



HAL
open science

Production d'hydrogène par fermentation obscure : intensification du procédé par extraction des gaz et développement d'un bioréacteur à membrane

Valentin Clion

► **To cite this version:**

Valentin Clion. Production d'hydrogène par fermentation obscure : intensification du procédé par extraction des gaz et développement d'un bioréacteur à membrane. Autre. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAF024 . tel-02917979

HAL Id: tel-02917979

<https://theses.hal.science/tel-02917979>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
IPHC – Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien – UMR 7178

THÈSE présentée par :

Valentin CLION

soutenue le : **29 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie / Bioprocédé

**Production d'hydrogène par fermentation
obscur : Intensification du procédé par
extraction des gaz et développement d'un
bioréacteur à membrane**

THÈSE dirigée par :

Mme ERNST Barbara

Professeur, IPHC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. FAVRE Eric

Professeur, LRGP, Université de Lorraine

M. FONTANILLE Pierre

Maitre de conférences, IP, Université Blaise Pascal

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. MARROT Benoît

Professeur, M2P2, Aix Marseille université

Mme DUMAS Christine

Maitre de conférences, IPHC, Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement le Pr. Barbara Ernst, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'équipe de reconnaissance et procédés de séparation moléculaire (RePSeM), pour tout le temps qu'elle m'a accordé tout au long de cette thèse et pour son point de vue différent sur le monde actuel et sa vision de celui à venir.

Je tiens également à dire un grand merci au Dr. Christine Dumas, ma co-encadrante, pour ses conseils, pour m'avoir formé aux techniques utilisées au laboratoire ainsi que pour son optimisme souvent nécessaire.

Je remercie les membres du jury, qui ont accepté de prendre le temps de juger cette thèse et pour leurs retours, très importants pour moi. Je remercie particulièrement le Pr. Eric Favre et le Dr. Pierre Fontanille, les rapporteurs de ce document ainsi que le Pr. Benoit Marrot, pour l'examen de ce travail.

Je remercie l'ADEME et la région Alsace, qui ont soutenu financièrement ce travail. Je remercie en particulier Loïc Antoine, Ingénieur ADEME référent de cette thèse, qui m'a permis d'avoir une vision différente et concrète du secteur de l'hydrogène et de l'énergie.

Je souhaite remercier L'Eurométropole de Strasbourg et Valorhin, filiale de Suez Environnement, gestionnaire de la station d'épuration et en particulier Frédéric Pierre, pour les autorisations de prélèvement sur le site.

Merci au Pr. Stéphane Vuilleumier pour m'avoir accueilli au GMGM pour y faire de la microbiologie, sous l'œil expert de Christelle Gruffaz.

Je remercie le Dr. Catherine Jeunesse qui m'a donné l'opportunité d'enseigner pendant trois années en travaux pratiques de licence professionnelle « Industries chimiques et pharmaceutiques ».

Je désire également remercier Norbert Cléry, qui m'a aidé à développer mon projet professionnel dans le cadre du « Nouveau Chapitre de la Thèse ».

Je souhaite exprimer ma gratitude à tous les membres de l'équipe que je côtoie quotidiennement ; aux enseignants-chercheurs, Dominique Trébouet, Véronique Hubscher, Jérémy Brandel, Maud Villain-Gambier et Yacine Benguerba pour tous les échanges et conseils tant pour ma thèse que pour tout le reste. Je remercie bien entendu Marco Kraemer pour les virées en voiture à la station d'épuration, Yvan Zimmermann pour son expertise en « canalisation », Sylvia Michel pour ses services et Sébastien Brauchi pour ses coups de main occasionnels. Je souhaite enfin remercier Bernadette Gein pour sa maîtrise des méandres administratifs et sa jeunesse éternelle.

Je dis bien merci aux autres thésards, Emilie, Matthieu et Marie avec qui j'ai pu partager de bonnes journées de travail, souvent entrecoupées de mots fléchés. Je remercie également toutes les personnes qui sont venues, plus ou moins longtemps au laboratoire, en particulier Vijetha, Luis, Guillaume,... Je remercie à nouveau toutes les personnes, déjà citées, avec qui j'ai pu participer à diverses soirées en dehors du laboratoire, se terminant parfois même jusqu'à Vendenheim...

Remerciements

Bien entendu, je veux remercier profondément mes parents, mes sœurs et toute ma famille pour leur soutien depuis bien longtemps maintenant.

Je remercie tous mes amis, d'Alsace, du Pas-de-Calais et d'ailleurs qui sont très importants pour moi.

Et pour finir, un grand merci à Lucile, pour m'avoir supporté tous les jours tout au long de cette thèse. Si elle n'avait pas été là, j'aurais été tout seul.

Table des matières

Remerciements.....	I
Table des matières	III
Abréviations.....	VII
Lexique	VIII
Introduction générale.....	1
I. Revue bibliographique	5
I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production	5
I.A.1. Utilisation de l'hydrogène	7
I.A.2. Moyens de production	12
I.B. Fermentation obscure	22
I.B.1. Le processus de fermentation obscure.....	22
I.B.2. L' <i>inoculum</i> bactérien	25
I.B.3. Prétraitement des cultures mixtes	30
I.B.4. Les paramètres clés de fonctionnement du bioréacteur	32
I.B.5. La fermentation obscure – notre stratégie d'optimisation	36
I.C. Le procédé de fermentation obscure	37
I.C.1. Les modes de fonctionnement.....	37
I.C.2. Les différents types de réacteurs.....	40
I.C.3. Sélection du procédé pour notre étude	41
I.D. L'utilisation de la séparation membranaire en fermentation obscure	42
I.D.1. Généralités sur les bioréacteurs membranaires, BRM.....	42
I.D.2. Le couplage du module membranaire avec la fermentation obscure	43
I.D.3. Le couplage de la séparation membranaire et de la fermentation obscure dans cette étude	48
Objectifs de la thèse	49
II. Matériels et méthodes	51
II.A. <i>Inocula</i> microbiens, substrats modèles et réels	51
II.A.1. <i>Inocula</i> microbiens	51
II.A.2. Substrats modèles	53
II.A.3. Substrats réels (bourbes)	53
II.B. Dispositifs de fermentation	54
II.B.1. Dispositif du réacteur agité semibatch (RASB)	54
II.B.2. Dispositif du réacteur agité continu (RAC)	55
II.B.3. Dispositif du bioréacteur membranaire (BRM)	56
II.B.4. Dispositifs d'extraction des gaz produits	58
II.C. Méthodes analytiques	60
II.C.1. Analyse des gaz produits lors de la fermentation	60
II.C.2. Analyse du milieu fermentaire	60
II.D. Critères de performances	65
II.D.1. Production d'hydrogène et de dioxyde de carbone	65

Table des matières

II.D.2. Modélisation de la production d'hydrogène en réacteur semibatch	66
II.D.3. Corrélation des productions d'acétate et de butyrate	66
II.E. Bilan carbone de la fermentation	66
III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)	69
III.A. <i>Inocula</i> microbiens issus de la station d'épuration	70
III.A.1. Tests de fermentation sans apport de substrat	72
III.A.2. Tests de fermentation avec apport de substrat modèle	78
III.B. Stabilité de l' <i>inoculum</i> microbien issu des boues activées de la zone anoxie et impact du prétraitement thermique des boues	86
III.B.1. Analyse de la composition chimique du milieu	86
III.B.2. Analyse microbiologique du <i>consortium</i> microbien	88
III.C. Régulation du pH de fonctionnement	94
III.D. Influence de la température de fermentation	98
III.D.1. Suivi de la production d'hydrogène	98
III.D.2. Analyse des métabolites et bilan carbone	103
III.D.3. Analyse microbiologique	106
III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu	114
III.E.1. Evolution temporelle de la composition du milieu fermentaire et de la production de gaz	114
III.E.2. Analyse microbiologique	118
III.E.3. Bilan du suivi de fermentation	125
III.F. Conclusion du chapitre	125
IV. Intensification du procédé par extraction des gaz	127
IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz	128
IV.A.1. Suivi de la production de gaz	128
IV.A.2. Analyse des métabolites et bilan carbone	133
IV.A.3. Analyse microbiologique	136
IV.A.4. Bilan de l'influence des différents modes d'extraction	139
IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage	140
IV.B.1. Influence du débit de gaz de balayage	140
IV.B.2. Influence de la composition (CO ₂ : N ₂) du gaz de balayage	151
IV.C. Conclusion du chapitre	163
V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)	165
V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)	165
V.A.1. Test préliminaire de fermentation RAC-a	166
V.A.2. Test de fermentation RAC-b	170
V.A.3. Analyse microbiologique – tests RAC-a et RAC-b	174
V.A.4. Bilan du mode de fonctionnement RAC	178
V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)	179
V.B.1. Mise en fonctionnement – test préliminaire BRM-a	181
V.B.2. Amélioration du fonctionnement – test BRM-b	186
V.B.3. Analyse microbiologique – tests BRM-b et RAC-b	202
V.B.4. Bilan de la mise en œuvre du BRM	206

V.C. Autres optimisations du bioréacteur membranaire (BRM)	206
V.C.1. Fonctionnement avec/sans boucle de recirculation.....	207
V.C.2. Panne de régulation de température	211
V.C.3. Mise en place d'une extraction libre des gaz produits du BRM	213
V.D. Conclusion du chapitre	217
VI. Etudes complémentaires sur le bioréacteur membranaire (BRM)	219
VI.A. Ajout de nutriments	219
VI.A.1. Ajout ponctuel de phosphate de monopotassium.....	220
VI.A.2. Ajout en continu d'un mélange complet de nutriments	222
VI.A.3. Bilan de l'ajout de nutriments	226
VI.B. Production d'hydrogène avec substrat réel : les bourbes viticoles	226
VI.C. Mise en évidence d'un biofilm dans le BRM	232
VI.D. Utilisation du biofilm comme <i>inoculum</i> microbien	236
VI.E. Conclusion du chapitre	238
Conclusions générales et perspectives	241
Bibliographie.....	247
Table des figures	A
Liste des tableaux.....	G
Annexes.....	K

Abréviations

AGV	Acide gras volatil
APM / PSA	Adsorption à pression modulée
ApTT°	Après traitement thermique
ATM / TSA	Adsorption à température modulée
AvTT°	Avant traitement thermique
B/A	Rapport molaire du butyrate sur l'acétate produit au cours de la fermentation
BRM	Bioréacteur membranaire
DAS	Débit d'alimentation en substrat
DCO	Demande chimique en oxygène
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
H ₂ /2(B+A)	Rapport molaire de la production d'hydrogène sur le double de la production de butyrate et d'acétate au cours de la fermentation
H ₂ /CO ₂	Rapport molaire de l'hydrogène et du dioxyde de carbone produit au cours de la fermentation
H _{max}	Production maximale cumulée d'hydrogène
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
MES	Matières en suspension
MOF	Matières organiques fermentescibles
MS	Matières sèches
OTU	Operational taxon unit
PAC	Pile à combustible
pb	Paire de bases
PCI	Pouvoir calorifique inférieur
PCS	Pouvoir calorifique supérieur
RAC	Réacteur agité continu
RASB	Réacteur agité semibatch
R _{max}	Vitesse maximale de production
SPE	Substances polymériques extracellulaires
STEP	Station d'épuration
t ₀	Instant initial de la fermentation, correspondant au temps = 0 min
TCD	Détecteur à conductivité thermique
T-RFLP	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux
TSH	Temps de séjour hydraulique
TSS	Temps de séjour des solides
λ	Temps de latence
μGC	Microchromatographie en phase gazeuse

Lexique

Consortium : On entend par « *consortium* », une population de microorganismes présente dans un environnement délimité.

Métabolisme : On entend par « métabolisme », l'ensemble des voies métaboliques empruntées par le *consortium* microbien dans un environnement délimité.

Substrat : On entend par « substrat », l'ensemble des éléments nutritifs organiques utilisés par un microorganisme et nécessaire à sa croissance ou à son métabolisme.

Biomasse : On entend par « biomasse », toute matière organique métabolisable, contenant un *consortium* microbien et/ou un substrat.

Inoculum : On entend par « *inoculum* », la matière introduite dans le réacteur, comportant au moins une partie du *consortium* microbien mis en œuvre.

Hydrogénotrophe : On entend par « *hydrogénotrophe* », la capacité d'un microorganisme, d'un métabolisme ou d'une voie métabolique à consommer de l'hydrogène.

Hydrogénogène : On entend par « *hydrogénogène* », la capacité d'un microorganisme, d'un métabolisme ou d'une voie métabolique à produire de l'hydrogène.

Introduction générale

"We have become great in a material sense because of the lavish use of our resources, and we have just reason to be proud of our growth. But the time has come to inquire seriously what will happen when our forests are gone, when the coal, the iron, the oil, and the gas are exhausted, when the soils shall have been still further impoverished and washed into the streams, polluting the rivers, denuding the fields, and obstructing navigation."

Théodore Roosevelt, le 13 mai 1908

Ce constat, datant d'il y a plus d'un siècle, reste frappant de vérité. Bien que d'importantes avancées aient été réalisées ces dernières décennies, un travail important reste à réaliser pour concilier notre mode de vie avec ce que notre environnement peut nous offrir durablement. En particulier en ce qui concerne nos besoins énergétiques, très importants et en augmentation permanente ; la consommation pour 2040 est estimée à 21 milliards tep, soit 48% de plus qu'en 2012 [1]. Une transition énergétique est nécessaire pour limiter profondément le recours aux énergies fossiles représentant plus de 85% de l'énergie consommée mondialement (énergie nucléaire incluse), et dont l'extraction est de plus en plus coûteuse et polluante.

Une des voies vers la transition énergétique est l'utilisation de l'hydrogène en tant que vecteur énergétique : l'hydrogène-énergie. En effet, ce gaz, à forte densité énergétique, est un combustible non-carboné et propre, ne produisant que de l'eau lors de sa combustion ou de sa conversion en énergie électrique dans une pile à combustible. La perspective de l'émergence de l'hydrogène-énergie présente donc beaucoup d'intérêts, tant au niveau scientifique, qu'industriel ou politique [2].

L'utilisation de l'hydrogène dans le secteur du transport, l'hydrogène-mobilité, pour l'alimentation des piles à combustible permettant d'accroître l'autonomie des véhicules électriques, met en exergue ses avantages en terme de propreté et de densité énergétique, mais également ses inconvénients, que sont la difficulté de son stockage et l'absence actuelle de réseau de distribution à grande échelle. Cette situation est cependant en train d'évoluer avec le développement de nombreuses stations en Europe, dans le cadre du projet Hydrogen Mobility Europe (H2ME), passant d'une quarantaine de stations actuellement opérationnelles à plus de 300 à l'horizon 2020 [3]. Avec cependant des divergences sur les approches de déploiement : financement d'une infrastructure de ravitaillement de grosses capacités en pariant sur l'arrivée de véhicules particuliers ou déploiement de flottes de véhicules gravitant autour de petites stations, stratégie explorée en France.

L'hydrogène peut, en outre, être utilisé pour la production de carburant conventionnel, permettant la capture du CO₂ par méthanation (système « Power-To-Gas ») avec production d'hydrogène par électrolyse de l'eau [4]. Sans passer par cette étape de conversion thermo-chimique, il est actuellement techniquement possible d'ajouter de l'hydrogène directement dans le réseau de gaz naturel à hauteur de 20% en volume pour former l'Hythane® sans impact significatif sur l'efficacité

énergétique du mélange ni d'adaptation nécessaire des infrastructures [5], comme cela est en cours de test sur la communauté urbaine de Dunkerque dans le cadre du projet GRHYD coordonné par GDF SUEZ [6]. Une application commercialisée par Ad-Venta ouvre de nouveaux marchés pour l'hydrogène-énergie, il s'agit de l'utilisation de réservoirs d'hydrogène de petite capacité (50 L_{H2}) couplés à de petites piles à combustible pour le chargement d'appareils électroniques nomades (lampe, téléphone, vélo électrique, drone, etc.), ce qui permet de s'affranchir du réseau électrique [7].

L'hydrogène-énergie n'a de sens que si l'hydrogène est issu de voies de production renouvelables. Or l'hydrogène est, à l'heure actuelle, produit à 96% par reformage des énergies fossiles et à 4% par électrolyse de l'eau [8]. Il est donc important de développer des technologies propres de production d'hydrogène, en particulier à partir de la biomasse. Celles-ci se déclinent en deux catégories, les processus thermochimiques énergivores : gazéification, pyrolyse, liquéfaction hydrothermale et les processus biologiques : fermentation, estérification, digestion, produisant respectivement de l'éthanol, du biodiesel et du biogaz, qui devront subir un traitement de reformage (étape thermique catalytique) pour produire de l'hydrogène.

Ainsi, seuls les procédés biologiques de photolyse de l'eau utilisant des algues ou des cyanobactéries, la photo-fermentation et la fermentation obscure (*dark fermentation*) de composés organiques par des microorganismes, agissant comme des biocatalyseurs, permettent de produire de l'hydrogène à basses températures. Parmi ces procédés peu énergivores, celui de fermentation obscure présente les taux de production les plus élevés et surtout offre la possibilité d'exploiter des déchets organiques (boues de station d'épuration, effluents des industries agroalimentaires, d'exploitations agricoles) et de les convertir en ressources énergétiques valorisables. De plus, il ne nécessite pas de rayonnement lumineux, contrairement aux deux autres procédés.

La fermentation obscure consiste en la dégradation de molécules carbonées (ex : glucides) pour la production d'hydrogène avec coproduction d'acétate, de butyrate et de CO₂, par des bactéries acidogènes en conditions anaérobies et avec un rendement maximal *in vivo*, à partir d'hexose, de 4 mol_{H2}/mol_{hexose} (*Enterobacter* et *Clostridium*). Les voies d'intensification de ce procédé sont diverses et permettent d'améliorer l'efficacité énergétique et/ou économique de ce mode de production d'H₂. L'utilisation de cultures mixtes comme les boues de station d'épuration est efficace pour la production d'H₂ et permet de s'affranchir des étapes coûteuses de stérilisation. De même, la mise en fonctionnement continu du procédé permet d'améliorer la productivité et de réduire les coûts de maintenance. La recherche de biomasses fermentescibles particulièrement adaptées au procédé, avec des teneurs en sucres métabolisables élevées, est également une approche importante, pour améliorer la quantité d'hydrogène produite par tonne de biomasse, le coût de l'acheminement des biomasses étant un aspect non négligeable des procédés biochimiques.

De plus, l'extraction des gaz produits est un des paramètres clés du processus de fermentation obscure, leur présence dans le milieu limitant l'activité des bactéries hydrogénogènes et favorisant celle des bactéries acétogènes et des archées présentes dans l'*inoculum* convertissant l'hydrogène respectivement en acétate et en méthane. La première approche, développée dans ce manuscrit, pour lever ce verrou est l'optimisation du mode d'extraction des gaz produits pour réduire leurs pressions partielles dans le milieu fermentaire, au moyen d'un gaz de balayage, stratégie la plus utilisée à ce jour, ou d'autres méthodes d'extraction (dépression).

Une des voies d'intensification du procédé de fermentation obscure, en fort développement depuis 2008, est l'utilisation de bioréacteurs membranaires. L'application la plus étudiée actuellement est la concentration de la matière organique dans le milieu fermentaire [9–20]. Notre contribution par le développement d'un bioréacteur membranaire avec extraction *in situ* de l'hydrogène produit est tout à fait novatrice dans sa configuration (extraction gaz/liquide) et permettra d'apporter des éléments de réponse quant aux performances de production de l'hydrogène ; seules 2 études ont été récemment publiées sur des configurations d'extraction des gaz non sélectives, mais exclusivement en mode batch [21,22].

Le principal objectif de cette thèse est donc la mise en œuvre du couplage de la production en continu d'hydrogène par fermentation obscure avec une technologie membranaire de type contacteur, pour une extraction optimisée des gaz produits du milieu fermentaire. Cette configuration, permettra l'extraction au cours de la fermentation des gaz produits au travers de fibres creuses, directement placées au sein du milieu fermentaire. Cette thèse correspond aux premiers travaux réalisés sur cette configuration de bioréacteur membranaire pour la fermentation obscure.

Ce manuscrit de thèse est divisé en six chapitres :

- Un premier chapitre, dont l'objectif est de faire un état des lieux du contexte de production de l'hydrogène et de son utilisation, ainsi que de réaliser une revue bibliographique sur le procédé de fermentation obscure et son couplage aux procédés membranaires.
- Le deuxième chapitre présentera l'ensemble du matériel et les méthodes de bioproduction et d'analyse utilisés dans le cadre de cette étude.
- Le troisième chapitre présentera le choix du *consortium* microbien et la sélection des paramètres de fermentation obscure optimaux pour celui-ci, en réacteur agité semibatch.
- Le quatrième chapitre portera sur l'intensification du procédé par extraction des gaz produits en utilisant différents modes d'extraction, en particulier par l'utilisation d'un gaz de balayage.
- Le cinquième chapitre présentera l'adaptation au fonctionnement continu de ce procédé de fermentation optimisé, d'abord en réacteur agité, puis directement en bioréacteur membranaire à fibres creuses.
- Le sixième chapitre de cette thèse, plus exploratoire, proposera la mise en œuvre du bioréacteur membranaire avec différentes alimentations afin d'en améliorer les performances et de prouver la faisabilité du procédé en conditions réelles (biomasse complexe). La stabilisation de *consortium* microbien dans le BRM avec production d'hydrogène sans apport d'*inoculum* externe sera étudiée.

Enfin, les résultats obtenus lors de cette étude permettront de conclure et d'ouvrir sur des perspectives d'améliorations du procédé pour sa mise en œuvre, future, à l'échelle industrielle.

I. Revue bibliographique

L'objectif de ce chapitre est de présenter les applications de l'hydrogène les plus importantes et les moyens de production de celui-ci, actuellement utilisés et en cours de développement, avec une attention particulière pour les processus de production biochimiques, et spécifiquement le processus de fermentation obscure qui sera détaillé. Les différents paramètres clés de ce procédé seront présentés, ainsi que les moyens d'améliorer les performances de ce procédé de production d'hydrogène. Enfin les différents modes de fonctionnement et types de bioréacteurs pouvant être mis en œuvre pour le procédé de fermentation obscure seront décrits, incluant une présentation exhaustive des études ayant utilisé ce procédé biologique en couplage avec les procédés membranaires.

I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production

Dans le contexte actuel de développement en faveur de la transition énergétique, la perspective d'une économie de l'hydrogène présente beaucoup d'intérêt, tant au niveau scientifique qu'industriel ou politique. Ceci grâce aux propriétés intrinsèques de l'hydrogène, molécule non carbonée avec une densité énergétique forte. L'hydrogène pourrait ainsi jouer un rôle important comme vecteur énergétique dans une économie décarbonée, pour le stockage et le transfert de l'énergie. Dans la plupart des cas, l'hydrogène est alors une énergie secondaire, qui nécessite la transformation d'une énergie primaire qui peut être de différentes natures. L'hydrogène peut cependant également être une source d'énergie primaire, dont l'exploitation reste en cours d'étude [23]. Il s'agit d'un vecteur d'énergie dit « propre » puisqu'aucune molécule carbonée ou toxique n'est produite lors de sa combustion ou de sa conversion dans une pile à combustible ; seule de l'eau et de l'énergie sont produites (1).



L'intérêt majeur de l'utilisation de ce gaz comme vecteur énergétique réside dans sa très forte densité massique en énergie (Figure 1) avec un pouvoir calorifique inférieur (PCI) de 119,9 MJ/kg soit plus du double de celui du gaz naturel liquéfié (50,0 MJ/kg) et presque trois fois celui de l'essence ou du diesel (43,1 et 42,8 MJ/kg, respectivement) [24].

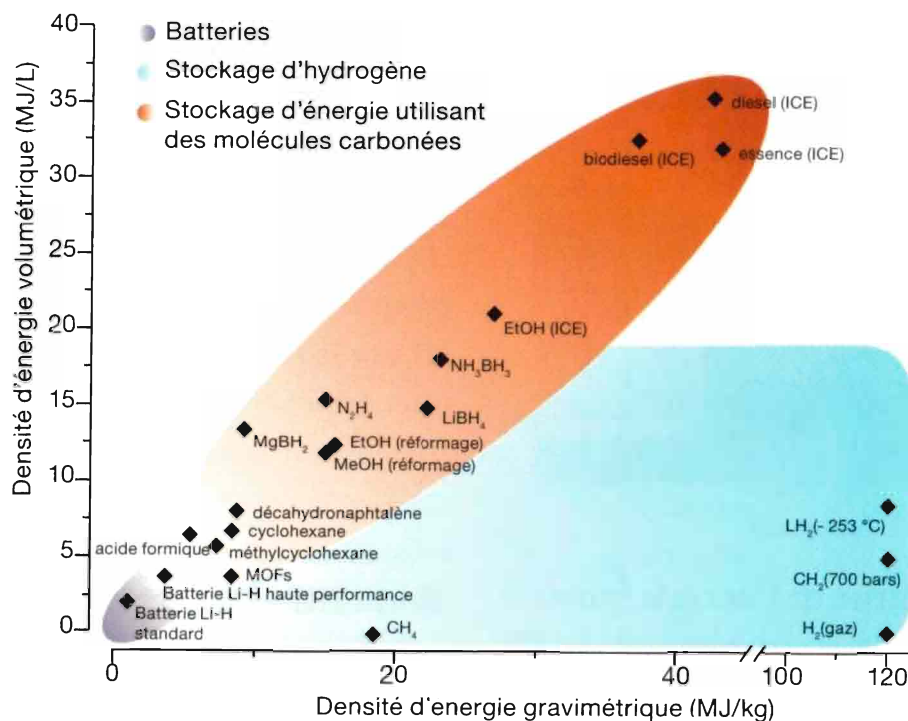


Figure 1. Diagramme présentant les capacités comparées de stockage d'énergie en volume et en masse [23]

Le mode de stockage de l'énergie est, en effet, un point critique pour certaines applications, en particulier celle nécessitant un système de stockage compact ou mobile. La Figure 1 est particulièrement représentative des différences existantes entre les différentes catégories d'énergie. Les batteries électriques sont le mode de stockage présentant la densité énergétique la plus faible, tant volumique ($< 5 \text{ MJ/L}$), que gravimétrique ($< 10 \text{ MJ/kg}$). Le deuxième type de stockage important de l'énergie correspond aux molécules carbonées conventionnelles (diesel et essence), avec une densité énergétique par unité de volume très élevée ($> 40 \text{ MJ/L}$) ; expliquant le succès du pétrole au 20^{ème} siècle et l'intérêt pour la fabrication de biocarburant de type conventionnel (biodiesel et bioéthanol) [23]. Enfin, en ce qui concerne le stockage de l'hydrogène, la densité énergétique gravimétrique est très élevée ($119,9 \text{ MJ/kg}$), tandis que l'hydrogène possède une densité volumique en énergie relativement faible, avec seulement $8,5 \text{ MJ/L}$ pour l'hydrogène sous forme liquide, soit à -253°C ($20,3 \text{ K}$) [24] rendant le stockage de cette énergie plus difficile [23].

Trois stratégies de stockage de l'hydrogène existent :

- Le stockage à haute pression est le plus simple à mettre en œuvre, à petite échelle, et permet une utilisation mobile. Les pressions de stockage pour les véhicules à hydrogène sont typiquement de 350 et 700 bar [25].
- Le stockage liquide à basse température ($20,3 \text{ K}$) jusqu'à dix fois plus dense en énergie par rapport au stockage 700 bar, nécessite cependant l'utilisation d'une isolation thermique importante et implique inévitablement des pertes de gaz non négligeables entre 0,5 et 1% par jour [25]. Ce type de stockage est donc plus adapté à un stockage stationnaire avec un volume d' H_2 important, permettant d'améliorer l'inertie thermique.
- Le stockage solide par absorption, qui peut être réalisé avec des matériaux métalliques dans lequel les atomes d'hydrogène pénètrent et occupent des sites interstitiels, formant alors un hydrure métallique [23]. Ce phénomène peut être réalisé à pression et température modérées, par exemple, l'option de l'hydrure de magnésium, proposée commercialement par l'entreprise McPhy, permet d'absorber l'hydrogène à $\approx 350^\circ\text{C}$ et 10 bar (désorption à 2 bar) avec une

I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production

densité énergétique volumique supérieure d'environ 30%. Ce procédé présente cependant l'inconvénient de fortement réduire la densité énergétique massique ; la masse de métal nécessaire au stockage de l'hydrogène étant très élevée ; ce qui rend ce procédé incompatible avec les applications hydrogène-mobilité, mais reste intéressant pour l'hydrogène-énergie stationnaire ou de petites capacités [26].

L'hydrogène présente un large éventail d'applications, plus ou moins importantes en terme de volumes, dont certaines sont installées comme l'hydrogène-réactif et d'autres en plein essor, comme l'hydrogène-énergie. C'est cet aspect de la diversité des voies d'utilisation de H₂ qui va être approfondi dans un premier temps, puis nous nous intéresserons aux différentes méthodes de production de ce gaz, celles utilisées au niveau industriel, jusqu'à celles actuellement encore au niveau de la recherche, mais qui promettent, pour certaines d'entre elles, de permettre une production plus durable de ce vecteur énergétique.

I.A.1. Utilisation de l'hydrogène

Les utilisations actuelles de l'hydrogène sont variées, bien établies et importantes économiquement. Le développement d'une économie fondée sur l'hydrogène en tant que vecteur énergétique permettrait l'émergence de nouvelles applications à grande échelle.

I.A.1.1. L'hydrogène, un réactif chimique

L'industrie consomme actuellement la quasi-totalité des 600 milliards de mètres cubes d'hydrogène produits dans le monde, la moitié (44%) étant utilisée par l'industrie pétrolière pour le raffinage [27]. Il est utilisé lors de l'étape d'hydrotraitement des différentes fractions du pétrole et permet en particulier d'éliminer le soufre présent sous forme de fonction thiol, et l'azote sous forme d'amine, ainsi que de réduire les liaisons insaturées, dans le but d'ajuster le rapport hydrogène/carbone de la fraction pétrolière, en fonction de son utilisation [28]. L'hydrogène est également utilisé pour rectifier les fractions d'hydrocarbures pendant l'étape d'hydrocraquage catalytique à haute pression, ce qui permet d'ajuster la longueur des chaînes aliphatiques en fonction des besoins [25].

De plus, l'industrie chimique, utilise l'H₂ pour :

- la production de méthanol à partir du gaz de synthèse par voie catalytique. Après conversion du monoxyde de carbone et de l'eau par la réaction de conversion de gaz à l'eau ou « water-gaz shift », $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$, $\Delta_r G^0 = -20,1 \text{ kJ/mol}$; le dioxyde de carbone et l'hydrogène produits, avec un apport supplémentaire d'hydrogène, sont utilisés pour produire du méthanol, $\text{CO}_2 + 3 \text{H}_2 \leftrightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$, $\Delta_r G^0 = -9,3 \text{ kJ/mol}$ [29]. L'hydrogénation catalytique pour la production de méthanol peut également être utilisée pour la capture de dioxyde de carbone, sans utilisation du gaz de synthèse. En fonction de la provenance de l'hydrogène, le méthanol peut être considéré comme un biocarburant, pouvant être utilisé comme combustible direct, ou via des piles à combustibles adaptées [30].
- la production de méthane, permettant la capture des molécules de dioxyde de carbone par méthanation via la réaction $\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \leftrightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$, $\Delta_r G^0 = -130,3 \text{ kJ/mol}$. Dans ce cas, si l'hydrogène utilisé est d'origine biologique, le méthane produit peut être considéré comme un biocarburant conventionnel, parfaitement compatible avec les infrastructures actuelles.
- la production d'ammoniac (procédé Haber-Bosch) est la seconde voie d'utilisation de l'hydrogène (38%) [27]. A haute pression (100-400 bar) et à température modérée (300-650°C),

I.Revue bibliographique

la réaction permet de convertir le mélange azote et hydrogène en ammoniac ($\text{N}_2 + 3 \text{H}_2 \leftrightarrow 2 \text{NH}_3$, $\Delta_r G^0 = -33,0 \text{ kJ/mol}$) avec un rendement global de 98%, grâce à des catalyseurs à base de fer et au recyclage des réactifs [24,31]. L'ammoniac produit est utilisé principalement pour l'amendement des sols (80%).

