl (Figure 8b, Table 12).

However, biogas gains were recorded the mixture containing 0.3 to 3.3 g Tan g/l when comparing to the biogas volume produced from the Gl alone and seemed to be directly proportional to Tan only at concentrations of 0.3 g/l (Table 12). That demonstrated a positive effect for the co-digestion in this concentration. By contrast, reductions of biogas yields were observed in these mixtures from 6.7 to 13.3 g Tan/l (Table 12). Thus, these concentrations corresponded to those of partial inhibition of Tan on Gl digestion *i.e.* 3.6 and 7.1 g C/l and were higher than those of gallic acid or phenols which were reported to inhibit partially gas production of sludge (inoculum) at concentrations between 0.8 and 1.6 g C/l of phenolic compounds (Hernandez and Edyvean, 2008).

Indeed, by comparison to the biogas volume recorded for the control sample Gl after 230th day of incubation, it could be concluded that the biogas produced by Tan alone at a concentration ranging from 0.3 to 1.7 g/l would result from the conversion of its ten

carboxylate groups which represent 25.9 % of the molecular weight and its glycosyl groups representing 10.6%. It is to remark that this gas was produced without apparent toxicity effect (Figure 1, Table 12). However, biogas yields from Tan alone began to decrease with increasing concentrations up to 3.3 g/l and was nil in presence of 6.7 g Tan/l or more (Figure 8f, Table 12).

4.1.4. Biogas yields of the mixtures of Gl and Sal and Sal alone

As shown in Tan case, the biogas yields of the mixtures of Gl with Sal decreased with the increase of the Sal concentrations and biogas gains were recorded at 0.3 and 3.3 g Sal/l (Figure 8c and Table 12). This highest gain was measured at 0.3 g Sal/l. However, a reduction of biogas yield was noted for the mixtures with 6.7 and 13.3 g Sal/l when comparing to that of Gl (Table 12). That suggests with the results of table 3, a partial inhibition of the biogas production of the Gl by Sal from 3.6 g C/l. Sal alone at 0.3 g/l and 3.3 g/l would produce biogas volumes nearly equal (Figure 2g) indicating that the biogas yields decreased as the concentrations of Sal increased (Table 12). The biogas yield at 0.3 g Sal/l was better than Gl at 3.3 g/l and this biogas would result from its hydroxymethyl group and its glycone constituted of a sole glycosyl group (Figure 7, Table 12). However, Sal inhibited biogas production of itself already partially at 3.3 g/l and completely at 6.7 g/l (Table 12).

4.1.5. Biogas yields of the mixtures of Gl and Alo and Alo alone

The biogas yields of the mixtures containing Gl and Alo decreased with the increase of Alo concentration (Figure 8d, Table 12). None of these mixtures produced an additional volume of biogas compared to that of Gl, in spite of the presence of glycone in the Alo which represented 42% of its molecular weight and although this content is higher than that of Tan (Figure 7, Table 12). In this work, concentrations of Alo increasing from 0.3 g/l up to 13.3 g/l lead to a partial inhibition of the biodegradation of Gl with increasing intensity since the biogas yield decreased progressively. Consequently, Alo alone did not produce biogas (Table 12). That would be probably due to the synergy of toxicity effects of aloin (50%) and polyphenols (23%) such as tannins contained in Alo as suggested by Chen et al. (2008).

4.2. Methane yields of the mixtures containing Gl and CPSM and CPSMs alone

4.2.1. Generality

Regarding cumulative methane production depicted in Figure 9, no methane was detected for the sludge. That suggests that its biogas was essentially composed of carbon dioxide (Figure 8) since it did not contain either H₂ after 16 days of incubation. By contrast, the BMP tests with Gl or mixtures of Gl with different CPSMs produced methane. However, the methane yields of these different mixtures decreased when the concentrations of the CPSMs increased (Table 12). Indeed, after 100 days, the methane yields of these different mixtures were similar to that of Gl; except the methane yields of the different mixtures of Gl with Tan and with Sal (Figure 9, Table 12). Moreover, after day 230 of incubation, the methane yields of these different mixtures were lower than that of Gl alone (*i.e.* 171.8 mL/g VS in the control); except the methane yields of the mixtures of Gl with Tan at the concentration of 0.3 and 1.7 g/l and with Sal at concentration of 0.3 g/l (Figure 9 -, Table 12). That demonstrated that the very high C/N ratio did not inhibit the methanization but lead to a slow kinetic and that the inhibition would especially be due to the concentration of CPSMs.

4.2.2. Methane yields of the mixtures of Gl and Sap and Sap alone

Considering the BMP tests with Sap (Figure 9a), only the mixture containing 3.3 g Gl/l and 0.3 g Sap/l produced methane with a yield of 94.3% lower than that of Gl (Table 12). This value was higher than those reported by the studies in animal nutrition (10 - 25% with no precision on the saponins concentrations) (Bodas et al., 2012; Gerardi, 2003; Hobson and Wheatley, 1993; McSweeney et al., 2001). Consequently the biogas produced from the mixture of 3.3 g Gl/l and 0.3 g Sap/l was essentially constituted of carbon dioxide since no H₂ was detected after 16 days of incubation. Thus, Sap inhibited totally the Gl methanization from 1.7 g/l (Table 12) and the increase of methanization inhibition with the increase of Sap concentration was in accordance with others studies on saponins (Bodas et al., 2012; Goel and Makkar, 2012; Wina et al., 2005; Goel et al. 2008). Indeed, Sap alone was supposed not produce methane by comparison to volumetric methane from Gl although having the glycone in its structure (Figure 7 and Table 12).

4.2.3. Methane yields of the mixtures of Gl and Tan and Tan alone

The methane yields of the mixtures of Gl and Tan decreased when the concentration of Tan increased in the medium (Figure 9b and Table 12). Methane gains were noted for the mixtures of Gl with Tan at concentrations of 0.3 to 1.7 g/l. By contrast, Tan inhibited the Gl methanization partially at concentration of 3.3 g/l and totally from 6.7 g/l (Table 12). This minimal inhibitory concentration was higher to that of tannins (0.7 g/l) reported by Gerardi (2003).

Tan alone was supposed to not produce any methane at concentration of 0.3 g/l comparatively to the methane volume of Gl since this concentration would be insufficient for the methablism or the volume of methane produced would be undetectable with the method used (Table 12). However, from concentration of 1.7 to 3.3 g/l, Tan alone supposed to produce methane with a partial inhibition at concentration of 3.3 g/l (Table 12). By referring to the structure of Tan in Figure 7, it could be assumed that this methane would result from the conversion of its glycosyl and carboxylate groups since its carboxylate groups would be converted to acetate before its conversion to methane (Figure 9b). By contrast, Tan inhibited completely the methanization of itself from 6.7 g/l (Table 12). This inhibitory concentration was higher to than that of phenolic compounds (0.8 and 1.6 g/l) according to Hernandez and Edyvean (2008) since may be tannic acid is a polymeric phenol (Hobson and Wheatley, 1993) and also a glycosylated polyphenol.

4.2.4. Methane yields of the mixtures of Gl and Sal and Sal alone

The methane yields of the mixtures containing Gl and Sal decreased when the concentration of Sal increased however there were methane gains for the mixtures of Gl containing 0.3 to 3.3 g Sal/l (Figure 9c, Table 12). Moreover, Sal completely inhibited methanization of Gl from the concentration of 6.7 g/l in the mixtures with Gl. Sal alone was supposed to produce methane with a highest yield at concentration of 0.3 g/l comparatively to the methane volume of Gl maybe since it possesses the highest content in glycosyl group among the CPSMs used in this work and its hydroxymethyl substitute would be transformed also to methane by methylotrophic methanogens (Figure 7, Tables 11 and 12). Furthermore, Sal alone inhibited partially its own methanization at concentration of 3.3 g/l and totally from 6.7 g/l (Table 12).

4.2.5. Methane yields of the mixtures of Gl and Alo and Alo alone

Regarding Alo, Figure 9d, Table 12 show that whatever the Alo concentration, no additional methane production was detected for the mixtures with Gl comparatively to that of Gl alone. This suggests that Alo inhibited the methanization of Gl in any concentration, i.e. partially at concentration of 0.3 g/l and totally from 1.7 g/l (Table 12).

Concerning Alo alone, no methane production was recorded. That demonstrated that Alo inhibited totally its own methanization from 0.3 g/l. This phenomenon might be due to the synergy of inhibitory effects of aloin (50%) and polyphenols (23%) such as tannins contained in Alo as suggested by Chen et al. (2008) although Alo possesses glycosyl group.

4.3. Evolution of glucose, ethanol and VFAs) in the mixtures containing Gl and CPSM

4.3.1. Generality

In general, the total quantities of metabolites (glucose, ethanol, VFAs) produced during anaerobic co-digestion of Gl and CPSMs increased with the CPSM amounts in the culture media (Table 13). The VFAs concentrations were similar in the media with the same CPSM content. That suggests that the hydrolysis and acidogenesis processes occurred efficiently whatever the organic matter as shown in Table 13. The maximum concentration of each VFA measured in the different media was directly proportional to initial substrate concentration and similar trends were recorded for each CPSM (Table 13). VFAs obtained from Gl alone and from all the mixtures of 3.3 g Gl/l and 0.3 g CPSM/l had the tendency to be converted to biogas after 230 days of anaerobic digestion (Table 13). The presence of residual amounts of VFAs in these samples after 230 days prove that the high C/N ratio slowed the conversion; however the different anaerobic co-digestions of 3.3 g Gl/l and 0.3 g CPSM/l were faster than that of Gl alone (Table 13). That demonstrated that acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis were efficient. After addition of Gl at the 100th day, VFA accumulation was observed until the 230th day in the mixtures with concentrations higher than 1.7 g CPSM/l. That showed that the hydrolysis and acidogenesis achieved themselves effectively but acetogenesis and/or methanogenesis were partially or completely inhibited by CPSMs since pH conditions were suitable, between 6.5 and 7.2. The methanogenesis was completely inhibited at CPSM concentration of 3.3 g/l.

4.3.2. Evolution of glucose, ethanol and VFAs in the mixtures of Gl and Sap

From the 7th day to the 100th day of incubation, the VFAs in bottles containing the mixtures of Gl and Sap were converted essentially to carbon dioxide proving the inhibition of methane production (Figure 9 and Table 13). That was confirmed by GC measurements since H₂ was not detected after 16 days of digestion in the biogas obtained from all mixtures. Furthermore as seen in Table 13, there was no acetogenesis after the acidogenesis in the mixture of Gl and Sap at 0.3 g/l up to 100th day since formate was accumulated. That suggests that Sap would stimulate strains such as *Clostridium acetobutylicum* (USEPA, 1997). By contrast, after the second addition of Gl at the 100th day, acetogenesis started to develop as well as methane production with a low yield and a presence of a few amount of propionate after 230 days. This small accumulation of VFAs could be due to the reduction of their conversion rates because of the high C/N ratio. It was observed also a classical acidogenesis and acetogenesis but there was not a methanogenesis in other media with concentration above 0.3 g Sap/l after 230 days (Table 13). It is also to notice that the amounts of VFAs were similar in the different mixtures of Gl and Sap from the concentration of 3.3 g Sap/l after 100 days of incubation. However, after the addition of Gl at the 100th day, these VFAs amounts were doubled at the 230th day; except in the mixture with 13.3 g Sap/l where the quantity of VFAs was tripled (Table 13). That confirmed the positive effect of Gl on the biodegradation of itself and on that of Sap relative to both extents with an additional biogas composed essentially of carbon dioxide (Figures 8 and 9, Tables 12). However, this observation about Sap contradicted most studies in animal nutrition reporting that saponins favour the increase of propionate production (Bodas et al., 2012; Catro-Montoya et al., 2011). Besides, the VFAs concentrations recorded proved that these VFAs resulted from the conversion of Gl and the glycone of Sap. Thus the inhibition of methanogenesis might be especially due to the toxicity of Sap exerted on the methanogens from the concentration of 1.7 g/l since the VFAs concentrations recorded would not be able to inhibit alone the methanization completely according to Buffiere et al. (2007).

4.3.3. Evolution of glucose, ethanol and VFAs in the mixtures of Gl and Tan

Concerning the mixtures of Gl and Tan, it was observed at the 100th day accumulations of VFAs; however, they were lower than in Sap mixtures with Gl Table 13. Table 14 also shows that during the first 100 days all the stages of methanization were affected by the increase of the Tan concentration in the mixtures with Gl since the VFAs production did not proportionally increase with Tan concentrations. That explains why the yields of biogas were lower than those of the mixtures of Gl and Sap. This phenomenon was in accordance with that observed in the degradation of feed when the tannins are used as described in the literature (Bodas et al., 2012; McSweeney et al., 2001). However, it was observed higher methane yields than those of mixtures of Gl with Sap. The addition of Gl after 100 days of incubation seemed to stimulate the methanization in the mixture of Gl with 0.3 to 1.7 g Tan/l as in the mixtures of Gl and Sap. That was detectable thanks to the considerable reduction of VFAs with very small amount of residual VFAs at the 230th day. It was recorded accumulations of VFA in the mixtures of Gl with concentrations of Tan above 1.7 g/l indicating toxicity effects. The lowest quantity of VFAs was measured in the mixture of Gl with 13.3 g Tan/l although Tan inhibited microbial activity and was totally soluble at this concentration according to Table 11. That confirms that even the hydrolysis of the substrates was affected by the toxicity of Tan since this concentration corresponds to 8.4 g/l in phenolic groups (aglycone) which are responsible of the reduction enzymatic activity (Bodas et al., 2012; Bhatta et al., 2009; Ghasemi et al., 2012). The methanogenesis was completely inhibited at 13.3 g Tan/l.

4.3.4. Evolution of glucose, ethanol and VFAs in the mixtures of Gl and Sal

The total amounts of metabolites observed at the 7th day decreased at the 100th day in the mixtures containing Gl and Sal with the highest methane yied at 0.3 g Sal/l. However in the mixture with 13.3 g Sal/l, there was an important accumulation of ethanol suggesting that big producers of the ethanol such as *Ruminococcus gnavus* or *bromii* (Delfosse, 2010) would be activated by these substrates in co-digestion (Table 13). After the second addition of Gl in the mixtures containing Gl and Sal at the 100th days of incubation, the acidogenesis and acetogenesis were stimulated since the ethanol would be converted to butyrate, propionate and acetate, leading to a reduction of total amount of accumulated metabolites at the 230th day of

the anaerobic degradation; however without production of methane for the mixtures with 6.7 and 13.3 g Sal/l (Figure 9, Tables 12 and 14).

4.3.5. Evolution of glucose, ethanol and VFAs in the mixtures of Gl and Alo

By considering Figure 8d and Table 13, it is clearly demonstrated that during the first 100 days the anaerobic digestion of the mixtures of Gl and Alo was slow that could be due to the high C/N ratio and especially to the synergic inhibitor effect of aloin and polyphenols contained in Alo. It was noted accumulations of VFAs coming from the conversion of Gl and of the glycone of Alo after 100 days of incubation of the mixtures of Gl with all the concentration of Alo, except at 0.3 g Alo/l where quite little acetate was recorded but without a supplementary production of biogas. This effect was similar to that observed in Chapter 3. Furthermore, the poverty in VFAs by comparison to others CPSMs and the presence of residual glucose at the 100th day in the media at concentration of 13.3 g Alo/l, indicated that the hydrolysis, acidogenesis and acetogenesis were slowed and that methanogenesis was not effective. Gl added in the mixtures with Alo after the 100th day was completely consumed at the 230th day and the amounts of metabolites (VFAs and the other) were slightly greater than that at the 100th day and there was no glucose in the media. That suggests that only the acidogens bacteria would be stimulated in the mixtures of Gl with 3.3 to 13.3 g Alo/l that would explain, why there were not production of methane

5. Conclusion

In this paper, BMP tests were carried out with the glycosidic PSMs frequently released in water by vegetal wastes and present in certain industrial effluents. Except for the mixtures of Gl and Alo the anaerobic co-digestion of these bioactive substances at the concentration of 0.3 g/l with Gl was achieved without inhibition (*i.e.* only a lower kinetic) in the media compared to the digestion of Gl alone whereas the C/N ratio was relatively high about 102. Furthermore, the amount of biogas produced from each CPSM in this concentration seemed to result from its glycone. During the biodegradation, each CPSM showed a different metabolic pathway; thus, Sap, Tan, Sal and Alo favored specifically the production of propionate, formate, ethanol and butyrate, respectively. It is necessary to note that the stimulating effects of biodegradation by Gl or CPSM would be relative to the ratio Gl/PSM which changed according to the structure of the CPSM.

Indeed, it should be noticed that the inhibition was amplified by the concentrations of CPSM *i.e.* with the content of aglycone in the media and the synergism. For this reason, glycosylated phenolic compounds would be less toxic than non-glycosylated. The highest inhibitor effect on the digestion of GI was recorded with Alo followed by Sap, Tan and Sal. By contrast, the highest inhibitor effect on the methane production from the GI was recorded with Sap followed by Alo, Tan and Sal. According to the calculations The inhibition potential of each CPSM on its own biomethanization would be in the following decreasing order: Sap = Alo > Tan > Sal.

Therefore, it would be very important to avoid these chemical compounds alone or mixed in the wastewater or in vegetal waste at concentrations above 0.3 g/l for a good anaerobic digestion. Otherwise, the anaerobic digestion of PSMs would be considered as a bio-refinement way for producing cyclic hydrocarbons or aromatic compounds or VFAs. In-depth further investigations will be carried out on the anaerobic digestion of glycosidic PSMs for methane production, on the impact of glucose on PSMs in anaerobic digestion, and on the synergic inhibitor effect of these bioactive compounds in anaerobic digestion.