En outre, l'hydrogène est utilisé par l'industrie chimique pour diverses applications, pour la production de l'eau oxygénée, de polymères, de peintures, etc. [2,32].

La forte activité réductrice de l'hydrogène lui permet aussi d'être utilisé pour différentes applications où l'élimination de l'oxygène est importante, par exemple dans l'industrie métallurgique pour éviter l'oxydation des métaux durant différentes étapes, ou pour la fabrication du verre par le procédé de flottage sur bain d'étain [32]. L'activité réductrice de H_2 est également mise à profit dans l'industrie métallurgique, pour la réduction d'oxydes métalliques, à partir du minerai [33]. De la même façon, l'hydrogène permet de réduire des catalyseurs métalliques oxydés afin de les reconvertir en métal actif [32].

L'hydrogénation des huiles et graisses, dans l'industrie alimentaire, nécessite également l'utilisation d'hydrogène, afin de réduire les liaisons insaturées pour améliorer la stabilité en augmentant la température de fusion et en limitant l'oxydation [32].

I.A.1.2. L'hydrogène, un agent réducteur biologique

En tant qu'agent réducteur, l'hydrogène est une molécule importante dans la vie microbienne. C'est un intermédiaire des voies de production de méthane par les microorganismes méthanogènes hydrogénotrophes, via la voie de synthèse (2) [34]. L'hydrogène peut ainsi être injecté dans des méthaniseurs en fonctionnement pour améliorer le rendement en méthane, et réduire la quantité de dioxyde de carbone finale. En injectant H_2 à un débit correspondant à quatre fois celui de la production de CO_2 dans le méthaniseur, une amélioration du débit de production et de la composition finale du biogaz peut être observée, avec un mélange final contenant 75% de méthane [35].



Dans un but de conversion directe du CO_2 sous forme de méthane, l'hydrogène peut être utilisé comme alimentation d'archées hydrogénotrophes dans un bioréacteur de conversion chimioautotrophique dont le processus emprunte également la voie de synthèse (2) [36].

I.A.1.3. L'hydrogène, un combustible pour la production d'énergie thermique et électrique

I.A.1.3.1. Combustible pour la production d'énergie thermique

Contrairement à la combustion de carburant conventionnel, contenant du carbone, la combustion d'hydrogène ne produit pas de CO_2 mais uniquement de l'eau. La combustion de l'hydrogène produit cependant une faible quantité d'oxydes d'azote (NO_x) liée à la présence de N_2 dans l'air [37].

Pour la production d'énergie thermique, il est actuellement techniquement possible, comme nous l'avons vu, d'ajouter de l'hydrogène directement dans le réseau de gaz naturel à hauteur de 17%, ce mélange étant appelé l'hythane, sans impact significatif sur l'efficacité énergétique du mélange ni adaptation nécessaire des infrastructures [5]. Le Projet GRHYD [6] coordonné par GDF SUEZ et basé dans l'agglomération Dunkerquoise, prévoit la production et le stockage d'hydrogène dans le réseau

I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production

de gaz naturel à hauteur de 6% puis à terme de 20% (avec des infrastructures neuves et adaptées), dans l'optique d'une utilisation dans un quartier d'habitation pour le chauffage domestique, l'eau chaude sanitaire et la cuisson. En parallèle, il est prévu de valider le carburant Hythane® comme carburant d'une flotte de bus des transports en commun de l'agglomération.

Enfin, l'hydrogène, sous forme liquide à 20,3 K ou sous forme d'hydrazine est utilisé pour la propulsion d'engins aérospatiaux (missiles, fusées, navettes spatiales) et pour l'aviation militaire. L'hydrogène stocké sous forme liquide, permet de réduire le volume des réservoirs, alors encore quatre fois plus volumineux qu'un réservoir de kérosène, pour un même potentiel d'énergie [38].

Pour le secteur de la mobilité, l'utilisation de l'hydrogène comme combustible pour alimenter un moteur à combustion interne adapté est opérationnelle depuis le 19^e siècle, avec un regain d'intérêt important depuis les années 1970 et le développement de différents véhicules, en particulier par l'institut Musashi et les constructeurs automobiles BMW, Mazda et Ford [39,40]. Le coût d'un véhicule utilisant cette technologie est moins élevé que celui des véhicules à piles à combustibles, avec cependant une conversion moins efficace de l'énergie. De plus ce type de véhicule, dont le moteur est adapté à l'hydrogène, mais également à l'essence, permettrait d'accompagner la transition énergétique et l'installation de station à hydrogène sur le territoire [40].

Notons que pour le secteur de l'énergie, la très faible viscosité de H₂, qui est le plus fluide des composés, en fait un lubrifiant de pointe, pour certaines turbines de production d'électricité [32]. Cette caractéristique, couplée à sa forte conductivité thermique, et sa bonne capacité thermique font également de H₂ un excellent fluide caloporteur pour les applications nécessitant un refroidissement très rapide, comme pour les turbo générateurs [41] ou les systèmes de propulsion de fusées [38].

I.A.1.3.2. Combustible pour la production d'énergie électrique (pile à combustible - PAC) [2,23,42]

Développées dans les années 1960 pour alimenter en électricité les premières capsules spatiales Gemini du programme Apollo les piles à combustibles (PAC) permettent une production décentralisée d'électricité pouvant être alimentées avec différents combustibles, l'hydrogène, mais également le méthane, le méthanol, l'éthanol, le diméthyléther, etc. En effet, bien que le processus ne fonctionne qu'avec de l'hydrogène et de l'oxygène (1), les conditions d'utilisation de certaines PAC permettent la conversion préliminaire du combustible en hydrogène avant la production d'électricité.

Plusieurs technologies de PAC ont été mises au point en fonction de leur température de fonctionnement, des matériaux utilisés et de l'application envisagée. Les principales PAC présentant actuellement les meilleures perspectives sont de deux types :

- à « haute » température (600 - 1050°C), la pile à combustible à oxyde solide, SOFC (solid oxyde fuel cell) pouvant être alimentée avec des combustibles variés, convertie en proton H⁺ sur la surface catalytique. La haute température nécessaire au fonctionnement de ces PAC ne permet qu'une utilisation stationnaire du procédé, permettant, en outre, une cogénération de chaleur.

- à « basse » température (60°C - 200°C), les PEMFC (proton exchange membrane fuel cell) ne peuvent utiliser que de l'hydrogène pur. Ces PAC sont celles utilisées dans les applications mobiles comme les véhicules à hydrogène. Sur l'ensemble des piles à combustibles commercialisées en 2012, 88% étaient de type PEMFC [42].

I.Revue bibliographique

Pour le secteur des transports, les véhicules électriques dans lesquels sont intégrées des piles à combustible alimentées en hydrogène constituent l'application la plus exposée médiatiquement ; en effet, elle est représentative des avantages de l'hydrogène en terme de propreté et d'autonomie supérieure au véhicule électrique à batteries, tout comme ses inconvénients qui sont la difficulté de son stockage et l'absence actuelle de réseau de distribution à l'échelle nationale. Les différents constructeurs automobiles développent actuellement différentes technologies de véhicules à travers le monde, parmi lesquelles la propulsion par moteur électrique alimenté par une batterie, rechargée par une pile à combustible avec réservoir ou un rechargement sur secteur, permet d'atteindre les meilleures performances, avec un tarif compétitif de l'hydrogène à partir de 10 €/kg [43].

Pour le secteur de l'énergie, l'hydrogène est un atout comme source d'électricité hors réseau en cas de coupure de courant ou sur des sites isolés. Il est alors très compétitif par rapport aux systèmes de génération d'électricité par groupe électrogène, par panneau solaire ou par éolienne, en particulier grâce à la fiabilité des piles à combustible, ce qui limite les interventions de maintenance [44]. Comme citée précédemment, l'utilisation de réservoirs d'hydrogène de petite capacité, couplés à des PAC de petite taille permet le chargement d'appareils électroniques nomades, ce qui permet d'augmenter l'autonomie de ce type de produits en l'absence de réseau électrique et ouvre de nouveaux marchés pour l'hydrogène-énergie.

I.A.1.4. L'hydrogène, un biocombustible de troisième génération

Les deux principaux biocarburants actuellement développés sont le bioéthanol (par fermentation des glucides), substitut de l'essence, et le biodiesel (par esterification d'acides gras), qui lui, est un substitut du gasoil. Au fur et à mesure des avancées scientifiques et technologiques, trois générations de biocarburants sont apparues. Utilisant pour la première génération, les denrées alimentaires, des problèmes de concurrence entre alimentation et énergie ont été mis en évidence. Cette première génération est actuellement la seule développée à grande échelle [45].

L'utilisation de déchets organiques lignocellulosiques, pour la 2^{ème} génération de biocarburants, a permis de limiter ces problèmes en utilisant une biomasse non alimentaire. Cependant, le volume disponible de biomasses lignocellulosiques est limité par rapport aux besoins énergétiques et le système de production reste directement lié à la surface agricole disponible. De plus, la marchandisation potentielle de ces déchets, utilisés à grande échelle, posera à nouveau le problème de concurrence entre cultures permettant ou ne permettant pas la coproduction de matières celluloses.

Les biocarburants de 3^{ème} génération sont produits à partir de micro-organismes par photosynthèse (microalgues) à partir de CO₂ et de lumière, ou par voie fermentaire (levures, bactéries, microalgues) à partir de substrats organiques variés [46]. Cette définition met en avant l'utilisation de microorganismes, ce qui permet de concentrer au maximum les zones de production de biocarburants et de libérer l'espace agricole par l'utilisation de structures étagées et de terrains non cultivables. Les microorganismes sont utilisés pour la production de glucides ou d'acides gras [47], ensuite transformés en biocarburants par fermentation et transestérification comme pour les générations 1 et 2 ; ou alors, plus particulièrement pour la production d'hydrogène qui est un biocombustible à lui seul, permettant un transfert d'énergie par combustion directe, ou via une pile à combustible et pouvant également être utilisé pour capturer du CO₂ et former un biocarburant carboné adapté aux systèmes conventionnels par méthanation (2) ou par voies biologiques de production de biométhane comme la conversion chimioautotrophique (I.A.1.2).

I.A.1.5. Procédés de séparation et pureté de l'hydrogène

La pureté de l'hydrogène produit est un critère important à prendre en compte car en fonction de l'application visée, la composition nécessaire du gaz utilisé est variable. La technologie la plus sensible étant celle des PAC de type PEMFC, qui nécessite au minimum 99,99% d'H₂, tandis que le gaz utilisé par l'industrie pétrochimique pour le reformage catalytique ne nécessite que 70-80% d'H₂ [48]. Le Département de l'énergie (DOE) du gouvernement des États-Unis estime le degré de pureté du gaz d'alimentation des PAC pour les véhicules à hydrogène, à 98% de H₂ minimum et au maximum de 10 ppm de CO et 10 ppm de sulfure [49]. Ces deux composés sont en effet considérés comme des poisons pour les piles à combustible, à l'exception des piles à haute température où le CO devient alors combustible, ces piles acceptant les composés carbonés [50].

La purification de l'hydrogène produit est donc nécessaire dans la plupart des cas afin d'atteindre la pureté minimale requise. Différents procédés peuvent être utilisés en fonction de la pureté nécessaire et des quantités de gaz à traiter :

- Le procédé d'adsorption à pression modulée, APM ou PSA (pressure swing adsorption) [49,25], est le plus utilisé actuellement, dans l'industrie pétrochimique, typiquement à partir d'un mélange contenant également CO, CO₂, H₂O et CH₄. Le principe de ce procédé repose sur l'affinité particulière de certains gaz avec certains solides, en fonction de la pression. Le lit adsorbant solide peut être de plusieurs types (charbon actif, zéolite, gel de silice, etc.) selon la composition en impuretés à éliminer. La pureté de l'hydrogène produit par ce procédé est très élevée, typiquement de l'ordre de 99,999%. De plus, l'hydrogène en sortie du procédé est sous pression, ce qui est généralement nécessaire pour son conditionnement ou son utilisation.
- Le procédé d'adsorption à température modulée, ATM ou TSA (temperature swing adsorption) [49], est proche de celui d'APM, mais avec l'utilisation de l'affinité d'un gaz et d'un support poreux à différentes températures plutôt qu'à différentes pressions. Une partie du gaz d'alimentation typiquement à température ambiante est adsorbé lors de son passage sur le lit adsorbant, celui-ci étant ensuite désorbé à haute température. Ce procédé est moins utilisé que le procédé APM en raison de la nécessité d'une source de chaleur et d'une durée de cycle d'adsorption/désorption plus longue, typiquement plusieurs heures, contre quelques minutes pour le procédé APM.
- La cryogénie ou distillation à basse température [25] est réalisée par l'abaissement de la température du mélange de gaz à purifier, sous pression, jusqu'à liquéfaction de toutes les impuretés, soit à une température inférieure à 150°C. Plusieurs étapes de distillation sont nécessaires et la pureté maximale pouvant être atteinte est de 96% d'hydrogène. De plus, la consommation énergétique de ce procédé est plus importante que celle nécessaire au procédé APM.
- La séparation membranaire de l'hydrogène des autres gaz (CO₂, CH₄, etc.) peut être réalisée grâce à différents types de membranes (polymériques, métalliques, céramiques, etc.) nécessitant des conditions opératoires très différentes [25,48,49].

La séparation au travers de membranes métalliques composées de palladium ou d'alliages de Pd s'opère par un mécanisme de solution-diffusion de l'hydrogène avec formation d'hydrures de Pd ou par diffusion interstitielle de l'hydrogène atomique à haute température (250 - 350°C), permettant d'atteindre une pureté allant au-delà de 99% d'hydrogène dans le perméat.

I.Revue bibliographique

Cependant cette option a été abandonnée par la majorité des constructeurs. Les membranes céramiques fonctionnant comme des tamis moléculaires (diffusion gazeuse) présentent des sélectivités à l'hydrogène assez limitées. De plus, leur coût de fabrication et leur fragilité sont un frein à leur développement industriel.

Les membranes polymères peuvent être, quant à elles, utilisées à basse température et sans mise sous pression élevée. L'extraction sélective de H₂ est réalisée par exclusion stérique, sur la base de la différence de diamètre cinétique entre H₂ (2,89 Å) et CO₂ (3,30 Å). En revanche, l'extraction sélective de CO₂ est réalisée par affinité, avec des membranes permettant l'absorption et la diffusion préférentielle du CO₂ à travers celles-ci. Ces membranes permettent de réduire les coûts de fonctionnement, en particulier pour de petites unités de production d'H₂ en limitant la complexité du système.

- Le procédé de pompe électrochimique [51], développé récemment, permet la séparation de différents gaz en utilisant un potentiel électrique comme force motrice pour transporter sélectivement les protons, H⁺, au travers d'une membrane composée d'un électrolyte solide. Avec ce procédé, il est possible de mettre l'hydrogène sous pression dans le perméat, jusqu'à 100 bar, ce qui est un avantage par rapport aux autres procédés [49]. Cette méthode reste actuellement encore à l'état de recherche.

Contrairement au procédé APM (> 99,99% en H₂), les méthodes membranaires ne permettent pas d'atteindre les puretés élevées nécessaires pour certains procédés en aval.

L'hydrogène est un produit industriellement important présentant des propriétés chimiques et physiques uniques. De plus, H₂ constitue un vecteur énergétique d'avenir pouvant remplacer les carburants fossiles pour de nombreuses applications, en particulier dans le secteur de la mobilité. L'utilisation d'hydrogène biosourcé, en tant que biocarburant de 3^{ème} génération, présente alors des avantages environnementaux forts pour la transition énergétique. Un point important à considérer pour faire le lien entre utilisation et production d'hydrogène est sa pureté, celle-ci pouvant être améliorée par divers procédés. Le paragraphe suivant présente un panorama des différents procédés permettant la production d'hydrogène.

I.A.2. Moyens de production

Aucune voie de production d'hydrogène n'est spontanée, l'apport d'une source d'énergie est indispensable ; celle-ci pouvant être d'origine très variable. L'hydrogène peut donc être produit par des procédés divers, allant des voies thermochimiques utilisant les énergies fossiles comme matières premières, aux différentes voies biologiques utilisant des microorganismes alimentés en matières métabolisables ou en énergie solaire, en passant par les voies électrochimiques utilisant l'eau et l'énergie électrique.

Actuellement, l'hydrogène est produit à hauteur de 48% à partir du gaz naturel, de 30% à partir du pétrole et 18% à partir du charbon, les 4% restants étant à partir de l'électrolyse de l'eau [52]. La production d'hydrogène est donc assujettie aux énergies fossiles. Ce système n'est pas compatible avec l'idée d'une économie propre et décarbonée basée sur l'hydrogène, les émissions de CO₂ étant seulement délocalisées en amont de la filière énergétique à partir de ressources fossiles qui s'épuisent.

Des procédés de production alternatifs existent cependant et permettraient de limiter l'importance de l'industrie pétrochimique dans le secteur de l'hydrogène énergie en particulier.

I.A.2.1. Les voies thermochimiques

Les voies thermochimiques de production de H₂ utilisent l'énergie thermique pour réaliser des réactions chimiques à partir de molécules contenant de l'hydrogène (hydrocarbures ou eau). Actuellement, 96% de l'hydrogène produit dans le monde, l'est par des procédés thermochimiques :

- Le vaporeformage du méthane [53] (gaz naturel ou biogaz) ou SMR (steam methane reforming) est le plus développé industriellement, il a lieu à haute température (800°C) en présence d'un catalyseur composé de nickel et permet la production d'hydrogène et de monoxyde de carbone (3). Cette réaction peut être généralisée à l'ensemble des hydrocarbures (4) (gaz, liquides ou solides) ; dans le cas du charbon, on parle de gazéification.



Le procédé de gazéification [53,54] s'applique à des biomasses riches en composés hydrocarbonés comme le bois, ainsi qu'à des molécules issues de voies biologiques (fermentation ou estérification) et a lieu à des températures supérieures à 800°C. Une limite d'humidité de 35% dans la biomasse est nécessaire au bon fonctionnement du procédé. L'apport thermique nécessaire à la gazéification comme au vaporeformage est élevé.

- L'oxydation partielle ou POX (partial oxydation) est un procédé appliqué au gaz naturel et aux fractions lourdes de pétrole (5) en présence d'oxygène et à très haute température (1300 - 1500°C). L'oxydation partielle présente l'avantage de ne pas nécessiter de catalyseur et est donc moins sensible à la présence de soufre. De plus, il s'agit d'un procédé exothermique, générant cependant moins d'H₂ [53].



- Le reformage adiabatique ou ATR (autothermal reforming) est un compromis entre vaporeformage et oxydation partielle. Un apport d'oxygène permet de réaliser l'oxydation partielle et fournit l'énergie nécessaire à la réaction (6) [53].



- Le gaz obtenu par vaporeformage, oxydation partielle ou reformage adiabatique, contient principalement le mélange H₂ et CO, appelé gaz de synthèse. La réaction de conversion du gaz à l'eau ou « water-gaz shift » (7) a lieu à plus basse température (250 - 500°C) par voie catalytique et permet d'améliorer le rendement total en hydrogène par reformage du CO [53].



On notera que la réaction de déshydrogénation des coupes pétrolières, importante dans l'industrie pétrolière, coproduit de l'hydrogène (8). L'hydrogène produit par ce procédé restant, en pratique, captif dans les raffineries, réutilisé sur d'autres procédés [25].



I.Revue bibliographique

- La pyrolyse [53,54] est un procédé thermochimique, réalisé à plus faible température que la gazéification ($\approx 500^{\circ}\text{C}$), en l'absence d'oxygène et d'eau. En théorie, ce procédé permet la production exclusive d'hydrogène et de carbone à partir d'hydrocarbures (9). En pratique, la présence d'eau, d'air, de composés oxygénés dans la biomasse conduit à des produits plus divers, généralement un mélange de gaz, H_2 , CH_4 , CO et CO_2 , des huiles et des goudrons en plus du carbone attendu ; ces coproduits pouvant être retraités par vaporeformage (3), puis par la réaction de conversion du gaz à l'eau (7) pour améliorer le rendement en H_2 .



- L'hydrogène, dit naturel, est produit par le phénomène de serpentinisation au niveau de la mise en contact de roches riches en Fe^{2+} du manteau terrestre avec de l'eau, réactions pouvant être représentées par l'équation (10). On estime la production annuelle d'hydrogène naturel à une dizaine de millions de tonnes. Il s'agit d'un phénomène continu et pérenne, ce qui permet de qualifier cet hydrogène naturel de renouvelable, de nouvelles roches étant formées en continu dans le manteau terrestre. Cependant, les méthodes de récupération de cet hydrogène restent actuellement à l'état de recherche [23,55,56].



I.A.2.2. Les voies électrochimiques [25,53]

L'électrolyse de l'eau permet la production d'hydrogène pur par dissociation de molécules d'eau (11) en utilisant l'électricité comme source d'énergie. La production de gaz est provoquée par un courant électrique, qui traverse l'eau entre deux électrodes ; de l'hydrogène est produit à la cathode, et de l'oxygène à l'anode. Les gaz sont donc produits séparément à une grande pureté. La présence d'un électrolyte permet d'augmenter considérablement le transfert des électrons en solution et donc l'efficacité de l'électrolyseur, cet électrolyte pouvant être acide ou basique.



Ce procédé correspond à environ 4% de la production actuelle mondiale d'hydrogène. Cette faible proportion s'explique par le rendement énergétique limité de ce procédé et par le coût de l'hydrogène produit, plus élevé que celui issu des procédés thermochimiques. Cependant l'électrolyse permet la production d'un hydrogène pur, indispensable pour certaines applications (alimentaires, médicales, etc.) et offre la possibilité d'une flexibilité importante sur la production, ponctuelle ou continue, de plus ou moins grand volume.

L'électrolyse ne produit pas de coproduits carbonés. Cependant, ce procédé n'utilise pas de source d'énergie primaire, mais secondaire, l'électricité. L'impact environnemental de la production d'hydrogène doit donc également prendre en compte le moyen de production de cette énergie. Il est à noter d'ailleurs que la production d'hydrogène par électrolyse à partir d'énergie électrique issue d'énergie fossile a un impact environnemental plus important que la production d'hydrogène directe par procédé thermochimique, principalement en raison d'une efficacité énergétique globale inférieure [53].

Les deux principaux procédés d'électrolyse utilisés actuellement sont l'électrolyse alcaline et l'électrolyse avec membrane échangeuse de proton (PEM), qui correspond au procédé inverse de la pile à combustible de type PEMFC (présentée au paragraphe I.A.1.3.2). Une efficacité énergétique de

I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production

l'ordre de 55-70% est obtenue avec le procédé PEM, plus élevée que pour l'électrolyse alcaline, de l'ordre de 50-60%. Moins développée à l'heure actuelle, l'électrolyse à haute température (HTE), permet de remplacer une partie de l'énergie électrique nécessaire au procédé par de l'énergie thermique, pouvant améliorer le rendement énergétique jusqu'à 85-90%.

Le système appelé « power to gas » est fondé sur la conversion de l'énergie électrique excédentaire en période de creux de consommation (25 TWh annuels en France), par électrolyse de l'eau pour la production d'hydrogène, celui-ci peut ensuite être utilisé directement, injecté dans le réseau de gaz naturel, ou transformé en méthane par méthanation (2) avec capture de dioxyde de carbone. L'intérêt est alors de limiter les surproductions d'énergie, à perte, liées aux énergies renouvelables, dont la production n'est pas prévisible (solaire et éolien) et ne peut être corrélée à la consommation classique d'électricité [4].

Dans le cas de la production électrique nucléaire, il est possible de réaliser la radiolyse directe de l'eau par mise en contact avec des radiations ionisantes (α , β et γ) issues généralement des combustibles usés. Il s'agit d'une application limitée mais efficace en termes de conversion énergétique de déchets ultimes [57].

I.A.2.3. Les voies biologiques

Avec l'utilisation de voies biologiques pour la production d'hydrogène, une limitation importante de l'énergie nécessaire pour le fonctionnement du procédé est réalisée grâce à un fonctionnement à basses température et pression. Ces procédés ne nécessitent pas d'énergies fossiles, mais des déchets fermentescibles ou de l'énergie lumineuse (solaire de préférence). Les rendements en hydrogène sont cependant relativement faibles par rapport aux procédés matures utilisés actuellement pour la production d'hydrogène à grande échelle.

I.A.2.3.1. La biophotolyse directe de l'eau [50,53]

La biophotolyse directe de l'eau (12) est une voie biologique permettant la dissociation de molécules d'eau en H_2 et O_2 à partir d'énergie lumineuse, en conditions anaérobies, par des algues vertes, comme *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce procédé permet de produire de l'hydrogène sans coproduction de CO_2 . Le rendement énergétique de conversion de l'énergie lumineuse est estimé à 0,5% [53].



Le fonctionnement naturel de ces algues vertes est la production de biomasse et d'oxygène à partir de l'eau et du dioxyde de carbone par photosynthèse (13) en utilisant l'énergie lumineuse. Seule l'énergie lumineuse excédentaire, non nécessaire à la plante pour la photosynthèse, est utilisée pour la production d'hydrogène.



I.A.2.3.2. La biophotolyse indirecte de l'eau [50,54].

La biophotolyse indirecte de l'eau est réalisée par des cyanobactéries pour produire de l'hydrogène via l'intermédiaire d'une étape de photosynthèse (13) produisant des glucides et accumulant de la biomasse, celle-ci étant ensuite consommée lors d'une seconde phase, par fermentation aérobie, permettant la production d' H_2 et de CO_2 (14).



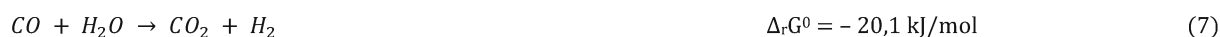
I.A.2.3.3. La photo-fermentation [50,59]

La photo-fermentation est réalisée par des bactéries photohétérotrophes de type bactéries pourpres photosynthétiques non sulfureuses, typiquement de la famille des *Rhodospirillaceae*. Celles-ci permettent la production d'hydrogène à partir de molécules organiques comme les glucides ou les acides gras volatils (AGV), grâce à l'énergie lumineuse lorsque le milieu est pauvre en azote. Une coproduction de dioxyde de carbone est associée à ce procédé consommant des molécules carbonées. L'utilisation de molécules organiques assez diverses peut être mise à profit pour la valorisation d'effluents industriels chargés en matières organiques. La voie de fermentation employée correspond aux équations (14) et (15), respectivement en cas d'alimentation avec glucose et acétate. Le rendement énergétique de ce procédé est estimé à 0,1% [53].



I.A.2.3.4. La réaction biologique de conversion du gaz à l'eau [50]

Certaines bactéries photohétérotrophes de la famille *Rhodospirillaceae*, comme *Rhodospirillum rubrum*, sont également capables de produire de l'hydrogène dans l'obscurité, à partir d'eau et de monoxyde de carbone (7). Contrairement à la réaction thermochimique de conversion du gaz à l'eau (paragraphe I.A.2.1), cette réaction peut être réalisée à température ambiante et pression atmosphérique, grâce à l'efficacité des voies enzymatiques.



I.A.2.3.5. L'électrolyse microbienne [60]

L'électrolyse microbienne est réalisée par des bactéries anaérobies de type exoélectrogènes, c'est-à-dire des bactéries capables de réaliser des transferts d'électrons pendant leur métabolisme. A l'instar de l'électrolyse classique (paragraphe I.A.2.2), l'électrolyse microbienne nécessite deux électrodes : l'anode, où des molécules organiques sont oxydées avec formation de CO_2 et d'électrons par les bactéries et la cathode, où l'hydrogène est produit à partir de protons, H^+ , et des électrons issus du métabolisme, complétés par une alimentation électrique, nécessaire pour limiter la production de méthane correspondant au métabolisme naturel. Ce procédé doit être réalisé en l'absence d'oxygène pour favoriser l'oxydation microbienne. Une membrane peut être utilisée pour séparer les compartiments de la cathode et de l'anode, permettant la production séparée du CO_2 et de l'hydrogène produit. L'efficacité énergétique de ce procédé est estimée à 78% [53].

I.A.2.3.6. La fermentation obscure [50]

Aussi appelée « dark fermentation » ou fermentation sombre, la fermentation obscure est le résultat de l'action d'un *consortium* microbien en conditions anaérobies mettant en œuvre plusieurs étapes de dégradation de molécules carbonées (typiquement des glucides) avec une coproduction d'AGV (principalement acétate et acide butyrate) et de CO_2 . Une grande variété de microorganismes est adaptée à ce processus, les plus étudiés étant les bactéries de genre *Clostridium*, *Enterobacter* et *Bacillus*. Des productivités très importantes, de l'ordre de 197 - 2910 $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$, ont été obtenues dans

I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production

la littérature [50]. Ce processus est détaillé dans le paragraphe I.B.1. Le rendement de ce procédé est estimé à 60-80% [53].

I.A.2.3.7. Bilan des voies de production biologiques d'hydrogène

Le Tableau 1 donne un résumé des différentes technologies biologiques de production d'hydrogène avec leurs avantages et inconvénients. Des productivités typiques relevées dans des revues bibliographiques sont données pour chaque processus.

I.Revue bibliographique

Tableau 1. Comparaison des voies biologiques de production d'hydrogène

	Biophotolyse directe de l'eau	Biophotolyse indirecte de l'eau	Photo-fermentation	Réaction biologique de gaz à l'eau	Électrolyse microbienne	Fermentation obscure
Microorganismes	algues vertes	cyanobactéries	bactéries pourpres photosynthétiques non sulfureuses	bactéries photohétérotrophes de la famille des <i>Rhodospirillaceae</i>	bactéries anaérobies exoélectrogènes	bactéries anaérobies acidogènes
Besoins	énergie lumineuse et eau	énergie lumineuse et eau	énergie lumineuse et molécules organiques	monoxyde de carbone et eau	électricité, eau et matières fermentescibles	matières fermentescibles
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> production d'H₂ pur consommation de CO₂ pour la croissance microbienne 	<ul style="list-style-type: none"> production d'H₂ pur consommation de CO₂ pour la croissance microbienne 	<ul style="list-style-type: none"> peut convertir des déchets 	<ul style="list-style-type: none"> tolérance à O₂ haute productivité en H₂ 	<ul style="list-style-type: none"> peut convertir des déchets 	<ul style="list-style-type: none"> ne nécessite pas de lumière = production continu peut convertir des déchets haute productivité en H₂ simplicité du procédé
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> nécessite de la lumière sensibilité à O₂ basse productivité en hydrogène 	<ul style="list-style-type: none"> nécessite de la lumière air nécessaire basse productivité en hydrogène 	<ul style="list-style-type: none"> nécessite de la lumière production de CO₂ sensibilité à O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> production de CO₂ nécessite une distribution efficace du CO dans le milieu 	<ul style="list-style-type: none"> consommation d'électricité sensibilité à O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> production de CO₂ coproduction d'AGV sensibilité à O₂
Productivité (mL _{H2} /L/h)	4,5 [60]	14,9 [60]	180 [50]	2309 [50]	130 [53]	197 – 2911 [50]

I.A. L'hydrogène, son utilisation, ses moyens de production

Bien qu'ils présentent l'avantage de ne pas coproduire de CO₂, les procédés de biophotolyse directe ou indirecte sont peu attractifs en raison de leur faible productivité (< 15 mL_{H2}/L_{milieu}/h) et du besoin de lumière, complexifiant le système. L'électrolyse microbienne a une productivité supérieure (130 mL_{H2}/L_{milieu}/h), mais nécessite un apport énergétique électrique supplémentaire en plus du substrat, l'électricité utilisée devant, par ailleurs, être d'origine renouvelable pour conserver l'intérêt écologique du procédé. Ce procédé étant assez récent, une amélioration des performances peut néanmoins être attendue pour l'avenir [60]. Le procédé de réaction biologique de conversion du gaz à l'eau est l'un des procédés les plus intéressants, il a un potentiel de productivité important (2309 mL_{H2}/L_{milieu}/h) et permet de reformer du monoxyde de carbone. Ce procédé, concurrent du procédé de conversion du gaz à l'eau classique, est donc adapté en couplage à un procédé industriel producteur de CO, pour une capture et une revalorisation de ce gaz.

La photo-fermentation est un procédé intéressant, avec des productivités allant jusqu'à 180 mL_{H2}/L_{milieu}/h, et pouvant être alimenté en déchets organiques métabolisables, ce processus nécessite cependant de l'énergie lumineuse. Enfin, la fermentation obscure est le procédé qui présente le potentiel de productivité le plus élevé, jusqu'à 2911 mL_{H2}/L_{milieu}/h. De plus, ce procédé peut être alimenté avec des déchets organiques métabolisables, sans nécessiter l'apport d'énergie lumineuse. L'intérêt de la fermentation obscure réside dans la simplicité de ce procédé et sa grande adaptabilité : différents microorganismes sont utilisables, avec différents substrats, à différentes températures de fonctionnement, dans différentes configurations ; aspects qui seront détaillés dans la suite de ce chapitre (paragraphe I.B).

En outre, la fermentation obscure produit des AGV, principalement l'acétate et le butyrate, ce qui permet un couplage avec le procédé de photo-fermentation qui consomme ces molécules ; ceci pour améliorer le rendement global de production d'hydrogène. Azwar *et al.* [60] proposent le couplage de trois procédés : fermentation obscure, photo-fermentation et électrolyse microbienne consommant les AGV en relais de la photo-fermentation durant la nuit. Un système intégrant également la photolyse de l'eau est donné par Holladay *et al.* [53] (Figure 2), où l'énergie lumineuse est utilisée dans un premier temps par la photolyse, sans utilisation du rayonnement infrarouge, utilisé par le procédé de photo-fermentation. On notera que ces couplages de procédés sont toujours fondés sur le procédé de fermentation obscure dont le rôle de conversion de déchets organiques bruts, dans l'obscurité ne peut être réalisé par un autre procédé. Ces propositions sont intéressantes pour optimiser au maximum les performances de bioconversion de déchets et d'énergie lumineuse en hydrogène, mais augmentent le degré de complexité du procédé global, dont tous les sous-processus nécessitent indépendamment, des conditions optimales différentes de température, pH, luminosité, etc.

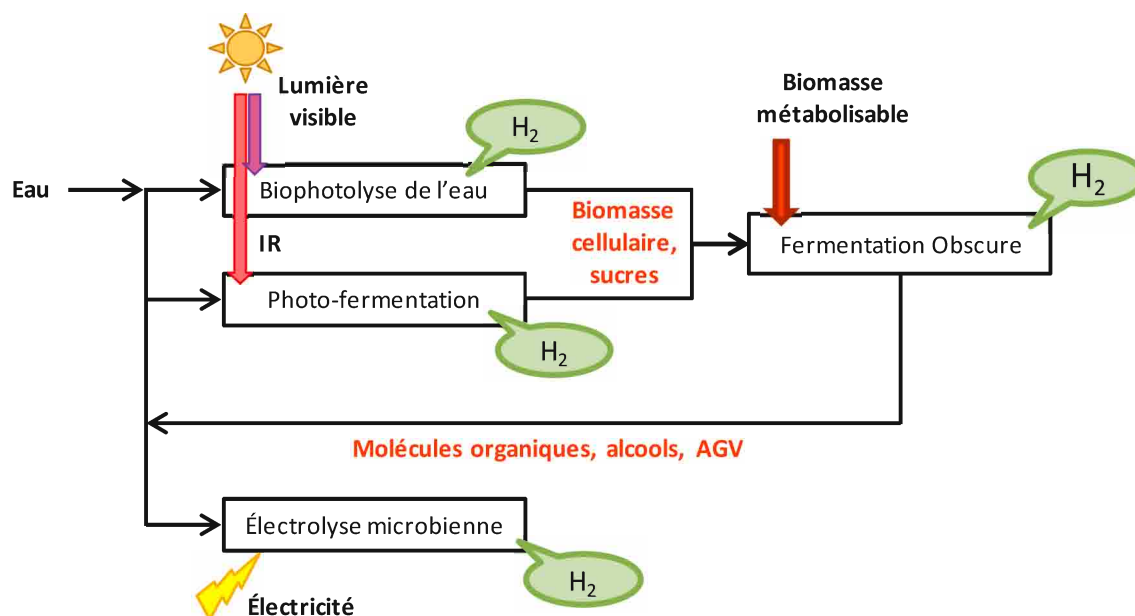


Figure 2. Principe général du couplage des procédés de production d'hydrogène (adapté de [53])

I.A.2.4. Les coûts de production de l'hydrogène

Le coût de production de l'hydrogène est un paramètre important à prendre en compte pour comparer objectivement les différentes voies de production. L'analyse du cycle de vie des procédés de production d'hydrogène proposée par Romagnoli *et al.* [61] (Figure 2) montre que les procédés thermochimiques utilisant les énergies fossiles sont les plus rentables, avec un coût maximum de 1,5 €/kg_{H₂}. Ces faibles coûts s'expliquent par des procédés de production centralisés, à très grande échelle et bénéficiant d'un tarif peu élevé en énergies fossiles. Le coût de production de l'hydrogène obtenu, à partir de la biomasse, par les procédés thermochimiques de gazéification ou de pyrolyse, est également relativement bas, avec 2 €/kg_{H₂}, compétitifs par rapport aux procédés pétrochimiques, mais nécessitant toujours un apport énergétique important. Le coût de l'hydrogène généré par les procédés électrochimiques est plus élevé, avec en moyenne 4 €/kg_{H₂}, avec peu de distinction en fonction de la source d'électricité, renouvelable ou non. Ces procédés devraient donc être privilégiés pour les contextes particuliers comme pour la production décentralisée d'H₂ pur en petite quantité. Les procédés de production par voie biologique peuvent potentiellement être compétitifs par rapport aux procédés thermochimiques de conversion de la biomasse, avec un coût moyen entre 2 et 3 €/kg_{H₂} et avec pour avantage un impact environnemental positif ; ces procédés nécessitant peu d'énergie pour fonctionner. De plus, ces coûts pourraient être réduits par une intensification du procédé et une mise à l'échelle industrielle.

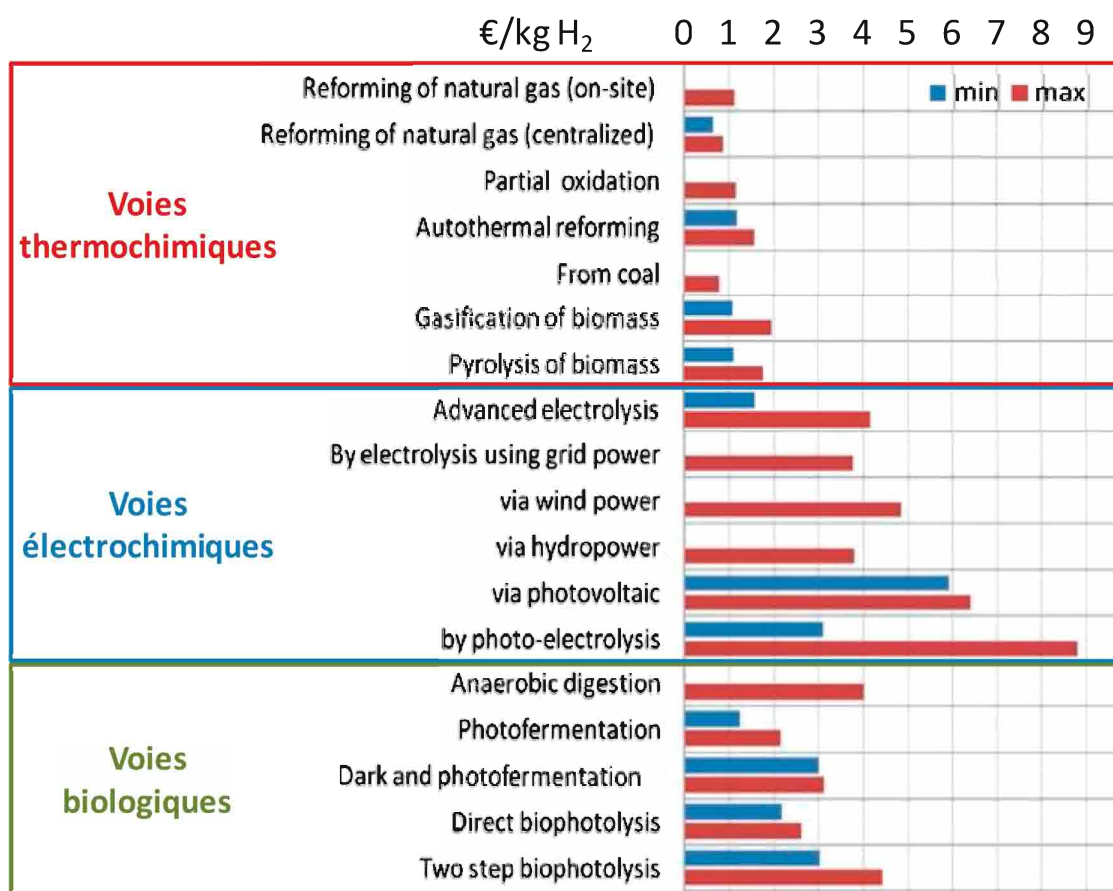


Figure 3. Comparaison des coûts de production d'hydrogène pour différentes voies de production (adapté de [61])

Ces coûts de production d'hydrogène sont à mettre en parallèle avec le véritable coût de l'hydrogène à l'achat, comprenant conditionnement et transport du produit. Les grandes unités centralisées de production industrielle de reformage catalytique ne permettent pas le transport de l'hydrogène en petite quantité à l'échelle locale sans augmentation importante du coût de vente lié au transport de l'hydrogène. L'utilisation de systèmes de production à plus petite échelle, adaptés au contexte énergétique et industriel local permettrait d'optimiser les coûts et l'efficacité énergétique du réseau de distribution de l'hydrogène. Les procédés de production biologiques sont plus adaptés à cette échelle de production locale, où les procédés thermochimiques classiques ne pourraient pas être concurrentiels. On notera que le tarif compétitif estimé est de 10 €/kgH₂ à la pompe pour l'hydrogène-mobilité [43].

Les procédés de production d'hydrogène sont très divers et nécessitent systématiquement un apport énergétique, celui-ci pouvant être d'origine thermique, électrique ou biologique via l'utilisation de microorganismes, afin d'atteindre une efficacité énergétique importante. Dans ce contexte, l'hydrogène généré par les processus biologiques peut alors être considéré comme un combustible renouvelable. Le procédé de fermentation obscure est très prometteur pour la production de biohydrogène à partir de déchets organiques, avec une productivité en H₂ importante, nécessaire à l'intégration industrielle du procédé. C'est pourquoi nous avons sélectionné la fermentation obscure, dans cette étude, comme procédé de production du biohydrogène.

I.B. Fermentation obscure

I.B.1. Le processus de fermentation obscure

Le processus de fermentation obscure fait partie du processus de digestion anaérobie, réalisé sans contrainte d'apport de lumière et en l'absence d'oxygène. La dégradation de composés organiques par un *consortium* bactérien anaérobie, permet de produire de l'hydrogène en continu à partir de déchets fermentescibles lors d'une fermentation autorégulée. La Figure 4 illustre de façon schématique les principales voies de dégradation empruntées par le *consortium* microbien durant le processus complexe de digestion anaérobie.

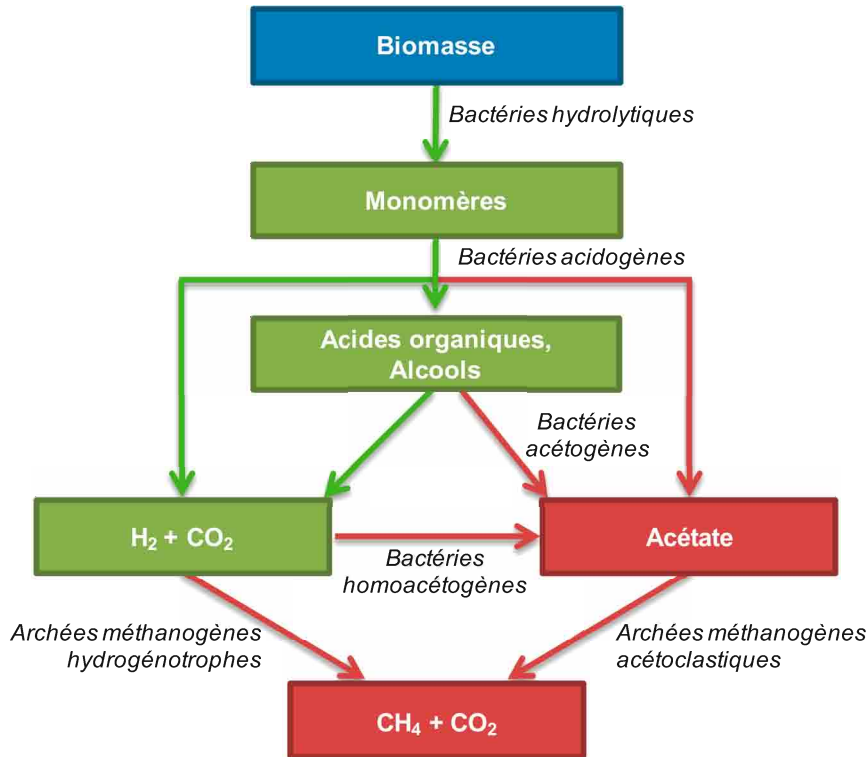


Figure 4. Illustration schématique du processus de digestion anaérobie (adapté de [62])

Dans un premier temps, les bactéries hydrolytiques vont hydrolyser les protéines polymériques et les glucides complexes en acides aminés et hexose ou pentose. Puis, les bactéries de fermentation (acidogènes) vont former principalement des acides organiques volatils, de l'hydrogène et du dioxyde de carbone à partir des molécules simples. La voie acétate (16) permet la production de 4 moles de H₂ par mole d'hexose, tandis que la voie butyrate (17) ne permet de produire que 2 mol_{H2}/mol_{hexose}. La voie de production de l'éthanol (18), nommée solvantogénèse, ne donne pas lieu à une coproduction de H₂. Ces voies de production s'intègrent dans un ensemble de réactions complexes (Figure 5) liées au métabolisme des bactéries et pour lesquelles de nombreux coproduits peuvent être formés : alcools (éthanol et butanol), acides gras volatils (AGV) (acides acétique, propionique, butyrique, etc.), autres acides organiques (acides pyruvique, formique, succinique, lactique, etc.), solvant (acétone), etc.



I.B. Fermentation obscure

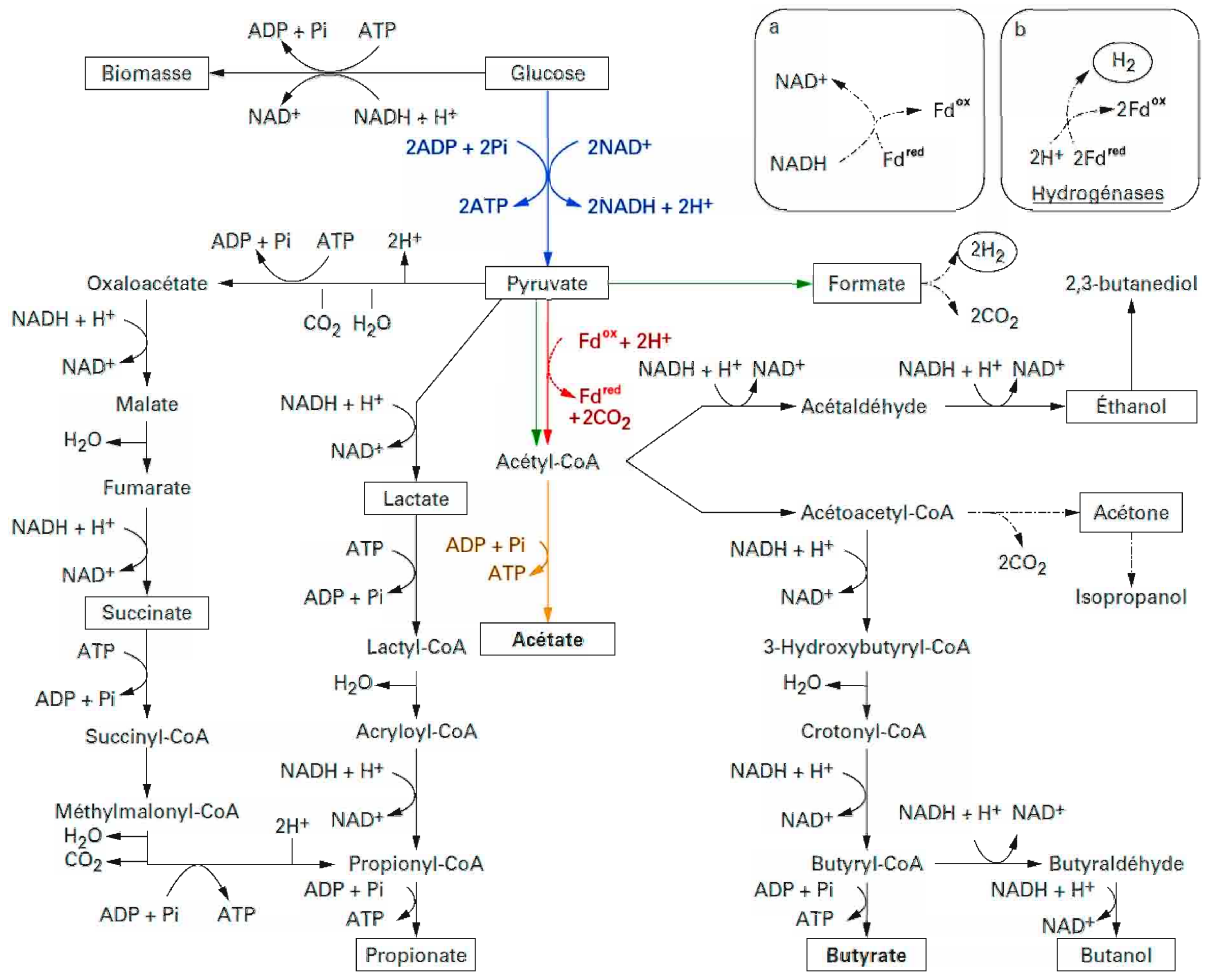


Figure 5. Principales voies métaboliques de la production d'hydrogène par fermentation obscure (adaptée de [63] et [64])

Afin de produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), le métabolisme microbien réoxyde des molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH), une coenzyme, pour produire du NAD^+ . La production d'ATP est réalisée, en grande partie, lors de la dégradation du glucose (voie en bleu sur la Figure 5) [65,66].

Deux voies principales permettent la production d'hydrogène via la molécule de ferrédoxine réduite (Fd^{red}). D'abord la voie [ferrédoxine : hydrogénase] via de la production d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) à partir de pyruvate réduisant une molécule de ferrédoxine par molécule de pyruvate (voie en rouge sur la Figure 5), ensuite la voie [NADH : ferrédoxine oxydoréductase : hydrogénase], par oxydation d'une molécule de NADH afin de régénérer une molécule de NAD^+ (Figure 5 encadré a). Dans les deux cas, la production d'hydrogène est réalisée par l'hydrogénase, lors de l'oxydation de la ferrédoxine réduite (Fd^{red}) en ferrédoxine oxydée (Fd^{ox}) permettant d'obtenir de l'hydrogène (Figure 5 encadré b) [64].

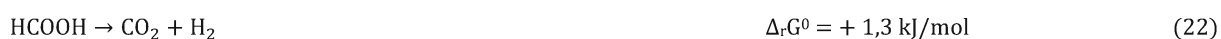
Ainsi, l'ensemble des voies de productions secondaires utilisant des molécules de NADH entrent en concurrence directe avec la production d'hydrogène, comme dans le cas de la production d'éthanol (18) et de lactate (19), dont les productions consomment deux molécules de NADH, à partir du pyruvate, soit la totalité du NADH généré lors de la production du pyruvate, ce qui ne permet donc aucune coproduction d'hydrogène (Figure 5). Les cas des voies de production du propionate (20) ou du succinate sont d'autant plus problématiques puisqu'elles nécessitent plus de NADH qu'elles n'en génèrent (une mole de NADH par mole de produit), et consomment donc du NADH issu d'autres voies

I.Revue bibliographique

de production comme celle de l'acétate, ce qui réduit directement la production d'hydrogène attendue.



La seconde voie de production de H₂ est la voie [pyruvate : formiate-lyase] (voie en vert sur la Figure 5), réalisée en deux temps à partir du pyruvate, par l'action de l'enzyme pyruvate : formiate lyase, produisant de l'acétyl-CoA (sans ferrédoxine) et du formiate à parts égales (21) ; le formiate étant ensuite utilisé par l'enzyme hydrogène lyase pour produire H₂ et CO₂ (22), tandis que l'acétyl-CoA est utilisé avec un phosphate pour la production d'acétate et d'ATP (voie orange sur la Figure 5) (23) et (24) [66–69].



Soit globalement, à partir du glucose, pour la production d'acétate et de formiate (25) :



On notera que si l'ensemble du formiate produit par la voie (25) est convertie en H₂ et CO₂ par la voie (22), un rendement en hydrogène de 4 mol_{H₂}/mol_{hexose} est observé, identique à celui obtenu par la voie acétate (16).

La production de dioxyde de carbone peut être importante dans le cas de la production de métabolites secondaires non désirés comme l'éthanol, le succinate, ou l'acétone. Le rapport molaire des gaz produits H₂/CO₂ permet alors de caractériser le métabolisme et de comparer son efficacité avec ceux obtenus dans d'autres conditions de fonctionnement.

D'une façon similaire, le rapport molaire de la quantité de butyrate sur celle d'acétate produite pendant la fermentation, appelé B/A, est un paramètre qui permet de caractériser le métabolisme suivi par le *consortium* bactérien pour la production d'hydrogène, en comparant indirectement les voies de production de ces deux métabolites (16) et (17). En effet, un rapport molaire B/A élevé correspond à une forte production relative de butyrate, donc à un rendement en hydrogène limité à 2 mol_{H₂}/mol_{hexose}, donc à une quantité relative de dioxyde de carbone produite importante par rapport à celle d'hydrogène puisque la voie acétate permet un rapport H₂/CO₂ de 2 tandis que la voie butyrate ne permet qu'un rapport de 1. Ce paramètre peut cependant être modifié par la production d'acétate par homoacétogénèse (26) consommant quatre moles d'hydrogène et deux moles de dioxyde de carbone. La production globale d'hydrogène observée est alors réduite, tandis que celle d'acétate augmente. Une production directe d'acétate peut également avoir lieu par acétogénèse homo-fermentaire, directement à partir d'hexose, sans coproduction d'hydrogène ni de dioxyde de carbone (27), modifiant le rapport B/A sans impacter le rapport H₂/CO₂ [70].



I.B. Fermentation obscure

D'autres voies de l'acétogénèse peuvent être utilisées pour produire de l'acétate à partir des autres métabolites (propionate (28), butyrate (29), lactate ou éthanol) consistant aux voies inverses de production, vers le pyruvate ou l'acétyl-CoA, puis à la production d'acétate avec coproduction d'hydrogène [71].



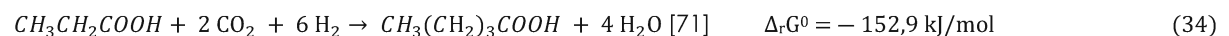
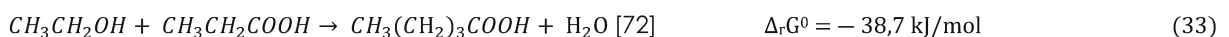
L'utilisation d'un troisième paramètre permet de vérifier que le butyrate et l'acétate sont issus des voies coproductrices d'hydrogène (16) et (17), en utilisant le fait qu'elles permettent toutes les deux la production de deux moles d'hydrogène par mole d'acide. Ce paramètre est donc le rapport molaire $H_2/2(B+A)$, égal à 1 si seules les voies (16) et (17) sont utilisées pour la production d'acétate et de butyrate. Si le rapport molaire $H_2/2(B+A)$ est inférieur à 1, cela signifie qu'il y a moins d'hydrogène produit que la quantité d'acide laisse prévoir. Ceci peut s'expliquer, soit par une consommation de l'hydrogène produit, par exemple par la voie propionate (20), soit par une production d'acides sans coproduction d'hydrogène, généralement par homoacétogénèse (26) qui allie les deux effets. Tandis qu'une valeur supérieure à 1 du rapport molaire $H_2/2(B+A)$ serait impossible dans les conditions de fermentation obscure.

En plus des bactéries homoacétogènes, l'*inoculum* microbien peut contenir d'autres microorganismes hydrogénotrophes, les archées méthanogènes, qui vont consommer H_2 pour la synthèse du méthane par la voie (30), ainsi que des bactéries réductrices de sulfates ou de nitrates, qui vont utiliser H_2 pour son pouvoir réducteur (31) et (32).



Plusieurs stratégies de prétraitement de l'*inoculum* microbien existent afin de limiter l'activité des microorganismes hydrogénotrophes (paragraphe I.B.3). L'extraction de l'hydrogène produit permet également de limiter sa consommation en réduisant la pression partielle du gaz dans le milieu fermentaire (paragraphe I.B.4.3).

La production de valérate a lieu à partir du propionate (produit avec consommation d' H_2 (20) sans coproduction d'hydrogène, soit via la voie (33) avec l'utilisation d'éthanol comme agent réducteur, soit par la voie (34) consommant une quantité importante d'hydrogène en tant qu'agent réducteur.



I.B.2. L'*inoculum* bactérien

Le processus naturel de digestion anaérobie fait participer différents microorganismes pour les différentes étapes de dégradation de la biomasse et de production de métabolites. La fermentation obscure peut cependant être réalisée à partir de bactéries en culture pure, sélectionnées, nécessitant des conditions stériles pour empêcher la contamination du système. Le fonctionnement à partir de cultures pures dans le cas d'une alimentation en déchets métabolisables est donc très contraignant.

L'utilisation de cultures mixtes, contenant de nombreuses espèces microbiennes, permet alors de s'affranchir de la contrainte de stérilisation de la biomasse. Ces consortia microbiens peuvent être issus d'environnements naturels (sols de forêt, vases côtières, consortium du rumen, etc.) ou anthropogéniques (boues de station d'épuration, consortium de bioréacteur, etc.).

I.B.2.1. Les bactéries productrices d'hydrogène

De nombreuses espèces bactériennes produisent de l'hydrogène pendant leur métabolisme. Celles-ci peuvent être de type anaérobies strictes (*Clostridia*), anaérobies facultatives (*Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Micrococci*) voire aérobies (*Alcaligenes* et *Bacillus*) [73,74]. Elsharnouby *et al.* [75] ont répertorié 185 tests de fermentation employant 16 espèces bactériennes différentes en cultures pures en fermentation obscure dans la littérature (103 références) (Tableau 2). Parmi celles-ci, les bactéries des ordres *Clostridiales* et *Enterobacteriales* ont été les plus étudiées pour la production d'hydrogène.

Tableau 2. Conditions et performances moyennes de tests de fermentation obscure relevées dans la littérature sur 185 expériences, (données adaptées de l'étude de Elsharnouby *et al.* [75])

Ordre	Espèce bactérienne	Température (°C)	pH	Rendement en hydrogène (mol _{H₂} / mol _{hexose})	Productivité en hydrogène (mL _{H₂} /L/h)
<i>Clostridiales</i>	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	70 - 72	6,8 - 7,2	2,4 - 3,8	25 - 371
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	30 - 37	5,0 - 7,2	0,6 - 2,4	55 - 889
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	30 - 41	6,0 - 7,2	1,7 - 2,8	21 - 660
	<i>Clostridium butyricum</i>	30 - 39	5,2 - 8	0,1 - 3,1	17 - 1033
	<i>Clostridium DMHC-10</i>	37	5,0	3,4	89
	<i>Clostridium thermocellum</i>	55 - 60	4,4 - 7,4	0,4 - 1,9	0,4 - 763
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	35 - 37	5,7 - 7,2	1,1 - 3,2	67 - 696
	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	35 - 37	5,0 - 7,0	1,4 - 2,3	69 - 817
<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	35 - 40	5,5 - 7,0	0,2 - 2,8	54 - 517
	<i>Enterobacter Cloacae</i>	36 - 37	5,0 - 6,5	0,7 - 3,3	80 - 660
	<i>Escherichia coli</i>	30 - 37	6,0 - 6,8	0,2 - 1,5	13 - 2400
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37	6,0 - 6,5	0,5 - 2,1	420 - 508
<i>Thermoanaerobacteriales (classe des Clostridia)</i>	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	70	8,0	2,5 - 2,7	54 - 100
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	60	5,5 - 7,0	1,1 - 2,8	152 - 367
<i>Thermotogales</i>	<i>Thermotoga neapolitana</i>	60 - 85	7,0 - 7,5	1,3 - 3,9	1,4 - 413

Les bactéries de genre *Clostridium* sont capables de dégrader de nombreux types de glucides plus ou moins facilement métabolisables (glucose, saccharose, lactose, arabinose, cellobiose, etc.) et ont montré leur potentiel de production d'hydrogène à partir d'effluents industriels [64]. Ces bactéries sont sporulantes, c'est-à-dire qu'elles forment des cellules dormantes, les spores, lorsque les conditions de vie dans leur milieu sont défavorables. Ces spores végétatives sont très résistantes et permettent une sauvegarde du matériel génétique des bactéries jusqu'à leur germination, au retour de conditions de fermentation favorables. Le métabolisme des bactéries du genre *Clostridium* emprunte typiquement les voies [NADH : ferrédoxine oxydoréductase : hydrogénase] et [ferrédoxine : hydrogénase] pour produire l'acétyl-CoA puis principalement de l'acétate et du butyrate [67].