6. References

- Acros, http://www.fishersci.com/ecom/servlet/fsproductdetail_10652_647073__-1_0, accessed 23 May 2014.
- Angenot L (1973) Contribution à l'étude du strychnos usambarensisgilg, principal constituant d'un poison de chasse curarisant africain. Thèse de doctorat, Université de Liège.
- Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA (2008) Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 21-27.
- Bhatta R, Uyeno Y, Tajima K, Takenaka A, Yabumoto Y, Nonaka I, Enishi O, Kurihara M (2009) Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 92: 5512–5522.
- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrésa S, Giráldeza FJ, López S (2012) Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176: 78–93.

- Buffiere P, Carrere M, Lemaire O, Vasquez J (2007) Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides : Projet METHAPI-Expertise. Centre de Recherche Propreté & Energie, p 29.
- Castro-Montoya JM, Makkar HPS, Becker K (2011) Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. *Can. J. Anim. Sci.* 91: 433–448.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99: 4044- 4064.
- Delfosse P (2010) microbiologie de la digestion anaérobie compte rendu de la présentation (centre de recherche public gabriel lippmann). http://www.aile.asso.fr/wp-content/uploads/2013/07/CR_presentation-Phillipe-Delfosse_avec-ppt_2011-06-21. Accessed 17 April 2014.
- Gerardi Michael H (2003) *The Microbiology of Anaerobic Digesters*, John Willey et Sons, USA Inc, p 192.
- Ghasemi S, Naserian AA, Valizadeh R, Tahmasebi AM, Vakili AR, Behgar, Ghovvati S (2012) Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. *Small Rumin. Res.* 104: 94–98.
- Goel G, Makkar HPS, Becker K (2008) Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J Appl Microbiol* 105: 770–777.
- Goel G, Makkar HPS (2012) Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins, *Trop Anim Health Prod* 44: 729-739.
- Hamilton C, Hilgsmann S, Beckers L, Masset J, Wilmotte A, Thonart P (2010) Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi continuous operating mode. *Int J Hydrogen Energ* 35:1089–1098.
- Hernandez JE, Edyvean RGJ (2008) Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* 160: 20-28.
- Hilgsmann S, Masset J, Hamilton C, Beckers L, Thonart P (2011) Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology* 102: 3810-3812.

- Hobson PN, Wheatley AD (1993) Anaerobic digestion modern theory and practice. Elsevier applied science, London and New York, pp 21-232.
- Jouany JP, Morgavi DP (2007) Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1: 1443–1466.
- Kamra DN, Patra AK, Chatteerjee PN, Kumar R, Agarwal N, Chaudhary LC (2008) Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal Experimental Agriculture* 48:175-178.doi: 10.1071/EA07268.
- Kayembe K, Basosila L, Mpiana PT, Sikulisimwa et al. (2012) The Impact of the bisubstituted aromatics functional groups on the inhibition of methane biosynthesis (Biogas). *Advances in Microbiology* 2: 617-622.
- Kayembe K, Basosila L, Mpiana PT, Sikulisimwa PC, Mbuyu K (2013) Inhibitory effects of phenolic monomers on methanogenesis in anaerobic digestion. *British Microbiology Research Journal* 3(1): 32- 41.
- Lusakibanza M (2012) Etude phytochimique et pharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle congolaise. Thèse de doctorat, Université de Liège, pp 130-135.
- Macheboeuf D, Bergeault R, Papon Y, Arturo-Schaan M (2011) Effets comparés de trois sources de saponines extraites de *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* ou *Trigonellafoenum-graecum* sur les fermentations ruminales in vitro et les émissions de méthane. *Renc Rech Ruminants* 18: 135.
- Mambanzulua Ngoma P, Hiligsmann S, Sumbu Zola E, Culot M, Fievez T, Thonart P (2015) Comparative study of the methane production based on the chemical compositions of *Mangifera Indica* and *Manihot Utilissima* leaves. *SpringerPlus*, 4:75 doi: 10.1186/s40064-015-0832-y.
- Makkar HPS, Francis G, Becker K (2007) Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal* 1: 1371–1391.
- McSweeney C, Palmer B, Bunch R, Krause D (2001) Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90: 78–88.
- Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, Beckers L, Franck F, Thonart P (2010) Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-production *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *International Journal of Hydrogen Energy*.

- Multon JL (1991) Techniques d'analyse et de controle dans les industries agro-alimentaires. Vol 4, analyss des constituants alimentaires, Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 370-380.
- Owen WF, Stuckey DC, JB H Jr, Young LY, McCarty PL (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Resour* 13: 485-492.
- Patra AK, Saxena J (2010) A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1205-1217.
doi:10.1016/j.phytochem.2010.05.010.
- Patra AK, Stiverson1 J, Yu1 Z (2012) Effects of quillaja and yucca saponins on communities and select populations of rumen bacteria and archaea, and fermentation in vitro. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1329-1340.
- Pubchem, 3 <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=16133892>, accessed 23 May 2014.
- Rodriguez C, Hiligsmann S, Ongena M, Charlier R, Thonart P (2005) Activité biologique dans les centres d'enfouissement technique de déchets ménagers : biodisponibilit  de la cellulose et modélisation. Thèse de doctorat, Université de Liège, pp 46-48.
- SigmaAldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/403040?lang=en®ion=>, accessed 23 May 2014.
- Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorunetry of total phenolics withphosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16, vol 3, University of California, 144-158.
- Szumacher-Strabel M, Cie slak A (2010) Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *J. Anim. Feed Sci.* 19: 319-337.
- USEPA (1997) *Clostridium acetobutylicum* Final Risk Assessment
http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra003.htm. Accessed 17 April 2014.
- Wagner H, Bladt S (1966) *Plant drug analysis*. Springer Verlag, Berlin.
- Wang YS, Byrd CS, Barlaz MA (1994) Anaerobic biodegradability of cellulose and hemicellulose in excavated refuse samples using a biochemical methane potential assay. *Journal of Industrial Microbiology* 13: 147-153.
- Wina E, Muetzel S, Hoffmann E, Makkar HPS, Becker K (2005) Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 121: 159-174.

Chapter V: Anaerobic co-digestion for improvement of methane production from *Mangifera indica* and *Manihot utilissima* leaves

Prepared for submission to Biodegradation

**Philippe Mambanzulua Ngoma^{ab}, Serge Hiligsmann^a, Eric Sumbu Zola^c, Marc Ongena^a,
Philippe Thonart^a**

a: Walloon Center of Industrial Biology (CWBI), Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030, Gembloux, Belgium

b: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 212, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

c: Faculty of Agricultural Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 117, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

Avant propos

Le chapitre précédent révèle que le groupe glucidique des métabolites ou le glucose semble réduire l'inhibition des métabolites secondaires. De ce fait, il est envisagé de constituer des mélanges entre les feuilles de *Mangifera indica* (MI), riches en carbone et aussi en composés toxiques, et les feuilles de *Manihot utilissima* (MU), pauvres en substances antimicrobiennes mais riches en azote et en amidon. Elles sont méthanisées conjointement à différentes proportions afin d'atteindre un rapport C/N favorable. Cette approche est tentée pour l'amélioration de la méthanisation de ces deux feuilles mais spécialement celle des feuilles de MI qui se montrent difficilement biodégradables.

Des essais de méthanisation ont été menés dans des bouteilles de sérum contenant des différents mélanges de ces feuilles avec une teneur en feuilles de MI variant de 25% à 75%. La production du biogaz et du méthane est suivie par la méthode d'absorption de CO₂ par le KOH et la composition qualitative du biogaz est déterminée par la chromatographie gazeuse. Les métabolites produits dans les milieux de culture pendant la biodégradation de ces mélanges des feuilles sont également contrôlés mais par chromatographie en phase liquide de haute performance.

Après biodégradation anaérobie, les digestats issus du mélange avec 50% de feuilles de MI sont récupérés et séparés en liquide et solide pour la détermination de C, N, P et K. Le choix de ce mélange se base sur le fait que sa méthanisation est bénéfique pour les deux feuilles surtout celles de MI.

L'enjeu est aussi de déterminer quels ratios entre les feuilles de MI, riches en carbone mais aussi en métabolites secondaires divers et pauvres en minéraux, et les feuilles de MU, riches en azote, en minéraux mais pauvres en métabolites secondaires, sont susceptibles de ralentir voire inhiber la biométhanisation de leur mélange.

Abstract

A previous study demonstrated that methane production from *Mangifera indica* (MI) leaves was unfavorable by comparison to *Manihot utilissima* (MU) leaves. Both these leaves are available in tropical regions as biological waste from mango tree and cassava plant respectively. By comparison to MI; MU leaves are generally characterized by a high content in mineral elements and a low concentration in bioactive compounds. The C/N ratios of MU and MI leaves were about 7 and 48 respectively, i.e. significantly out of the range from 20 to 30 commonly recommended for optimal anaerobic digestion. The main objective of this work was to investigate the optimization of methane production from MI and MU leaves in co-digestion through BMP tests at 30°C. Consequently, they were mixed in different ratios in order to improve their methane yields. These were maximum in the mixture containing 75% MU and 25% MI (C/N of 9) with a methane yield of 0.125 l CH₄/g volatile solids corresponding to 9% of the calorific power of wood. This result was about 1.3-fold and 100-fold higher than that recorded from methanisation from MU or MI leaves alone. The methane yield decreased of about 17% and 71% when the MI leaves fraction increased in the mixture at 50% (C/N of 13) and 75% (C/N of 21), respectively. Therefore, this study shows that co-digestion would lead especially to the stimulation of methanogenic archaea to resist against the inhibition effect of bioactive compounds of MI leaves. Although the digestates from the mixture of 50% MI were poor in phosphorous, they could be used as fertilizer for the vegetables and the fruit trees.

Keywords: anaerobic co-digestion, optimization, leaves, *Mangifera indica*, *Manihot utilissima*

1. Introduction

A comparative study of the biomethanation potentials of MI and MU leaves alone is described in Chapter 3. Large amounts of these organic matters are available in Kinshasa and other tropical regions but up to date they are not really valorized. Results of this study showed that the anaerobic digestion of the MU leaves was carried out without inhibition with a methane yield of 0.1 l CH₄/g SV. This yield was slightly lower than the literature data for other leaves (Gunaseelan et al., 2004). By contrast, whereas acidogenesis occurred classically, the anaerobic degradation of MI leaves was inhibited with about no methane production. As a consequence, this work concerned the optimization of the biomethanation of MI and MU leaves in mixture.

It is known that adaptation of microorganisms to inhibitory substances and co-digestion of wastes are among the easiest and less expensive methods suggested to improve significantly the waste treatment efficiency (Chen et al., 2008; Ward et al., 2008). Ward et al. (2008) examined the methane-producing potential of various agricultural feedstocks taking into account the advantages of co-digestion to improve carbon-to-nitrogen ratios (C/N) and the use of pre-treatments to increase degradation yields. Pre-treatment can break down the recalcitrant polymers (cellulose or lignin) physically, thermally, or chemically (acid or alkali pre-treatment) (Gunaseelan, 1994; Clarkson and Xiao, 2000; Ward et al., 2008). They can increase biogas production, volatile solids reduction (Tiehm et al., 2001; Ward et al., 2008) and residual compounds solubilisation (Tanaka et al., 1997; Ward et al., 2008). Additives can enhance the production rate of a reactor or increase the speed of startup (Ward et al., 2008). However, both these methods are relatively expensive. By contrast, co-digestion can be applied in developing countries as Democratic Republic of Congo where low complexity and cheap technology are needed most. A particularly strong reason for co-digestion of feedstocks is the adjustment of the carbon-to-nitrogen ratio. Microorganisms generally utilize carbon and nitrogen in the ratio of 25–30/1, but C/N ratios can often be considerably lower than this ideal value. For example anaerobic digestion of sewage sludge is frequently performed at a C/N ratio of approximately 9/1 (Kizilkaya and Bayrakli, 2005). Feedstocks can widely vary in their C/N ratios and some reactors are affected more than others by non ideal ratios.

Indeed, the two-stage reactor with biomass retention is considered as the only anaerobic digestion system capable of reliable activity with C/N ratios less than 20 (Mata-Alvarez,

2002; Ward et al., 2008). Co-digestion of a rich nitrogen feedstock (low C/N ratio) with a rich carbon feedstock (high C/N ratio) such as crop seeds can adjust the ratio closer to ideality (Ward et al., 2008).

Our former investigations (Mambanzulua et al., 2015) showed that MU leaves present favorable characteristics through their composition rich in nutrients and poor in bioactive substances or plant secondary metabolites (PSM_s) comparatively to MI leaves. However, MU and MI leaves are characterized by a lower and a higher C/N ratio, respectively than the common optimal C/N ratios. These complementary characteristics could be exploited to correct their C/N ratio leading to an increase of the methane production yield. Therefore, in this work we studied different mixtures of MU and MI leaves in order to improve their anaerobic digestion. Many agricultural and municipal waste biomass resources are currently used in combination to produce biomethane (Parawira et al., 2004; Ward et al., 2008; Frear et al., 2011; Esposito et al., 2012). But, to our knowledge, there is no publication on the co-digestion of specific leaves such as those from MI and MU.

In this paper, the biochemical methane potential (BMP) assays of mixtures of MI and MU leaves in different proportions were investigated (Owen et al., 1979). These assays were carried out with monitoring of biogas volume and composition, and of volatile fatty acids (VFAs) production. After BMP assays, the fertilizing values of biomethanation residues were determined regarding C/N ratio, P and K content.

2. Material and methods

2.1. Source and conservation of leaves and physico-chemical analyses of leaves

The samples used in in this experiment were the same than those of the chapter 3 and conserved under the same conditions.

2.2. Biogas and methane yields

The BMP assays of mixtures of MU and MI leaves were determined following the procedure described by Rodriguez et al. (2005) and Wang et al. (1994). The tests were carried out in 250 ml sterile glass serum bottles filled with 150 ml of mixture. This mixture contained 125 ml of

phosphate and carbonate buffer solutions (with the pH adjusted to 7.2 with KOH 5N), 25 ml of anaerobic sludge inoculum and milled mixture of leaves. Mixtures of MU and MI leaves grounded at 1mm size were used for tests with 8000 mg in MI/MU ratio of 1/3, 1/1 and 3/1. The minerals elements and vitamins were not added considering that those substances should be present in anaerobic sludge inoculum and in the leaves. Each positive control sample consisted of 0.25 g of glucose monohydrate (GI) and 25 ml of inoculum in a 250 ml sterile glass serum bottle containing 125 ml of phosphate – carbonate buffer solution. Each blank sample was constituted of 25 ml of the anaerobic sludge inoculum and 125 ml of phosphate – carbonate buffer solution. No energetic substrate was added to the blank samples.

The composition of the buffer solution was described elsewhere (Rodriguez et al., 2005).

This sludge was the same than that used in the chapters 3 and 4. The BMP tests for each sample were run in duplicate and incubated at 30 °C.

The composition and volume of biogas produced were periodically measured during 230 days according to the method with CO₂ absorption by KOH as described (Hiligsmann et al., 2011). H₂, CH₄, and CO₂ were determined using a method described by Hamilton et al. (2010) and separation was achieved using a Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph (GC; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a 30 m long, 0.32 mm id Alltech GAS PRO GSC column (Grace, Deerfield, IL, USA) in series with a 20 m long, 0.25 mm id Chrompack CARBOPLOT P7 column (Agilent Technologies) and a thermal conductivity detector. The carrier and reference gas was He, and a mixture of N₂ (15%), CO₂ (35%) and CH₄ (50%) was used to calibrate the instrument for determining the proportions of CH₄ and CO₂ in the biogas. A mixture of H₂ (80%) and CO₂ (20%) was used to determine the fraction of H₂ in the biogas produced with N₂ as carrier gas. The GC injection port, the thermal conductivity detector chamber, and the oven were maintained at 90, 110, and 55 °C, respectively.

Biogas or methane yields were calculated by dividing the measured biogas or methane volume by the theoretical biogas or methane potential from the TOC content of each bottle. The available energy amounts in the biogas were calculated from the calorific energy of methane produced from 1 kg of leaves.

2.3. Analysis of glucose, ethanol and VFAs

The evolution of glucose, ethanol and VFAs concentrations in samples was analyzed by HPLC. The samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 μm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate, acetate, propionate, butyrate, lactate and succinate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as described formerly (Masset et al., 2010).

2.4. Analysis of liquid and solid digestion products

After 230 days of anaerobic digestion, the content of the BMP test containing initially equal amounts of the both leaves, and resulting in efficient yield and kinetic, was separated in liquid and solid residues by centrifugation and filtration on 0.2 μm cellulose acetate membrane. The liquid residue was analyzed for saponins, water-soluble total polyphenols, TOC and TKN whereas the solid residue was dried for TOC and TKN analyses.

3. Results

3.1. Characteristics of leaves mixtures

The amounts of some essential components of leaves were estimated before and after mixture from the results of physico-chemical analyses of individual leaves, formerly reported in Tables 6 and 7. The results are reported in Table 14.