Certaines bactéries classifiées initialement dans le genre *Clostridium* ont été reclassées dans d'autres catégories [76]. Cependant, ces erreurs de classement ayant été réalisées à cause des

I.B. Fermentation obscure

similarités entre ces bactéries et celles du genre *Clostridium*, certaines de ces bactéries étant également productrices d'H₂.

NB : La banalisation du séquençage des gènes, codant l'ARN 16S et la protéine ribosomiale, pour la caractérisation des espèces bactériennes a permis, au début des années 2010, une remise en cause importante de la classification des bactéries du genre *Clostridium*. Certaines bactéries (*eubacterium*,...) sont entrées dans le genre *Clostridium*, tandis que 78 espèces en ont été extraites, reclassées dans 6 nouveaux genres, extérieurs à la famille taxonomique Clostridiaceae [77]. Ces nouveaux genres, obtenus par classification phylogénétique basée sur l'évolution de la séquence des gènes codant l'ARN 16S et la protéine ribosomiale, sont : *Peptoclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Lachnoclostridium*, *Erysipelatoclostridium*, *Gottschalkia* et *Tyzzrella* ; tandis que les bactéries du genre *Clostridium* « réel » sont appelées *Clostridium sensu stricto* [76].

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (genres *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, etc.) sont également régulièrement utilisées en fermentation obscure. Ces bactéries ne sont pas sporulantes et produisent de l'hydrogène par la voie [pyruvate : formiate-lyase], coproductrice de formiate et d'acétyl-CoA [67,78]. Ces bactéries sont capables de dégrader différents type de glucides complexes [64], cette alimentation pouvant être complétée avantageusement avec du formiate afin d'exploiter au maximum leur aptitude à convertir cette molécule en H₂ et CO₂ (22) [78,79].

L'utilisation de cultures pures à l'échelle du laboratoire permet d'étudier dans le détail le métabolisme particulier d'une espèce et ainsi d'optimiser les conditions de fermentation qui lui sont le plus adaptées pour améliorer les performances de production d'hydrogène [75], ce qui a permis d'apporter des informations importantes sur le fonctionnement de ce processus. Cependant, cela nécessite d'éviter toute contamination de l'environnement et de réaliser l'apport d'un substrat stérile. Une transposition de ces procédés à l'échelle industrielle est difficilement envisageable, alors que l'utilisation de cultures mixtes efficaces pour la production d'hydrogène permet d'éviter ces étapes coûteuses de stérilisation [73].

I.B.2.2. L'utilisation de cultures mixtes

L'utilisation de cultures mixtes présente divers avantages par rapport à l'utilisation de cultures pures. La présence de nombreuses espèces microbiennes permet une adaptabilité plus importante du consortium à différentes conditions opératoires et à différents substrats complexes [64]. De plus, les cultures mixtes peuvent être issues d'environnements naturels ou anthropogéniques, parfois directement issues du substrat, sans nécessiter de mise en croissance en laboratoire. Les cultures mixtes, sont un écosystème complet où différentes fonctions sont remplies par de nombreux microorganismes. Cette coopération permet alors l'hydrolyse et la métabolisation complète de substrats complexes comme les protéines par les *Saprosiraceae* [80] et les *Clostridiaceae* [81], la cellulose par certaines *Clostridiales* (*Clostridium sp.*, *Acetivibrio cellulolyticus*) [82] ou la chitine par les *Chitinopagaceae* [82].

Certaines bactéries, sont productrices de substances polymériques extracellulaires (SPE) qui permettent de générer des structures complexes, comme les biofilms sur des surfaces, ou la floculation de la biomasse et des bactéries en milieu liquide (granules ou flocs) [83], c'est par exemple le cas des bactéries du genre *Zoogloea* [84]. Cette agglomération des différents microorganismes protège le consortium de l'environnement extérieur, ce qui améliore sa robustesse. La présence de microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*) permet de consommer les quantités résiduelles d'oxygène dissous dans le milieu,

ce qui évite l'effet toxique de O_2 sur les bactéries anaérobies strictes comme celles du genre *Clostridium* [82,85].

Cependant, des bactéries non favorables à la fermentation obscure peuvent également être présentes dans la diversité microbienne des cultures mixtes. En particulier, certaines bactéries lactiques, comme *Sporolactobacillus*, peuvent sécréter des bactériocines pouvant limiter la production d'hydrogène [82]. *Bacillus coagulans* peut également présenter un effet inhibiteur sur la production d'hydrogène, en utilisant le substrat pour la production d'acide lactique [86]. D'autres microorganismes, hydrogénotrophes, sont généralement présents dans les cultures mixtes, réduisant considérablement le rendement global du système, en particulier les bactéries homoacétogènes, les bactéries sulfato-réductrices, les bactéries productrices de propionate et les microorganismes méthanogènes [87]. Néanmoins, ces microorganismes peuvent être inhibés efficacement par un prétraitement du consortium microbien, ce qui sera discuté au paragraphe I.B.3.

L'intérêt de l'utilisation de cultures mixtes par rapport aux cultures pures est important, ce qui explique leurs nombreuses utilisations dans la littérature par rapport aux cultures pures [74]. Parmi les nombreuses sources utilisables pour l'apport de l'inoculum microbien, les boues activées de station d'épuration sont particulièrement intéressantes [88].

I.B.2.3. Les boues activées de station d'épuration

Les boues activées de station d'épuration sont les boues issues du traitement biologique des eaux usées après décantation des boues primaires (Figure 6). Il s'agit du procédé le plus couramment utilisé dans les stations d'épuration pour réduire la quantité de matières organiques en activant l'activité microbologique. Une décantation finale permet de séparer l'eau traitée des boues, plus denses, en partie utilisées pour réensemencer les eaux usées provenant du décanteur primaire. Le surplus de boues doit être traité car celui-ci contient une quantité importante de microorganismes actifs, dont certains sont pathogènes. Afin d'exploiter cette activité biologique, leur utilisation en digestion anaérobie est de plus en plus commune (22% des boues produites en France) [89] et leur potentiel d'utilisation comme *inoculum* de fermentation obscure a été démontré avec succès [88].

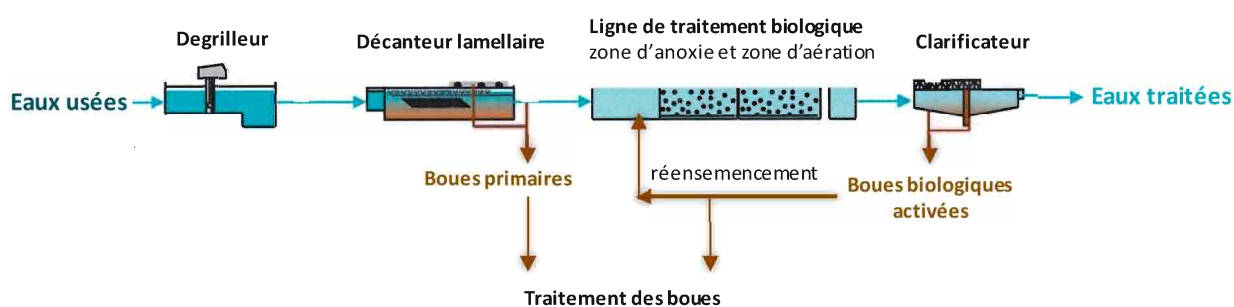


Figure 6. Schéma de principe du traitement biologique des eaux usées en station d'épuration avec décantation primaire (adapté de [90])

La production annuelle française de boues de station d'épuration s'élève à plus d'un million de tonnes de matières sèches (MS) [89]. En fonction du procédé de traitement utilisé, les quantités de MS dans les boues, peuvent varier de 5 à plus de 40 g/L [91,92], contenant environ 75% de matières organiques fermentescibles (MOF) [91]. Les principaux composants organiques des boues biologiques activées sont les protéines ($\approx 46\%$ des MOF), les glucides ($\approx 22\%$ MOF) et les lipides ($\approx 6\%$ MOF) [91,93]. La

I.B. Fermentation obscure

proportion importante de protéines dans les boues provient, en partie, de l'activité bactérienne et en particulier de la production de SPE. En général, les boues contiennent également des AGV ($\approx 5\%$ MOF) et d'autres composants organiques d'origine biologique comme les acides fulviques, humiques, nucléiques (ADN), et artificiels comme des détergents [94]. Globalement, une proportion de 11% d'azote et de 5% de phosphore est présente dans les MOF [92].

Comme toutes cultures mixtes, la composition microbiologique type des boues activées est complexe et variable [95]. Ces populations sont typiquement structurées en granules ou en floccs. Une partie importante des bactéries constitue les consommateurs primaires, contenant les bactéries hydrolytiques qui dégradent la matière organique complexe pour la rendre accessible aux bactéries acidogènes via la production d'énergie biochimique (processus potentiellement producteur d'hydrogène). L'étape d'hydrolyse des matières organiques complexes est l'étape cinétiquement limitante de ce processus. D'autres microorganismes sont classés parmi les prédateurs et consomment les consommateurs primaires, évitant ainsi la surproduction de biomasse due à la croissance bactérienne [96].

Les boues activées de station d'épuration constituent un consortium microbien particulièrement intéressant. En effet, celui-ci contient les microorganismes anaérobies compatibles avec la fermentation obscure. De plus, ces boues sont disponibles en quantités importantes ; les stations devant traiter quotidiennement des volumes de déchets importants, chargés à des teneurs variables en matières métabolisables, sources potentielles de substrat. On notera également que les boues de station d'épuration contiennent de nombreux minéraux et nutriments nécessaires au métabolisme microbien, qui ne seront donc pas à ajouter depuis une source extérieure au milieu réactionnel.

I.B.2.4. Les nutriments nécessaires aux bactéries

Les procédés microbiens, comme la fermentation obscure, nécessitent des nutriments pour le métabolisme et la croissance des microorganismes [73]. Les principaux nutriments nécessaires pour alimenter le *consortium* de fermentation obscure sont le carbone, l'azote et le phosphore [97]. La composition en nutriments optimale au fonctionnement du *consortium* bactérien est variable, dépendante des bactéries présentes dans le *consortium* actif. De plus, l'utilisation de cultures mixtes issues d'une biomasse réelle, présente des besoins différents de ceux d'une culture pure [98].

Le carbone est directement issu du substrat, dont la concentration en glucides peut être corrélée à la production d'hydrogène. En effet, une quantité de substrat trop élevée peut être à l'origine d'une inhibition de la production d'hydrogène par une augmentation de la pression osmotique, défavorable aux bactéries, tandis qu'une quantité trop limitée de glucides ne permettra que d'alimenter la croissance microbienne [97].

L'azote est le second nutriment le plus important, celui-ci peut être trouvé sous la forme de protéines, de nitrate, de nitrite ou d'ion ammonium dans les substrats réels [97]. Il a été avancé que l'azote introduit dans le milieu de fermentation n'est pas essentiel pour la production d'hydrogène, mais est nécessaire à la croissance bactérienne [97]. Dans la littérature, des études du rapport de mole d'atomes C/N optimal pour la production d'hydrogène rapportent des valeurs très variables, allant de 5 à 47 [73], voire 200 [99].

I.Revue bibliographique

Enfin, le phosphore sous la forme de phosphates est essentiel pour le métabolisme [100,101], en particulier pour l'activité de transfert énergétique des adénosines diphosphate (ADP) et triphosphate (ATP) [66]. Différentes études ont montré qu'un rapport de mole d'atomes C/P autour de 120 – 130 était optimal pour la production d'hydrogène [73].

D'autres nutriments, des métaux, sont également nécessaires dans le milieu fermentaire. Le fer et le nickel en particulier sont des cofacteurs pour les enzymes hydrogénases [Fe-Fe] ou [Ni-Fe] [102], essentielles à la production d'H₂. Des améliorations significatives de la production d'hydrogène ont été observées lors de l'ajout de Fe²⁺ à des concentrations entre 5 et 350 mg/L_{milieu}, en fonction des conditions de fermentation [73,97,102,103]. En ce qui concerne le nickel, la concentration optimale est plus basse, 0,1 mg/L de Ni²⁺, car la concentration de ce métal devient toxique à partir de 1 mg/L [104].

L'importance du magnésium, du sodium et du zinc, en tant que cofacteurs enzymatiques, pour la production d'hydrogène a également été montrée par Lin et Lay [98] avec des concentrations optimales de 4,8, 393 et 0,25 mg/L_{milieu}, respectivement. Le magnésium est, en effet, essentiel au maintien de l'activité enzymatique et présente un rôle important dans l'activité des ribosomes et la constitution des protéines membranaires [102]. L'ajout de zinc dans le milieu fermentaire est controversé, des études ayant montré un effet toxique de ce métal [73,102,105,106].

Le mélange de nutriments type n'existe pas et est dépendant des microorganismes présents dans le milieu réactionnel ; dans le cas de l'utilisation d'un substrat réel, des nutriments sont déjà présents dans le milieu. Pour des tests de fermentation semibatch court (< 24 h), à partir de boues de station d'épuration, la composition du milieu réactionnel initial devrait suffire au développement microbien. En revanche, en mode de fonctionnement continu, l'apport d'azote et de phosphore sous la forme d'ammonium et de phosphate permettrait de compléter un substrat modèle composé de glucides. L'ajout complémentaire de sels de fer, de magnésium et de nickel à des concentrations proches de celles de la littérature serait également à réaliser.

I.B.3. Prétraitement des cultures mixtes

Les cultures mixtes contiennent des microorganismes non producteurs d'hydrogène et, dans la plupart des cas, hydrogénotrophes (consommateurs d'hydrogène). Afin de limiter ces populations, défavorables à la production d'hydrogène, sans défavoriser les populations productrices d'hydrogène, différentes stratégies de prétraitement des *consortia* ont été mises en place.

I.B.3.1. Prétraitement acido-basique

Les conditions de pH du milieu réactionnel sont importantes pour la croissance et l'activité des microorganismes. D'une manière générale, les microorganismes peuvent être efficacement inhibés en se plaçant au-dessus ou en dessous de leur pH de fonctionnement optimal, globalement situé dans la gamme 6,3 - 7,8 ; le pH de fonctionnement des bactéries productrices d'hydrogène étant plus flexible [73]. Le contrôle du pH durant le fonctionnement de la fermentation obscure sera discuté au paragraphe I.B.4.2. Un choc de pH peut être utilisé comme prétraitement de l'*inoculum* microbien, par ajout d'acides ou de bases jusqu'à des valeurs de pH allant de 3 à 5 et de 10 à 12, pendant une durée relativement longue (24 h), ce qui inhibe durablement les microorganismes non producteurs

I.B. Fermentation obscure

d'hydrogène et hydrogénéotrophes, mais pas les bactéries sporulantes, comme celles des genres *Clostridium* et *Bacillus*, productrices d'H₂ [73,97].

On notera qu'en plus de bloquer l'activité des méthanogènes, des conditions très basiques (pH > 10) sont optimales pour l'hydrolyse des polysaccharides et protéines non solubles présentes dans le milieu fermentaire, ce qui permet de les rendre disponibles pour les bactéries acidogènes dès le début de la fermentation [107].

I.B.3.2. Prétraitement chimique

Différents composés organiques ont été utilisés pour inhiber les voies biologiques de consommation de H₂ : le 2-bromoethanesulphonate (BES), l'acide 2-bromoethanesulphonique (BESA), la lumazine, le chloroforme, l'iodopropane, etc. [88]. Le rôle de ces molécules est généralement d'inhiber le fonctionnement des enzymes de production de méthane (BES, BESA, lumazine et iodopropane) ou plus généralement des microorganismes consommateurs d'hydrogène (chloroforme) [88]. Dans la plupart des cas, l'inhibition est réversible et nécessite donc la présence en continu de l'inhibiteur dans le milieu [88]. Ces molécules peuvent également être létales pour les bactéries hydrogénéogènes et dangereuses pour l'environnement [97]. De plus, le prix de ces molécules est élevé [73] ce qui limite leur utilisation.

I.B.3.3. Prétraitement thermique

Les traitements thermiques sont basés sur la résistance des différents microorganismes aux chocs thermiques, à haute ou à basse température, et en particulier à la sélection des bactéries sporulantes et productrices d'H₂ [88]. Le traitement thermique à haute température est le prétraitement le plus utilisé dans la littérature. Il est réalisé entre 65°C et 121°C pour des durées de 15 à 120 min, les conditions les plus communes étant de 100°C pendant 15 min [73,97].

Ces procédés thermiques sont énergivores et nécessitent donc une optimisation pour limiter au maximum l'écart de température et la durée nécessaire à l'inhibition des microorganismes non producteurs d'hydrogène et hydrogénéotrophes, sans limiter l'activité des bactéries hydrogénéogènes ; ceci étant à optimiser en fonction des bactéries présentes dans le *consortium* initial [97].

Un second type de prétraitement thermique, à froid, peut également être cité, bien que celui-ci soit peu efficace. Il s'agit alors de congeler et décongeler rapidement l'*inoculum* ; cela pouvant être dommageable pour les cellules et ne favorisant pas pour autant les bactéries productrices d'hydrogène [97].

I.B.3.4. Autres prétraitements

D'autres types de prétraitements ont été utilisés dans la littérature, mais n'ont pas permis d'atteindre l'efficacité des procédés précédemment cités. Parmi eux, les traitements par ultrasons, UV et aération peuvent être évoqués [97]. Les ultrasons détruisent les cellules des microorganismes, sans distinction entre consommateurs et producteurs d'H₂. Une optimisation fine du temps de traitement peut cependant permettre de sélectionner certaines bactéries hydrogénéogènes, sans atteindre, cependant, les résultats d'un traitement thermique. On notera également que les ultrasons permettent de rendre accessible une quantité de matière organique plus importante, dans le cas de l'utilisation de substrats réels [97].

L'irradiation de l'*inoculum* par ultraviolet (15 min) a permis d'éliminer les microorganismes méthanogènes, enrichissant le milieu en bactéries hydrogénéogènes. Ce procédé n'est cependant pas

aussi efficace que les traitements précédemment cités et n'est pas applicable sur un milieu contenant des matières en suspension (MES) en quantités importantes comme des boues de station d'épuration [97].

Les microorganismes méthanogènes sont anaérobies, l'apport d'oxygène dans le milieu permet donc d'inhiber ceux-ci par un stress oxydant. Cependant, ce stress affecte également les bactéries productrices d'hydrogène, qui sont majoritairement anaérobies strictes [73,97]. Néanmoins, ce procédé est adaptable si l'utilisation de bactéries anaérobies facultatives ou aérobies, pour la production d'H₂, est possible, celles-ci n'étant pas, comme les bactéries sporulantes, résistantes aux conditions de températures élevées ou de pH extrêmes.

Les travaux de la littérature ont montré la supériorité du traitement thermique à haute température, permettant de sélectionner les microorganismes producteurs d'hydrogène sporulants, et inhibant les microorganismes non producteurs d'hydrogène et hydrogénotrophes. D'autres procédés sont cependant envisageables et peuvent s'avérer intéressants si l'inoculum microbien ne contient pas de bactéries sporulantes, comme les Enterobacter. Des procédés comme les ultrasons ou le traitement basique, bien que moins efficaces pour la sélection microbienne, permettent d'améliorer la disponibilité des matières organiques métabolisables.

I.B.4. Les paramètres clés de fonctionnement du bioréacteur

Différents paramètres influencent le fonctionnement des bactéries et leur métabolisme durant la fermentation obscure. Afin d'améliorer la productivité et le rendement en hydrogène, le choix de conditions favorables au développement de bactéries hydrogénogènes, tout en limitant les voies de consommation de H₂ est primordial. Quel que soit le substrat, l'*inoculum*, ou le mode de fonctionnement du bioréacteur, la température de fermentation, le pH du milieu et la pression partielle en hydrogène dans le milieu sont identifiés comme étant les trois paramètres clés « universels » du procédé de fermentation obscure [64,73,108].

I.B.4.1. La température de fermentation

La température de fermentation utilisée a un impact majeur sur les espèces bactériennes actives dans le milieu réactionnel. En culture pure, la performance du bioréacteur sera directement liée aux conditions optimales de l'espèce bactérienne utilisée pour la production d'hydrogène, mésophile ($\approx 40^{\circ}\text{C}$), thermophile ($\approx 55^{\circ}\text{C}$) ou hyperthermophile ($> 65^{\circ}\text{C}$). Dans le cas d'utilisation de cultures mixtes, ce sont les conditions opératoires qui permettent l'émergence d'espèces bactériennes adaptées, parmi les espèces présentes dans le *consortium* initial. L'utilisation d'un même *inoculum* permettra donc dans des conditions de températures différentes, le développement d'espèces différentes, celles-ci plus ou moins performantes pour produire de l'hydrogène. Ainsi, en fonction des bactéries potentiellement présentes dans les cultures mixtes utilisées, la température optimale de fermentation pourra être différente.

L'utilisation d'une culture mixte provenant d'un environnement thermique spécifique (mésophile ou thermophile) devrait conduire à une température optimale de fonctionnement similaire, les bactéries étant spécifiquement adaptées à ces conditions. Karadag et Puhakka [86] observent, en effet, avec l'utilisation d'un *inoculum* bactérien issu de sources chaudes, une température optimale de

I.B. Fermentation obscure

fermentation identique à celle sur le site de prélèvement du *consortium* bactérien (45°C). Cependant, plusieurs études ont montré que la température optimale de fonctionnement en fermentation obscure diffère de celle du milieu d'origine de l'*inoculum* utilisé [109,110]. Ceci est en particulier observé lorsque la culture mixte est utilisée sans prétraitement préalable afin de limiter le développement des microorganismes méthanogènes et/ou hydrogénotrophes, prédominants en conditions mésophiles au détriment de la production d'hydrogène [111,112]. L'utilisation de conditions thermophiles permet alors d'inhiber les archées méthanogènes, encore potentiellement actives, au profit de bactéries thermophiles productrices d'hydrogène.

Le second paramètre important à considérer pour la sélection de la température de fermentation est la nature du substrat qui sera utilisé pour alimenter le *consortium* bactérien en matières métabolisables. En effet, contrairement aux substrats simples directement métabolisables (oses, disaccharides, acides aminés, etc.), l'utilisation de substrats complexes comme des déchets alimentaires ou de la cellulose va nécessiter une étape d'hydrolyse, préalablement à la production d'hydrogène. L'utilisation d'une température de fermentation élevée peut alors permettre une accélération et une amélioration du rendement d'hydrolyse, directement liée à la production d'hydrogène, qui apparaît ainsi plus efficace à haute température [109,110,113]. A partir d'un même *inoculum*, l'utilisation d'un substrat complexe nécessiterait donc une température de fermentation plus élevée que celle nécessaire pour la production d'hydrogène avec un substrat simple, comme le glucose. Ce constat n'empêche pas l'utilisation de déchets organiques réels riches en molécules organiques, directement métabolisables, comme la vinasse de canne à sucre [114], les fruits [115], ou les déchets vitivinicoles [116], en conditions mésophiles. L'hydrolyse enzymatique préalable des déchets contenant une part importante de molécules complexes est une alternative possible pour conduire la fermentation obscure en condition mésophile, tout en permettant une conversion énergétique efficace [117].

Avec la modification de la température de fermentation, des modifications dans les bactéries actives sont observées, à partir d'un même *inoculum*. Les bactéries du genre *Clostridium* sont généralement observées dans la gamme de température mésophile, avec une certaine variabilité de température d'activité en fonction des espèces présentes [118], certaines espèces thermophiles pouvant rester actives jusqu'à 60°C comme *C. thermopalmarium* [119]. Les espèces du genre *Bacillus* peuvent être présentes en condition mésophile, mais sont généralement plus actives aux alentours de 50°C - 55°C [86,114], lorsque d'autres bactéries plus efficaces pour la production d'hydrogène semblent moins bien adaptées.

A plus haute température, le genre bactérien *Thermoanaerobacterium*, phylogénétiquement proche des *Clostridium* est fréquemment identifié [86,118,119,114]. La température optimale de production d'hydrogène de ce genre se situant autour de 60°C [86], celui-ci n'est jamais identifié dans les *consortia* de production d'hydrogène en dessous de 55°C. Un autre genre de bactéries, *Caloramator*, également proche de celui des *Clostridium*, est reconnu pour son potentiel de production d'hydrogène en conditions thermophiles [120,121].

Afin d'améliorer les performances de production d'hydrogène, il semble évident qu'une optimisation de la température de fermentation doit être envisagée pour permettre d'adapter les conditions de fermentation au consortium et au substrat utilisés pour la fermentation.

I.B.4.2. Le pH du milieu réactionnel

Le pH du milieu réactionnel durant la fermentation est un paramètre clé du procédé de fermentation obscure. Celui-ci impacte directement la croissance et le métabolisme des microorganismes, ainsi que l'activité enzymatique des hydrogénases [122]. Différentes études ont mis en évidence une valeur optimale de pH pour la production d'hydrogène, avec un consensus assez large sur la gamme 5,0 – 6,5 [108,122–124], la valeur la plus observée étant 5,5 [70,109,125–128].

Van Ginkel et Logan [125] ont mis en relation l'évolution de la proportion de métabolites sous forme d'acides dissociés (acides acétique et butyrique) dans le milieu réactionnel par rapport à la production en hydrogène. Dans la gamme de pH autour des pKa des acides acétique (4,76) et butyrique (4,81) une variation importante de la proportion d'acides non dissociés est observée, de moins de 10% (pH = 6,0) à plus de 60% (pH = 4,5), ce qui s'accompagne d'une baisse du rendement en hydrogène, confirmant la valeur optimale au pH de 5,5.

Il a également été avancé qu'une valeur de pH inférieure à 6 permettait d'inhiber significativement les microorganismes sulfato-réducteurs et méthanogènes, avec en revanche la possibilité de production d'acide lactique [88]. On notera que la production de propionate, voie consommatrice d'H₂ (20), devient importante à partir d'un pH supérieur à 7,0 [73], ce qui est supérieur à la gamme de pH optimal déterminée.



La production d'H₂ est coproductrice d'acides organiques qui conduisent inévitablement à une baisse du pH. Le contrôle du pH durant la fermentation est alors indispensable, pour de longues durées de fermentation, afin de limiter l'acidification du milieu réactionnel, avant que le métabolisme ne change au profit de la production d'alcool (pH < 4,5) [64]. Dans le cas de tests de fermentation batch, avec un seul apport initial de substrat, la nécessité d'un contrôle du pH dépendra de la quantité de substrat et donc de la quantité d'acides pouvant être produite. Lorsqu'un contrôle du pH est nécessaire, une solution de base forte (NaOH, KOH) est régulièrement utilisée dans la littérature, l'ajout d'une solution tampon (de type carbonate ou phosphate) pouvant être également envisagé [108]. On notera que certains substrats, présentant une forte alcalinité, comme les boues de station d'épuration, peuvent limiter les quantités de solution (basique ou tampon) à ajouter au milieu [108].

Il a été montré que, dans la majorité des cas, un pH proche de la valeur de 5,5 était un bon compromis pour favoriser la production d'hydrogène en limitant les voies concurrentes ou hydrogénéotrophes. Une régulation du pH est généralement nécessaire, mais non indispensable en cas de fonctionnement batch avec une production d'acides modérée, si le pH ne descend pas en dessous de 4,5.

I.B.4.3. La pression partielle des gaz produits

D'un point de vue strictement thermodynamique, la présence de H₂ ou CO₂ dans le milieu réactionnel, inhibe voire inverse le sens des réactions de production de ces gaz. Cet effet mène ainsi à l'utilisation du substrat pour d'autres voies métaboliques comme l'éthanol (18) ou le lactate (19) [50]. Lors du fonctionnement normal de la digestion anaérobie, les microorganismes hydrogénéotrophes consomment l'hydrogène produit au fur et à mesure de la fermentation, la pression partielle de H₂ reste

I.B. Fermentation obscure

donc très basse [64]. L'extraction de ces gaz est donc un paramètre clé de la production d'hydrogène par fermentation obscure.

Pour extraire ces gaz, différentes stratégies ont été utilisées dans la littérature. L'agitation du milieu réactionnel, l'utilisation d'un gaz de balayage, l'extraction par dépression ou l'extraction transmembranaire sont autant de méthodes permettant de réduire la pression partielle du gaz dans le milieu fermentaire. Lamed *et al.* [129] ont montré que l'agitation permet d'améliorer considérablement l'extraction des gaz du milieu réactionnel, avec un gain significatif sur la production d'hydrogène (entre + 55% et + 179%). Cet effet a été confirmé par Clark *et al.* [65] avec des gains plus modérés (+ 39% en moyenne).

L'utilisation d'une extraction des gaz produits par pompage, instaurant une dépression dans l'enceinte du réacteur a été étudiée avec des résultats variables. En effet, Kataoka *et al.* [130] n'observent aucune amélioration significative à 284 mbar, de même que Lee *et al.* [131] qui n'observent qu'une amélioration limitée (+ 8%) de la production et de la productivité en H₂ à une pression absolue de 507 mbar. En revanche, Mandal *et al.* [132], également à 507 mbar, ont obtenu une forte amélioration de la production (+ 95%) et de la productivité (+ 180%). Rajhi *et al.* [133] ont étudié l'impact de la dépression pour différents substrats, avec un même *inoculum* (boues de station d'épuration) et observent une amélioration significative de la production d'H₂ pour la majorité des substrats ; la coproduction de méthane (*inoculum* non prétraité) étant globalement réduite. Plusieurs de ces études ont testé différentes valeurs de dépression [131,132,134], deux d'entre elles ayant observé une valeur optimale de 507 mbar. Kisieleska *et al.* [135], en réacteur continu, montrent cependant qu'une faible dépression de 25 - 35 mbar est suffisante pour observer un impact positif sur la productivité en H₂, compris entre + 18% et + 108%, l'utilisation d'une dépression plus modérée permettant de limiter l'apport énergétique nécessaire au procédé.

Le bullage d'un gaz neutre azote ou argon dans le milieu réactionnel (gas sparging) permet également d'extraire efficacement les gaz produits. En effet, l'utilisation d'un gaz inerte à des débits allant de 5 à 150 mL/L_{milieu}/min, a permis d'améliorer systématiquement le rendement et la productivité en hydrogène (jusqu'à + 150%), en mode de fonctionnement semibatch, comme en mode de fonctionnement continu [136–142]. La valeur optimale étant cependant variable en fonction de la configuration du bioréacteur [137,139]. Cette méthode de réduction de la pression partielle en hydrogène est la plus étudiée actuellement, celle-ci permettant une amélioration incontestable de la production d'hydrogène, avec cependant l'inconvénient de diluer les gaz produits.

L'utilisation de membranes pour extraire les gaz du bioréacteur a également fait l'objet de quelques études [21,22] avec des résultats prometteurs qui nécessiteraient plus de recherche. Ce mode d'extraction des gaz sera présenté plus en détails dans le paragraphe I.D.2.4.

A partir des potentiels électrochimiques des couples d'oxydoréduction impliqués dans les réactions de production d'hydrogène, Clark *et al.* [65] ont calculé les pressions partielles minimales pour les différentes voies de production de H₂. Une pression limite très basse de 0,85 mbar est obtenue pour la voie [NADH : ferrédoxine oxydoréductase : hydrogénase], qui est donc peu favorisée. En revanche, pour la voie [ferrédoxine : hydrogénase], des valeurs limites allant de 0,024 à 4,56 bar sont calculées, dépendant fortement de l'espèce bactérienne envisagée, ici pour deux espèces de *Clostridium*, respectivement *C. thermoaceticum* et *C. acidi-urici*. Ceci peut expliquer les différences de

performances observées en fonction de l'*inoculum* utilisé dans différentes études, pour des pressions partielles en hydrogène pourtant équivalentes.