Tableau 14. Some essential components in the concentrations of MU and MI leaves alone and mixed

Samples concentrations	TOC (g/l)	TKN (g/l)	C/N ratio	P (g/l)	K (g/l)	Gallic acid (g/l)	Pyrogallol (g/l)	Total polyphenols (g/l)
49.5 g MU/l	17.7	2.5	7.0	0.1	1.1	0,0	0,0	0.1
53.3 g (25% MI+75% MU)/l	19.8	2.1	9.3	0.1	0.9	0.1	0.1	0.3
53.3 g (50% MI+50% MU)/l	20.5	1.6	13.1	0.1	0.7	0.2	0.2	0.6
53.3 g (75%MI+25%MU)/l	21.2	1.0	21.0	0,0	0.5	0.2	0.4	0.8
54.4 g MI/l	22.4	0.5	48.0	0,0	0.3	0.3	0.5	1.1

3.2. Evolution of the anaerobic digestion of the mixtures of MI and MU leaves

3.2.1. Biogas and methane yields

The evolution of the biogas production was monitored in BMP tests carried out to assess anaerobic digestion of the mixtures of MU and MI leaves. The results are presented in Figure 10. After 230 days of anaerobic digestion, the total volumes of biogas produced in the vessels were 22.0 ± 0.0 ml for blank samples, 98.0 ± 9.0 ml for the control samples (G1) containing glucose at a concentration of 1.7 g/l and 1466.3 ± 57.8 ml, 1231.5 ± 10.5 ml and 1159.8 ± 36.3 ml for the mixtures of MU and MI leaves at contents of 25%, 50% and 75% MI leaves, respectively (Figure 10a).

The results of methane production are shown in Figure 10b. The composition in hydrogen, methane and carbon dioxide of biogas samples was verified by GC measurements after 48 and 230 days of incubation. The hydrogen content in the biogas from all the samples were nil after 48 days of incubation; by contrast, the methane content was 0%, 0%, 42.7%, 2.5% and 2.7%, respectively for the blank and control (G1) samples and the mixtures with 25%, 50% and 75% MI leaves. After 230 days, they were of 4.4%, 39.3, % 51.0%, 51.0% and 60.0%, respectively. The total volumes of methane produced were 1.8 ± 0.2 ml for blank samples, 45.9 ± 7.9 ml for G1 samples and 881.3 ± 24.8 ml, 725.4 ± 39.3 ml and 664.1 ± 23.2 ml for the mixtures containing MU and MI leaves at contents of 25%, 50% and 75% MI leaves, respectively (Figure 10b).

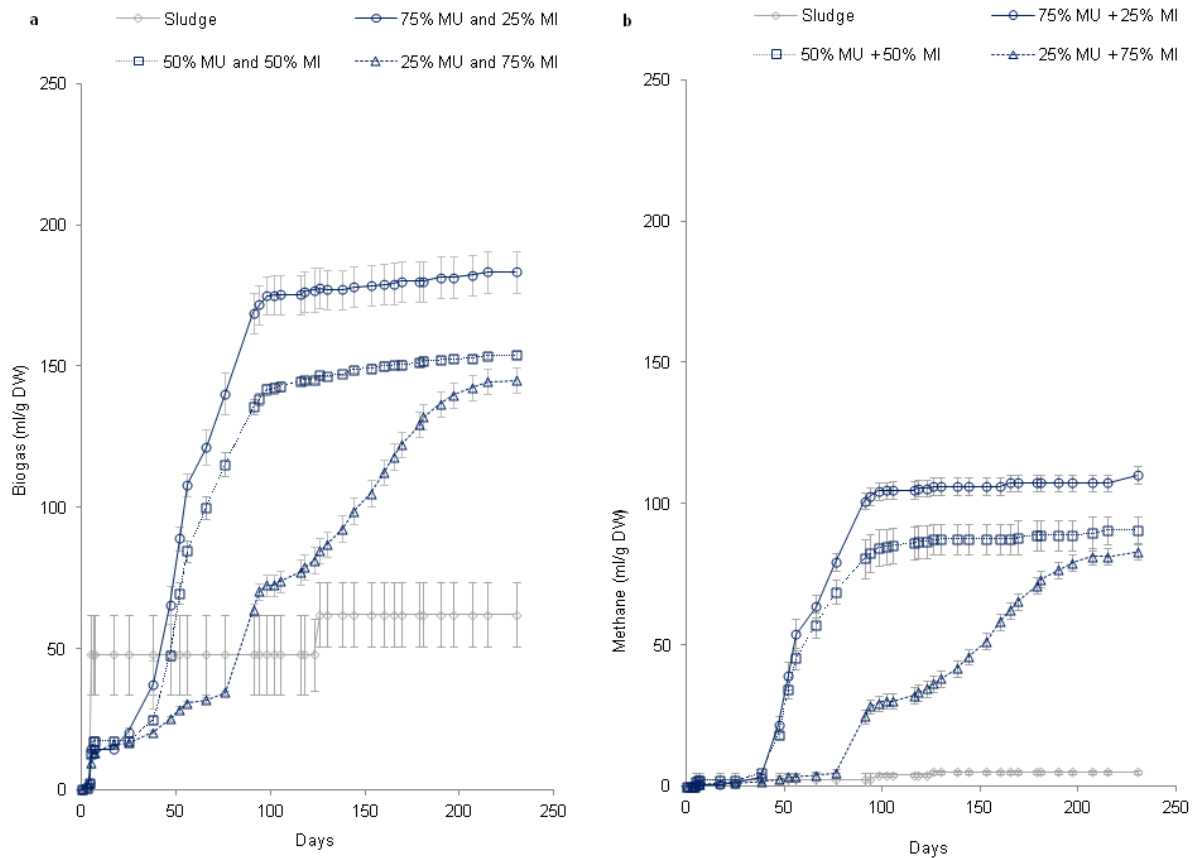


Figure 10 Production of biogas (a) and methane (b) (ml \pm MD) during the anaerobic digestion of the mixtures of MU and MI leaves containing 25% MI, 50% MI and 75% MI in BMP tests

The volumetric biogas and methane production were expressed in terms of yields related to the initial TOC of the leaves and are reported in Table 15. The maximum methane production rates calculated for the different concentrations of MU leaves were: 13.2, 10.3 and 4.4 ml/day at contents of 25%, 50% and 75% MI, respectively.

Tableau 15 Biogas and methane production yields after 230 days of BMP tests at 30°C with the mixtures of MU and MI leaves containing 25% MI, 50% MI and 75% MI control test (G1) with 1,7 g/l glucose

Samples concentrations	Biogas yields (ml/g TOC)	Methane yields (ml/g TOC)
1.7 g G1 /l	1070	538
53.3 g (75% MU + 25% MI)/l	511	304
53.3 g (50% MU + 50% MI) /l	399	246
53.3 g (25% MU + 75% MI) /l	370	212

The available energy in the biogas produced from the anaerobic digestion of different mixtures of leaves after 100 and 230 days are reported in Table 16. They are calculated according to the calorific power of methane of 37580 kJ/m³ reported by Shuku (2011),

Tableau 16 Energy amount in the biogas produced from the anaerobic digestion of 1 kg of the mixtures of MU and MI leaves after 100 and 230 days

Mixtures of leaves concentrations	Methane yields for 100 days (l/g VS)	Methane yields for 230 days (l/g VS)	Energy after 100 days (kJ)	Energy after 230 days (kJ)
53.3 g (75% MU + 25% MI)/l	0.108	0.113	3854.4	4052.5
53.3 g (50% MU + 50% MI)/l	0.091	0.096	3260.5	3420.1
53.3 g (25% MU + 75% MI)/l	0.033	0.086	1171.8	3073.9

3.2.2. Analysis of glucose, ethanol and (VFAs)

The concentrations of VFAs (formic, acetic, propionic and butyric acids), glucose, lactic and succinic acids and ethanol in the culture media were measured by HPLC. No glucose, ethanol, succinic or lactic acids was detected in the media and no VFA was detected in the blank samples. The maximum VFA concentrations reached 1.0 g/l for test with G1 and 9.0, 8.0 and 9.2 g/l for the mixtures containing MU and MI leaves at contents of 25%, 50% and 75% MI, respectively (Figures 11 and 12). After 130 days, the concentrations of VFAs were 0 for all concentrations of the mixtures of MU and MI leaves.

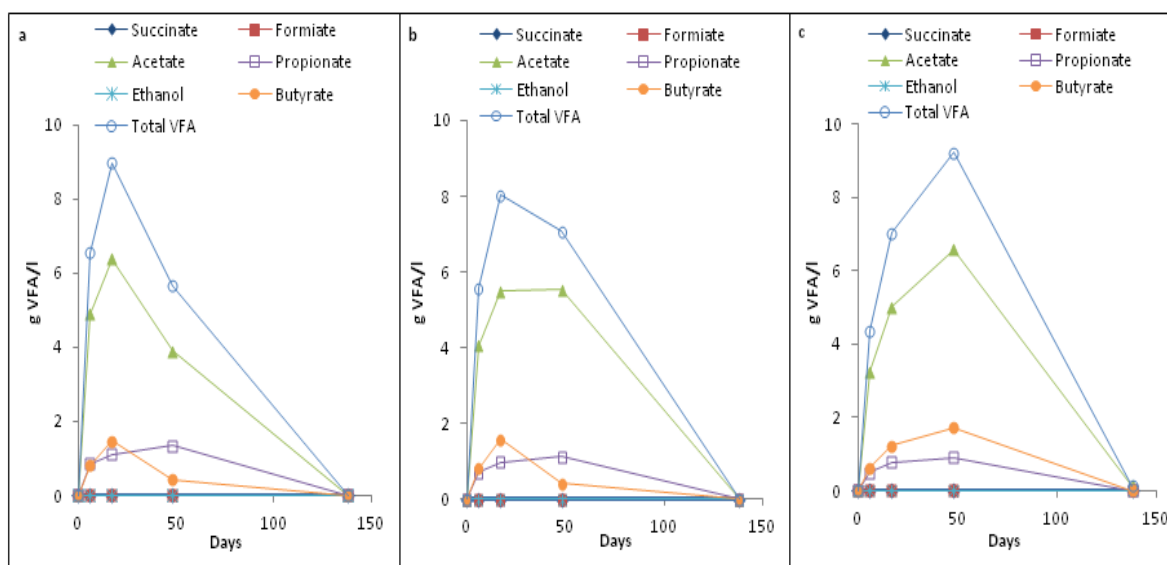


Figure 11 VFAs production during anaerobic digestion of the mixtures of MU and MI leaves containing 25% MI (b), 50% MI (c) and 75% MI(d)

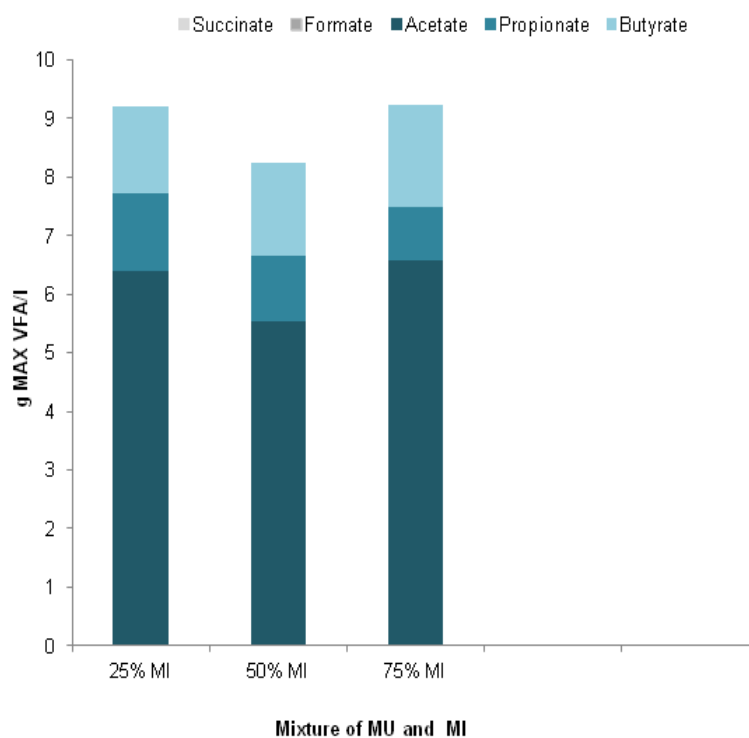


Figure 12 Maximum concentration of each metabolite produced by anaerobic digestion from control sample and the mixtures of MU and leaves containing 25% MI, 50% MI and 75% MI

3.3. Solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion

After the anaerobic digestion, the mixture of 50% MU and 50% MI was chosen since its methane yield, methanization kinetic and MI leaves content were advantageous for MI leaves anaerobic digestion when comparing to the other mixtures. Its residue was separated in liquid and in solid fraction, and the results of their analyzes are presented in Table 17.

Tableau 17 TOC, TKN, P, K, and water-soluble total polyphenols contents and presence of saponins in the solid and liquid residues produced after the anaerobic digestion in BMP test with the mixture of 50% MU and 50% MI

Components	Total residues states	
	Liquid	Solid
TOC (mg/g)	36.7± 0.0	360.8 ± 0.4
TKN (mg/g)	10.2 ± 0.1	30.3 ± 0.4
P (mg/g)	0.0 ± 0.0	4.7 ± 0.1
K (mg/g)	82.6 ± 0.0	24.0 ± 0.0
C/N	3.6	11.9
Polyphenols (mg/g)	9.6 ± 0.0	ND
Saponins	+	ND

The presence of saponins is expressed by +

4. Discussion

4.1. Biogas yields

The total biogas volumes produced after 230 days of incubation decreased with the increase of MI leaves concentration in the mixtures of MU and MI leaves (Figure 10a). This trend was confirmed regarding the yields (Table 15). The profile of biogas production with a delay before exponential production should also be linked to MI leaves concentration in the mixture. Indeed, the biogas production in BMP tests with the mixtures containing 25% and 50% MI increased rapidly after 38 days of incubation whereas for the mixture with 75% MI this event occurred after more than 75 days of incubation. Nevertheless the pH and oxydo-reduction potential conditions were suitable *i.e.* between 6.5 and 7.2, and -440 and -447mV. Table 14 shows that TOC increased with the MI leaves in the medium and at concentration of 75% MI in the mixture total polyphenols concentration reached 0.8 g/l with a concentration of 0.6 g/l for the mixture of gallic acid and pyrogallol without counting saponins antraquinones and lignin. These substances affect the digestibility and biogas production performance (Bodas et al., 2008; Nyamangara et al., 2009; Olivera et al., 2007; Kamdem et al., 2013). In

spite of these toxic compounds, the biogas yield of the mixture of 75% MU and 25% MI was higher than that of MU leaves at 49.5 g /l, and the biogas yield of the different mixtures were higher than those of MI leaves at 13.3 g/l and 54.4 g/l (Chapter 3). That proves that MU leaves would release nutrients that facilitate the anaerobic biodegradation of leaves especially those of MI.

4.2. Methane yields

Regarding cumulative methane production over 230 days depicted in Figure 10b, CH₄ was produced from all the mixtures of MU and MI leaves. Moreover, CH₄ was only detected in biogas from the 5th day of culture for all the mixtures of MU and MI leaves. The methane content of the biogas measured by GC showed an increase from 48th to 230th day with a maximum of about 60%. Whereas a quite low methane production was generated from anaerobic digestion of the sole MI leaves (Mambanzulua et al., 2015) these results suggest that the mixtures are sufficient to enable growth and respiration of microflora producing mainly CO₂ before growth of methane-producing microflora. Indeed, e.g. for the mixture of 75% MU and 25% MI leaves, a high methane production rate of 1.7 ml/gday was reached at the 48th day with a content of 42.7% CH₄ in the biogas. Similar results were recorded with the 50% MU and MI mixture. That suggests that a highly efficient anaerobic digestion occurred without limitations although the MI leaves were present in the culture medium at a concentration of 13.3 g MI/l corresponding to a concentration of 0.3 g/l of total polyphenols. This content of MI leaves was identified formerly (Mambanzulua et al., 2015) as an inhibitory concentration due to their various PSMs (saponins, anthraquinones, flavonoids, anthocyanins, gallic and catechic tannins) (Tables 7 and 14).

Indeed, according to the literature, these bioactive substances are inhibitory of methanogenesis (Macheboeuf et al., 2011; Patra et al., 2010; Kamra et al., 2008). By contrast, the methane yield obtained from the mixture of 75% MU and 25% MI suggests the presence of suitable environmental conditions and nutrients for methanogenesis. The results reported in Tables 15 and 16 confirm this hypothesis since the methane yields of the mixtures were, after 100 days of incubation, inversely proportional to MI concentration. By comparison to other leaves, only the yield of the mixture of 75% MU and 25% MI, *i.e.* 0.125 l CH₄/g VS, was in the range reported by Gunaseelan (2004). In addition this methane yield increased by more than 23% *i.e.* 304 ml CH₄/g TOC (Table 16) when comparing to that of MU leaves alone

(Chapter 3). Since the C/N ratio was only improved from 7 to 9,3, this enhancement could be explained by a complementarity in nutrients between MU and MI leaves, with especially a positive impact of some specific substances on methanogenic fermentation of bioactive substances.

On another hand the high C/N of the MI leaves could not be considered as the only cause of their low biogas and methane production since methanization of GI was achieved effectively with a very high C/N ratio. Moreover the mixtures containing 50% MI and 75% MI approaching the optimal C/N value of 20 (Mital 1996) (Table 14), achieved lower methane yields than that of the mixture of 75% MU and 25% MI (Table 15). Therefore, the impact of increasing amounts of PSMs released by the MI leaves in the media should also be considered to reduce kinetics of the biomethanization since the 50% and 75% MI leaves mixtures achieved similar yields but lower than that with 25% MI leaves. Additionally whereas at the 230th day, the methane contents in biogas from the mixtures with 50% and 75% MI leaves were the same 51% and 60%, respectively. The gas production profiles were quite different showing slower metabolism in presence of the higher MI content. As a consequence the yield after 100 days of incubation for the mixture with 75% MI leaves was only at 38% of the total yield after 230 days while it was of 95% for the other mixtures.

Therefore the, biogas produced by the mixture of 75% MU and 25% MI after 100 days possessed the highest amount of energy, followed by those of 50% MI and 75% MI. This energy represented about 9% of the calorific power of wood that was 19% higher than that of MU leaves alone (Table 16, Chapter 3).

4.3. Glucose, ethanol and VFAs production

In general, the total quantities of VFAs were similar in the different mixtures of leaves. They reached up to about 9 g/l (Figures 11 and 12). According to Buffiere et al. (2007) this concentration could partially inhibit or slow the methanization. However, that suggests that hydrolysis and acidogenesis processes were efficient whatever the leaves proportions in the mixtures and that about 20% DW of each leaves mixture were degradable. These VFAs would only be generated from the leaves since no VFA was detected in the blank samples. A positive effect appeared in the mixture of 75% MU and 25% MI where the VFAs maximum production was as rapid as that of 50% MU and 50% MI but more rapid than that of 25% MU and 75% MI (Figure 12) and with a lower amount. That could be explained by the role of

some activator substance released from MU leaves which would contain proteins, essential amino acids and various vitamins (Ramou, 2000).

During acidogenesis, acetate, propionate and butyrate were produced simultaneously. Acetate production and its further conversion to methane were the fastest reactions in the mixture with 25% MI followed by that with 50% MI and 75% MI (Figure 12). Additionally, the maximum acetate amount was the highest of VFAs and was similar in the mixtures with 25% MI and 50% MI followed by that with 75% MI (Figure 12). These observations confirm that the bacteria responsible of acetate production e.g. *Clostridium* sp. and the methanogens *i.e.* *Methanohalobium* or *Methanosaeta* or *Methanosarcina* utilizing acetate as substrate would be more affected by anti-microbial components of MI leaves than by the C/N ratio.

Regarding the conversion of propionate and butyrate, the propionate profile was nearly equal for all the mixtures (Figure 11). By contrast, likely to acetate a slower conversion of butyrate was observed in the bottles containing 25% MU and 75% MI. These results should be related to the concentration of total polyphenols in the mixture of 25% MU and 75% MI that was approximately 73% of that of MI leaves at 54.4 g/l and significantly higher than the 0.3 g/l estimated in the mixture of 75% MU and 25% MI (Table 14).

However, at the end of BMP tests, all VFAs produced from the mixtures of MU and MI leaves at different concentrations were converted to biogas containing more than 50 % methane. No VFA accumulation was recorded. According to Chen et al. (2008) the accumulation of VFAs is an indicator of an inhibition. Therefore the codigestion would provide nutrients or specific enzymes of MU leaves that would raise or prevent the inhibitory effect of saponins, anthraquinones, flavonoids, anthocyanins, gallic and catechic tannins and other polyphenols of MI leaves. Consequently these substances would stimulate methanogenic archaea to adapt to these toxic compounds.

4.4. Digestates

At the end of the different BMP tests after 230 days of anaerobic digestion, the digestates of the mixture was separated in liquid (95%) and solid (5%) phase that were analysed. The inoculum was the same than that used in the chapter 4 and its impact on the total digestate was very low. The presence of saponins and of nearly 77% of the initial total polyphenols in

the liquid digestate (Table 15) seems to confirm the absence of methanogenic inhibition. According to Hernandez and Edyvean (2008), the other part *i.e.* about 23% of total polyphenols would be degraded, autoxidized, and adsorbed on the sludge matrix.

The nitrogen concentration in the residual liquid solution of this mixture was of 480.2 mg/l (7.1 mg/g) (Table 17). This concentration was lower than that of the inhibition (1500 mg/l) at pH 6.5-7.2 reported by Gerardi (2003). That could explain why although the nitrogen content in this mixture of MU and MI leaves was high, there was no adverse effect (Gerardi, 2003). This liquid residue had a C/N ratio of 3.6 and it was rich in nitrogen and potassium but poor in Phosphorus (Table 17). However, the majority (about 82%) of K measured in the liquid residue came from the KOH solution used for adjusting pH (Tables 14 and 17). This digestate could be used as fertilizer for plants, specially for vegetables (Hobson et al., 1993; CDAQ, 2005) but its maturation state should be first assessed according to Anid (1983) since it contained organic toxins such as saponins (with a foam height of 1.5 cm) and polyphenols (Table 17). By contrast, the solid residue of this mixture had a C/N ratio of 12 that was slightly higher than 10 considered as optimal for soil organisms and soil-conditioning (MCDF, 1993; Ducat and Bock, 1995; Davet, 1996; Mze, 2008). This residue rich in nitrogen and potassium but poor in phosphorus, since nearly 50% of P came from the phosphate-carbonate buffer solution would be used for vegetables and fruit trees.

5. Conclusion

This study proved that the methane yields of MU and MI leaves in anaerobic co-digestion at three mixing ratios (MU/MI=3/1, 1/1 and 1/3) were enhanced comparatively to those achieved with these leaves alone. However, the methanogenic kinetic, the methane and biogas yield decreased when the MI leaves fraction increased in the medium. This trend would be due to a low increase of synergic inhibitor effect caused by the increase in the mixture of toxic molecules such as saponins, polyphenols and anthraquinones originating especially from MI leaves. However these bioactive organic molecules would be partially degraded by microorganisms resulting in no complete inhibition of the methanogenesis but to a lower kinetic. As a consequence, only the methane yield of the mixture with 25% MI leaves, *i.e.* 0.125 CH₄/g VS for 100 days of incubation, was in the range reported for other leaves *i.e.* from 0.12 to 0.43 l CH₄/g VS. This study also showed that the methane yields of the anaerobic digestion of the mixtures decreased with increasing C/N ratio from 9.3 up to a more optimal C/N ratio of 21. This demonstrates that C/N ratio is not the sole parameter to consider

when preparing organic mixtures for anaerobic digestion. Co-digestion of MI leaves at 75% in mixture with MU leaves achieved a methane yield about 100-fold higher than that of the MI leaves alone at similar total leaves concentration of 54.4 g/l. Additionally, the co-digestion was profitable for the MU leaves in mixture with 25% MI resulting in a 30% improvement of methane yield. These results suggest that the MU leaves would carry some specific nutrients or possess some enzymes able to prevent the synergic inhibitory effect of bioactive compounds. Further investigations will be carried out to identify these components and the mechanisms of their action.

In addition, the digestates would represent efficient fertilizers for the promotion of the biological vegetable and fruit tree garden.

6. References

- Angelidaki I, Ahring, B (1993) Thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 560–564.
- Angelidaki I, Ellegaard L, Ahring BK. (1993) A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnol Bioeng* 42: 159–166.
- Angenot L (1973) Contribution à l'étude du strychnos usambarensisgilg, principal constituant d'un poison de chasse curarisant africain. Thèse de doctorat, Université de Liège.
- Anid PJ (1983) Contribution à la caractérisation des composts des déchets urbains : Evaluation de leur état de maturation et des risques éventuels de contamination métallique des cultures. Gembloux: FUSA, thèse de doctorat.
- APHA (1992) Standard methods for the examination of water and waste water: method 4500 P-E- Heteropoly blue Method. 18th edition, Greenberg, Clesceri, Eaton Editors, Washington. Merck. Notice d'utilisation du kit Spectroquant Phosphates.
- Barakat A, Monlau F, Steyer JP, Carrere H (2012) Effect of lignin derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour Technol* 104: 90–99.
- Barlaz MA (1994) Anaerobic biodegradability of cellulose and hemicellulose in excavated refuse samples using a biochemical methane potential assay. *Journal of Industrial Microbiology* 13: 147-153.

- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrésa S, Giráldeza FJ, López S (2012) Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176: 78–93.
- CDAQ, (2005) Quelques notions defertilization.
[http://www.cdaq.qc.ca/content_Document/Doc Quelques Notions Final.pdf](http://www.cdaq.qc.ca/content_Document/Doc%20Quelques%20Notions%20Final.pdf).
- Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T (2012) Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes. *Renew Sust Energ Rev* 16: 1462–1476.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99: 4044-4064.
- Clarkson WW, Xiao W (2000) Bench-scale anaerobic bioconversion of newsprint and office paper. *Water Science and Technology* 41: 93–100.
- Davet P (1996) Vie microbienne du sol et production végétale. Paris: INRA.
- Ducat N, Bock L (1995) Etat organique des terres agricoles en Hesbaye. In : Geypens Met Honnay JP (eds) *Matières organiques dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*. Comité de recherche sur la matière organique du sol. Bruxelles: I.R.S.I.A: 33-43.
- Esposito G, Frunzo L, Giordano A, Liotta F, Panico A, Pirozzi F (2012) Anaerobic co-digestion of organic wastes. *Rev Environ Sci Biotechnol* 11: 325-341.
- Frear C, Liao W, Ewing T, Chen S (2011) Evaluation of Co-Digestion at a Commercial Dairy Anaerobic Digester. *Clean-Soil, Air, Water* 39: 697-704.
- Gerardi Michael H (2003) *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Willey et Sons, Inc, p 107.
- Gunaseelan VN (1994) Methane production from *Parthenium hysterophorus* L., a terrestrial weed, in semicontinuous fermenters. *Biomass & Bioenergy* 6: 391–398.
- Gunaseelan VN (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review; *Biomass and Bioenergy* 13: 83-114.
- Gunaseelan VN (2004) Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks *Biomass and Bioenergy* 26: 389–399.
- Hamilton C, Hilgsmann S, Beckers L, Masset J, Wilmotte A, Thonart P (2010) Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi continuous operating mode. *Int J Hydrogen Energ* 35:1089–1098.

- Hernandez JE, Edyvean RGJ (2008) Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* 160: 20-28.
- Hiligsmann S, Masset J, Hamilton C, Beckers L, Thonart P (2011) Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology* 102: 3810-3812.
- Hobson PN et Wheatley AD (1993) *Anaerobic digestion modern theory and practice*. Elsevier applied science, London and New York, pp 21-232.
- Kamdem I, Tomekpe K, Thonart P (2011) Production potentielle de bioéthanol, de biométhane et de pellets à partir des déchets de biomasse lignocellulosique du bananier (*Musa spp.*) au Cameroun. *Biotechnol Agron Soc Environ* 15(3): 461–473.
- Kamdem I, Hiligsmann S, Vanderghem C, Bilik I, Paquot M, Thonart P (2013) Comparative biochemical analysis during the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass from six morphological parts of Williams Cavendish banana (Triploid *Musa AAA* group) plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*: 1-12.
- Kamra DN, Patra AK, Chatterjee PN, Ravindra Kumar, Neeta Agarwal, Chaudhary LC (2008) Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal Experimental Agriculture* 48:175-178.doi:10.1071/EA07268.
- Kizilkaya R, Bayrakli B (2005) Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *Applied Soil Ecology* 30: 192–202.
- Lelo N (1999) La gestion des déchets domestiques : bilan annuel d'une expérience pilote de l'Hôtel de Ville de Kinshasa. *Med Fac Landbouww, Univ Gent* 64(1): 107-114.
- Lusakibanza M (2012) Etude phytochimique et pharmacologique de plantes antipalidiques utilisées en médecine traditionnelle congolaise. Thèse de doctorat, Université de Liège, pp 130-135.
- Macheboeuf D, Bergeault R, Papon Y, Arturo-Schaan M (2011) Effets comparés de trois sources de saponines extraites de *Yucca schidigera*, *Quillaj Saponaria* ou *Trigonellafoenum-graecum* sur les fermentations ruminales in vitro et les émissions de méthane. *Renc Rech Ruminants* 18: 135.
- Mahamat AY, Gourdon R, Leger P, Vermande P (1989) Methane recovery by anaerobic digestion of cellulosic materials available in Sahel, *Biological Wastes* 30: 181-197.

- Mambanzulua N, Kayembe K et Noki V (1999) Détermination des activités méthanogéniques spécifiques des lisiers dans le traitement anaérobie des déchets. *Med FacLandbouww, Univ Gent* 64(1): 183-188.
- Mambanzulua Ngoma P, Hiligsmann S, Sumbu Zola E, Culot M, Fievez T, Thonart P (2015) Comparative study of the methane production based on the chemical compositions of *Mangifera Indica* and *Manihot Utilissima* leaves. *SpringerPlus*, 4:75 doi: 10.1186/s40064-015-0832-y.
- Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, Beckers L, Franck F, Thonart P (2010) Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-production *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Mata-Alvarez J (2002) *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. IWA Publishing.
- Mbonigaba MJJ (2007) Etude de l'impact des composts à base de biomasse végétale sur la dynamique des indicateurs physico-chimiques, chimiques et microbiologiques de la fertilité des sols : application sur trois sols acides tropicaux du Rwanda. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques Gembloux, Belgique.
- MCDF (1993) *Memento de l'agronome Paris: 4ème éd (réimpression), collection techniques rurales en Afrique, Ministère de la coopération et du développement (France)*.
- Mital KM (1996) *Biogas systems: principles and applications*. New Age International Publishers Limited, New Delhi.
- Mulaji KC (2011) Utilisation des composts de biodéchets ménagers pour l'amélioration de la fertilité des sols acides de la Province de Kinshasa (Rép. Dém. du Congo). Thèse de Doctorat, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Gembloux, Belgique.
- Multon JL (1991) *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Vol 4, analyses des constituants alimentaires, Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 370-380*.
- Mze SP (2008) influence d'apports en matières organiques sur l'activité biologique et la disponibilité du phosphore dans deux sols de la région des grands lacs d'Afrique. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire de Sciences Agronomique de Gembloux, Belgique.
- NF T 90 – 024 (1963) *Essais des eaux, dosage spectrophotométrique du manganèse*. AFNOR, Paris.
- Nyamangara J, Mtambanengwe F, Musvoto C (2009) Carbon and nitrogen mineralization from selected organic resources available to smallholder farmers for soil fertility improvement in Zimbabwe. *African Journal of Agricultural Research* 4: 870-877.

- Oliveira L, Cordeiro N, Evtuguin DV, Torres IC, Silvestre AJD (2007) Chemical composition of different morphological parts from *Dwarf Cavendish* banana plant and their potential as non-wood renewable source of natural products. *Ind Crops Prod* 26: 163–172.
- Owen WF, Stuckey DC, JB H Jr, Young LY, McCarty PL (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Resour* 13:485–492.
- Parawira W, Murto M, Zvauya R, Mattiasson B (2004) Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. *Renewable Energy* 29: 1811-1833.
- Patra AK, Saxena J (2010) A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1205- 1217.
doi: 10.1016/j.phytochem. 2010.05.010.
- Rannou, MJN (2000) Les richesses du sol, les plantes à racines et tubercules en Afrique: une contribution au développement des technologies de récolte et d'après-récolte, DES, GTZ, Feldafing Allemagne.
- Rodier J (1966) Analyse de l'eau. 8^e édition Dunod, Paris.
- Rodriguez C, Hiligsmann S, Ongena M, Charlier R, Thonart P (2005) Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation* 16: 415–422.
- Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult* 16(3): 144-158, University of California.
- Shuku NO (2011) Impact de l'utilisation de l'énergie-bois dans la ville province de Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC). Mémoire, Université du Québec. Montréal
- Tanaka S, Kobayashi T, Kamiyama K, Bildan M (1997) Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Science and Technology* 35: 209–215.
- Tiehm A, Nickel K, Zellhorn M, Neis U (2001) Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research* 35: 2003–2009.
- Vanhaelen M (1994) Identification de matières premières d'origine végétale par chromatographie planaire et microscopie à l'usage du pharmacien d'officine. Rapport mi-projet.
- Wagner H, Bladt S (1966) Plant drug analysis. Springer Verlag, Berlin. Wang YS, Byrd CS.

Ward AG, Hobbs PJ, Hollimann PJ, Jones DL (2008) Optimisation of the anerobic digestion of agricultural resources. *Bioressouce Technology* 99: 7928-7940.

Chapitre VI: Discussion générale, conclusion et perspectives

1. Discussion générale

La biomasse végétale constitue l'essentiel (62%) des déchets solides de la Ville Province de Kinshasa (VPK) dont les feuilles sont les plus accessibles (Mafwila, 1999; Pangu et al., 1999; Lelo, 2008). Mais, cette biomasse n'est pas systématiquement valorisée suite au manque de politique générale efficace sur la gestion des déchets en RDC. Parmi les feuilles, les plus visibles sont celles de *Manihot utilissima* (MU) et *Mangifera indica* (MI). Elles ont été étudiées dans ce contexte, en vue de leur élimination dans l'environnement par la méthanisation en valorisant le biogaz comme source énergétique et le digestat comme fertilisant. On contribue ainsi à la salubrité, à la fertilisation du sol et à l'approvisionnement en énergie à Kinshasa. Mais hélas, leurs potentiels méthanogènes ne sont pas connus et les données sur leurs compositions sont incomplètes dans la littérature. C'est ainsi que leurs compositions chimiques et leurs pouvoirs méthanogènes ont été déterminés dans le cadre de cette thèse. Une première partie de ce chapitre fait une synthèse des résultats obtenus et la seconde aborde la projection à l'échelle de la VPK.