On notera qu'il existe un point de vue discordant sur l'impact de la pression partielle en hydrogène. En effet, Logan *et al.* [143] ont étudié thermodynamiquement l'impact de H₂ sur la fermentation et ont conclu que celui-ci n'était pas inhibiteur dans leurs conditions de fermentation (classiques). Une pression partielle maximale extrêmement élevée (10⁸ atm) a été calculée concluant à la non inhibition de la conversion du glucose en H₂. Ils n'expliquent cependant pas les résultats obtenus dans leur propre étude, une amélioration de la production d'H₂ étant obtenue lors de l'extraction par dépression des gaz produits. Park *et al.* [144] et Alshiyab *et al.* [145] montrent que l'extraction sélective du CO₂, par un piège alcalin dans le ciel gazeux du réacteur batch, a un impact positif important pour la production d'H₂, ce qui pourrait expliquer l'amélioration de la production dans l'étude de Logan *et al.* [143]. Cependant, ce mode avec capture du CO₂ est difficile à mettre en œuvre en mode de fonctionnement continu, nécessitant des quantités importantes de solution basique et leur retraitement. En utilisant de l'hydrogène comme gaz de balayage, les tests de Tanisho *et al.* [136] démontrent un gain de productivité de H₂, ce qui va également dans le sens de l'inhibition liée uniquement à la pression partielle de CO₂.

Un troisième point de vue discordant existe cependant, celui-ci présentant le CO₂ comme favorisant la production d'H₂. En effet, Kim *et al.* [139] ont montré que l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage avait un effet bénéfique sur la production de H₂, supérieur à l'utilisation d'un gaz neutre (N₂), avec respectivement + 60% et + 24% en rendement par rapport au test réalisé sans gaz de balayage, effet positif confirmé à plusieurs reprises [139,146,147]. Ce mode de fonctionnement est attractif puisqu'il permettrait de réutiliser le CO₂ produit par la fermentation après extraction de l'H₂ du flux de gaz et limiterait la complexité du mélange à séparer sortant du bioréacteur.

L'impact de la pression partielle des gaz produits sur la production d'hydrogène est important et dépend fortement des conditions de fermentation, en particulier des microorganismes présents et de la nature du substrat. L'extraction non sélective des gaz produits par gaz de balayage permet une amélioration de la production d'hydrogène. Ce mode d'extraction sera donc utilisé dans notre étude. L'extraction par dépression sera également testée et comparée au mode d'extraction sans dépression. Afin de nous prononcer sur l'impact éventuellement positif ou négatif du dioxyde de carbone pour la fermentation, l'utilisation de ce gaz comme gaz de balayage sera également testé.

I.B.5. La fermentation obscure – notre stratégie d'optimisation

Dans la première partie de notre étude, l'objectif sera de mettre en œuvre un bioréacteur efficace pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. Des boues de station d'épuration seront sélectionnées comme *inoculum* microbien, celles-ci contenant les microorganismes anaérobies nécessaires à la fermentation obscure. Un substrat modèle sera apporté pour réaliser de courts tests de fermentation en mode de fonctionnement semibatch (durée < 24 h). Cette configuration permettra d'optimiser les paramètres clés de fermentation par rapport à l'*inoculum* sélectionné : la température de fermentation sera testée sur les gammes mésophile et thermophile, tandis que différents modes d'extraction des gaz seront testés pour diminuer la pression partielle des gaz produits dans le milieu

I.C. Le procédé de fermentation obscure

fermentaire. L'optimisation de ces paramètres permettra ensuite de mettre en place le bioréacteur de production d'hydrogène en mode de fonctionnement continu et la séparation membranaire des gaz produits.

La partie suivante s'intéresse donc plus particulièrement aux procédés de fermentation obscure développés dans la littérature.

I.C. Le procédé de fermentation obscure

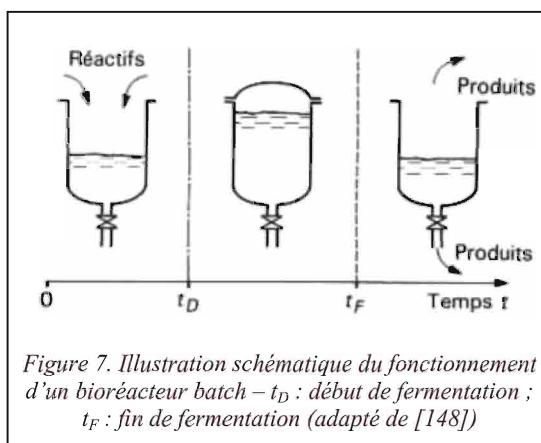
Différents modes de fonctionnement et types de réacteurs existent et sont adaptables à la production d'hydrogène par fermentation obscure. Ces configurations sont généralement issues de celles développées pour la digestion anaérobie, ces procédés étant proches [70].

I.C.1. Les modes de fonctionnement

Les procédés de production peuvent être divisés en trois modes de fonctionnement : batch, semibatch et continu [148]. Les procédés batch et semibatch sont généralement plus adaptés aux unités de production de petite taille, tandis que les procédés continus permettent d'atteindre des productivités importantes à plus grande échelle [64].

I.C.1.1. Opération discontinue ou batch

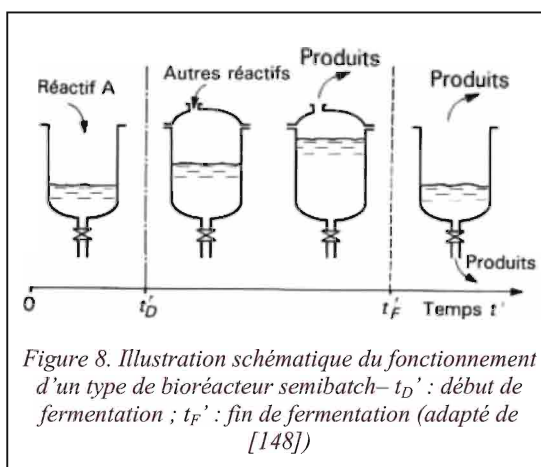
Le mode de fonctionnement batch, ou discontinu, correspond à une production par lot dans une enceinte close, le bioréacteur. L'ensemble des réactifs, ici l'*inoculum*, le milieu réactionnel et le substrat, sont ajoutés initialement, aucun réactif n'est ajouté et aucun produit n'est évacué pendant la phase de fermentation (Figure 7). Dans le cas d'une production de gaz, en travaillant à volume constant, une augmentation de la pression dans le réacteur a lieu. Avec ce type de dispositif, le contrôle du pH par ajout d'une base n'est pas possible, ni la diminution de la pression partielle en gaz produit. Ce mode de fonctionnement, le plus simple à mettre en œuvre, s'avère également le moins polyvalent.



I.C.1.2. Opération semi-continue ou semibatch

Le mode de fonctionnement semibatch, ou semi-continu, est identique au mode de fonctionnement batch, avec cependant la possibilité d'ajouter et/ou d'extraire des réactifs/produits au bioréacteur durant la fermentation (Figure 8). Différentes configurations sont possibles. La configuration la plus utilisée étant celle d'un réacteur batch avec extraction des gaz au fur et à mesure de leur production, cette extraction étant libre ou favorisée par l'ajout d'un système d'extraction par dépression ou par gaz de balayage [148].

Un autre mode de fonctionnement semibatch, appelé *fed-batch*, utilisé dans la littérature [70], correspond à la configuration précédente, avec un



renouvellement ponctuel du substrat à plusieurs reprises (ou en continu sur la période du test) au cours de la fermentation, afin d'entretenir la production sur une plus longue durée. Cette configuration permettant d'augmenter la quantité totale de substrat et de produits par quantité d'*inoculum* et de réduire la part relative de croissance bactérienne par rapport au temps total de production. En revanche, une quantité importante de métabolites s'accumule dans le milieu réactionnel, avec le risque d'une dérive de la production d'hydrogène vers la solvantogénèse si le pH n'est pas régulé.

Le mode de fonctionnement semibatch étant très polyvalent, de nombreuses autres configurations sont envisageables.

I.C.1.3. Opération continue

Le mode de fonctionnement continu correspond à un bioréacteur avec alimentation en substrat et évacuation des produits via le ciel gazeux pour les gaz et une évacuation pour les effluents liquides, à volume de milieu réactionnel constant (Figure 9). L'*inoculum* bactérien initial est conservé et renouvelé par la croissance bactérienne durant le fonctionnement du système. A l'instar du mode de fonctionnement *fed-batch*, une amélioration des performances peut être observée avec ce mode de fonctionnement par rapport au mode de fonctionnement batch, la durée totale de production étant très longue et théoriquement infinie. Le renouvellement perpétuel du milieu réactionnel permet, en outre, d'éliminer en continu les produits de la fermentation, dont l'accumulation est inhibitrice en fonctionnement semi-continu.

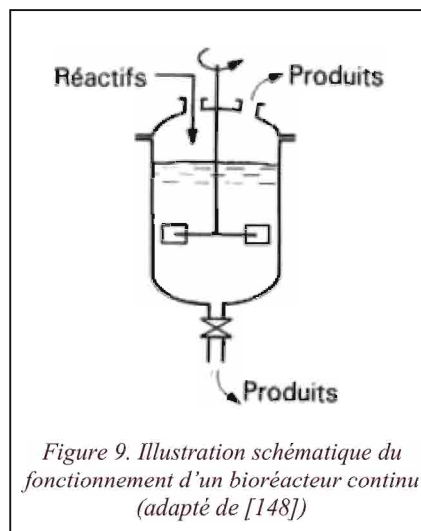


Figure 9. Illustration schématique du fonctionnement d'un bioréacteur continu (adapté de [148])

Dans la perspective d'une production efficace d'hydrogène à l'échelle industrielle, la mise en continu du procédé de production est nécessaire, car ce mode de fonctionnement est plus efficace énergétiquement et automatisable plus facilement.

I.C.1.3.1. Mode d'alimentation

Plusieurs modes d'alimentation existent pour le fonctionnement du bioréacteur continu.

Le mode d'alimentation le plus classiquement utilisé est le mode à flux continu, la solution d'alimentation contenant l'ensemble des éléments nutritifs, substrat et nutriments, étant alimenté à un débit fixe lors du fonctionnement du bioréacteur [88]. Un cas particulier de ce mode d'alimentation est le chemostat, pour lequel le bioréacteur est alimenté en continu avec un mélange nutritif contenant tous les composants en excès sauf un, appelé facteur limitant. Les microorganismes vont alors se développer en fonction de ce que la quantité de facteur limitant leur permet. Ce mode d'alimentation est utile pour étudier l'impact de différents facteurs sur un système donné [149].

Le mode d'alimentation séquentiel est typiquement divisé en quatre étapes successives adaptées au métabolisme bactérien : une première étape d'alimentation généralement courte par rapport au cycle global, une étape de production, une étape de sédimentation permettant la séparation de la phase liquide et des matières en suspension, contenant la majorité des microorganismes, suivi de l'étape finale de vidange d'une partie de la phase liquide. Ce cycle peut ainsi être répété avec conservation et accumulation du *consortium* bactérien [70,150].

I.C.1.3.2. Le temps de séjour hydraulique - TSH

En fonctionnement continu, le temps de séjour hydraulique, TSH, est un paramètre important de la fermentation obscure. Il s'agit de la durée théorique nécessaire au renouvellement complet du milieu réactionnel ; cette valeur dépend donc directement du débit d'alimentation et du volume de milieu. Des valeurs optimales de TSH allant de 38 h [151] à 1 h, voire 0,5 h [152] ont été déterminées dans la littérature, en fonction du paramètre de performance considéré. Un TSH optimal de l'ordre de 8 – 12 h étant généralement le plus observé en réacteur agité, avec alimentation d'un substrat simple directement métabolisable [11,18,20,153–158].

Avec un TSH élevé, le vieillissement des biomasses résulte en une baisse de rendement en H₂ quelque soit la configuration du bioréacteur [108]. Cette baisse de rendement est liée à l'activité des bactéries hydrogénotrophes, en particulier des homoacétogènes, dont le temps de développement est plus long que celui des bactéries hydrogénogènes [70]. L'utilisation d'un TSH court, inférieur à 48 h est recommandée pour limiter cet effet [159]. Cependant, un TSH de plusieurs jours peut être nécessaire pour pouvoir métaboliser un substrat plus complexe [150], ce qui rend indispensable l'utilisation d'un prétraitement pour l'inhibition des bactéries hydrogénotrophes.

La réduction du TSH permet d'augmenter le débit d'alimentation en substrat sans nécessiter de concentrer les matières métabolisables [108]. De plus, le milieu réactionnel est ainsi rapidement renouvelé, ce qui évite l'accumulation des métabolites produits, potentiellement inhibiteurs, et l'acidification du milieu. Cependant, la réduction du TSH va de paire avec le lessivage des bactéries présentes dans le milieu réactionnel [155]. Un découplage du TSH et du temps de séjour des solides (TSS) est donc nécessaire et est permis par l'utilisation de bioréacteurs spécifiques.

I.C.1.3.3. Le débit d'alimentation en substrat - DAS

Le débit d'alimentation en substrat ou DAS est le second paramètre clé du fonctionnement de la fermentation obscure en opération continue. Ce paramètre correspond à la quantité de matières fermentescibles apportées au bioréacteur par unité de temps et de volume de milieu, typiquement exprimé en $g_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$. Ce paramètre est donc dépendant du volume de milieu, du TSH et de la concentration en substrat de la solution d'alimentation. Dans la plupart des études d'impact du TSH, la valeur du DAS augmente linéairement avec la réduction du TSH, la concentration de la solution d'alimentation restant fixe. Ceci ne permet pas d'étudier objectivement ces deux paramètres puisqu'une réduction du TSH de moitié (multiplication de la valeur du DAS par deux) a un impact important sur le métabolisme. Le métabolisme peut, en effet, être inhibé par un surplus de substrat [154], ou au contraire, l'apport de substrat supplémentaire peut permettre une amélioration importante de la productivité, mais avec une réduction du rendement en hydrogène [11].

L'impact de ce paramètre est cependant variable car il dépend fortement de la nature et de la quantité de bactéries en présence et du type de substrat utilisé. Parmi différentes études ayant testé ce paramètre à TSH fixe (10 ou 12 h), les DAS optimaux ont été observés par rapport à la productivité en H₂ entre 0,9 à 3,7 $g_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$ et par rapport au rendement en H₂ entre 0,2 à 2,3 $g_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$ [125,138,157,160]. On remarque que l'optimisation du rendement conduit toujours à un DAS plus faible que pour l'optimisation de la productivité en H₂, ce qui pourrait s'expliquer par une population microbienne limitée en quantité, ne pouvant assimiler la totalité du substrat [88]. Certains types de bioréacteurs, permettant d'accumuler les microorganismes, fonctionnent à des DAS beaucoup plus importants, par exemple 40 $g_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$, avec une productivité de 760 $mL_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$ [124,161].

Le paragraphe suivant porte sur les différents types de bioréacteurs utilisés dans la littérature pour la production d'H₂ par fermentation obscure.

I.C.2. Les différents types de réacteurs

Beaucoup d'études paramétriques ont été réalisées en mode de fonctionnement batch dans de simples flacons de verre de faibles volumes (typiquement 125 - 300 mL), permettant un fonctionnement simple et reproductible en quantité importante [73]. Ce conditionnement est adapté aux études paramétriques nécessitant de nombreux réplicats avec différents paramètres, mais les résultats obtenus sont difficilement transposables à plus grande échelle ; c'est pourquoi, il est important d'utiliser des configurations plus avancées comme des réacteurs agités, à lits fixes ou membranaires.

I.C.2.1. Le réacteur agité, RA

Le réacteur agité, RA, est la configuration la plus commune, l'homogénéité du milieu permettant une mesure et un contrôle facilité des différents paramètres, par exemple la température ou le pH [73]. De plus, il a été montré que l'agitation permettait de réduire la pression partielle des gaz produits, en améliorant leur extraction [65,129].

Ce réacteur est parfaitement adapté en mode batch ou semibatch où le milieu réactionnel n'est pas évacué. En mode de fonctionnement continu, un temps de séjour trop court peut conduire à un lessivage des microorganismes, évacués du système avant que la population ne puisse croître. L'utilisation de cultures immobilisées permet d'éviter ce problème [73]. Un autre inconvénient du RA en fonctionnement continu est l'homogénéisation du milieu réactionnel, qui induit une concentration relativement élevée de substrat dans l'effluent du bioréacteur, la composition de l'effluent étant identique à celle du milieu réactionnel [73,162]. Les alternatives au bioréacteur agité impliquent généralement une immobilisation des cultures sur un support.

I.C.2.2. Fonctionnement avec des cultures immobilisées.

L'immobilisation des microorganismes permet de réduire fortement le TSH sans risque de lessivage et l'utilisation d'une solution d'alimentation très chargée en substrat. L'agrégation de ces microorganismes dans une matrice, sur une surface biologique ou non biologique est appelée biofilm [163]. Les biofilms sont composés d'une structure de substances polymériques extracellulaires (SPE) dans laquelle les microorganismes sont agglomérés. Différentes méthodes d'immobilisation existent : les supports mécaniques sur lesquels un biofilm va se fixer et les supports biologiques dont la structure est créé par les microorganismes :

- Supports mécaniques : billes d'argile, terre de diatomées, charbon actif, membranes, etc.
- Supports biologiques : granules ou floccs en suspension dans le milieu, générés par certains microorganismes.

Ainsi, avec l'utilisation de granules générées par des boues de station d'épuration, Lee *et al.* [152] ont pu maintenir une production d'hydrogène efficace jusqu'à un TSH de 0,5 h. Il est également possible de capturer les microorganismes dans des supports solides, type « sol gel », par gélification de microorganismes avec par exemple de l'alginate, mais la conservation à long terme de ce type de cultures immobilisées est plus difficile [164].

Les supports solides peuvent être mis en œuvre en lit fixe (*packed bed*), où le support est immobile dans le bioréacteur et placé dans le flux du liquide (Figure 10 a) ou en lit fluidisé (*fluidized*

I.C. Le procédé de fermentation obscure

bed), où le flux de liquide met les différentes structures en suspension dans le milieu (Figure 10 b). Le réacteur à boues granuleuses ou « UASB » (*up-flow anaerobic sludge blanket reactor*) est un procédé issu du traitement biologique des effluents industriels et de la production de biométhane [70,165]. Il s'agit d'un réacteur à lit fluidisé où des granules biologiques correspondent au support microbien (Figure 10 c). En fermentation obscure, Gavala *et al.* [166] ont observé que le réacteur agité continu classique permet d'atteindre des rendements plus élevés (+ 143%), alors que le réacteur à boues granuleuses permet de stabiliser plus efficacement la production d'hydrogène, avec en particulier des productivités plus importantes (+ 126%) à un TSH court de 2 h, ceci étant dû à la concentration plus élevée de la biomasse dans le milieu fermentaire.

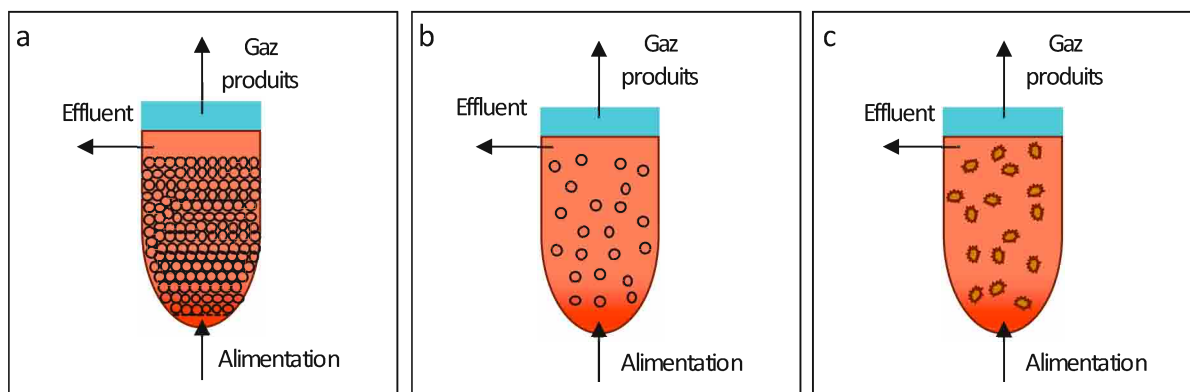


Figure 10. Illustration schématique du fonctionnement de bioréacteurs continus avec cultures immobilisées. Réacteur à lit fixe (a) ; Réacteur à lit fluidisé (b) ; Réacteur à boues granuleuses (c)

On notera que la fluidisation du lit est généralement réalisée par le flux de liquide effluent recyclé et/ou d'alimentation, mais peut également se faire par l'utilisation d'un flux de gaz inerte, d'une recirculation du gaz produit ou d'une agitation mécanique [162]. Un autre type de bioréacteur permettant le maintien des solides dans le milieu fermentaire à des TSH courts, est le bioréacteur membranaire, qui peut être utilisé pour différents objectifs.

I.C.2.3. Le bioréacteur membranaire BRM

Les bioréacteurs membranaires ont été développés initialement pour le traitement biologique des eaux usées et peuvent, aujourd'hui, être mis en œuvre avec différentes configurations pour améliorer les performances de production d'hydrogène en fermentation obscure. En particulier, la membrane peut être utilisée pour l'ultrafiltration de la phase liquide effluente du bioréacteur, permettant de concentrer et de conserver les microorganismes dans celui-ci. Dans d'autres systèmes, la membrane du BRM peut également être utilisée pour favoriser le développement d'un biofilm sur sa surface. Les BRM et leurs applications en fermentation obscure seront décrits plus en détails dans le paragraphe I.D.

I.C.3. Sélection du procédé pour notre étude

Dans cette étude, différents modes de fonctionnement vont être utilisés pour mettre en œuvre le procédé de fermentation obscure. Dans un premier temps, l'optimisation des paramètres clés sera réalisée en réacteur agité en fonctionnement semibatch (RASB), avec alimentation initiale en *inoculum* et substrat et une évacuation continue des gaz produits. L'utilisation d'un procédé semibatch permettra de réaliser des tests courts (< 24 h) pouvant être répétés facilement. La seconde partie de l'étude portera sur la mise en œuvre du réacteur agité en fonctionnement continu (RAC), en utilisant les paramètres optimisés en RASB. Afin de s'affranchir des problèmes d'interprétations, il a été décidé

de faire varier indépendamment DAS et TSH, en modifiant la concentration de la solution d'alimentation utilisée, dans cette étude. Enfin l'utilisation d'un bioréacteur membranaire sera évaluée, testée et optimisée pour la production d'hydrogène par fermentation obscure.

I.D. L'utilisation de la séparation membranaire en fermentation obscure

D'une façon générale, les technologies de séparation membranaires présentent des avantages majeurs par rapport aux techniques conventionnelles de séparation car elles sont généralement peu énergivores par leur fonctionnement et non consommatrices de produits chimiques [167]. Ces technologies ne présentent pas de contraintes de volume de traitement minimal nécessaire pour leur mise en place, l'utilisation de petits modules comme de plusieurs grands modules est possible et permet l'adaptation du système au flux à traiter. Ces dispositifs sont donc de plus en plus utilisés par l'industrie pour des applications en couplage avec des procédés biologiques avec lesquels les membranes sont particulièrement compatibles.

Le couplage de la séparation membranaire avec la fermentation obscure permettrait donc d'améliorer les performances de production d'hydrogène grâce à l'extraction spécifique de produits de fermentation avant leur consommation, améliorant le rendement, ou la concentration des microorganismes ce qui permettrait d'améliorer la productivité en hydrogène.

I.D.1. Généralités sur les bioréacteurs membranaires, BRM

Un bioréacteur membranaire, BRM, est le couplage d'un procédé biologique avec un procédé de séparation membranaire. Le secteur industriel utilisant typiquement des BRM est le secteur du traitement des eaux usées pour traiter l'eau des bassins de traitement biologique des boues activées, celles-ci étant plus concentrées, donc plus actives. Dans ce contexte, les BRM permettent de réduire considérablement la dimension nécessaire des stations d'épuration, ne nécessitant plus de bassins de décantation pour la biomasse. De plus, les membranes produisent une eau de meilleure qualité, directement réutilisable en aval du traitement pour l'industrie, l'agriculture, etc. [168]

Les bioréacteurs peuvent cependant être utilisés pour d'autres procédés biologiques. Par l'extraction d'un produit de fermentation ou de réaction enzymatique, un contacteur membranaire peut être utilisé pour déplacer l'équilibre thermodynamique vers la production des produits de réaction, augmentant le taux de conversion. Les BRM peuvent donc s'appliquer à de nombreux procédés biologiques [169].

Trois types de configurations de bioréacteur membranaire sont utilisés (Figure 11). Dans la configuration *ex situ* le module est placé en série avec le réacteur sur une boucle de recirculation, tandis qu'en configuration *in situ*, la membrane est directement immergée au sein du bioréacteur, en contact direct avec le milieu. La troisième configuration est intermédiaire, *ex situ* avec une membrane immergée dans un réservoir placé sur une boucle de recirculation. Dans toutes les configurations, le rétentat retourne dans le bioréacteur, tandis que le perméat est extrait, une extraction secondaire étant réalisée pour éliminer l'effluent.

I.D. L'utilisation de la séparation membranaire en fermentation obscure

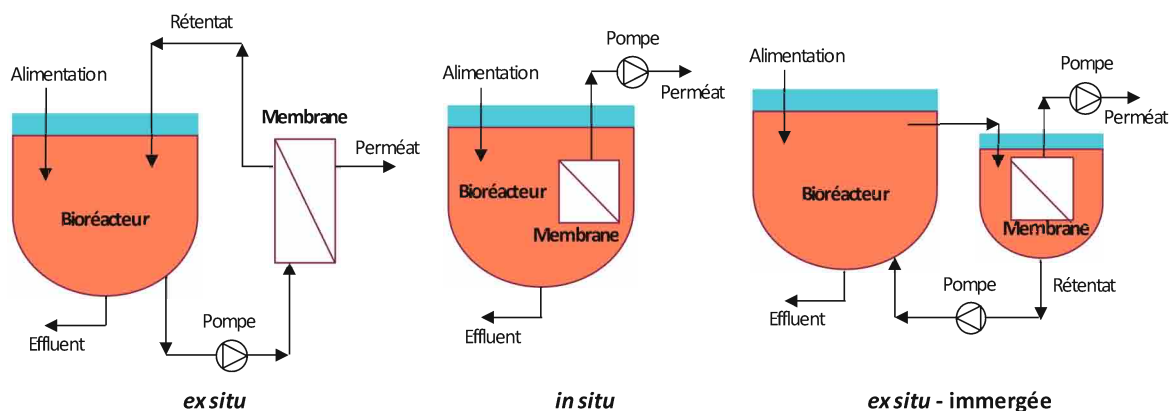


Figure 11. Illustration schématique des différentes configurations de bioréacteurs membranaires généralement utilisés (adapté de [170])

Dans la configuration *ex situ*, non immergée, l'extraction du perméat est permise par la surpression générée dans le module membranaire. En revanche, dans le cas des configurations immergées, une dépression transmembranaire est réalisée par pompage du perméat. L'intérêt principal des configurations *ex situ* est de permettre un remplacement et un entretien plus facile des membranes, tandis que la configuration *in situ* permet de réaliser une économie d'énergie de pompage de recirculation [170]. Des modules membranaires tubulaires en céramique sont généralement employés en configuration *ex situ*, tandis que des fibres creuses ou des membranes planes polymériques sont immergées dans le milieu [169].

I.D.2. Le couplage du module membranaire avec la fermentation obscure

L'utilisation de bioréacteurs membranaires pour la fermentation obscure s'est développée, depuis le début des années 2000 [150], dans l'objectif d'améliorer la production d'hydrogène. Différentes stratégies de mise en œuvre ont été testées pour atteindre cet objectif. En configuration *ex situ*, le contacteur membranaire permet l'extraction sélective de l' H_2 dans le flux de gaz en sortie du réacteur (extraction gaz/gaz). Le module membranaire peut être utilisé pour augmenter la concentration de matières en suspension (MES) en éliminant la phase liquide (extraction liquide/solide). L'extraction sélective d'une partie des composants liquides du milieu peut être réalisée pour limiter leurs impacts négatifs sur la fermentation (extraction liquide/liquide). Enfin, le module membranaire peut être directement placé au contact du milieu réactionnel pour en extraire les gaz produits, de manière sélective ou non.

On notera que les deux types de configuration *in situ* et *ex situ* peuvent être utilisés pour le fonctionnement du module membranaire avec la fermentation obscure, bien que la configuration *in situ* soit de plus en plus préférée, son avantage principal étant de ne pas nécessiter de recirculation entre le bioréacteur et le module membranaire [150].

I.D.2.1. Extraction gaz/gaz

L'utilisation de technologies membranaires pour la purification du gaz produit est un avantage pour la production d'hydrogène à petite échelle. En effet, les technologies classiques de séparation gaz/gaz adaptées à l'hydrogène nécessitent des volumes importants de gaz pour fonctionner efficacement. Les différents types de membranes adaptées à cette séparation gaz/gaz ont été évoqués au paragraphe I.A.1.5.

I.Revue bibliographique

Il s'agit d'une configuration exclusivement *ex situ*, pour laquelle le module membranaire ne fait pas partie du bioréacteur, mais constitue une étape en série sur le procédé de production d'hydrogène ; celui-ci n'aura donc aucun impact sur le rendement ou la productivité en hydrogène. Dans cette configuration, le gaz en sortie du réacteur est séparé afin de concentrer l'hydrogène. Lors du contact entre le flux de gaz et la membrane et selon sa sélectivité, un des constituants du gaz (H_2 ou CO_2) va traverser préférentiellement la membrane, ce qui va permettre de raffiner les gaz de part et d'autre du système. L'objectif premier du module membranaire est donc de purifier l' H_2 produit. Une des difficultés majeures est la composition du gaz à purifier, contenant majoritairement de l'hydrogène, du dioxyde de carbone, avec potentiellement de l'azote en quantité importante et d'autres gaz comme le sulfure d'hydrogène (H_2S) ou le méthane, ainsi qu'une quantité importante de vapeur d'eau [171]. Ceci rend plus difficile l'extrapolation pour les conditions réelles à partir de données expérimentales sur des tests de sélectivité membranaire réalisés avec des gaz purs ou des mélanges binaires. Le couplage de la fermentation obscure à la séparation gaz/gaz a cependant été réalisé dans quelques études, utilisant différentes technologies de séparation membranaire.

Nielsen *et al.* [172] utilisent des membranes métalliques composées de palladium dans un module membranaire nécessitant un chauffage à $350^\circ C$ pour traiter le flux de gaz sortant (H_2 et CO_2) entraîné par un flux de gaz de balayage (N_2). Jusqu'à 90% de l'hydrogène a été extrait du gaz contenant seulement 7,5% d' H_2 environ. La pureté de l'hydrogène dans le perméat n'est pas indiquée mais est probablement élevée avec ce type de membrane (Pd). Cependant, la contamination de la membrane métallique est un problème important, en particulier lié à la présence d' H_2S dans le gaz produit, ce qui rend nécessaire l'ajout d'un piège entre le bioréacteur et le module membranaire. L'utilisation de membrane métallique directement en sortie du réacteur semble peu adaptée, cette configuration étant particulièrement coûteuse en matériel (Pd-Ag) et en énergie.