1.1. Synthèse des résultats

Les résultats de rendements de production en biogaz et en méthane repris au Tableau 8 ont montré que la production du biogaz et du méthane à partir des feuilles de MU augmentait avec la concentration. La méthanisation des feuilles de MU s'est réalisée sans accumulation des AGV, autrement dit, sans inhibition jusqu'à la concentration la plus élevée de 49,5 MU g/l en dépit de leur rapport carbone/azote (C/N) de 7 (Figure 5) inférieur aux valeurs optimales variant de 20 à 30 (Mital, 1996). A cette concentration, les feuilles de MU ont conduit à une teneur basse en polyphénols totaux solubles dans l'eau, soit environ 0,1 g/l (Tableau 14) et en saponines qui sont généralement en quantité minime dans les végétaux (Multon 1991). En outre, les feuilles de MU étaient exemptes des anthraquinones (Tableau 7). Cette teneur en polyphénols était inférieure à 0,3 g/l identifiée comme la concentration inhibitrice minimale des métabolites secondaires sur la méthanisation (Chapitre 4). D'autres

expériences ont montré que les métabolites secondaires notamment la saponine de *Quilaja saponaria molina pract* et les phénols comme l'acide tannique stimulent la digestion à des concentrations basses (0,3 g/l) en présence de glucose (Chapitre 4). Patra et al. (2012) ont également rapporté cet effet positif avec la saponine de *Quilaja* à la concentration de 0,2 g/l. Cela expliquerait le rendement élevé en biogaz pour les feuilles de MU comparativement à celui des feuilles de MI (Tableau 8). En outre, les feuilles de MU sont riches en glucides (essentiellement amidon), en protéines, en vitamines (Rannou, 2000) et en minéraux (Tableau 6).

Les feuilles de MI ont par contre un rapport C/N plus élevé que les valeurs optimales fixées par Mital (1996). Ces feuilles sont pauvres en minéraux (Tableau 6). La digestion anaérobie de ces feuilles à des concentrations comprises entre 1,7 et 6,7 g/l s'est réalisée sans inhibition probablement dû aux teneurs en polyphénols inférieures à la concentration inhibitrice minimale de 0,3 g/l des métabolites secondaires (Tableau 14). Cependant, il n'y avait pas production de biogaz mesurée à 1,7 g MI/l. Plusieurs raisons ont été évoquées dont la concentration en substrat disponible insuffisante pour une dégradation par les microorganismes méthanogènes ou le volume de gaz produit serait trop faible pour être détecté par la méthode utilisée. Cela se justifie puisqu'à 6,7 g/l, les feuilles de MI ont produit du biogaz avec le rendement le plus élevé (Tableau 8). Dans cette condition, la teneur en polyphénols serait presque 3 fois moindre que la concentration inhibitrice minimale (0,3 g/l) (Chapitre 4) en dépit de la présence d'autres métabolites secondaires tels que les saponines et anthraquinones (Tableau 7). Une baisse du rendement du biogaz et du méthane a été observée à partir de 13,3 g MI/l jusqu'à la concentration la plus élevée de 54,4 g MI/l. Dans ces cas, les concentrations en polyphénols seraient respectivement égales et supérieures à la concentration inhibitrice minimale de 0,3 g/l (Tableau 14). A cet effet inhibiteur des polyphénols s'ajoute ceux des saponines, des anthraquinones identifiées qualitativement mais non quantitativement au sein de MI (Tableau 7) et celui de la lignine selon Nyamangara et al. (2009).

Le rendement en méthane à la concentration de 54,4 g MI/l était presque nul (Tableau 9). L'inhibition de la méthanisation des feuilles de MI était décelable également à partir de l'accumulation des AGV (Figure 5). L'acide acétique seul s'était accumulé à la concentration de 13,3 g MI/l. Tandis qu'à la concentration de 54,4 g MI/l, il y avait accumulation d'un mélange d'acides acétique et un peu de propionique (Figure 5). On peut en déduire que les bactéries seraient inhibées sélectivement en fonction de l'augmentation de la concentration en

substances toxiques des feuilles de MI (lignine, polyphénols, saponines et anthraquinones) dans le milieu de culture. Les méthanogènes seraient les premiers à être intoxiqués à la concentration de 13,3 g MI/l suivis des acétogènes à la concentration de 54,4 g MI/l. De plus, la concentration maximale des AGV à l'état ionique étant de l'ordre de 1% à la concentration de 54,4 g MI/l (Figure 5), ils ne pouvaient pas inhiber complètement la méthanisation selon Buffiere et al. (2007).

A l'issue de la digestion anaérobie, les teneurs en carbone et azote totaux organiques au sein des digestats de ces deux feuilles ont été déterminées. Les digestats issus de la fermentation méthanique des feuilles de MU à la concentration de 49,5 g/l seraient compatibles pour être utilisés comme fertilisant avec leur rapport C/N similaire à la valeur optimale de 10 selon la littérature (MCDF, 1993; Ducat and Bock, 1995; Davet, 1996; Mze, 2008). Ces digestats représentaient environ 85% du poids sec du substrat initial (Tableau 18). Par contre les digestats des feuilles de MI à la concentration de 54,4 g/l représentant 95% du poids sec du substrat initial (Tableau 18), contenaient les acides gras volatils sous risque de polluer le sol, ils ne pourraient pas être utilisés tel quel (Anid, 1983; Hobson and Wheatley, 1993). Quant à celui obtenu à la concentration de 6,7 g MI/l, bien que riche en carbone, il pourrait être utilisé soit seul pour enrichir le sol très pauvre en carbone soit mélangé à un autre fertilisant riche un azote (Palm et al., 2001; Nyamangara et al., 2009).

Tableau 18 Bilan carbone des essais de méthanisation des feuilles de MU et de MI

Constituant	49,5 g MU/l			54,4 g MI/l			53,3 g (50% MU+50% MI)/l		
	Substrat initial	Digestats	Biogaz	Substrat initial	Digestats	Biogaz	Substrat initial	Digestats	Biogaz
TOC (mg)	2751,0	2338,0	412,6	3477,0	3303,2	173,9	3183,1	2642,0	541,1

Il était démontré dans les Chapitres 3 et 4 que l'inhibition de la méthanisation des feuilles de MI et de MU serait due surtout à leur concentration en métabolites secondaires plutôt qu'à leur rapport C/N défavorable. On en avait déduit que, en général, la concentration en métabolites secondaires dans le digesteur pour une meilleure méthanisation doit être inférieure à 0,3 g/l (Chapitre 4).

Outre la mise en évidence des facteurs influençant la méthanisation de ces feuilles, l'objectif de ce travail était aussi de mettre au point une technique simple peu onéreuse de

méthanisation de ces feuilles. Bien que la méthanisation des feuilles de MU et MI ne soit pas inhibée respectivement jusqu'à 49,5 g et 6,7 g/l, leurs potentiels méthanogènes étaient plus faibles que ceux trouvés dans la littérature dont les valeurs varient de 0,12 à 0,43 ml/g SV (Gunaseelan, 2004). Cela s'expliquerait par le fait que ces métabolites secondaires contiennent dans leurs structures des noyaux aromatiques et des cycles hydrocarbonés difficilement biodégradables (Hernandez et Edyvean 2008). Les feuilles de MU, étant chimiquement les plus propices à la méthanisation, ont un rendement relativement faible soit 0,1 ml/g SV tandis que celui des feuilles de MI, il est presque nul aux concentrations les plus élevées (Tableau 9). Suite à cela, une co-digestion de ces feuilles a été tentée. La co-digestion anaérobie est une technique peu dispendieuse, elle consiste à la mise au point d'un rapport C/N optimal à partir des substrats différents en les méthanisant conjointement. Pour ce faire, les feuilles de MU et de MI ont été mélangées en 3 proportions différentes à savoir: mélanges avec 25, 50 et 75% des feuilles de MI.

Les résultats ont démontré qu'en co-digestion anaérobie sans agitation, le biogaz produit par le mélange des feuilles de MU et de MI à la concentration totale de 53,3 g/l diminuait quand la teneur en feuilles de MI augmentait (Tableau 15). Le mélange contenant 25% de feuilles de MI soit 13,3 g MI/l a produit du biogaz sans inhibition contrairement en digestion anaérobie des feuilles de MI seules (Figure 5, Tableau 15). Pourtant, cette portion de feuilles de MI dans le mélange correspondait à une concentration de polyphénols de 0,3 g/l (Tableau 14). Cette concentration avait auparavant été identifiée comme concentration inhibitrice minimale de la méthanisation des feuilles de MI seules (Figures 3, 4 et 5). Ce phénomène de biodégradation observé par rapport aux composés antibactériens ou anti-méthanogènes pourrait s'expliquer par la présence dans le milieu de matières protéiques ou enzymatiques et glucidiques issues des feuilles de MU. Ces matières activeraient ainsi la digestion du mélange végétal en stimulant les microorganismes avec un rendement en biogaz le plus élevé parmi les trois différents mélanges (Tableau 15) soit 511 ml/g COT. Avec la proportion de 50% à 75% de feuilles de MI dans le mélange, le rendement de production de biogaz diminue. La quantité de polyphénols dosée dans le milieu était respectivement de 0,6 à 0,8 g/l (Tableau 14). Cette baisse du rendement de biogaz était presque proportionnelle à l'augmentation de la quantité de feuilles de MI dans le milieu de culture (Tableau 15). Cela pourrait être dû à l'augmentation des composés constitués de noyaux benzéniques (polyphénols, glucosides alcooliques et anthraquinones) et à chaînes hydrocarbonées cycliques (saponines) dans le milieu de culture. Notons que la diminution de la production du biogaz était davantage

perceptible au cours de la biodégradation du mélange à 75% de feuilles de MI dans les 100 premiers jours (Figure 10a).

Le mélange à 25% MI a conduit à un rendement en méthane le plus élevé soit 304 ml/g COT, c'est-à-dire 23% de plus que les 248 ml/g COT produits lors des essais avec le MU seul à une concentration de 49,5 g/l dans le milieu. Cette amélioration des rendements évolue inversement par rapport à celle des ratios C/N de ces mélanges de feuilles, partant de 9.3 pour le mélange à 25% MI jusqu'à un rapport C/N de 21 relativement optimal pour le mélange à 75% MI (Tableau 15). Cela serait dû à l'augmentation des inhibiteurs dans le milieu de culture apportés principalement par les feuilles de MI (Tableau 14). Soulignons cependant que le rendement en méthane à la concentration élevée en feuilles de MI (75%) était le plus bas (Tableau 15) soit 212 ml/g COT mais 62% et 40 fois plus élevé que les rendements respectifs (131 et 5 ml/g COT) obtenus pour MU et MI seuls à une concentration similaire de 13.3 et 54,9 g/l dans le milieu. De plus, aucune accumulation des AGV n'a été enregistrée durant la co-digestion anaérobie de ces différents mélanges de feuilles de MI avec celles de MU. Un certain ralentissement a toutefois été observé dans la disparition des AGV en fonction de l'augmentation de la concentration des feuilles de MI dans le milieu (Figure 12).

Par conséquent, la levée d'inhibition serait due à la synergie des microorganismes et constituants des feuilles de MU et MI.

Les digestats obtenus à l'issue de la co-digestion des feuilles de MU et MI équivalant à 83% en matière sèche du substrat initial (Tableau 18), seraient, bien que pauvres en phosphore, également dans la norme des fertilisants favorables pour les microorganismes et le conditionnement du sol (Tableau 17).

1.2. Projection à l'échelle de la Ville Province de Kinshasa (VPK)

Ces résultats peuvent être exploités pour estimer comme au chapitre 2, l'efficacité de l'élimination des déchets végétaux (feuilles) par la méthanisation sur la résolution des problèmes relatifs à l'énergie au niveau des ménages, à la déforestation et à la fertilisation des sols pour la promotion de l'agriculture familiale urbaine et périurbaine et aussi l'agriculture industrielle périurbaine. La production annuelle de ces déchets végétaux (feuilles mortes) s'élèverait à 1 million de tonnes.

Le ménage kinois a comme source énergétique principale le bois énergie pour la cuisson (Schuru, 2011). Elle représente 87% de la consommation énergétique ménagère kinoise (Schuru, 2011). La consommation annuelle totale en bois énergie à Kinshasa est estimée à $963 \cdot 10^{10}$ kJ (Chapitre 2). Cette consommation est à la base de la destruction des forêts périurbaines et des provinces voisines de la Ville Province de Kinshasa soit environ $3\,640 \text{ km}^2$ (Shuku, 2011). A cela s'ajoute l'agriculture itinérante familiale périurbaine sur brulis pratiquée sur un sol pauvre en matière organique d'où la nécessité de fertiliser (Mulaji, 2011). La superficie agricole de Kinshasa est estimée à $55,11 \text{ km}^2$ (Primature, 2014; Mbuangi et al., 2005; Makungu, 2006).

En effet, dans l'objectif d'un traitement des déchets organiques à domicile, à proximité ou sur le site de production pour réduire les dépenses relatives au transport ou à la logistique et en même temps approvisionner les ménages en énergie et en engrais (Figure 13), il serait important de connaître avant tout la quantité des déchets que peut générer en moyenne une parcelle d'habitation ou un ménage et un marché dans la VPK.

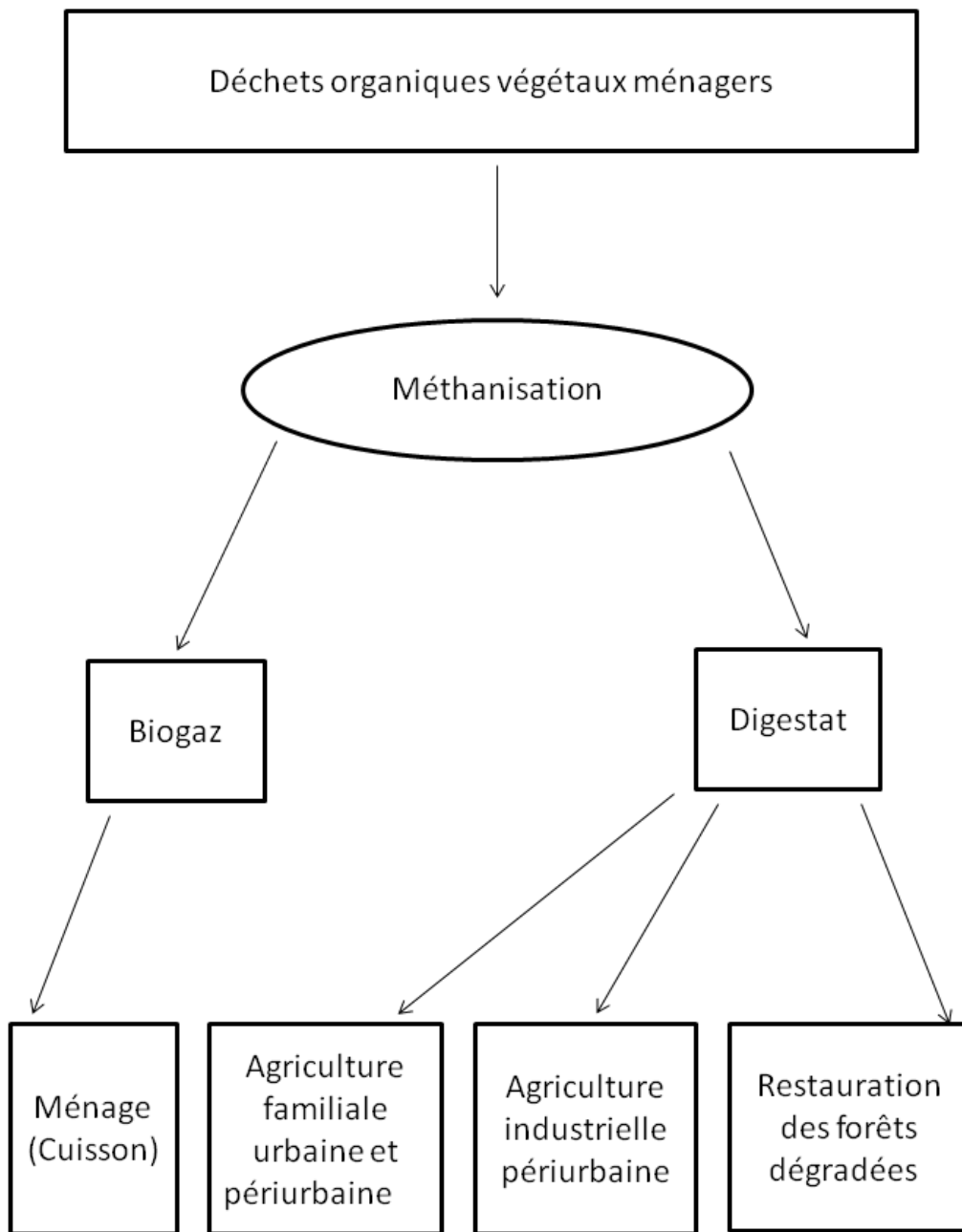


Figure 13 Valorisation des déchets organiques végétaux ménagers

Cependant, suite à l'absence des données suffisantes sur les déchets des marchés, ce travail s'est focalisé sur les déchets végétaux qu'une parcelle d'habitation (ménage) peut produire. D'après les données du chapitre 2, une personne produit en moyenne 600 g des déchets par jour contenant 70% de matière sèche; les déchets kinois contiennent 66% de matière organique et 94% de déchets végétaux (Lelo, 2008; Pangu, 1999) et chaque ménage kinois comprend 6,7 personnes selon le projet JEEP. En supposant dans le cadre de ce travail que tous les déchets végétaux soient les feuilles de MU et MI mélangées dans le rapport de 1

(suite à l'inexistence des données). La production journalière moyenne par ménage en poids sec de ces déchets mélangés serait d'environ 1,7 kg et tous les ménages produiraient annuellement environ 1,4 million de tonnes de déchets des feuilles mortes brutes, soit environ 1 million de tonnes de déchets secs. La production annuelle des déchets ainsi estimée, la consommation annuelle du bois énergie estimée donnée précédemment et les données des Tableaux 2, 3, et 4 ont permis de déterminer les pouvoirs calorifiques inférieurs (PCI) totaux annuels des feuilles, du bois énergie, du pétrole et de l'électricité reportés au Tableau 5, en supposant que le bois énergie n'est consommé que par le ménage.

En se référant aux résultats du chapitre 5, le mélange des feuilles de MU et MI produiraient annuellement $273\,254 \times 10^7$ kJ avec un pouvoir méthanogène de $0,091 \text{ m}^3/\text{kg SV}$ pour 100 jours d'incubation puisque conformément à la littérature le pouvoir méthanogène est déterminé après 100 jours de méthanisation (Gunaseelan 2004). Cette énergie serait presque équivalente à 28% de l'énergie du bois énergie consommée annuellement par les ménages kinois selon Schuru (2011) (Tableaux 3, 4 et 5) et représenterait environ 25% de la consommation énergétique totale annuelle dans les ménages.

En effet, la quantité des digestats découlant de la méthanisation en co-digestion des feuilles de MU et de MI pour un ménage kinois, a été estimée en soustrayant le poids sec initial des feuilles de la quantité de biogaz produite. Ainsi, près de 11 307 907 tonnes de digestat seraient produites par l'ensemble des ménages kinois. Selon le procédé d'épandage Bahri et Houmane (1987) et les données de la Primature (2014), de Makungu (2006) et de Mbuangi et al. (2005). Cette quantité de digestat couvrirait par an, la totalité des surfaces agricoles et des forêts dégradées (Figure 13). La couverture en digestat hors des ménages s'effectuerait sur des grands jardins des vallées et des espaces à reboiser environnants pour réduire le coût de la logistique.

Ainsi, en se basant sur le fait que la période d'incubation est de 100 jours, chaque ménage posséderait à volonté, au moins 2 jusqu'au plus 100 digesteurs parcellaires discontinus amovibles disposés en série dont le schéma d'un exemplaire est indiqué à la Figure 14 pour une production continue du biogaz à partir des déchets végétaux ménagers.

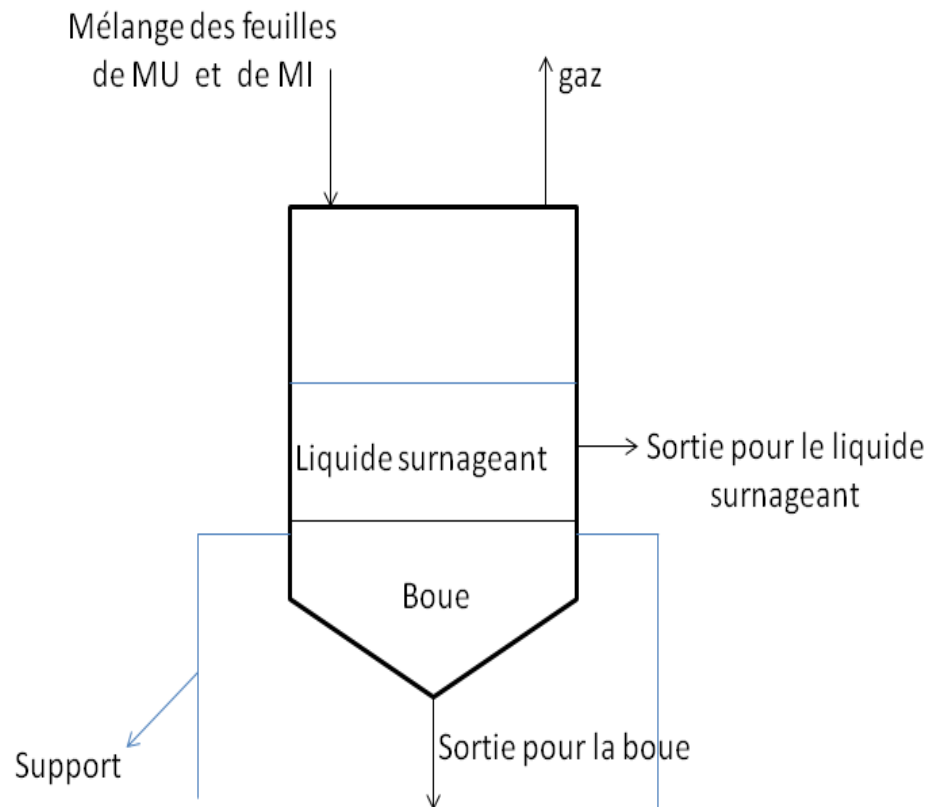


Figure 14 Digesteur discontinu familial amovible

Comme l'enjeu futur serait d'optimiser cette co-méthanisation, en procédant de la même manière que précédemment le potentiel énergétique idéal ou théorique est estimé aussi. Si l'on arrivait à convertir tout le carbone organique des déchets végétaux (feuilles) en biogaz, d'après les données des Tableaux 16 et 18. Le volume moyen en méthane de ce biogaz correspondrait à $1\,707\,837,5\,10^7$ kJ et serait capable de diminuer la consommation du bois énergie de 177%. Une couverture totale du besoin énergétique des ménages par le biogaz pour la cuisson est envisageable d'après les données de Schuru (2011). Cela serait possible à long terme. A partir de ce potentiel énergétique, il serait en pratique possible de réduire d'environ 71% la consommation du bois et de couvrir 63% du besoin énergétique dans les ménages à Kinshasa à moyen terme. Il y aurait conjointement une réduction de la déforestation dans le même ordre.

Il est aussi à noter qu'il y aurait une diminution de la quantité de digestat au fur et à mesure de l'amélioration du rendement en méthane de la co-digestion mais la couverture annuelle totale en fertilisant ne serait pas affectée selon les informations de la Primature (2014), de Makungu (2006) et de Mbuangi et al. (2005).

Dans le souci d'atteindre l'objectif de cet enjeu futur et l'application de la méthanisation familiale, un essai pilote (annexe) a été réalisé et les résultats obtenus sont prometteurs.

2. Conclusion et perspectives

Les problèmes majeurs touchant actuellement la Ville Province de Kinshasa à savoir celui de la salubrité, de la fertilisation du sol et de l'énergie et tout ce qu'ils entraînent comme conséquence, pourraient trouver partiellement solution par la méthanisation. A la différence du compostage, la méthanisation permet de récupérer facilement l'énergie contenue dans la biomasse sous forme de biogaz et d'immobiliser l'azote dans les digestats sans exposition des microorganismes, sans émission d'odeur, sans attrait et prolifération des vecteurs. Cette technique une fois appliquée serait capable de réduire certaines maladies, créer des emplois, réduire les émissions des gaz à effet de serre, la déforestation et promouvoir l'agriculture familiale urbaine et périurbaine pour la souveraineté alimentaire. Il ressort de cette thèse que le ménage kinois pourrait idéalement bien arriver à couvrir ses besoins en énergie et en fertilisant s'il arrive à maîtriser et optimiser le processus de méthanisation des déchets organiques. A priori une réduction à environ 28% à court terme en consommation de bois énergie au niveau des ménages serait possible à partir d'une méthanisation ménagère ou parcellaire des déchets. Un essai pilote prometteur a été réalisé (annexe).

Les investigations menées ont révélé que lors de la méthanisation des matières végétales le glycone ou le groupement glycosyl et le groupement carboxylate des métabolites secondaires se décomposeraient en se convertissant en méthane dans certaines conditions. Les aglycones généralement constitués des cycles hydrocarbonés et des noyaux aromatiques ou des groupements phénoliques, ne seraient pas dégradables. En général, ces métabolites secondaires à des teneurs inférieures à 0,3 g/l pourraient être bénéfiques pour la stimulation de la méthanisation et ils ralentiraient ou inhiberaient totalement la méthanogénèse à des concentrations plus élevées. Leurs actions inhibitrices augmentent généralement avec la concentration.

L'inhibition des feuilles de MI sur la fermentation méthanique évoluerait dans le sens contraire des étapes de ce processus c'est-à-dire elles inhiberaient d'abord la méthanogénèse suivi de l'acétogénèse, l'acidogénèse et l'hydrolyse. Ce phénomène pourrait être exploité pour isoler des produits intermédiaires tels que les acides butyrique, propionique et acétique ainsi que leurs biomasses respectives.

Ce travail a démontré que la toxicité exercée par des composés actifs des feuilles sur la fermentation méthanique était plus importante que leurs rapports C/N.

Cette étude a prouvé également que lors de la co-digestion anaérobie des feuilles de MU et de MI, certains nutriments, probablement des protéines ou enzymes issues des feuilles de MU atténueraient l'effet inhibiteur des métabolites secondaires. En outre, les digestats résultant de cette co-digestion des feuilles étant pauvres en phosphore, des recherches pourraient être menées pour identifier des déchets riches en phosphore pour leur incorporation en amont par co-digestion anaérobie ou en aval dans les digestats. Ainsi, sur base de cette étude la méthanisation peut être élargie à d'autres déchets organiques pour la mise au point de digestions anaérobies à multi-substrats. Cela pour parvenir à l'élimination complète de tous les déchets organiques kinois.

Une étude sur l'évaluation de la maturation des digestats serait menée pour confirmer sa stabilité ou rééquilibrer le rapport C/N et tester s'ils ont aussi des propriétés répulsives face aux ravageurs des cultures.

3. Bibliographie

- Anid PJ (1983) Contribution à la caractérisation des composts des déchets urbains: Evaluation de leur état de maturation et des risques éventuels de contamination métalliques des cultures. Thèse de doctorat, Gembloux, FUSA, Gembloux, Belgique.
- Bahri A, Houmane B (1987) Effet de l'épandage des eaux usées traitées et des boues résiduelles sur les caractéristiques d'un sol sableux de Tunisie. *Science du sol* Plaisir-France 25 (4) : 267-278.
- Buffiere P, Carrere M, Lemaire O, Vasquez J (2007) Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides : Projet METHAPI-Expertise, Centre de Recherche Propreté & Energie.
- Davet P (1996) Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris
- Ducat N, Bock L (1995) Etat organique des terres agricoles en Hesbaye. In: Geypens Met Honnay JP (ed) *Matières organiques dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales*. Comité de recherche sur la matière organique du sol, Bruxelles: I.R.S.I.A, pp 33–43.
- Gerardi MH (2003) *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Willey et Sons, Inc, p 107.

- Gunaseelan VN (2004) Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks *Biomass and Bioenergy* 26: 389–399.
- Hernandez JE, Edyvean RGJ (2008) Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* 160: 20–28.
- Hobson PN, Wheatley AD (1993) *Anaerobic digestion modern theory and practice*. Elsevier applied science. London and New York, pp 21–232.
- Lelo N (2008) *Kinshasa: Ville et environnement*. Édition Harmattan, Paris.
- MbuangiML, SendaL, KombaND (2005) *Monographie de Kinshasa*,
[En ligne] URL : http://ruralcongo.cd/minider/images/pdf/kinshasa_monographie.pdf
- Mafwila M (1999) La problématique des déchets agricoles dans la ville de Kinshasa. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 64(1): 41-44.
- Makungu MN (2006) Le volet «développement» dans une action humanitaire: une expérience à Kinshasa (République Démocratique du Congo). [En ligne] URL: <http://www4.uqo.ca/observer/DevLocal/Initiatives/Internationales/Kinshasa.pdf>. Consulté le 14 décembre 2014.
- MCDF (1993) *Memento de l'agronome Paris: 4ème éd (réimpression)*, collection techniques rurales en Afrique Ministère de la coopération et du développement (France).
- Multon JL (1991) *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Vol 4, analyse des constituants alimentaires, Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 370-380.
- Mze SP (2008) influence d'apports en matières organiques sur l'activité biologique et la disponibilité du phosphore dans deux sols de la région des grands lacs d'Afrique. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire de Sciences Agronomique de Gembloux, Belgique.
- Nyamangara J, Mtambanengwe F, Musvoto C (2009) Carbon and nitrogen mineralization from selected organic resources available to smallholder farmers for soil fertility improvement in Zimbabwe, *African Journal of Agricultural Research* Vol. 4 (9), pp. 870-877, [online] <http://www.academicjournals.org/AJAR>. Consulté le 29 décembre 2013.
- Palm CA, Gachengo N, Delve RJ, Cadisch G, Giller KE (2001) Organic inputs for soil fertility management in tropical agroecosystems: application of an organic resource database. *Agric Ecosys Environ* 83: 27-42.
- Pangu SZ, Shidi G, Kabuyaya MV (1999) Problématique de l'enlèvement des déchets solides à Kinshasa: les moyens mis en œuvre. *Med Fac Landbouww Univ Gent* 64(1): 273-289.

- Patra AK, Stiverson J, Yu Z (2012) Effects of quillaja and yucca saponins on communities and select populations of rumen bacteria and archaea, and fermentation in vitro, *Journal of Applied Microbiology* 113: 1329-1340.
- Primature de la RDC (2014) <https://www.primature.cd/public/securite-alimentaire-gouvernement-et-lr-group-signent-deux-contrats-pour-relancer-le-daipn>. Consulté, le 11 décembre 2014.
- Rannou MJN (2000) Les richesses du sol, les plantes à racines et tubercules en Afrique : une contribution au développement des technologies de récolte et d'après-récolte. DES, GTZ, Feldafing Allemagne p 242.
- Shuku NO (2011) Impact de l'utilisation de l'énergie-bois dans la ville province de Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC), Mémoire. Université du Québec, Montréal.
- Schure J, Verina I, Mayimba AC (2011) Bois énergie en RDC: Analyse de la filière des villes de Kinshasa et de Kisangani. *Projet Makala/CIFOR*, [En ligne] URL: <http://www.gembloux.ulg.ac.be/newsletter/newsletter10/img/Makala..> Consulté le 25 septembre 2013.

Annexe: Anaerobic co-digestion of *Mangifera indica* and *Manihot utilissima* leaves in bioreactor for the methane production

Prepared for submission to BASE.

**Philippe Mambanzulua Ngoma^{ab}, Serge Hiligsmann^a, Eric Sumbu Zola^c, Marc Ongena^a,
Philippe Thonart^a**

a: Walloon Center of Industrial Biology (CWBI), Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030, Gembloux, Belgium

b: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 212, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

c: Faculty of Agricultural Sciences, University of Kinshasa, P. O. Box 117, Kinshasa XI, Democratic Republic of Congo

Avant propos

Les résultats du chapitre précédent ont montré que seuls les rendements de la méthanisation du mélange avec 25% des feuilles de MI et celui avec 50% des feuilles de MI sont meilleurs en comparant à ceux des feuilles de MU seules et a fortiori à ceux des feuilles de MI seules. Leurs digestats d'après les analyses, seraient bons pour le maraichage. En plus, aucune inhibition n'a été enregistrée durant la méthanisation de ces différents mélanges. Sauf un ralentissement remarquable lors de la fermentation méthanique du mélange contenant 75% des feuilles de MI. La co-digestion anaérobie des feuilles de MU et de MI en proportions égales sera testée dans ce chapitre mettant en oeuvre la biométhanisation à l'échelle pilote.

Avant l'ensemencement, l'inoculum est d'abord enrichi au moyen de l'acétate de sodium puis est introduit dans un digesteur agité; ensuite, le mélange des feuilles de MU et de MI y est ajouté progressivement. La production du biogaz est mesurée au cours du temps au moyen d'un débitmètre. Cependant, lorsque la mesure du biogaz produit devient imprécise par le débitmètre, les digestats sont transmis dans une bouteille de sérum pour continuer à suivre la production du biogaz par la méthode du piège à KOH. La composition de ce biogaz est

déterminée par la chromatographie gazeuse. Par ailleurs, la production des métabolites dans le digesteur est suivie également au cours du temps mais par la HPLC.

A la fin de la digestion, les digestats sont séparés en phase liquide et solide puis analysés pour connaître leurs valeurs fertilisantes.

Abstract

The Democratic Republic of Congo in its capital Kinshasa produces mainly, the plant waste of which most accessible are the leaves of *Mangifera indica* (MI, mango leaves) and *Manihot utilissima* (MU, cassava leaves) but it has no policy of treatment of these waste. Thus, after the realization of the possibility of the optimization of the methane production of these leaves in anaerobic co-digestion in the previous work. An experimental was carried out in a stirred bioreactor at 30°C to produce methane from these leaves mixed in a ratio of 1. The daily methane yields for MU and MI were nearly 2-fold and 200-fold higher respectively than the corresponding mixture in BMP test. Also, the obtained residues could be used as fertilizer. Thus, the application of this technique in the scale industrial is possible and all the products are useful.

Keywords: anaerobic co-digestion; bioreactor; biogas; methane; leaves; *Mangifera indica*; *Manihot utilissima*

1. Introduction

According to many authors, solid wastes of vegetal origin represent a high potential energy resource if they can be properly and biologically converted to methane (Gunaseelan et al., 2004; Barakat et al., 2012; Chandra et al., 2012; Kamdem et al., 2013). They are renewable and therefore their net CO₂ contribution to the atmosphere is nil.

Indeed, the biomethanation potential of mixture of *Mangifera indica* (MI) and *Manihot utilissima* (MU) leaves were investigated in chapter 3 since large amounts of this organic matter are available in Kinshasa and other African regions and moreover, up to date, they are about not valorized. However, the results achieved in Chapter 4 show that the methane yields from the mixture containing 50% MU and 50% MI were nearly of that of the mixture of 75%

MU and 25% MI. As a consequence, it was chosen as the proportion to test the anaerobic co-digestion of MI and MU leaves in mixed batch bioreactor for waste treatment at home.