Dans une autre étude, Teplyakov *et al.* [173] ont utilisé un procédé moins énergivore : avec un contacteur membranaire pour extraire sélectivement le CO_2 du gaz produit. Il s'agit d'un contacteur asymétrique utilisant deux membranes polymériques (PVTMS) avec une solution alcaline de K_2CO_3 utilisée comme fluide de transport entre les deux contacteurs membranaires pour le CO_2 . A partir d'un mélange initial CO_2/H_2 80/20 produit par photo-fermentation, un rétentat à 90% en H_2 est obtenu. Ce système est intéressant dans la mesure où il ne nécessite pas de matériaux coûteux ni de température élevée de fonctionnement. En revanche, la mise en circulation de la solution alcaline et les changements rapides de températures à $60^\circ C$ puis $18^\circ C$ à chaque cycle sont énergétiquement importants.

Enfin Bélafi-Bakó *et al.* [174] en 2006 et Bakonyi *et al.* [20] en 2015 ont mis en place des modules membranaires à fibres creuses sur le flux de gaz effluent de leur bioréacteur de production d'hydrogène par fermentation obscure. En mode semibatch, Bélafi-Bakó *et al.* [174] utilisent deux différents modules placés en série (avec une membrane poreuse en polyéthylène haute densité (HDPE) et une membrane dense en Matrimid® + Sumikaexcel®) pour extraire successivement CO_2 puis H_2 sur un flux de gaz sortant composé de $H_2 : CO_2 : N_2$ avec en volume environ (23 : 13 : 64). Tandis que Bakonyi *et al.* [20] n'utilisent qu'un module à fibres creuses en polydiméthylsiloxane (PDMS) dense (extraction sélective de CO_2), sur un bioréacteur en fonctionnement continu, le gaz à traiter ne contenant que $H_2 : CO_2$ (51 : 49). Ces deux études obtiennent une pré-purification de l'hydrogène, jusqu'à 70% environ, mais avec une part importante d' H_2 dans le gaz résiduel, jusqu'à 40% dans l'étude

de Bakonyi *et al.* [20] et 29% pour Bélafi-Bakó *et al.* [174] ; la mise en recirculation du flux de gaz permettant d'améliorer le taux de recouvrement de H₂.

Ces études ont montré que la séparation membranaire pouvait être utilisée pour concentrer H₂ dans le flux de gaz effluent d'un bioréacteur de fermentation obscure, atteignant au minimum 70% d'hydrogène avec des membranes polymères. Cependant, la purification de l'H₂ reste nécessaire et réalisable par l'utilisation de plusieurs étages de modules membranaires ou d'autres procédés de séparation de gaz en aval [175].

I.D.2.2. Extraction liquide/solide

Cette configuration de bioréacteur membranaire est actuellement la plus étudiée pour la production d'H₂ [9–20] (de 2004 à 2015). La membrane permet le réglage découplé du temps de séjour hydraulique (TSH) et du temps de séjour solide (TSS). Une partie du milieu réactionnel est extraite tout en conservant les particules solides avec le *consortium* bactérien ; les solides pouvant être extraits séparément à un débit indépendant. Ceci permet l'augmentation du débit d'alimentation sans perte de production liée au lessivage du *consortium*. L'objectif d'un tel réacteur membranaire est alors d'augmenter la productivité en H₂ dans un système continu.

Les membranes utilisées dans ce type de configuration sont des membranes poreuses généralement de microfiltration (diamètre de pores compris entre 0,2 et 0,8 µm) permettant de séparer la phase liquide des solides. Shen *et al.* [13,17] utilisent des membranes d'ultrafiltration (0,04 µm), cependant rapidement colmatées (moins de 50 h).

Les membranes utilisées peuvent être minérales comme l'alumine [9], mais plus généralement organiques [10–20], préférées pour leur flexibilité et leur bas coût. Oh *et al.* [9] en 2004, utilisent un dispositif tubulaire à flux croisés, qui limite fortement la surface spécifique de la membrane (5,5 m²_{membrane}/m³_{milieu}) et accroît les risques de colmatage, apparaissant systématiquement avant 20 jours de fermentation. Ce problème est limité en augmentant la surface de membrane, permettant la perméation du liquide en limitant le colmatage par les matières en suspension : les modules à fibres creuses [10,11,13,17] sont particulièrement adaptés (surface spécifique > 10 m²_{membrane}/m³_{milieu}), tout comme les modules à membranes planes de type « flat-sheet » commercialisés par Kubota Co. et utilisés par Lee *et al.* [12,14–16,19] et Bakonyi *et al.* [20], avec une surface spécifique supérieure à 20 m²_{membrane}/m³_{milieu} ; avec des durées de fonctionnement allant jusqu'à plus de 60 jours pour Lee *et al.* [19] et Bakonyi *et al.* [20]. On notera que ces modules à membranes polymères permettent d'envisager une transposition industrielle directe du procédé en augmentant la taille et le nombre de modules membranaires.

Le module membranaire est dans la plupart des cas utilisé *ex situ*, sur une boucle de recirculation du milieu réactionnel [9,11,12,14–16,18,20], facilitant l'entretien du système comme le changement du module membranaire. En revanche, le brevet de Paterek [10] de 2006 indique que la configuration *in situ* permet d'extraire rapidement les produits de fermentation du milieu réactionnel sans mise en recirculation du milieu, énergétiquement coûteuse ; cette configuration est mise en œuvre par Shen *et al.* [13,17] en 2009 et Lee *et al.* [19] en 2014 avec, respectivement un module à fibres creuses et deux modules « flat-sheet », placés directement au sein du bioréacteur.

I.Revue bibliographique

Les substances polymériques extracellulaires (SPE) produites par les bactéries dans le milieu réactionnel augmentent considérablement en concentration avec l'augmentation du TSH, colmatant les membranes sur lesquelles elles se déposent et s'accumulent en créant un biofilm [12], ce qui peut être réduit par différentes stratégies. L'utilisation d'un fonctionnement séquencé peut être mise en place, alternant phase de pompage et phase de repos dans les tests de Lee *et al.* [12,14–16,19] ou d'inversion du flux de liquide [9,13,17] (*back flushing*) voire l'utilisation du biogaz produit par la fermentation pour réaliser ce contre flux, comme dans l'étude de Kim *et al.* [18]. Une stratégie complémentaire consiste à réaliser un barbotage de gaz (produit ou inerte) au niveau de la membrane afin de limiter l'accumulation de MES sur la surface [12–19]. Mais une fois installé, l'élimination complète du biofilm est impossible et ajoute une résistance au transfert de matière qui devient problématique pour l'extraction de liquide au travers de la membrane.

Grâce à cette configuration de séparation liquide/solide, le découplage du TSH et du TSS permet de limiter le lessivage du *consortium* microbien présent sur les MES, augmentant progressivement la population microbienne, permettant ainsi l'utilisation d'un TSH court. Lors du passage du mode RAC au mode BRM à TSH fixe, avec augmentation du TSS, une augmentation de la productivité en hydrogène est systématiquement observée, allant jusqu'à + 580% dans l'étude de Lee *et al.* [11] à un TSH de 4 h et un TSS infini. L'impact de l'utilisation de la séparation liquide/solide sur le rendement en hydrogène n'est pas aussi évident, pouvant être positif, nul ou négatif, en fonction des autres conditions opératoires et du *consortium* utilisé : Shen *et al.* [13] observent une variation comprise entre 0% et – 29%, en fonction du débit de substrat, tandis que Kim *et al.* [18] (fermentation à 60°C), observent une augmentation du rendement de 56% avec l'ajout du module membranaire.

La configuration du bioréacteur membranaire avec séparation liquide/solide permet l'amélioration de la productivité en rendant possible la réduction du TSH sans lessivage des microorganismes. Cependant, des phénomènes de colmatage des membranes utilisées sont observés, induisant des résistances au transfert de matières nécessitant des opérations supplémentaires. De plus, d'autres systèmes permettent de limiter le lessivage des microorganismes comme l'utilisation de lits microbiens immobilisés.

I.D.2.3. Extraction liquide/liquide

L'objectif de ce mode est d'extraire sélectivement les produits de fermentation (acides et alcools) tout en conservant la majeure partie de l'eau et des sels nutritifs, les MES étant également conservés dans le bioréacteur. L'extraction sélective des produits de fermentation permet de limiter leur impact inhibiteur sur le métabolisme évoqué au paragraphe I.C.1.3.2, sans nécessairement modifier le TSH. L'utilisation de substrat très concentré en matières métabolisables, serait alors possible, sans dilution préalable, l'eau du milieu réactionnel étant conservée, en théorie, durant le procédé.

L'étude réalisée par Trad *et al.* [176] met en œuvre ce type de séparation liquide/liquide couplé à un bioréacteur de fermentation obscure en configuration *ex situ*; ce dispositif en mode de fonctionnement semibatch est équipé d'une extraction continue des gaz produits, avec ponctuellement, des ajouts de substrat et des évacuations de l'effluent. Un module membranaire à fibres creuses hydrophobes, composées de polyfluorure de vinylidène (PVDF), est placé en

I.D. L'utilisation de la séparation membranaire en fermentation obscure

configuration *ex situ* sur la boucle de recirculation du système. L'application d'une dépression transmembranaire (≈ 100 mbar) a ainsi permis l'extraction d'un effluent chargé en AGV.

Une amélioration de plus du triple de productivité en hydrogène est observée après le premier cycle d'extraction des métabolites, mais suivi d'une chute de la productivité due à une remontée rapide des coproduits liée à cette forte production d' H_2 . L'espacement trop important des cycles du *fed-batch* d'alimentation et de filtration du milieu (200 h) semble avoir déséquilibré le métabolisme, ce qui pourrait être évité avec l'utilisation d'un mode de fonctionnement continu réel, celui-ci permettant de limiter durablement l'accumulation des produits de fermentation.

Ce mode de fonctionnement offre des perspectives très intéressantes afin de permettre l'utilisation de substrats très concentrés en matières métabolisables avec un faible débit d'alimentation, mais sans accumulation des produits de fermentation inhibiteurs. Ce mode d'extraction présente cependant le même inconvénient que l'extraction liquide/solide par rapport au colmatage de la membrane. Plus d'études sur ce procédé seront nécessaires, en particulier sa mise en place en fonctionnement continu et l'étude de l'efficacité de l'extraction des différents métabolites par différents types de membranes, en conditions de fermentation obscure.

I.D.2.4. Extraction gaz/liquide

Dans ce dernier mode de fonctionnement, très peu étudié dans la littérature, le module membranaire est utilisé pour extraire les gaz produits directement au sein du milieu réactionnel. L'amélioration de l'extraction du gaz du milieu liquide avec membrane est liée à l'augmentation importante de la surface d'interface entre les phases liquide et gaz. Ceci permet de réduire la pression partielle en H_2 , ce qui tend à améliorer la production de ce gaz et à limiter sa consommation par les microorganismes hydrogénotrophes, comme cela a été expliqué au paragraphe I.B.4.3. Les membranes pouvant être utilisés pour ce dispositif sont en théorie identiques à celles permettant la séparation gaz/gaz, dans la mesure où celles-ci sont hydrophobes et peuvent être utilisées dans les conditions de température et de pression de la fermentation obscure ; ce qui n'est pas le cas, par exemple des membranes métalliques bien que très sélectives à H_2 . L'objectif recherché d'un tel dispositif est donc principalement l'augmentation du rendement en H_2 .

Le test réalisé par Zheng *et al.* [21] en 2010, avec une membrane plane (tamis moléculaire CTMSS - Carbon Template Molecular Sieve Silica), séparant un bioréacteur batch, a montré une extraction totale de l'hydrogène produit à la surface de la membrane durant le premier jour du test de fermentation. Cependant, un colmatage total de la membrane, en seulement deux jours, par l'eau et la matière organique dans les pores, n'a pas permis de réaliser efficacement l'extraction d'hydrogène ; la majorité du gaz produit ($> 90\%$) étant observée dans le rétentat (ciel gazeux) plutôt que dans le perméat. En effet, le dispositif utilisé, ne permet pas d'avoir une surface membranaire suffisante (ici $0,0025 \text{ m}^2/\text{m}^3_{\text{milieu}}$), augmentant le colmatage, rendant cette configuration de bioréacteur non transposable à grande échelle.

En revanche, Liang *et al.* [22] en 2002, montrent qu'un bioréacteur membranaire à fibres creuses en silicone avec une surface membranaire de $3400 \text{ m}^2/\text{m}^3_{\text{milieu}}$ avec dépression transmembranaire (pression absolue de 108 mbar), permet d'extraire l'ensemble des gaz produits, en mode de

fonctionnement semibatch. Une légère augmentation du rendement en H₂ (9%) est obtenue par rapport à un réacteur sans membrane (respectivement 0,93 et 0,84 mol_{H₂}/mol_{hexose}). Ces résultats prometteurs n'ont cependant pas été vérifiés en mode de fonctionnement continu, les tests ne dépassant pas 24 h.

Il a été montré que l'extraction gaz/liquide permet de réaliser une prépurification des gaz produits lorsque deux extractions séparées sont réalisées via le ciel du bioréacteur et via la membrane. Avec un dispositif comprenant un réacteur agité et sur une boucle de recirculation un module membranaire à fibres creuses en silicone, Liang *et al.* [22], montrent que 82% du CO₂ est extrait via la membrane alors que le mélange extrait dans le ciel du réacteur contient 68% de l'H₂ produit. L'utilisation d'un tel procédé en mode de fonctionnement continu constituerait une avancée importante et permettrait de prouver l'efficacité sur le long terme.

L'extraction gaz/liquide permet d'améliorer le rendement en hydrogène en extrayant les gaz produits du milieu réactionnel. L'utilisation de membranes polymères semble la plus adaptée par leur caractère hydrophobe nécessaire pour limiter la pénétration de l'eau dans la porosité de la membrane. Aucun colmatage limitant le flux de gaz au travers de la membrane polymère ne devrait être observé, ce qui est un avantage par rapport au mode de séparation liquide/solide ou liquide/liquide.

I.D.3. Le couplage de la séparation membranaire et de la fermentation obscure dans cette étude

Dans cette étude, notre choix d'intensification du procédé de production s'est porté sur cette dernière configuration, avec une extraction gaz/liquide, mise en œuvre dans un module membranaire à fibres creuses, en configuration *in situ*. Ce bioréacteur sera mis en fonctionnement continu et une extraction non sélective du biogaz sera réalisée, permettant de limiter la pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel. Pour favoriser l'extraction des gaz produits, un gaz de balayage sera utilisé dans le jeu des fibres creuses.

Objectifs de la thèse

Les résultats obtenus lors de cette thèse sont présentés en quatre parties :

Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Ce troisième chapitre présentera, dans un premier temps le choix de l'*inoculum* microbien utilisé dans cette étude parmi les différentes cultures mixtes disponibles à la station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg. Leurs potentiels de production d'hydrogène seront déterminés sans apport de substrat supplémentaire, puis un apport de substrat modèle permettra de s'affranchir de l'effet de la biomasse. Ces tests seront réalisés en réacteur agité semibatch, facilitant la reproduction des tests de fermentation. La sélection des paramètres de fermentation obscure optimaux sera ensuite réalisée pour l'*inoculum* microbien sélectionné. L'optimisation de la température de fermentation sera réalisée et l'option de la régulation du pH sera évaluée. Dans ce chapitre, une extraction des gaz produits par gaz de balayage sera systématiquement réalisée pour réduire leurs pressions partielles dans le milieu fermentaire. Ces paramètres optimisés permettront de constituer un test de référence, dont l'évolution de la production de gaz et de métabolites sera étudiée en détails. Ce test sera utilisé pour comparaison dans la suite de l'étude. Une analyse microbiologique des échantillons de biomasse permettra d'observer les modifications du *consortium* bactérien en fonction des conditions opératoires utilisées, permettant de corréliser ces évolutions avec les productions de gaz et de métabolites analysées.

Intensification du procédé par extraction des gaz

Le quatrième chapitre de cette thèse portera sur l'intensification du procédé par extraction des gaz produits selon différents modes d'extraction. En plus du mode d'extraction par gaz de balayage, l'extraction par dépression et l'extraction libre seront testées et comparées à l'utilisation d'un réacteur clos (batch). L'impact du débit de gaz de balayage sur la production de gaz sera évalué pour déterminer la valeur limite pouvant être utilisée pour une production efficace d'H₂. L'utilisation du dioxyde de carbone comme gaz de balayage sera également testée, ce qui permettra de nous prononcer sur l'impact éventuellement positif ou négatif du CO₂ pour la fermentation. En plus des variations de production d'H₂ et de CO₂, l'impact de ces différents paramètres sur la production de métabolites et sur la composition du *consortium* bactérien sera étudié.

Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Ce cinquième chapitre présentera la mise en fonctionnement continu du procédé de fermentation optimisé aux chapitres précédents. Dans le réacteur agité utilisé en mode semibatch, une alimentation et une extraction du liquide seront mises en place, en flux continu, permettant d'entretenir la production d'hydrogène avec un volume de milieu réactionnel constant pour différents temps de séjour hydraulique.

La mise en œuvre du couplage de la production d'hydrogène par fermentation obscure avec une technologie membranaire de type contacteur (module à fibres creuses), pour une extraction

optimisée des gaz produits du milieu fermentaire, constitue l'objectif principal de la thèse. Le postulat retenu est de pouvoir améliorer les performances de production d' H_2 par le développement d'un BRM avec un mode d'extraction gaz/liquide et en favorisant la stabilisation du *consortium* microbien. Une membrane de microfiltration en polymère hydrophobe (Polytétrafluoroéthylène - PTFE) a été sélectionnée. Contrairement aux bioréacteurs membranaires de séparation liquide/solide, le développement d'un biofilm sur la surface des fibres ne devrait pas être un frein au transfert de matière, notamment pour le passage de l'hydrogène. Plusieurs tests seront réalisés pour améliorer la configuration du bioréacteur membranaire, en particulier par la modification du temps de séjour hydraulique. La robustesse de ce procédé de fermentation obscure en fonctionnement continu sera éprouvée.

Études complémentaires sur le bioréacteur membranaire (BRM)

Enfin ce sixième chapitre, plus exploratoire, permettra de tester différentes solutions d'alimentation du bioréacteur membranaire, dans un premier temps, avec l'ajout de nutriments, pour palier au lessivage des éléments indispensables au métabolisme microbien lors du renouvellement du milieu fermentaire, puis dans un second temps, par l'utilisation d'une biomasse issue de la filière vitivinicole, les bourbes, comme substrat d'alimentation réel. Ces tests permettront de prouver la faisabilité du procédé en conditions réelles, dans l'optique d'une transposition à l'échelle industrielle. Un effet particulier induit par le fonctionnement du BRM au bénéfice de la production d'hydrogène sera exposé.

II. Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, les différentes matières, utilisées dans cette étude, pour réaliser l'apport microbien (*inocula*) et l'apport de substrat sont décrites. Les configurations des bioréacteurs utilisés sont également détaillées ainsi que leurs principaux paramètres de fonctionnement. Enfin, sont décrites les différentes méthodes utilisées pour les analyses chimiques et microbiologiques, qui permettront de calculer les critères de performances pour comparer les différents résultats obtenus dans cette étude.

II.A. *Inocula* microbiens, substrats modèles et réels

II.A.1. *Inocula* microbiens

Les *inocula* utilisés dans cette étude sont issus des lignes de traitement de la station d'épuration (STEP) de l'Eurométropole de Strasbourg, 4^{ème} plus grande station de France. Les *inocula* de cette STEP ont été choisis pour leur disponibilité en quantités importantes (190 000 m³ d'eau traitée par jour) à proximité du laboratoire, permettant l'utilisation de boues fraîchement prélevées pour chaque test. De plus, comme nous le verrons, leurs résultats performants et stables en production d'hydrogène par fermentation obscure en font d'excellents *inocula* après prétraitement thermique. Le traitement des eaux usées au sein de la station d'épuration est réalisé en plusieurs étapes spécifiques, décrites sur la Figure 6. Arrivées sur le site, les eaux usées sont dégrillées, dessablées, dégraissées et enfin mise à décanter pour en extraire les boues primaires chargées en matières en suspension (MES \approx 20 g/L) minérales et organiques, dont la composition est directement liée à la composition des eaux usées, donc variable.

Le surnageant des décanteurs primaires est envoyé vers les trois lignes de traitement biologique où une *inoculation* en continu est réalisée avec des cultures mixtes prélevées en aval du traitement biologique. Il s'agit de boues activées à faible charge (MES \approx 4 g/L) qui circulent successivement dans six zones de traitement : une zone d'anoxie, où les boues sont mélangées, deux zones d'aération, où un flux d'air est injecté au fond du bassin par des disques poreux, puis à nouveau une zone d'anoxie, suivi de deux zones d'aération. Le passage des boues dans ces bassins permet le développement des bactériesensemencées et la consommation des matières carbonées, azotées et phosphorées présentes dans les eaux usées, réduisant efficacement leur demande chimique en oxygène (DCO) et permettant après clarification par décantation de rejeter le surnageant des boues vers le Rhin. Les boues obtenues par décantation (MES \approx 8 g/L) à la fin de ces lignes de traitements sont appelées boues biologiques. Ces boues, qui sont utilisées pour réensemencer les lignes de traitement biologique, sont riches en matières organiques vivantes.

Les boues primaires et les boues biologiques en excès sont ensuite indépendamment floculées par l'ajout de polymères, puis épaissies par passage sur des tambours d'égouttage. Ces deux types de boues épaissies comportent approximativement 50 g/L de matières en suspension. Les boues biologiques épaissies sont utilisées pour alimenter un digesteur anaérobie permettant la production de méthane, valorisé sur la STEP. Les boues en sortie du digesteur anaérobie, appelées boues digérées, et les boues primaires épaissies, sont ensuite homogénéisées, séchées et envoyées à l'incinération.

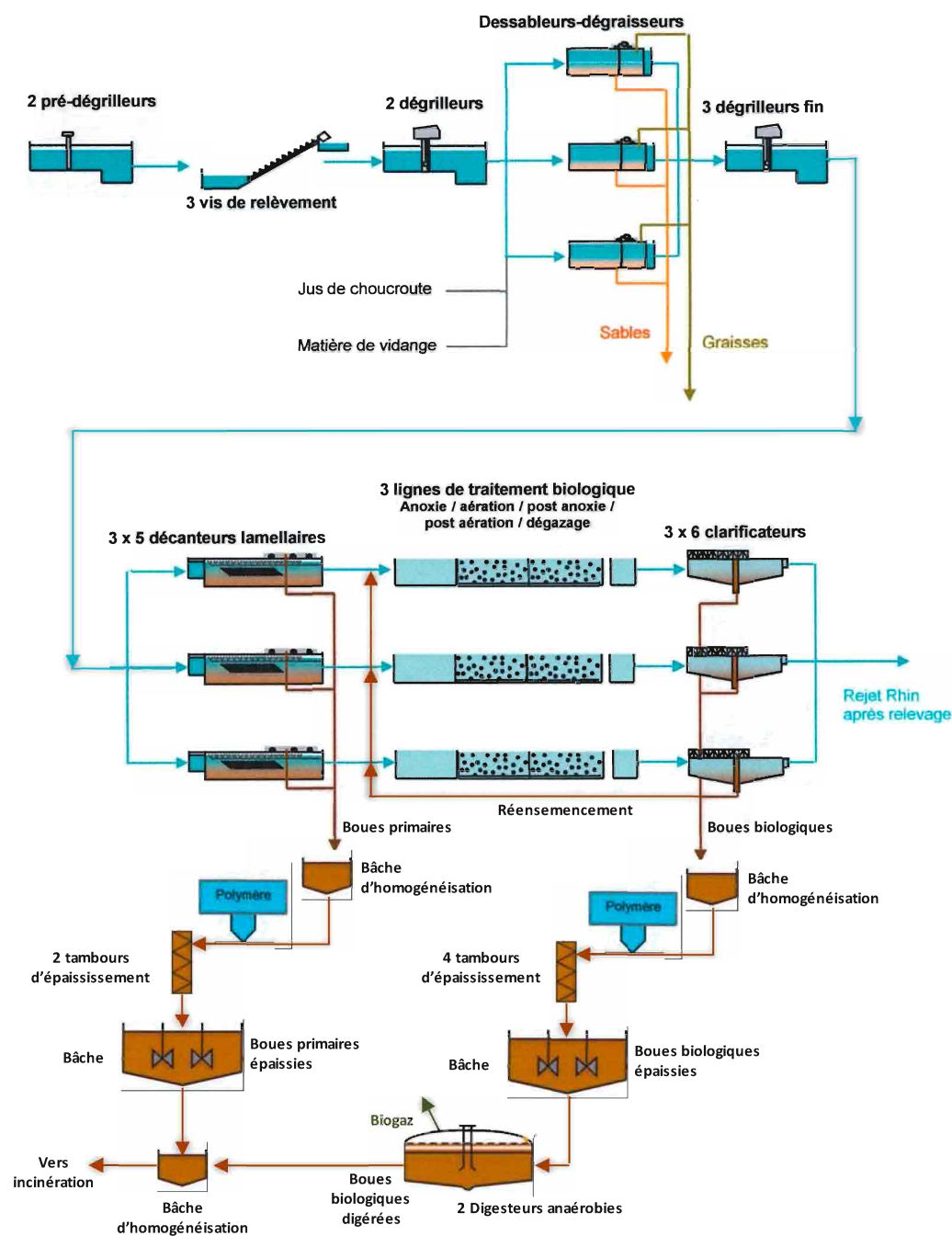


Figure 12. Schéma du traitement des eaux usées de la station d'épuration avec les différents points de prélèvement des inocula testés (adapté de [90])

Dans un souci de reproductibilité, un échantillon « frais » de boues est prélevé dans les bassins de la station d'épuration 2 h avant chaque test de fermentation pour être utilisé comme *inoculum* microbien. Les boues issues de sept points de prélèvement différents ont été testées comme *inoculum* pour notre étude : les boues primaires, les boues activées des zones anoxie et aérée sur les lignes de traitements biologiques, les boues biologiques obtenues en sortie de ces lignes, ainsi que les boues primaires épaissies et biologiques épaissies et les boues digérées. Les boues épaissies et digérées fortement concentrées en matières en suspension (MES \approx 50 g/L) sont diluées à 50% dans l'eau du réseau d'eau potable avant d'être placées dans le réacteur afin d'améliorer leur mise en suspension. Des tests ont été réalisés avec et/ou sans l'ajout de substrat afin de tester le potentiel de production des différents *inocula*.

II. Matériels et méthodes

A la suite de l'étude préliminaire sur la potentialité de production d' H_2 de ces différents *inocula* (paragraphe III.A), l'*inoculum* majoritairement utilisé dans cette étude correspond aux boues activées de la zone anoxie. Un volume total de 16 000 m^3 est disponible sur les trois lignes de traitements biologiques, pendant la première étape de traitement (zone anoxie).

II.A.2. Substrats modèles

L'utilisation d'un substrat modèle composé exclusivement de glucose permet une reproductibilité parfaite de l'alimentation. Lors des tests de fermentation en mode de fonctionnement semibatch, un ajout ponctuel du substrat (glucose ou saccharose) est réalisé sous forme de poudre au sein du bioréacteur, pour une concentration initiale en hexose d'environ $2 g_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}$, soit $11,1 \pm 0,2 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}$.

Lors des tests de fermentation en mode de fonctionnement continu, l'ajout de substrat est réalisé avec une solution de glucose dilué dans de l'eau du réseau d'eau potable, utilisée pour renouveler le milieu réactionnel du bioréacteur. La concentration en glucose de cette solution est adaptée en fonction du temps de séjour hydraulique (TSH) et au débit d'alimentation en substrat (DAS) appliqués au système. Dans les conditions de référence, un TSH de 12 h et un DAS de $1 g_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$ sont appliqués au système, avec l'utilisation d'une solution de glucose à 12 g/L.

Un renouvellement en nutriments du milieu de fermentation a également été réalisé avec l'ajout de nutriments à la solution d'alimentation, dont les concentrations sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Composition de la solution d'alimentation utilisée lors des tests de fermentation avec nutriments

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	12,000
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	0,175
Sulfate d'ammonium	$(NH_4)_2SO_4$	3,500
Sulfate de fer II	$FeSO_4, 7 H_2O$	0,250
Sulfate de magnésium	$MgSO_4, H_2O$	0,050
Chlorure de nickel	$NiCl_2, 6 H_2O$	0,002

Les concentrations utilisées pour la préparation de cette solution sont issues de la littérature [97–99,102,104,177] avec des rapports de moles d'atomes C/N de 6,5, C/P de 120 et C/Fe de 96.

II.A.3. Substrats réels (bourbes)

Des bourbes issues de la production vitivinicole de deux vignobles ont été utilisées comme substrat pour alimenter le *consortium* microbien, issu des boues de STEP, en matières organiques métabolisables et en nutriments. Les bourbes correspondent à la biomasse obtenue pendant le débouillage du moût, lui-même obtenu par pressurage du raisin, avant fermentation. Elles contiennent donc une quantité importante de matières métabolisables ($DCO_{\text{total}} \approx 250 \text{ g/L}$), avec des matières en suspension ($MES \approx 100 \text{ g/L}$) issues du raisin.

Des bourbes de cépage « Riesling », produites par le domaine Pfister à Dalhenheim, en Alsace, ont été utilisées. Elles proviennent d'un vignoble géré de manière traditionnelle. La concentration en glucides solubles de ce lot de bourbes est de $200 g_{\text{hexose}}/L_{\text{bourbes}}$.

II.B. Dispositifs de fermentation

Ces boues ont été divisées en aliquotes puis stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Une fois décongelées, les boues sont diluées dans l'eau du réseau de Strasbourg afin d'obtenir la concentration en hexose adéquate, puis tamponnées à pH 7,0 avant d'être stockées à 4°C afin de limiter le développement microbien. Après décongélation, les boues ainsi préparées et stockées sont utilisées au maximum dans les 48 h suivantes.

II.B. Dispositifs de fermentation

Différents modes de fonctionnement du bioréacteur de fermentation ont été mis en œuvre dans cette étude. Dans un premier temps, un fonctionnement en réacteur agité semibatch (RASB) a été utilisé lors de l'étude d'optimisation de différents paramètres de fermentation et d'extraction des gaz produits. Le bioréacteur agité a ensuite été mis en œuvre en mode continu (RAC). De plus, ce système en mode continu a été adapté pour utiliser un module membranaire comme bioréacteur membranaire (BRM) à la place du réacteur agité, pour la production d'hydrogène par fermentation obscure.