Promotion of the adaptation of microorganisms to inhibitory substances and co-digestion of wastes are among the easiest methods suggested to improve significantly the waste treatment efficiency (Chen et al., 2008; Ward et al., 2008). In the literature, there is almost no commercial bioreactor destined to treat solid wastes. The sole bioreactors known are Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB). These reactors are continuous reactor destined to wastewater treatment (Mambanzulua et al., 1999).

In this paper, the biomethanation assay of mixture of MI and MU leaves in equal fractions was achieved in a mixed batch bioreactor. This experience was carried out with monitoring of volume and composition biogas and of metabolites (glucose, ethanol, and volatile fatty acids (VFAs) production. After the assay, the fertilizing value of biomethanation residues was determined regarding C/N ratio and the content in K and P.

2. Materials and methods

2.1. Source, conservation and physico-chemical analyses of leaves

The samples and their conditions of conservation were the same than those of the chapters 3 and 4.

2.2. Biogas and methane yields

The test was carried out in 30 l in a vat filled with 25 l of mixture. This mixture consisted of 17 l of drinking water, 8 l of anaerobic sludge inoculum and milled leaves. The mixture containing MU and MI leaves grounded at 1 mm size was used for bioreactor test in the ratio of 1 added progressively up to the inhibition when the biogas production decrease and by avoiding to acidify the culture medium. The minerals elements and vitamins were not added considering that those substances should be present in the sludge and the leaves.

The anaerobic sludge inoculum was a mixture of different digestates resulted from the previous BMP assays achieved in Chapters 3, 4 and 5 where the substrates were not at

inhibitory concentrations. This anaerobic sludge was activated or enriched during one month with sodium acetate before the use.

The anaerobic digestion test was run at 30°C without in simple.

The composition and volume of biogas produced were periodically measured with a flowmeter BK-GAM during 48 days. This incubation period was divided in two parts: the first time covering 22 days concerned methanization test and the second was for methanogenic inhibition test during 26 days.

H₂, CH₄, and CO₂ were determined using a method described by Hamilton et al. (2010) and separation was achieved using a Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph (GC; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a 30 m long, 0.32 mm id Alltech GAS PRO GSC column (Grace, Deerfield, IL, USA) in series with a 20 m long, 0.25 mm id Chrompack CARBOPLOT P7 column (Agilent Technologies) and a thermal conductivity detector. The carrier and reference gas was He, and a mixture of N₂ (15%), CO₂ (35%), and CH₄ (50%) was used to calibrate the instrument for determining the proportions of CH₄ and CO₂ in the biogas. A mixture of H₂ (80%) and CO₂ (20%) was used to allow the fraction of H₂ in the biogas produced to be determined with N₂ as carrier and reference gas. The GC injection port, the thermal conductivity detector chamber, and the oven were maintained at 90, 110, and 55°C, respectively.

Biogas or methane yields were calculated by dividing the measured biogas or methane volume by the maximum theoretical biogas or methane potential estimated from the TOC content in the vat. The total volume of methane was calculated from average composition of methane in the total volume of biogas. These calculations were done according to 22 days and loading method of the digester for a good comparison to the previous tests.

The test of the degree of the biogas or methane production inhibition was carried out in a 60 ml serum bottle filled with 37.5 ml of the digestates resulting from the bioreactor at the 26th day of incubation. When the sample bottle was filled, it was capped tightly with rubber septa and sealed with aluminum seals, and nitrogen was passed into the bottle to flush out air and other gas before the incubation (Hilgsmann et al., 2011). The bottle was then incubated at 30°C. The composition and volume of biogas produced were periodically measured during 22 days according to the method with CO₂ absorption by KOH as described by Hilgsmann et al. (2011).

2.3. Glucose, ethanol and VFAs evolution

The evolution of glucose, ethanol and VFAs concentrations in samples was analyzed by HPLC. The samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate, acetate, propionate, butyrate, lactate and succinate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as described formerly (Masset et al., 2010).

2.4. Analysis of digestates

After 33 days of anaerobic digestion of the leaves mixture, the digestates were separated in liquid and solid residue by centrifugation and filtration on 0.2 µm cellulose acetate membrane. The solid residue was dried for TOC, TKN, K and P analyses. The liquid was used for TOC, TKN, K, P, water soluble total polyphenols and saponins analyses.

2.5. Description and tightness of bioreactor

The reactor was constituted by a 30 l plastic vat with an electric agitator. The vat was hermetically closed by a plastic lid equipped with a valve to introduce the substrate and a pipe for gas evacuation with gates using two debit-meters. The tightness of bioreactor was verified by comparing the nitrogen entering flowrate in the bioreactor to that getting out.

3. Results

3.1. Evolution of the anaerobic digestion of the mixtures containing MI and MU leaves

3.1.1. Characteristics of leaves mixture

The residual amounts of some essential components of different leaves after their mixture were calculated from the results of physico-chemical analyses of leaves, qualitative identification of bioactive substances in leaves aqueous extract and further quantitative

analysis of total polyphenols and some free specific polyphenols amounts given in Tables 6 and 7. The results obtained after calculations are presented in Table19.

Tableau 19 Concentrations of essential components in different leaves mixtures concentrations

Mixtures concentrations	Components (g/l)						
	TOC	TKN	P	K	Gallic acid	Pyrogallol	Total polyphenols
17 g (50% MI+50% MU)/l	6.5	0.5	0.0	0.2	0.0	0.1	0.2
26 g (50% MI+50% MU)/l	9.9	0.8	0.0	0.3	0.0	0.2	0.3

3.1.2. Biogas and methane yields

The evolution of the biogas production was monitored in a stirred bioreactor carried out to assess anaerobic digestion of the mixture of MU and MI leaves. After day 19, the concentration of this mixture of leaves added in the bioreactor reached 17 g/l by stirring at 150 rounds per minute and after 22 days, the total volume of biogas recorded was 25.5 l. These results are presented in Figure 15. After day 22, the addition of this mixture of leaves continued up to reach the concentration of 26 g/l at the 25th day.

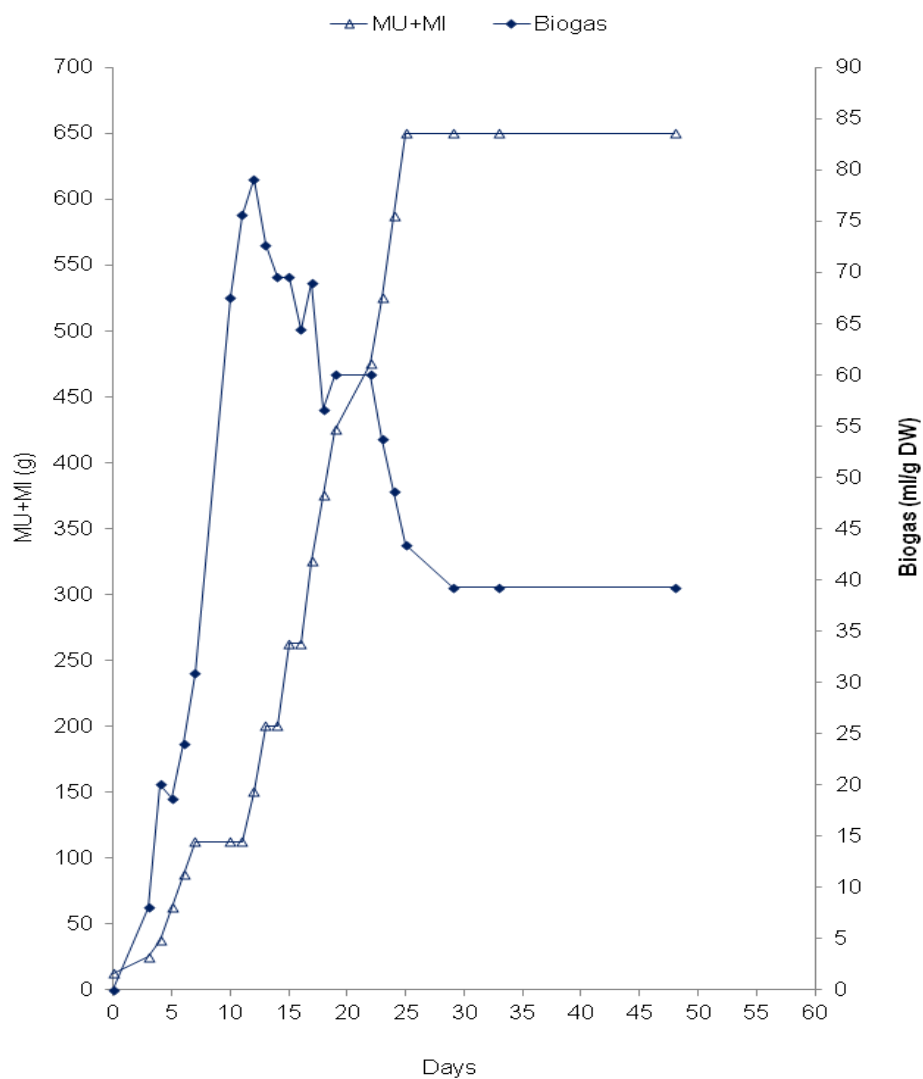


Figure 15 Biogas production during the anaerobic digestion of the mixture containing MU and MI leaves in the ratio of 1 in bioreactor test

After this day up to the 48th day, there was no biogas production detectable by flowmeter from digester (Figure 15) but detectable by the method of CO₂ absorption from the biogas produced by the digestates after transfer in serum bottle. The results of biogas and methane production are shown in Figure 16. After 22 days of incubation, the total volume of biogas was 54 ml and that of methane was 30.3 ml.

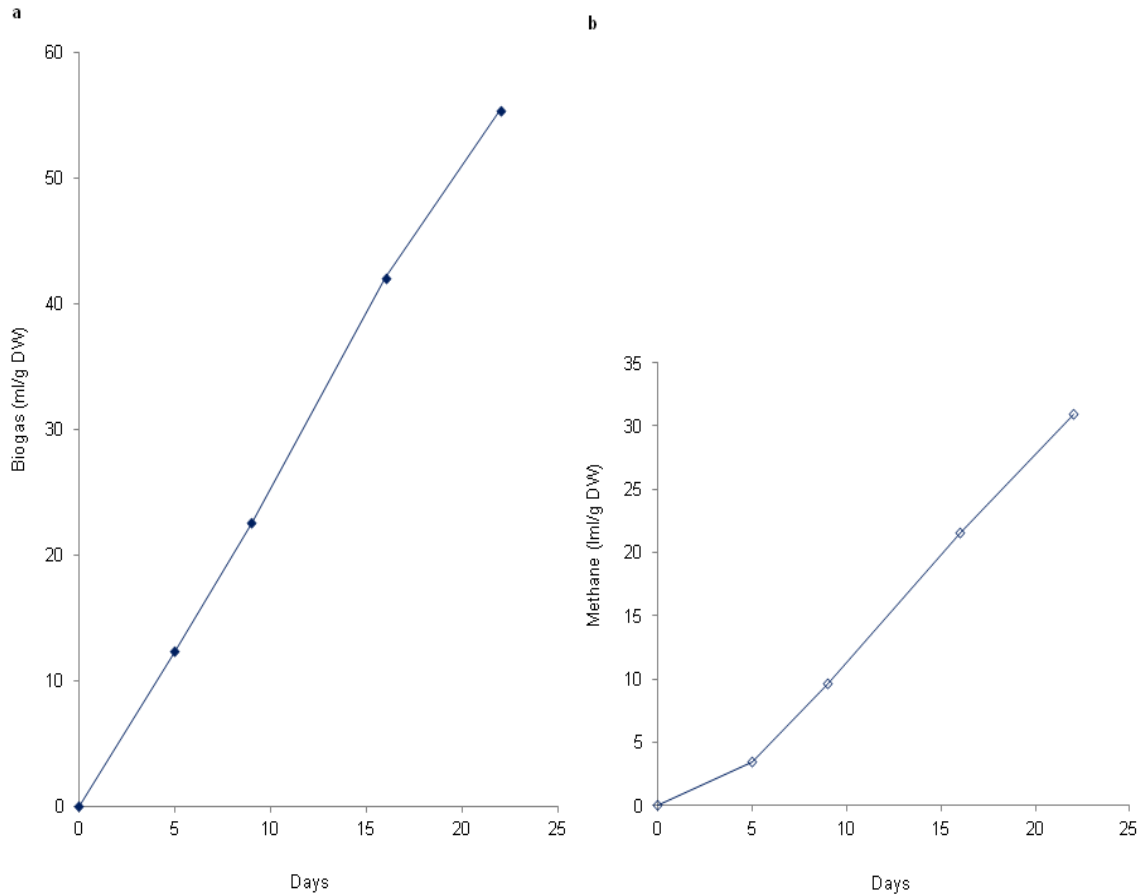


Figure 16 Biogas (a) and methane production (b) from the digestates coming from of anaerobic digestion of mixtures containing MU and MI leaves during 26 days

The daily yields of biogas and methane production, and amount of energy in the biogas corresponding to 1 kg of the mixture of 50% MU and 50% MI in the non-stirred reactor were calculated during the period of high production from the data of Figure 10. The results are presented in Table 20.

Table 20 Daily yields of biogas and methane, and energy amount of 1 kg of the mixture of 50% MU and 50% MI leaves with system without agitation according to the great period of production of 94 days

Leaves mixture	Daily yield (ml/g TOC)	Daily yield (ml/g TOC)	Daily yield (l/g VS)	Energy (kJ)
Concentration	Biogas	Methane	Methane	for 94 days
53 g (MU+MI)/l	3.8	2.3	0.001	2947.4

The biogas was constituted of 50% of methane at the 7th day and 60.1% at the 14th day that was the period of the high biogas production. The volumetric biogas and methane production

were expressed in terms of daily yields related to the initial TOC and VS of the leaves and are reported in Table 21.

Table 21 Daily production yields of biogas and methane from 17 g/l of mixture containing MU and MI leaves (MU+MI) after 22 days in a bioreactor at 30°C

Leaves mixture	Daily yield (ml/g TOC)	Daily yield (ml/g TOC)	Daily yield (ml/g VS)	Energy (kJ)
Concentration	Biogas	Methane	Methane	for 22 days
17 g (MU+MI)/l	7.0	3.9	0.002	1220.7

3.1.3. Analysis of glucose, ethanol and VFAs

Concentrations of VFAs, glucose and ethanol in the culture medium were measured by HPLC. The VFAs (succinic, formic, acetic, lactic, propionic and butyric acids), glucose and ethanol analysis were achieved from leaves biodegradation. Only, the ethanol, formic and succinic acids were absent in the medium.

The maximum concentration of VFAs reached 1.2 g/l for 26 g/l of leaves mixture after 33 days of incubation (Figure 17).

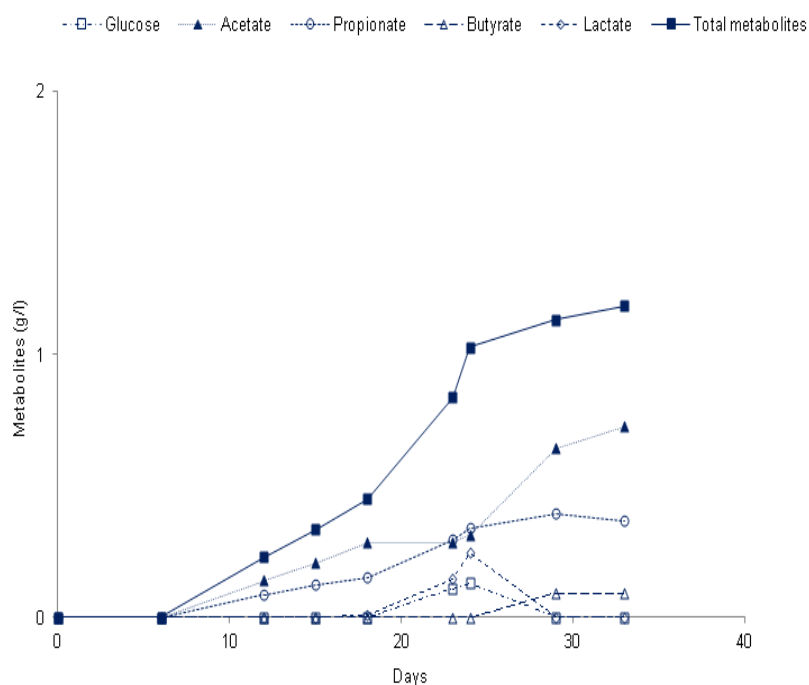


Figure 17 VFAs production during anaerobic digestion from the mixtures containing MU and MI leaves in bioreactor test in the ratio of 1

3.2. Digestates

The results of analyses of TOC, TKN, K, P, water soluble total polyphenols and saponins in the residues are reported in Table 22. The C/N ratios were of 3.4 and 8.3 for its liquid and solid residue, respectively (Table 22).