II.B.1. Dispositif du réacteur agité semibatch (RASB)

Le schéma du montage RASB est donné Figure 13. La fermentation est réalisée dans un réacteur (Büchi AG) de 1,0 ou de 1,5 L, équipé d'une double enveloppe couplée à un bain thermostaté (Polystat 5A – Bioblock Scientific). Un échantillon de boues de station d'épuration est utilisé comme *inoculum* microbien avec un taux de remplissage de 80% du volume total, soit 0,8 ou 1,2 L pour les réacteurs de 1,0 et 1,5 L, respectivement. L'enceinte du réacteur est à pression atmosphérique. Les boues sont mises en suspension par agitation à 220 tr/min, permettant l'homogénéisation du milieu, en particulier pour l'apport de substrat et la diffusion des gaz. Le pH du milieu réactionnel est suivi en continu pendant la fermentation avec un régulateur de pH (HANNA Instruments BL 7916), permettant notamment la régulation du pH (si souhaitée) par injection de soude (3 mol/L).

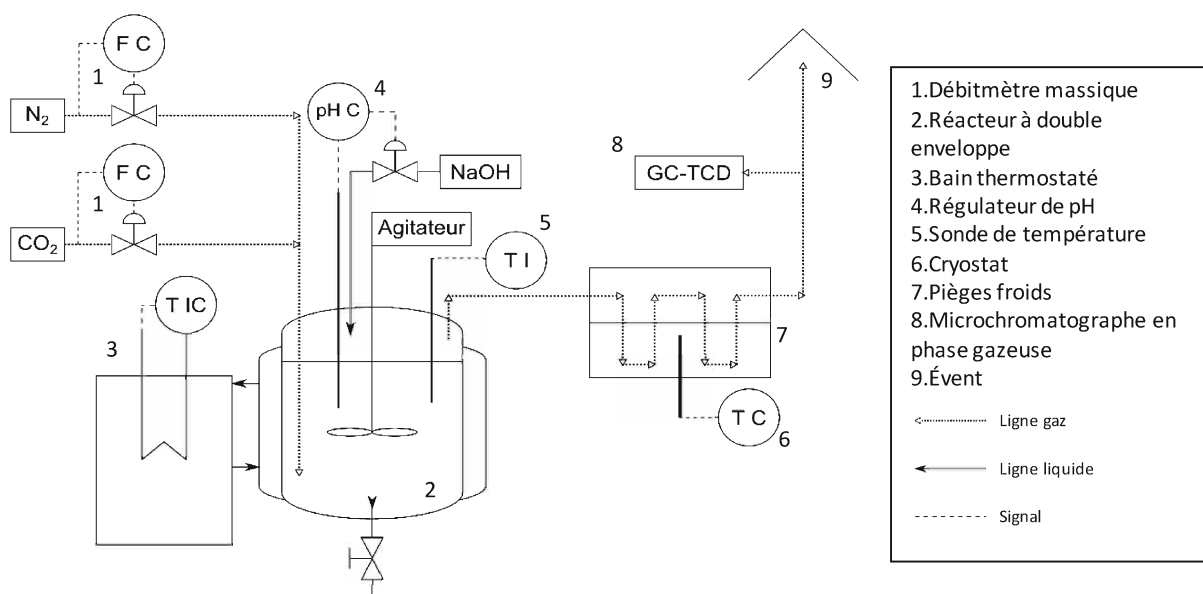


Figure 13. Schéma du dispositif expérimental du réacteur agité semibatch (RASB)

Un prétraitement thermique à une température proche de 70°C (température de réglage du bain thermostaté) pendant 1 h 15 min sous atmosphère d'air statique à pression atmosphérique est appliqué aux boues. La température de fermentation (35°C , 38°C , 45°C , 49°C , 55°C ou 59°C) est ensuite programmée à la fin du traitement thermique, 30 min avant le début du test de fermentation, et suivie

II. Matériels et méthodes

au cours de la fermentation par une sonde de température. L'évolution de la température dans le réacteur est représentée sur la Figure 14. L'instant « t₀ » correspondant à la mise sous flux de gaz de balayage. Un substrat modèle sous forme solide (poudre) est ajouté à l'*inoculum* microbien au t₀ du test de fermentation.

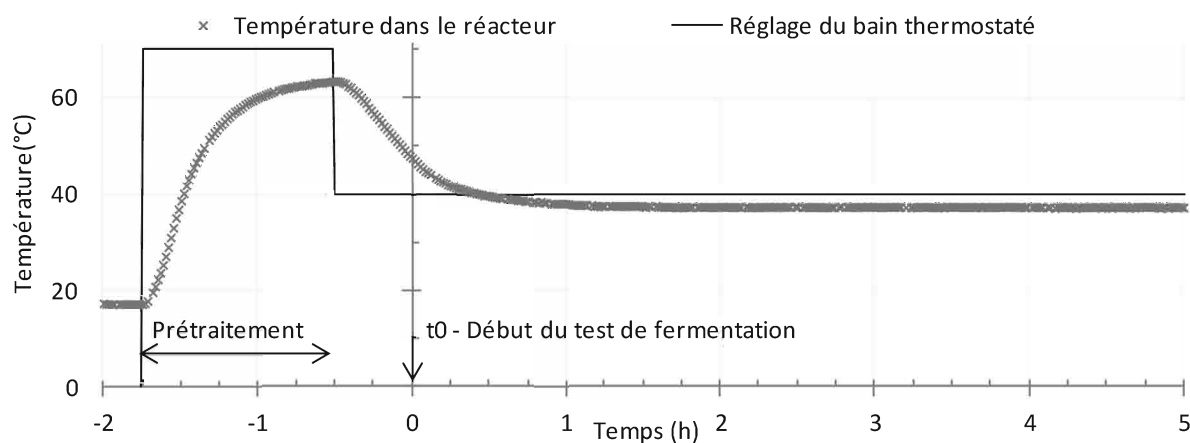


Figure 14. Profil de température dans le réacteur en fonction du temps pour un test de référence

Pendant la phase de fermentation, un gaz inerte est introduit par balayage pour extraire les gaz produits en utilisant un bullage dans le réacteur via une canne. Le débit de gaz est régulé par un débitmètre massique (5850E Brooks) sur une gamme de débits allant de 10 à 200 mL/min. Des mélanges gazeux CO₂ : N₂ ayant un rapport volumique de (0 : 100), (50 : 50), (75 : 25) et (100 : 0) ont été utilisés en tant que gaz de balayage. Deux pièges froids (2-3°C) (Cryostat Huber TC40) et un séparateur gaz/liquide à membrane (EIF 3S5SEC25) sont installés en série sur la ligne de sortie des gaz du bioréacteur afin de condenser les liquides avant l'arrivée du flux de gaz vers l'analyse en ligne par μ GC-TCD (Agilent M200 / T3000). Le surplus de gaz est évacué à l'évent.

A la suite de chaque test de fermentation, un nettoyage complet du réacteur est réalisé par brosse avec détergent et rinçage à l'éthanol (70%), afin de limiter la formation d'un biofilm microbien sur les surfaces du dispositif.

II.B.2. Dispositif du réacteur agité continu (RAC)

Le système utilisé en mode RASB a été adapté afin de pouvoir fonctionner en mode continu (Figure 15). Pour cela, un réservoir en verre à double parois thermostaté (Scilabware), contenant une solution de substrat, est utilisé pour alimenter le bioréacteur à un débit contrôlé par une pompe péristaltique (Ismatec IP). Afin d'améliorer l'homogénéisation du milieu de fermentation, une mise en circulation est réalisée à l'aide d'une seconde voie de la pompe péristaltique par la mise en place d'une boucle de recirculation sur laquelle est réalisée l'ajout de la solution de substrat et une évacuation à débit équivalent de l'effluent du milieu réactionnel excédentaire, afin de garder un volume constant au sein du bioréacteur. Afin de garantir des conditions d'anaérobie strictes dans le milieu réactionnel, un dégazage continu du substrat est réalisé par bullage d'azote dans le réservoir de solution d'alimentation.

II.B. Dispositifs de fermentation

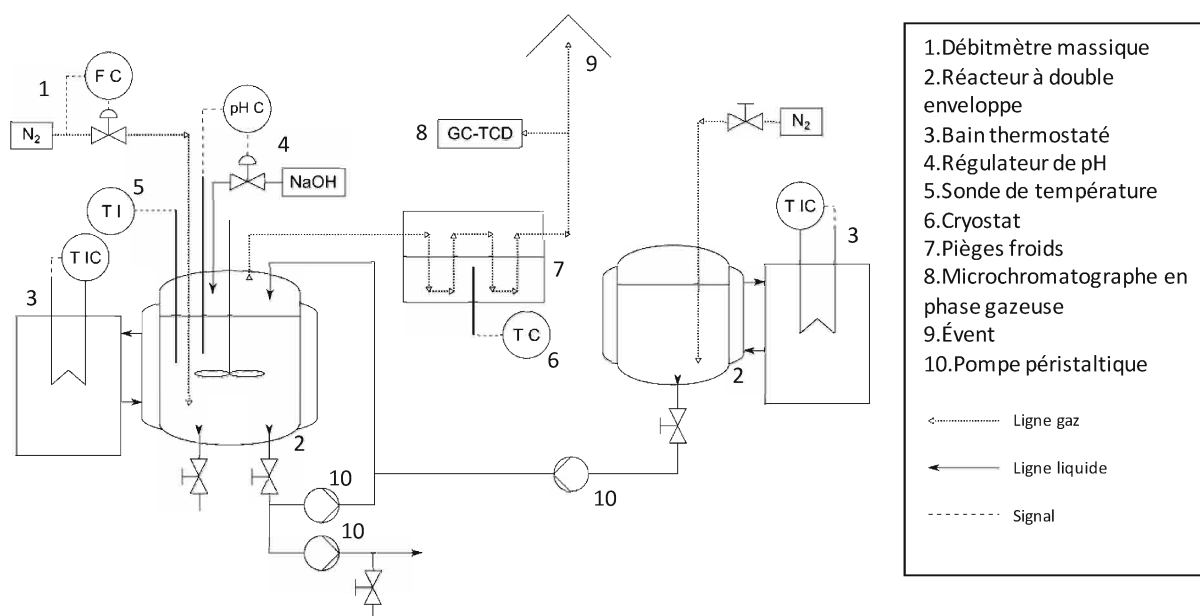


Figure 15. Schéma du dispositif expérimental du réacteur agité continu

La phase d'acclimatation du consortium microbien à la production d'hydrogène et pour son fonctionnement en continu correspond aux cinq premières heures d'un test en mode de fonctionnement RASB, temps nécessaire pour atteindre le maximum de production d'hydrogène. A l'instar du mode RASB, l'instant « t₀ » correspond à la mise sous flux de gaz de balayage et à l'apport initial de substrat. Une filtration grossière (diamètres de pores ≈ 0,6 mm) de l'inoculum est réalisée afin de limiter le colmatage des voies de circulation du milieu réactionnel. A partir de la 5^{ème} heure de fermentation, la mise en circulation du milieu réactionnel est enclenchée, ainsi que l'ajout de substrat et l'extraction d'effluent. L'extraction des gaz produits par la fermentation est réalisée par un gaz de balayage de la même façon que pour le RASB. La régulation du pH dans le milieu réactionnel est réalisée par ajout automatique d'une solution de NaOH (1 mol/L) dans le milieu réactionnel par un régulateur de pH (HANNA Instruments BL 7916).

Un débit d'alimentation en substrat (DAS) d'environ 1 g_{hexose}/L_{milieu}/h a été utilisé en mode RAC. Des temps de séjour hydraulique (TSH) de 12, 18, 23 et 73 h ont été utilisés. Le taux de recirculation du milieu réactionnel utilisé dans cette étude est typiquement de 1, soit un débit d'alimentation égal au débit de recirculation du milieu.

A la suite de chaque test de fermentation en continu, un nettoyage complet du système est réalisé par la mise en circulation d'une solution diluée d'eau de javel dans le réservoir de substrat et la boucle de recirculation jusqu'à l'effluent, suivi d'un rinçage à l'eau du réseau d'eau potable. Le réacteur est nettoyé par brossage avec détergent et rinçage à l'éthanol (70%) comme dans le cas du RASB. Les éléments du système (tubes, raccord, vannes de prélèvement, etc.) sont rincés à l'éthanol (70%) afin de limiter la formation d'un biofilm microbien sur les surfaces du dispositif.

II.B.3. Dispositif du bioréacteur membranaire (BRM)

Un module membranaire de microfiltration à fibres creuses (Polymem) (Figure 16) est utilisé pour l'extraction des gaz du milieu fermentaire. Le module membranaire utilisé est composé de 238 fibres creuses en polytétrafluoroéthylène (PTFE), d'un diamètre interne de 0,45 mm et d'un diamètre externe de 0,87 mm et dont le diamètre des pores est 0,1 μm. Celles-ci sont disposées dans un volume utile de 478 mL avec un taux de remplissage de 8,5%. Le flux de liquide circulant dans la calandre de bas en

II. Matériels et méthodes

haut permet la relative mise en suspension des matières solides présentes dans le milieu réactionnel. Placé en position verticale, un ciel gazeux se forme dans la cavité supérieure de la calandre au dessus de la sortie liquide, avec un volume moyen de 55 mL. Un volume de liquide de 423 ± 5 mL est donc présent dans le module membranaire. Le chauffage de la calandre à la température de fermentation est réalisé par la circulation d'eau d'un bain thermostaté (Polystat 5A – Bioblock Scientific) dans un serpentin compact composé d'un tube flexible vinyle entourant la calandre.

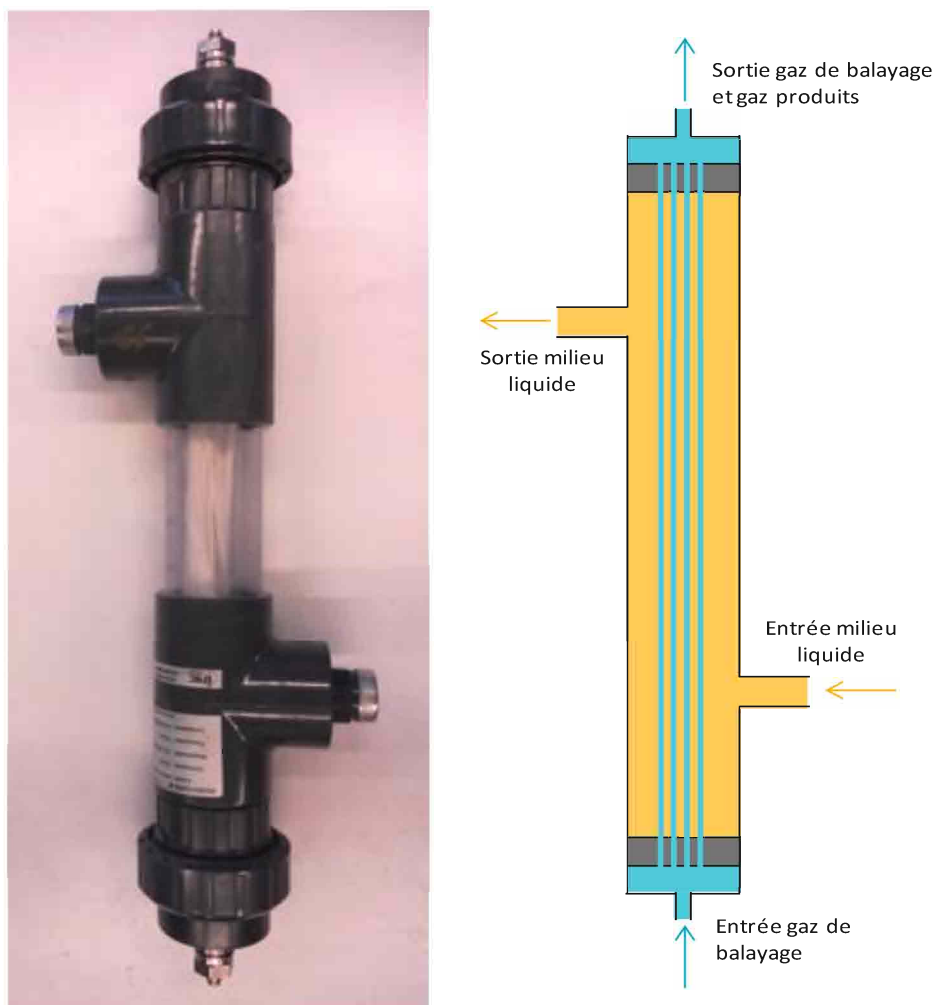


Figure 16. Photographie et schéma du module membranaire à fibres creuses Polymem utilisé dans cette étude

Le module membranaire est utilisé seul en tant que bioréacteur pour la production d'hydrogène (Figure 17). Le remplissage du module membranaire par le milieu réactionnel est réalisé après acclimatation du *consortium* microbien (5 h de fermentation en mode RASB). Une fois le milieu réactionnel transféré dans la calandre, le réacteur initial en mode RASB est séparé du système. Le milieu réactionnel est alors mis en circulation dans une boucle de recirculation. Les gaz produits sont directement extraits du milieu liquide par la circulation d'un gaz de balayage du bas vers le haut à l'intérieur des fibres creuses. Dans la majorité des tests de fermentation, un taux de recirculation proche de 1 est conservé, avec un TSH de ≈ 12 h et un DAS de ≈ 1 $\text{g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$. L'impact d'autres TSH (12, 17, 20 et 46 h) et DAS (1 et 2 $\text{g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) a cependant été testé sur le BRM, ainsi que son utilisation sans boucle de recirculation. Deux circuits de recirculation ont été utilisés lors de cette étude, sans modification du dispositif hormis le volume total de liquide dans le système complet, soit un volume de milieu de 440 mL ou 490 mL environ, selon le circuit utilisé.

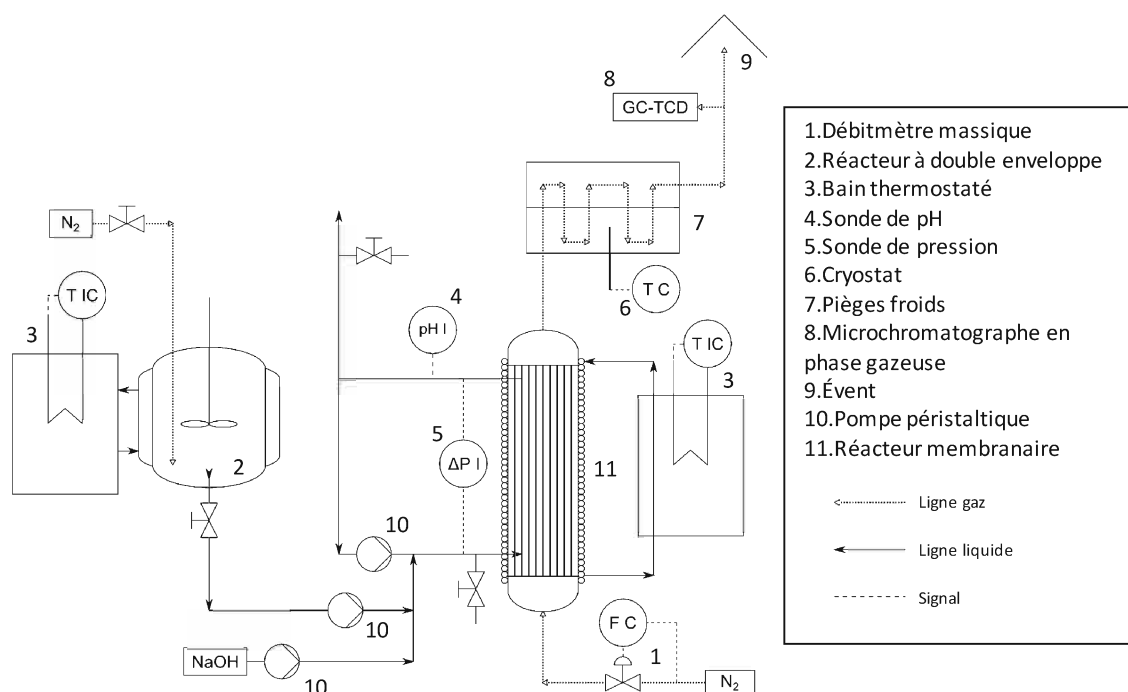


Figure 17. Schéma du dispositif expérimental du bioréacteur membranaire (BRM)

L'apport au milieu de composés nutritifs permettant de renouveler le milieu initial, et d'éviter un appauvrissement, présumé préjudiciable à la production d'hydrogène, a été réalisé, soit par ajouts ponctuels directement sur la boucle de recirculation, soit par ajout continu dans la solution d'alimentation. L'utilisation de bourbes issues de la filière vitivinicole comme substrat réel d'alimentation du *consortium* microbien a été réalisée avec le BRM. Lors de l'utilisation d'un milieu riche en glucides et en nutriments (mélange modèle ou bourbes), un développement microbien est possible dans le réservoir de substrat à température ambiante. C'est pourquoi, le réservoir a été thermostaté à environ 4°C. De plus, un nettoyage complet du réservoir est réalisé ponctuellement en cas de suspicion de contamination, par brossage avec détergent et rinçage à l'éthanol (70%). Cette intervention est réalisée en cours de fermentation, sans interruption d'alimentation, grâce à l'utilisation d'un volume tampon de substrat.

En plus de la procédure de nettoyage décrite pour le RAC, après utilisation, le nettoyage du bioréacteur membranaire est réalisé par vidanges et rinçages répétés de la calandre avec de l'eau de javel (1 ppm de chlore actif). Ce nettoyage permet de supprimer les particules présentes dans la calandre, mais son but n'est pas de détruire le biofilm qui peut s'établir sur les fibres creuses pendant la fermentation, afin de conserver son potentiel d'activité. Un réensemencement du BRM est cependant réalisé au début de chaque test de fermentation avec des boues acclimatées en RASB, afin de l'entretenir et de limiter la déviation des résultats de production due à un déséquilibre du *consortium* microbien. Un test de fermentation sans apport d'*inoculum* extérieur a été réalisé, avec apport de substrat et de nutriments, afin d'observer le potentiel de ce biofilm pour la production d'hydrogène par fermentation obscure.

II.B.4. Dispositifs d'extraction des gaz produits

En complément du mode d'extraction des gaz produits par gaz de balayage, d'autres dispositifs d'extraction ont été testés. Le dispositif expérimental utilisé (Figure 18) permet l'analyse en ligne des gaz produits en continu, sans utilisation d'un flux continu de gaz de balayage dans le bioréacteur. Le fonctionnement du dispositif en réacteur clos (batch) ou avec extraction libre, ainsi qu'avec une faible

II. Matériels et méthodes

dépression a été réalisé. Quelque soit le mode de fonctionnement utilisé, un dégazage initial du milieu réactionnel de 30 min est réalisé avec un gaz de balayage (N₂) à partir du t₀ de la fermentation afin d'atteindre des conditions d'anaérobiose strictes.

En mode de fonctionnement avec réacteur clos, les voies d'entrée et de sortie des gaz sont fermées et les gaz produits s'accumulent dans le bioréacteur, avec une augmentation significative de la pression, mesurée par un manomètre (Serv'Instrumentation). En fin de fermentation, la vanne de sortie des gaz est ouverte progressivement et les gaz sont analysés en ligne, après dilution dans un flux constant d'azote, permettant la normalisation du débit de gaz en sortie et la quantification des gaz produits.

La configuration du dispositif est identique dans le cas du réacteur avec extraction libre, à l'exception de l'ouverture de la vanne de sortie des gaz produits pendant la phase de fermentation. Les gaz produits sont alors évacués en continu, puis dilués dans un flux constant d'azote avant l'analyse en ligne.

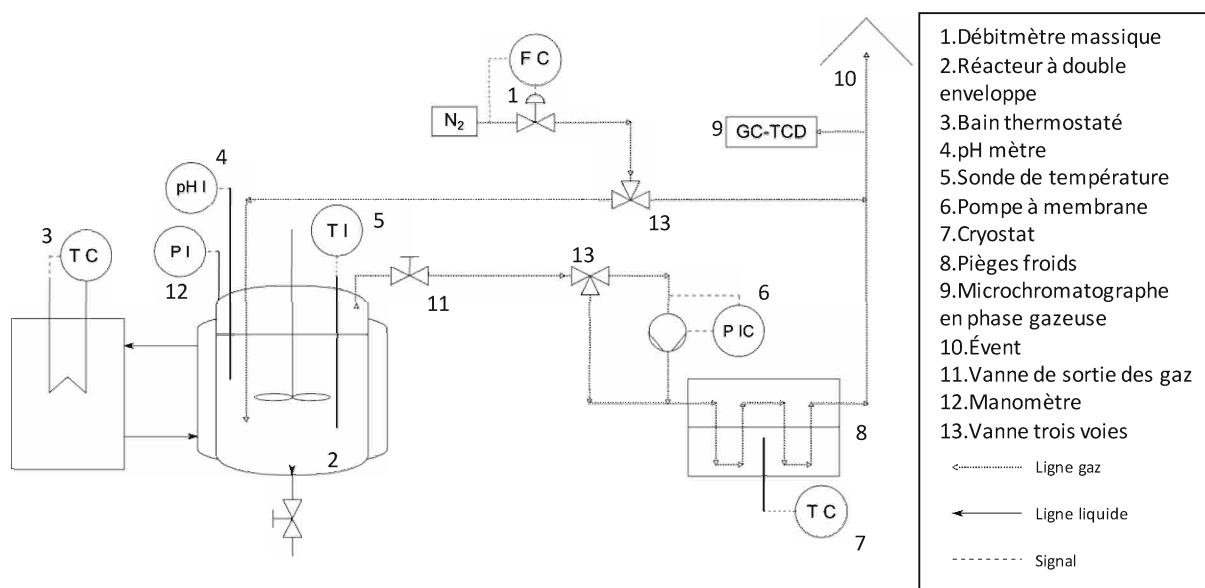


Figure 18. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour modes d'extraction des gaz : réacteur clos, avec extraction libre et en dépression

Une pompe (MPC 301 E - ILMVAC) et un système de régulation du vide (VCB 521 cv - ILMVAC) sont placés en sortie du dispositif pour permettre la régulation à une pression absolue de 800 mbar dans l'enceinte du bioréacteur. Les gaz produits sont pompés hors du bioréacteur et analysés en ligne comme dans le cas du dispositif avec réacteur avec extraction libre.

Avec ces trois modes de fonctionnement, le dégazage du ciel gazeux et du liquide du bioréacteur après fermentation est nécessaire afin d'évaluer précisément la totalité du volume de gaz produit. Ce dégazage est réalisé par injection d'azote dans la canne d'injection, utilisée pour l'extraction des gaz produits dans les tests avec gaz de balayage. Les gaz résiduels sont alors extraits du milieu réactionnel, dans des conditions comparables à celles obtenues avec le mode de fonctionnement avec gaz de balayage.

Le mode d'extraction libre des gaz produits en réacteur avec extraction libre a été adapté et utilisé avec le BRM en mode de fonctionnement continu.

II.C. Méthodes analytiques

II.C.1. Analyse des gaz produits lors de la fermentation

L'analyse en ligne des gaz produits est assurée par un microchromatographe en phase gazeuse (μ GC) (Agilent M200 / T3000), constitué de deux modules équipés de détecteurs à conductivité thermique (TCD). Le Tableau 4 donne la configuration du μ GC utilisé. Le premier module comporte une colonne de type zéolithe tamis moléculaire 5 Å permettant la séparation des gaz permanents (N_2 , O_2 , H_2 , CO et CH_4), tandis que le second module contient une colonne polymérique PoraPLOT U permettant la séparation d'autres gaz, en particulier le CO_2 dans cette étude.

Tableau 4. Description de la configuration des modules du μ GC-TCD utilisé pour l'analyse des gaz

	Module A	Module B
Colonne	Molsieve 5A	PoraPLOT U
Phase	Aluminosilicate tamis moléculaire 5 Å	Divinylbenzene Ethylene glycol dimethacrylate
Dimension de la colonne	10 m x 0,32 mm, 30 μ m	8 m x 0,32 mm, 10 μ m
Gaz vecteur	Argon	Hélium
Température injecteur	90°C	90°C
Temps de retrobalayage	10 s	10 s
Temps d'injection	30 ms	30 ms
Sensibilité	haute / moyenne	moyenne
Température colonne	110°C	85°C
Pression colonne	1,7 bar	1,7 bar
Durée de l'analyse	75 s	75 s
Gaz analysé	N_2 , O_2 , H_2 , CO et CH_4	CO_2 et CH_4

Une membrane gaz/liquide, placée en amont du μ GC-TCD, permet d'éviter l'arrivée de toutes phases condensées sur le microchromatographe. Une série de 3 analyses de 75 s est réalisée toutes les 10 min durant la fermentation.

II.C.2. Analyse du milieu fermentaire

Après prélèvement dans un tube de 15 mL en polypropylène par la vanne de fond du réacteur, l'échantillon de milieu réactionnel est centrifugé à 4500 tr/min pendant 30 min. Le surnageant est ensuite transféré dans un second tube de 15 mL. Les deux tubes, contenant respectivement culot et surnageant, sont stockés à $-20^\circ C$ jusqu'à analyse.

II.C.2.1. Analyse des métabolites de fermentation

Les échantillons de surnageant sont décongelés et 2 mL sont prélevés et placés dans un microtube de 2 mL en polypropylène. Ce tube est centrifugé à 15000 tr/min pendant 15 min.

II.C.2.1.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est utilisée pour l'analyse des alcools produits par fermentation. Une aliquote de surnageant centrifugé est prélevée et mélangée (50 : 50 volumique) avec une aliquote de solution d'acide trifluoroacétique (TFA) ($3,42 \cdot 10^{-2}$ mol/L) pour un pH final inférieur à 2. Cette solution est ensuite filtrée (diamètre des pores : 0,22 μ m) pour supprimer toutes particules et microorganismes résiduels, et conservée à $4^\circ C$ avant analyse. Si nécessaire, une dilution des échantillons dans la gamme d'étalonnage est réalisée avec de l'eau ultra pure avant le mélange avec le TFA.

II. Matériels et méthodes

L'analyse est effectuée par GC-FID (Agilent Technologies 7890A GC). La colonne chromatographique utilisée est de type DB-FFAP (15 m x 0,1 mm, 0,1 µm), dont la phase est spécifique à l'analyse des composés organiques polaires, comme les alcools. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit fixe de 0,4 mL/min. L'injection (5 µL) est réalisée en mode split (20 : 1), à une température de 220°C. Un gradient de température est appliqué à la colonne chromatographique, débutant avec un palier de 3 min à 70°C, suivi d'une rampe à 10°C/min jusqu'à la température de 200°C (13 min), puis d'un palier final de 4 min à 200°C, soit un temps d'analyse total de 20 min. La détection est réalisée par ionisation de flamme (FID) ; le détecteur est placé à une température de 250°C.

Les molécules analysées en routine par la méthode GC-FID sont l'éthanol et le butanol. L'Annexe 1 donne le détail des informations sur ces molécules.

Cette méthode d'analyse permet la quantification de certains acides organiques (acétate, butyrate, etc.) mais avec une précision inférieure à la méthode par chromatographie liquide présentée dans le paragraphe suivant.

II.C.2.1.2. Analyse par chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est utilisée pour l'analyse des autres métabolites produits par la fermentation. Une aliquote de surnageant centrifugé est filtrée (diamètre des pores : 0,22 µm) pour supprimer toutes particules et microorganismes résiduels, et conservée à 4°C avant analyse.