Tableau 22 TOC, TKN, P and K, water soluble total polyphenols and saponins in the residues produced after the anaerobic digestion of 26 g/l of mixture containing MU and MI leaves in a bioreactor

Components	Digestates			Substrate
	Inoculum	Total digestates states		
		Liquid	Solid	
TOC (mg/g)	50.9	18.0	390.7	394.3
TKN (mg/g)	8.1	53.0	46.9	49.9
P (mg/g)	0.1	0.0	2.3	2.6
K (mg/g)	80.9	46.6	16.1	39.8
C/N	6.3	3.4	8.3	7.9
Polyphenols (mg/g)	ND	5.2	ND	ND
Saponins	ND	+	ND	ND

4. Discussion

4.1. Biogas production

4.1.1. Period of the 22 first days of incubation

The production of biogas already began at the fourth day of incubation at oxydo-reduction potential of -269 mV. The total biogas volumes produced until 22nd day of incubation increased with the amount of the mixture of MU and MI leaves with the last loading at 19th day. Indeed, biogas production increased with decreasing oxydo-reduction potential *i.e.* due to oxygen consumption by facultative anaerobic bacteria. At day 10, the oxydo-reduction potential corresponded to the lowest value of -305 mV of this period. This oxygen removal would be quick since the agitation facilitated the solubility of oxygen in the water (Edeline, 2001) and also the contact between aerobic bacteria and oxygen. Consequently, the biogas for the first 10 days was rich in oxygen. Moreover, it was noted that the loading of leaves in the bioreactor increased with the biogas production that could be due to the growth or the increase

of activity of the microorganisms (Mambanzulua et al., 1999). It was remarked an improvement of 85% of the daily biogas yield related to TOC in this stirred digester higher comparatively to that of the system without agitation by considering only its period of great biogas production from of 94 days (Table 20). The leaves mixture (Table 20, Chapter 5). It would suggest that the anaerobic sludge inoculum was more active than that of previous study, the stirring favored the anaerobic biosynthesis and enabled to evacuate rapidly the gas out of the digester.

4.1.2. Period beyond 22 days of incubations

After the 22nd day, no biogas production was detectable by the flowmeter (Figure 14). However, biogas production continued but was low. It was detectable by method of absorption of CO₂ by KOH when these bioreactor digestates were transferred in serum bottle. It was observed that the productivity of biogas decreased from 2.7 ml/g DW day to 2.5 ml/g DW.day during the first 22 days and after this period, respectively (Figure 16). These values seemed to be similar since the gas volume in the serum bottle was 2.4-fold higher proportionally than that in the vat. Furthermore, the methods of measure of volume were different for each case. This decrease of productivity is interpreted as an inhibitory effect on biogas production caused by the increase of plant secondary metabolites amounts came especially from MI leaves in the bioreactor by slowing the production. This inhibition started at concentration of 17 g (MU+MI)/l corresponding approximately to 0.2 g/l of total polyphenols according to Table 19, without taking into account the other bioactive substances (Chen et al., 2008). That could be explained by the medium stirring that would favor the increase the formation of toxic colloids and the contact between microorganisms and bioactive compounds. As consequence, the combination between enzymes and phenol through hydroxyl groups would lead to inhibition of the biodegradation process appreciable by the decrease of biogas debit.

4.2. Methane production

Methane was detected in biogas with a concentration of 50% at the 7th day and 60% of biogas at the 14th day of methanization during the high production period by GC. It was remarked an increase of the content with the leaves concentrations with the time that could be due to the increase of methanogenic activity (Mambanzulua et al., 1999). The average of these two

measures of methane concentration in biogas volume corresponded to the daily methane yield about 0.002 l/g VS and was in the range of the methane yields of the leaves known according to the review of Gunaseelan (2004).

The theoretical yield of methane production during 22 days for the stirred bio-reactor was of 9% and 60% less than that of the non-stirred reactor during 94 days. That suggests that with agitation, the biomethanation of leaves mixtures lead to lower yields but to a 4- fold higher kinetic. While combining the two parameters, the agitation was 2 folds more beneficial. Although the oxydo reduction potential in the medium of digester was lower than that of the same mixture in the medium without stir (Chapter 5), the content in methane of its biogas was higher since its microbial biomass would be enriched in methanogens before the inoculation. Thus, this biogas produced from the mixture of MU and MI leaves after 22 days of incubation, possessed energy quantity equivalent to 2.7% of the calorific power of wood. This energy would be improved two times compared to that of the leaves mixture with the same proportion in the anaerobic digestion with unique loading and without stir of culture medium when the operation is repeated up to reach 100 days (Tables 20 and 21). After the 22nd day, the methane content in the biogas calculated was about of 56%, lower than that of the period of the 14th day because of the inhibition favored by the agitation of medium culture. Although, the concentration of total polyphenols was lower than that given in the literature for tannins, either 700 mg/l (Gerardi, 2003).

4.3. VFAs and other metabolites production

Ethanol, succinate and formate were not present in the medium. Propionate and acetate were the first to appear in the medium after 6 days. Glucose and lactate began to appear in the medium after 18 days. Butyrate appeared after 24 days. Glucose increased up to about 0.2 g/l and was further converted to propionate, butyrate or acetate. Its presence showed that the acidogenesis was slowed down in this concentration of leaves.

In general, the total quantities of VFAs increased with the addition of the mixture of MU and MI leaves in the bioreactor. For the first 25 days, the VFAs amounts increased rapidly with the quantity of leaves up to about 1g/l. They further remained constant since leaves was not added and there was inhibiting effect confirmed by the absence of biogas production after day 22 (Figure 17).The pH varied from 7.6 to 6.9 during the experiment. Propionate, butyrate, and

acetate were present after an increase and a decrease of their concentrations. That demonstrates that hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis processes were effective. However, all these VFAs were stable in the digester after 24 days; except lactate (Figure 17). This few lactates reached roughly 0.3 g/l before its complete conversion probably to acetate. Thus, it was a partial inhibition slowing acetogenesis and methanogenesis. Therefore, these results show that the low conversion rate of the mixture of MU and MI leaves at concentration higher than 17 g/l, would especially be due to the MI leaves concentration that reached 13 g/l.

4.4. Digestates

At the end of anaerobic digestion, the contribution of the inoculum in components in the total digestate was generally about 4% and particularly 36% for the K. Nitrogen concentration in the residual liquid of the mixture MU and MI leaves was of 183.2 mg/l (Table 21); this concentration was lower than that of the inhibitory concentration (1500 mg/l) at pH 6.5-7.2 reported by Gerardi (2003). Thus, the liquid residue of this leaves mixture with a C/N ratio of 3.4 was rich in nitrogen, potassium but poor in phosphorous and so it could be used as fertilizer for plants such as vegetables (Hobson et al., 1993). Furthermore, the liquid residue contained polyphenols and saponins (with a 0.5 cm foam height). The total polyphenols concentration was lower than the test with of 13.3 g MI/l *i.e.* 260 mg/l. The reason would be that a part of polyphenols was adsorbed onto the sludge matrix or degraded (Hernandez and Edyvean, 2008). By contrast, the solid residue of this mixture of leaves had a C/N ratio of 8.3 near 10 considered as optimal for soil organisms and soil-conditioning (MCDF, 1993; Ducat et Bock, 1995; Davet, 1996; Mze, 2008). This solid residue was poor in K and P than that of the BMP test, since the solutions contained K and P were not added in the medium.

The maturation of these digestates should be assessed before their utilization in the soil since they contained antimicrobial substances.

5. Conclusion

In this paper, methanization was carried out in stirred bioreactor at mesophilic temperature (30°C) with the mixture of MU and MI leaves. The results showed that the methanogenic biodegradation yield of this leaves mixture loaded progressively in the digester was improved comparatively to the daily methane yield of the anaerobic digestion without stirring.

Moreover, the methanogenic kinetic of this mixture of leaves was very efficient without addition of nutrients and buffered in the medium and, its daily methane yield was in the range of other leaves.

This work showed that the daily yield of methane and the energy of biogas from the mixture of leaves with the stirred culture medium were 2-fold higher than that without stirring. However, the methane yield over to the total time of the methanization was low.

Indeed, the agitation would favor the contact between microorganisms or enzymes and inhibitors contained in the leaves. However, the residues came from anaerobic digestion of the mixture containing MU and MI leaves seem to represent efficient bio-fertilizers for the promotion of the biological vegetable garden but their maturation should be tested before their used.

Therefore, this study showed that it would be possible to transform industrially at ambient temperature this waste biomass into both bio-fuel and bio-fertilizer on the same time particularly in Kinshasa and generally in tropical regions by anaerobic co-digestion. This could be beneficial in the context of eliminating the environmental pollution caused by this biomass.

Thus, a study should be done for determining the optimal agitation of culture medium.

6. References

- Angelidaki I, Ahring B (1993) thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 560–564.
- Angelidaki I, Ellegaard L, Ahring BK (1993) A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnol Bioeng* 42: 159–166.
- Angenot L (1973) Contribution à l'étude du strychnos usambarensisgilg, principal constituant d'un poison de chasse curarisant africain. Thèse de doctorat, Université de Liège, Belgique.

- Anid PJ (1983) Contribution à la caractérisation des composts des déchets urbains : Evaluation de leur état de maturation et des risques éventuels de contamination métalliques des cultures. Thèse de doctorat, Gembloux, FUSA, Gembloux, Belgique.
- APHA (1992) Standard methods for the examination of water and waste water: method 4500 P-E- Heteropoly blue Method. 18th edition, Greenberg, Clesceri, Eaton Editors, Washington. Merck. Notice d'utilisation du kit Spectroquant Phosphates.
- Barakat A, Monlau F, Steyer JP, Carrere H (2012) Effect of lignin derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresource Technology* 104: 90–99.
- Buffiere P, Carrere M, Lemaire O, Vasquez J (2007) Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides: Projet METHAPI-Expertise. Centre de Recherche Propreté & Energie, p 29.
- Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T (2012) Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes. *Renew Sust Energ Rev* 16: 1462–1476.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99: 4044-4064
- Chynoweth DP, Turick CE, Owens JM, Jerger DE and Peckq MW (1993) Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 5: 95-111.
- Davet P (1996) Vie microbienne du sol et production végétale. Paris : INRA.
- Ducat N, Bock L (1995) Etat organique des terres agricoles en Hesbaye. In: Geypens Met Honnay JP (eds) *Matières organiques dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*. Comité de recherche sur la matière organique du sol. Bruxelles: I.R.S.I.A, pp 33-43.
- Edeline F (2001) *Le pouvoir autoépurateur des rivières, une introduction critique*. Editions Tec et Doc, Liège et Paris, p 239.
- Gerardi Michael H (2003) *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Willey et Sons, Inc, p 107.
- Gunaseelan VN (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review; *Biomass and Bioenergy* 13: 83-114.
- Gunaseelan VN (2004) Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks *Biomass and Bioenergy* 26: 389–399.

- Hess HD, Kreuzer MD, Iaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva RC, Andrea Machmüller (2003) Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 109: 79–85.
- Hernandez JE, Edyvean RGJ (2008) Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* 160: 20-28.
- Hiligsmann S, Masset J, Hamilton C, Beckers L, Thonart P (2011) Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology* 102: 3810-3812.
- Hobson PN et Wheatley AD (1993) *Anaerobic digestion modern theory and practice*. Elsevier applied science, London and New York, pp 21-232.
- Jin Wang, He Liu, Bo Fu, Kewei Xu, Jian Chen (2013) Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. *Biochemical Engineering Journal* 70: 1-8.
- Kamdem I, Tomekpe K, Thonart P (2011) Production potentielle de bioéthanol, de biométhane et de pellets à partir des déchets de biomasse lignocellulosique du bananier (*Musa spp.*) au Cameroun. *Biotechnol Agron Soc Environ* 15(3): 461–473.
- Kamdem I, Hiligsmann S, Vanderghem C, Bilik I, Paquot M, Thonart P (2013) Comparative biochemical analysis during the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass from six morphological parts of Williams Cavendish banana (Triploid *Musa AAA* group) plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(12): 2259-2270.
- Kamra DN, Patra AK, Chatterjee PN, Ravindra Kumar, Neeta Agarwal, Chaudhary LC (2008) Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal Experimental Agriculture* 48:175-178. doi:10.1071/EA07268.
- Lelo N (1999) La gestion des déchets domestiques: bilan annuel d'une expérience pilote de l'Hôtel de Ville de Kinshasa. *Med Fac Landbouww , Univ Gent* 64(1): 107-114.
- Luo G, Karakashev D, Xie L, Zhou Q, Angelidaki I (2011) Long term of inoculums pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 1816-1827.
- Lusakibanza M (2012) Etude phytochimique et pharmacologique de plantes antipalidiques utilisées en médecine traditionnelle congolaise. Thèse de doctorat, Université de Liège, Belgique, pp 130-135.

- Macheboeuf D, Bergeault R, Papon Y, Arturo-Schaan M (2011) Effets comparés de trois sources de saponines extraites de *Yucca schidigera*, *Quillaj Saponaria* ou *Trigonellafoenum-graecum* sur les fermentations ruminales in vitro et les émissions de méthane. Renc Rech Ruminants 18: 135.
- Mahamat AY, Gourdon R, Leger P, Vermande P (1989) Methane recovery by anaerobic digestion of cellulosic materials available in Sahel. Biological Wastes 30: 181-197.
- Mambanzulua N, Kayembe K et Noki V (1999) Détermination des activités méthanogéniques spécifiques des lisiers dans le traitement anaérobie des déchets. Med Fac Landbouww, Univ Gent 64(1): 183-188.
- Masibo M and He Q (2009) In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. Malaysian Journal of Microbiology 5: 73-80.
- Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, Beckers L, Franck F, Thonart P (2010) Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-production *Clostridium butyricum* CWBI 1009. International Journal of Hydrogen Energy.
- Mbonigaba MJJ (2007) Etude de l'impact des composts à base de biomasse végétale sur la dynamique des indicateurs physico-chimiques, chimiques et microbiologiques de la fertilité des sols: application sur trois sols acides tropicaux du Rwanda. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques Gembloux, Belgique.
- MCDF (1993) Memento de l'agronome Paris: 4ème éd (réimpression), collection techniques rurales en Afrique, Ministère de la coopération et du développement (France).
- Mital KM (1996) Biogas systems: principles and applications. New Age International Publishers Limited, New Delhi.
- Mulaji KC (2011) Utilisation des composts de biodéchets ménagers pour l'amélioration de la fertilité des sols acides de la Province de Kinshasa (Rép. Dém. du Congo). Thèse de Doctorat, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Gembloux, Belgique.
- Multon JL (1991) Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Vol 4, analyss des constituants alimentaires. Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 370-380
- Mze SP (2008) influence d'apports en matières organiques sur l'activité biologique et la disponibilité du phosphore dans deux sols de la région des grands lacs d'Afrique. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire de Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique.
- NF T 90 – 024 (1963) Essais des eaux, dosage spectrophotométrique du manganèse. AFNOR, Paris.

- Nunez-Selles AJ (2005) Antioxidant Therapy: Myth or reality? *Journal of Brazilian Chemical Society* 16: 699-710.
- Nyamangara J, Mtambanengwe F, Musvoto C (2009) Carbon and nitrogen mineralization from selected organic resources available to smallholder farmers for soil fertility improvement in Zimbabwe. *African Journal of Agricultural Research* 4: 870-877.
- Oliveira L, Cordeiro N, Evtuguin DV, Torres IC, Silvestre AJD (2007) Chemical composition of different morphological parts from *Dwarf Cavendish* banana plant and their potential as non-wood renewable source of natural products. *Ind Crops Prod* 26: 163–172.
- Palm CA, Gachengo N, Delve RJ, Cadisch G, Giller KE (2001) Organic inputs for soil fertility management in tropical agroecosystems: application of an organic resource database. *Agric Ecosys Environ.* 83: 27-42.
- Patra AK, Saxena J (2010) A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71:1205-1217.
doi:10.1016/j.phytochem. 2010.05.010.
- Rodier J (1966) *Analyse de l'eau*. 8^e édition Dunod, Paris.
- Rodriguez C, Hiligsmann S, Ongena M, Charlier R, Thonart P (2005) Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation* 16: 415–422.
- Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult University of California* 16(3): 144-158.
- Shyam M and Sharma PK (1994) Solid-state anaerobic digestion of cattle dung and agro-residues in small capacity field digesters. *Bioresource Technology* 48: 203-207.
- Vanhaelen M (1994) *Identification de matières premières d'origine végétale par chromatographie planaire et microscopie à l'usage du pharmacien d'officine*. Rapport mi-projet.
- Wagner H, Bladt S (1966) *Plant drug analysis*. Springer Verlag, Berlin.
- Wang YS, Byrd CS, Barlaz MA (1994) Anaerobic biodegradability of cellulose and hemicellulose in excavated refuse samples using a biochemical methane potential assay. *Journal of Industrial Microbiology* 13: 147-153.

Productions scientifiques

Articles

« Potentiel d'élimination des déchets végétaux (feuilles de *Mangifera Indica* et de *Manihot Utilissima*) par méthanisation dans la Ville Province de Kinshasa » Article de synthèse pour le journal *Vertigo* (2015) **3(1)**, (publié).

« Comparative study of the methane production based on the chemical compositions of *Mangifera Indica* and *Manihot Utilissima* leaves » Article de recherche dans le journal *SpringerPlus* (2015) **4(75)**, 1-12 (publié).

« Impact of different plant secondary metabolites addition: saponin, tannic acid, salicin and aloin on glucose anaerobic co-digestion » Article de recherche pour le journal *Fermentation Technology* (2015) **4(1)** (sous presse).

Communication posters

“Optimization of the methane production from *Mangifera Indica* (mango) and *Manihot Utilissima* (cassava) leaves in co-digestion”; “19th National Symposium on Applied Biological Sciences on 7 February 2014”; Gembloux Agro-Bio Tech, ULg; 07/07/2014.

“Methane production from the most accessible vegetal wastes of Kinshasa City: mango and cassava leaves”; Département de chimie et bio-industries; Gembloux Agro-Bio Tech, ULg; 02/07/2013