Le chromatographe (Agilent Technologies 1260 Series) couplé à la détection UV/visible est utilisé avec une colonne chromatographique Agilent Hi-Plex H (7.7 x 300 mm, 8 µm) précédée d'une pré-colonne Hi-Plex H (7.7 x 50 mm). La phase stationnaire Hi-Plex H est spécifique à la séparation des composés polaires comme les alcools et les acides organiques. La séparation chromatographique est réalisée par l'éluion isocratique avec un débit de 0,6 mL/min d'une phase mobile contenant 92% d'une solution de H₂SO₄ à 0,005 mol/L dans l'eau ultra pure et 8% d'acétonitrile (pur à 98%, avec 2% d'eau ultra pure).

La colonne chromatographique est thermostatée à 65°C. La détection est réalisée par spectrométrie UV à 210 nm. La durée de l'analyse est de 50 min.

Les molécules analysées en routine par cette méthode HPLC-UV sont :

- le citrate
- le tartrate
- le pyruvate
- le succinate
- le lactate
- le formiate
- l'acétate
- le propionate
- le butyrate
- l'isovalerate
- le valerate
- le caproate

L'Annexe 2 donne le détail des informations sur ces molécules.

Les molécules suivantes ont également été testées avec cette méthode d'analyse, mais n'ont pas été analysées en routine car elles n'ont pas été identifiées dans les différents échantillons analysés :

- l'oxalate
- le 2-oxoglutarate
- le malate
- le malonate
- le glycolate
- le fumarate
- l'isobutyrate
- le butyraldehyde
- le triméthylacetate
- le 2-méthylbutyrate
- l'heptanoate

II.C. Méthodes analytiques

Un total de 23 composés organiques peuvent donc être identifiés dans les échantillons analysés par HPLC-UV, à l'exception du glycolate et du fumarate, dont les pics coéluent.

II.C.2.2. Analyse des glucides

La quantité totale de glucides présente dans les échantillons est évaluée par dosage colorimétrique. Dans des tubes à essai en verre, une aliquote (1 mL) de surnageant est mélangée avec 2 mL de solution d'anthrone (2 g/L) dans H₂SO₄ concentré (95%). Les tubes sont ensuite chauffés à 80°C pendant 20 min, puis refroidis et conservés dans la glace et à l'obscurité pendant 20 min. Chaque échantillon est ensuite analysé par spectroscopie UV-visible (spectrophotomètre Varian Cary 3) à une longueur d'onde de 625 nm. Une nouvelle courbe d'étalonnage est réalisée avec chaque lot d'échantillons à partir d'une gamme étalon : 0, 10, 20, 40, 60 et 80 ppm de glucose.

Les résultats obtenus sont donnés en équivalent hexose, cette méthode permettant d'obtenir un résultat indépendant de la nature des sucres présents dans l'échantillon : réducteur ou non, simple ou complexe.

L'analyse de la fraction totale de la biomasse (boues de STEP et bourbes) brute donne la concentration totale en glucides, dissouts ou non. La centrifugation des boues permet la séparation du surnageant, contenant les glucides métabolisables de faible masse molaire, et du culot, contenant les glucides de masse molaire plus importante, non soluble, dont la majorité n'est pas métabolisable sans étape d'hydrolyse. La quantification des glucides dissouts est réalisée par l'analyse du surnageant. Une dilution des échantillons de biomasse dans la gamme d'étalonnage est réalisée avec de l'eau déminéralisée avant analyse.

II.C.2.3. Analyse microbiologique

L'analyse microbiologique va permettre de caractériser la diversité bactérienne présente dans le *consortium* microbien lors des tests de fermentation. Dans un premier temps, l'extraction de l'ADN présent dans les échantillons de biomasse et l'analyse par T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), de certains échantillons, a été réalisée en partenariat avec le laboratoire de Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie (GMGM, UMR 7156). Dans un second temps, un séquençage de l'ADN extrait a été réalisé par l'INRA *Transfert Environnement* de Narbonne, dans le but d'identifier les communautés bactériennes en présence, soit par pyroséquençage, soit par séquençage par synthèse Illumina (SBS).

II.C.2.3.1. Extraction de l'ADN

Les culots de centrifugation des échantillons prélevés dans le réacteur sont conservés à -20°C pendant une durée maximale de six mois avant d'être extraits. Des kits commerciaux sont utilisés selon les protocoles recommandés par les fournisseurs.

Dans un premier temps, un échantillon de 400 µL environ de culot est extrait à l'aide du kit E.Z.N.A.® Soil DNA (Omega Bio-Tek) permettant l'obtention de 100 µL de solution d'ADN. La concentration en ADN de cette solution est déterminée par fluorescence grâce au kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Molecular Probes).

II.C.2.3.2. Analyse par T-RFLP - (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

La méthode d'analyse par T-RFLP a été développée en 1997 par Liu et al. [178]. Il s'agit d'une méthode d'empreinte moléculaire. Un schéma simplifié du processus d'analyse est représenté Figure 19. Les principales étapes sont :

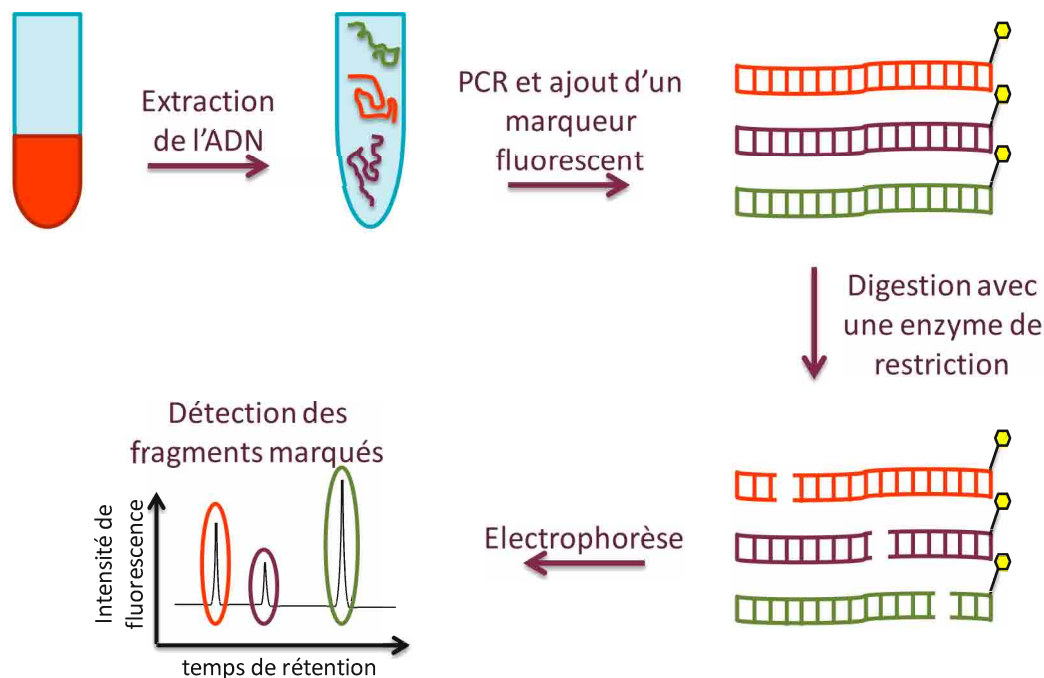


Figure 19. Schéma de principe de la T-RFLP (adapté de [179])

Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplification par PCR permet de cloner et donc d'augmenter le nombre de copies d'une séquence d'ADN déterminée afin de la sur-exprimer (rapport en nombre de séquences initial/final $> 10^6$). Le gène utilisé est celui codant pour l'ARN 16s, universellement présent chez les procaryotes. L'enzyme (Taq polymérase), les amorces initiales et finales du brin d'ADN codé (amorce 27f marquée par le fluorochrome 6-FAM (6-carboxyfluorescine) et amorce 927r) et des nucléotides libres (dNTPs) sont ajoutés à l'extrait d'ADN. La préparation des mélanges PCR (50 μ L) est réalisée en milieu stérile afin d'éliminer les risques de contamination de l'échantillon. L'amplification par PCR comprend plusieurs étapes automatisées par un thermocycleur (Biometra Tgradient) : une pré-dénaturation de 2 min à 95°C, suivie de 20 cycles de dénaturation (30 s à 98°C) - hybridation (30 s à 52°C) - élongation (30 s à 72°C) et une élongation finale à 72°C pendant 2 min. Les échantillons, réalisés en triplicat indépendants, sont ensuite réunis (150 μ L) puis concentrés à environ 30 μ L par évaporation sous vide.

Purification du produit PCR par électrophorèse

Dans le but de purifier les brins d'ADN amplifiés, le produit PCR est purifié sur gel d'agarose (1%) contenant 0,01% de BET (bromure d'éthidium) dans une solution tampon TAE (Tris/Acétate/EDTA). L'électrophorèse sur gel permet la séparation des brins d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. La migration des acides nucléiques, chargés négativement, s'effectue sous l'effet d'un champ électrique de 90 V (pendant environ 60 min). Après migration, l'ADN est révélé sous une lampe UV ; la fluorescence du BET étant 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à un fragment d'ADN. Les bandes d'environ 900 pb (paires de base), correspondantes à la séquence d'ADN amplifiée, sont découpées au scalpel et purifiées grâce au kit GENECLEAN® Turbo (MP).

Digestion de l'ADN

Chaque échantillon d'ADN subi une étape de digestion pendant 16 h à 37°C indépendamment par 2 enzymes de restriction, AluI (AG CT) et HhaI (GC GC). L'enzyme de restriction coupe la séquence d'ADN aux emplacements spécifiques de sa structure ; différents fragments sont donc obtenus en fonction de l'enzyme utilisée. Une purification finale est réalisée avec le kit QIAquick® Nucleotide Removal (Qiagen).

Analyse

Chaque échantillon de fragments digérés est préparé avec le marqueur de taille interne MapMarker® 1000 (BioVentures) marqué par le fluorochrome : ROX (carboxy-X-rhodamine). Pour chaque échantillon initial de biomasse, 2 analyses indépendantes sont ainsi réalisées (AluI/ROX ; HhaI/ROX). Les étapes sont : dénaturation à 95°C pendant 5 min ; refroidissement dans la glace pendant 5 min ; centrifugation à 12000 tr/min à 4°C pendant 15 min.

Les fragments sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire (ABI Prism 3130 XL, Applied Biosystems) et détectés par fluorescence. Seuls les fragments contenant l'amorce 27f marquée 6-FAM sont détectés ainsi que le marqueur de taille (marqué ROX).

Les électrophorégrammes, représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps de rétention, sont traités sur le logiciel Peak Scanner™ V1.0 qui permet de corréler le temps de rétention à la taille des fragments détectés. Les tailles des fragments sont ensuite corrigées afin de prendre en compte le changement de masse moléculaire dû aux fluorochromes (6-FAM / ROX). Cette méthode n'est pas quantitative et les hauteurs de pics obtenues peuvent varier de manière importante (facteur > 10). Afin de comparer ces pics dans une gamme fixe, leurs hauteurs sont normalisées par rapport à celle du pic majoritaire de chaque électrophorégramme. Les combinaisons de tailles de fragments obtenues sont comparées à une base de données afin de déterminer la ou les correspondances microbiologiques les plus proches de l'échantillon. La base de données utilisée dans cette étude est issue du site trfip.info [180] et comprend la digestion *in silico* de 15000 séquences du gène codant pour l'ARN 16s.

II.C.2.3.3. Analyse par pyroséquençage

Un échantillon de biomasse obtenu pendant un test de fermentation de référence, au maximum de production d'hydrogène (5 h), a été envoyé à INRA *Transfert Environnement* pour être analysé par pyroséquençage Roche 454 (séquenceur : Roche GS FLX+ System, XLR 70 sequencing chemistry).

Le pyroséquençage est une méthode de séquençage de l'ADN mise au point en 1996 par Ronaghi et Nyrén [181]. Le séquençage est réalisé à partir d'un échantillon d'ADN amplifié par PCR. Les séquences déterminées sont comparées à la base de données (Genbank) afin de déterminer l'espèce ou le genre bactérien le plus proche (> 97% d'homologie).

II.C.2.3.4. Analyse par séquençage par synthèse Illumina (SBS)

Une série d'échantillons de biomasse obtenus pendant les tests de fermentation a été envoyée à INRA *Transfert Environnement* pour être analysé par séquençage haut débit utilisant la technologie de séquençage par synthèse ou SBS (*sequencing by synthesis*) (séquenceur : MiSeq - Illumina).

II. Matériels et méthodes

La technologie SBS est une méthode de séquençage de l'ADN mise au point par Balasubramanian et Klenermanen à partir de la fin des années 90, commercialisée pour la première fois en 2006 [182]. Le séquençage est réalisé à partir d'un échantillon d'ADN amplifié par PCR.

Les séquences présentant 100% d'homologie sont regroupées en séquences uniques, puis en OTU (*operational taxonomic unit*) ou phylotype, qui regroupe les séquences ayant au moins 97% d'homologie entre elles. La séquence représentative de l'OTU, qui sera utilisée pour l'identification de l'espèce bactérienne, est la séquence qui présente une distance minimale entre elle et les autres séquences de l'OTU. L'identification a été réalisée sur la base de la taxonomie SILVA (version 119) pour les bactéries.

A partir de la répartition des séquences individuelles parmi les différents OTU, un indice de diversité peut être calculé, l'indice de Simpson, λ , [1] [183].

$$\lambda = \sum_{i=0}^n p^2 \quad \{1\}$$

Cet indice mesure la probabilité que deux séquences sélectionnées au hasard appartiennent à un même OTU, le maximum théorique de diversité, avec un nombre d'OTU représenté tendant vers l'infini, étant indiqué par une valeur tendant vers zéro. Pour un nombre fini d'OTU, n , représenté parmi les séquences analysées, l'indice de Simpson minimal est de $1/n$. A l'opposé, le minimum de diversité, soit un seul type d'OTU représenté, conduira à l'indice de Simpson maximal de 1.

II.D. Critères de performances

Plusieurs critères de performances sont utilisés dans cette étude pour comparer les résultats obtenus selon divers paramètres ou configurations du bioréacteur, ainsi qu'avec les résultats de la littérature. Lorsque plusieurs réplicats de fermentation sont réalisés, une valeur moyenne du critère de performance est donnée, l'incertitude sur chaque valeur correspondant à l'écart-type sur les réplicats. La liste des tests de fermentation et le nombre de réplicats réalisés dans cette étude est donnée en Annexe 3 pour les tests en mode de fonctionnement semibatch et en Annexe 4 pour les tests en fonctionnement continu.

II.D.1. Production d'hydrogène et de dioxyde de carbone

Les volumes produits d'hydrogène et de dioxyde de carbone, obtenus par l'analyse par $\mu\text{GC-TCD}$, permettent directement d'évaluer le potentiel de production. Ce volume de production est rapporté au volume de milieu réactionnel pour pouvoir être objectivement comparé aux résultats obtenus dans d'autres configurations, typiquement en $\text{mL}/L_{\text{milieu}}$. Dans le cas du fonctionnement en continu, la production est évaluée par unité de temps, il s'agit alors de la productivité en hydrogène, typiquement en $\text{mL}/L_{\text{milieu}}/\text{h}$, calculée en moyenne sur une période de temps représentative. Le rapport molaire des deux quantités de gaz produits, H_2/CO_2 , est également évalué.

Pour toutes les configurations utilisées, le rendement en hydrogène produit est calculé par rapport à la quantité de substrat ajouté initialement (RASB) ou au débit continu de substrat (RAC et BRM) ; ce critère de performance est exprimé en $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose ajouté}}$.

La consommation en substrat est estimée par différence entre les concentrations de substrat initiale et finale dans le RASB ou entre le substrat entrant et l'effluent sortant dans le cas du fonctionnement continu. Cette valeur de consommation permet d'accéder au rendement en H_2 par mole d'hexose consommé, $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose consommé}}$.

II.D.2. Modélisation de la production d'hydrogène en réacteur semibatch

Avec les conditions de fermentation en mode RASB, le profil de production cumulée d'hydrogène peut être efficacement modélisé avec l'équation modifiée de Gompertz {2} [184]. Cette modélisation permet d'accéder à la production maximale cumulée d'hydrogène H_{max} (mL_{H₂}/L_{milieu}), la vitesse maximale de production R_{max} (mL_{H₂}/L_{milieu}/h) et au temps de latence λ (h).

$$H = H_{max} \cdot \exp\left(-\exp\left[\frac{R_{max}(\lambda-t) \cdot \exp(1)}{H_{max}} + 1\right]\right) \quad \{2\}$$

La fonction « valeur cible » du logiciel Microsoft Excel a été utilisée pour ajuster le modèle aux données expérimentales.

Les trois paramètres, H_{max} , R_{max} et λ correspondent à trois critères de performance supplémentaires pour le mode de fonctionnement semibatch.

II.D.3. Corrélation des productions d'acétate et de butyrate

Les résultats obtenus par l'analyse par HPLC-UV sont utilisés pour calculer deux rapports molaires. Le rapport molaire de la quantité de butyrate et d'acétate produits pendant la fermentation est appelé B/A. Ce paramètre permet de caractériser le métabolisme suivi par le *consortium* microbien pour la production d'hydrogène, en comparant indirectement les voies de production des deux métabolites (16) et (17).



Ce paramètre peut cependant être faussé par la production d'acétate par d'autres voies métaboliques. L'utilisation d'un second paramètre, le rapport molaire de la quantité d'hydrogène produit divisé par le double de la somme des quantités molaires de butyrate et d'acétate produites, appelé $H_2/2(B+A)$, permet alors de vérifier que le butyrate et l'acétate sont issus des voies coproductrices d'hydrogène (16) et (17), ces deux voies permettant la production de deux moles d'hydrogène pour une mole d'acide. Ce rapport est égal à 1 si seules les voies (16) et (17) sont utilisées pour la production d'acétate et de butyrate.

II.E. Bilan carbone de la fermentation

Les quantités de glucides dosées, de métabolites et la quantité de gaz produit (CO₂) sont prises en compte dans les calculs du bilan carbone. La présence de composés non analysés et non quantifiés dans le milieu, produits ou consommés au cours de la fermentation, est la source majeure d'erreur sur ce résultat. Lors des tests en mode de fonctionnement RASB, le bilan carbone est réalisé entre les étapes après traitement thermique et finale. Dans le cas des tests en fonctionnement continu, une estimation des quantités de glucides solubles et des quantités de métabolites, consommées, produites et extraites du milieu est réalisée à différents temps de prélèvement du milieu réactionnel. Le bilan est alors réalisé par rapport aux quantités consommées et produites au fur et à mesure du test de fermentation.

Dans cette étude, pour chaque test de fermentation présenté, une analyse en ligne des gaz produits est réalisée afin d'évaluer les critères de performances de production d'hydrogène et de

II. Matériels et méthodes

dioxyde de carbone. Pour les tests de fermentation semibatch, RASB, une modélisation de la courbe de production sera systématiquement réalisée afin d'atteindre les critères de performances H_{max} , R_{max} et λ . De plus, une mesure du pH du milieu fermentaire est réalisée en continu pour la plupart des tests de fermentation. En mode de fonctionnement RASB, des échantillons de milieu réactionnel sont prélevés, a minima, à t_0 et après fermentation, afin d'évaluer les quantités de sucres solubles et de métabolites consommés et produits. En mode de fonctionnement continu, des prélèvements réguliers de milieu réactionnel sont réalisés (intervalle minimal de 24 h) et analysés pour avoir un suivi régulier et précis de l'évolution des conditions de fermentation. Ces analyses permettront de réaliser les bilans carbone pour l'ensemble des tests. De plus, pour les échantillons les plus pertinents de l'étude, des analyses microbiologiques seront réalisées afin de déterminer l'impact sur la population bactérienne de certains paramètres critiques.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Les boues de station d'épuration (STEP) issues de la décantation primaire et du traitement biologique des eaux usées sont produites en quantité importante et leur valorisation énergétique par digestion anaérobie porte sur le quart des boues produites en France [89]. Leur potentiel d'utilisation comme *inoculum* de fermentation obscure a également été démontré avec succès [73].

A partir d'un *inoculum* composé de boues de STEP, l'amélioration de la productivité et du rendement en hydrogène doit être réalisée par le choix de conditions favorables au développement de bactéries productrices d'hydrogène, en limitant les voies de consommation de H₂. Différents paramètres ont un rôle clé lors de la fermentation obscure. D'abord, l'origine et le type des boues utilisés (boues primaires, activées, épaissies, digérées) sont primordiaux, les bactéries présentes dans celles-ci allant directement impacter la production ou la consommation d'hydrogène pendant la fermentation [185]. Un prétraitement de cet *inoculum*, par exemple un traitement thermique, est généralement nécessaire pour éliminer les microorganismes méthanogènes et limiter la consommation d'hydrogène. De fortes variations de l'efficacité de la production d'hydrogène ont été observées en fonction de la température du milieu réactionnel pendant la fermentation [97]. Les performances sont directement liées aux conditions de températures optimales des espèces bactériennes productrices d'hydrogène présentes dans le milieu fermentaire, variant typiquement entre mésophile ($\approx 40^{\circ}\text{C}$), thermophile ($\approx 55^{\circ}\text{C}$), voire hyperthermophile ($> 65^{\circ}\text{C}$). Le pH du milieu réactionnel joue également un rôle déterminant, celui-ci devant rester dans la gamme 5,2 - 7,0 ; la gamme 5,5 - 6,0 étant généralement considérée comme optimale [73,108,123]. Dans le cas d'un fonctionnement batch, l'accumulation de métabolites produits dans le milieu réactionnel va progressivement réduire le pH ; l'utilisation d'une quantité de substrat ajustée permet alors d'éviter l'utilisation d'une régulation de pH, la production d'acides étant limitée [73].

Les boues de STEP contenant une grande diversité microbienne initiale, ce sont les conditions opératoires qui permettent l'émergence des espèces les plus adaptées. L'utilisation d'un même *inoculum* permettra donc dans des conditions différentes, le développement d'espèces différentes, celles-ci plus ou moins performantes pour produire de l'hydrogène. Ainsi en fonction des bactéries potentiellement présentes dans l'*inoculum* utilisé, les conditions opératoires optimales (température, pH, alimentation, etc.) de fermentation pourront être différentes.

Dans ce contexte, notre objectif est d'optimiser les paramètres importants du procédé de fermentation, afin de sélectionner les conditions optimales. Ces résultats permettront de situer les performances de notre procédé par rapport à la littérature et seront conservés pour la suite de l'étude comme configuration de référence, constituant le point de départ des étapes d'intensification ultérieures. Etant donné la variabilité des résultats observés dans la littérature, l'objet de ce chapitre est de tester, sur une même étude, les différents *inocula* disponibles en STEP, en réacteur agité semibatch (RASB) ; ce type de réacteur permettant la répétition des tests, grâce à des durées de fonctionnement relativement courtes (≈ 20 h). Ces conditions sont proches de celles utilisées typiquement dans la

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

littérature, avec une spécificité liée à l'extraction des gaz produits par gaz de balayage (N_2), permettant notamment un suivi précis de la production.

L'optimisation du procédé de production d'hydrogène est réalisée par différentes étapes successives :

- Test des *consortia* microbiens sans ajout de substrat modèle pour déterminer le potentiel de ces biomasses à la fois en tant qu'*inocula* et en tant que substrat.
- Test des *consortia* microbiens avec ajout de substrat modèle pour déterminer leur potentiel en tant qu'*inocula*.
- Etude de la composition et de la stabilité de l'*inoculum* microbien sélectionné, sur ses aspects chimique (métabolites) et microbiologique (bactéries).
- Test de la mise en place d'une régulation du pH, permettant de limiter l'acidification du milieu fermentaire.
- Test de la température de fermentation afin de déterminer les conditions optimales de fonctionnement pour cet *inoculum*.
- Suivi de l'évolution de la production de métabolites sur le test de fermentation dont la configuration aura été sélectionnée comme référence. L'analyse microbiologique du *consortium* bactérien présent dans le milieu réactionnel sera réalisée avant et en cours de fermentation, afin de caractériser les espèces bactériennes responsables de la production d'hydrogène.

N.B. : Aucune production de méthane n'a été détectée lors de chacun des tests de fermentation réalisés au cours de cette étude, la production de ce gaz ne sera donc pas discutée.

III.A. *Inocula* microbiens issus de la station d'épuration

Afin de produire de l'hydrogène par fermentation obscure, un *inoculum* doit être placé dans le bioréacteur afin d'apporter le *consortium* microbien. Cet *inoculum* a été prélevé à différents niveaux de la STEP de l'Eurométropole de Strasbourg. Les eaux usées subissent différents traitements, qui peuvent avoir un impact important sur l'activité microbienne et donc influencer sur les performances en production d'hydrogène par fermentation obscure. Afin d'évaluer le *consortium* le plus adéquat, les boues issues de différentes zones de la station ont été testées. L'emplacement de ces différents points sur la ligne de traitement est montré sur le schéma de la Figure 20.

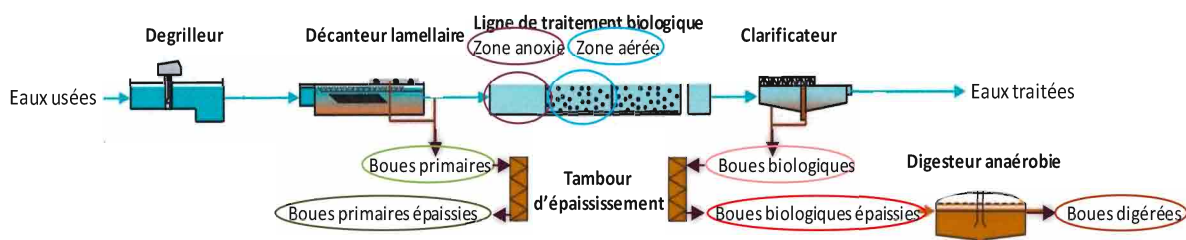


Figure 20. Schéma simplifié du traitement des eaux usées de la station d'épuration avec les points de prélèvements des inocula testés (adapté de [90])

Les boues issues de sept points de prélèvement ont été testées comme *inoculum* dans cette étude :

- les boues primaires, ayant sédimentées dans les décanteurs primaires de la ligne de traitement,
- les boues primaires épaissies, obtenues après floculation par ajout de polymères et passage sur des tambours d'égouttage des boues primaires,

III.A. *Inocula* microbiens issus de la station d'épuration

- les boues activées de la zone anoxie, prélevées sur les bassins de traitements biologiques, correspondant au surnageant des décanteurs primairesensemencés par des boues biologiques,
- les boues activées de la zone aérée, correspondant aux boues précédentes ayant subi une étape d'aération,
- les boues biologiques, obtenues en sortie des bassins de traitements biologiques après clarification dans un décanteur,
- les boues biologiques épaissies, obtenues après floculation par ajout de polymères et passage sur des tambours d'égouttage des boues biologiques,
- les boues digérées, obtenues après digestion anaérobie des boues biologiques épaissies

Les boues biologiques étant utilisées pour le réensemencement continu des bassins de traitement biologique, où sont prélevées les boues activées des zones anoxie et aérée, de faibles variations de performances sont attendues pour ces trois biomasses.

Une première série de tests est réalisée à partir des *boues* sans apport de substrat supplémentaire pour déterminer le potentiel de ces biomasses, à la fois en tant qu'*inoculum* et en tant que substrat. Cinq types de boues ont été utilisés pour cette série de tests :

- les boues primaires,
- les boues primaires épaissies,
- les boues activées de la zone anoxie,
- les boues biologiques épaissies,
- les boues digérées.

Pour cette série de tests, les boues activées de la zone anoxie ont été utilisées comme référence, en tant que boues biologiques non épaissies ; la composition des boues activées de la zone aérée et des boues biologiques étant probablement proche. Les boues issues du premier bassin de traitement biologique ont été sélectionnées car elles présentent probablement la plus forte concentration en matières organiques métabolisables.

Dans une seconde série de tests, réalisée avec l'ajout de substrat modèle (glucose), l'ensemble des *inocula* de la STEP a été testé pour la production d'hydrogène.

Une étude préliminaire a été réalisée, sur les boues activées de la zone anoxie, permettant de mettre en évidence la nécessité de prétraiter thermiquement la biomasse, utilisée comme inoculum microbien. Des tests préliminaires réalisés avec des températures de prétraitement thermique allant de 20°C à 88°C ont montré que le rendement en hydrogène est multiplié par 7 entre le test réalisé sans prétraitement ($0,23 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$) et une température de 70°C ($1,71 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$). La température optimale de 70°C a permis d'obtenir les meilleures performances en quantité d'hydrogène produit. Les bactéries hydrogénotrophes ou concurrentes ne parvenant pas à survivre dans ces conditions de température élevée. La quantité de matière organique disponible pour les bactéries hydrogénogènes est ainsi augmentée, permettant l'augmentation de la production de H_2 . Ce prétraitement thermique sera appliqué systématiquement aux boues en tant qu'étape préliminaire de chaque test de fermentation pour l'ensemble des tests de la thèse.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

NB : Lors de l'utilisation de boues épaissies (boues primaires et biologiques épaissies) ou de boues biologiques digérées, une dilution à 50% V/V dans l'eau du réseau d'eau potable sera réalisée pour réduire la quantité de matières en suspension d'environ 50 g/L à 25 g/L, afin de permettre la mise en œuvre de ces boues dans le bioréacteur agité utilisé dans cette étude.

III.A.1. Tests de fermentation sans apport de substrat

Une première série de tests de fermentation a été réalisée sans l'apport de substrat modèle dans l'objectif d'évaluer le potentiel de production d'hydrogène des différents types de boues de la STEP directement à partir des matières métabolisables présentes dans celles-ci. L'utilisation de boues primaires, ou de boues primaires épaissies n'ayant pas subi l'étape d'activation biologique, est testée pour la concentration potentiellement plus importante en matières métabolisables qu'elles présentent par rapport aux boues activées de la zone anoxie. Celles-ci pourraient alors être mises en œuvre dans un système continu pour produire de l'hydrogène à la fois en tant qu'*inoculum* et alimentation exclusive. De manière similaire, les boues biologiques épaissies, concentrées en matières en suspension, présentent potentiellement une quantité de matières organiques métabolisables importante. Les boues biologiques digérées sont également testées afin d'évaluer la possibilité d'une production d'hydrogène à partir de cette biomasse à l'issue de la digestion anaérobie. Enfin, les boues activées de la zone anoxie ont été utilisées comme référence, en tant que boues biologiques non épaissies.

La Figure 21 présente les profils de production d'hydrogène obtenus avec les différents *inocula* testés, donnant le débit de production d'hydrogène (a) et la quantité d'hydrogène cumulée (b) en fonction du temps. Les profils de production sont assez similaires pour les différents tests et mettent en évidence une production d'hydrogène sur une durée d'une dizaine d'heures hormis pour les boues biologiques issues du digesteur anaérobie (boues digérées) qui présentent une très faible quantité d'hydrogène produit. On observe une similitude entre les profils des tests utilisant les boues primaires et les boues primaires épaissies. Le profil de production des tests utilisant les boues activées de la zone anoxie et les boues biologiques épaissies sont proches. Des temps de latence assez variables sont obtenus, plus courts pour les boues activées de la zone anoxie et les boues biologiques (environ 3,2 h) et plus longs pour les boues primaires, épaissies ou non (supérieurs à 4,5 h). Ceci peut s'expliquer par une activité microbiologique proche ; les boues activées de la zone anoxie provenant d'un bassin de traitement alimenté en boues biologiques. En revanche, on notera que ces temps de latence sont tous plus courts que ceux pouvant être observés dans la littérature pour la production d'hydrogène à partir de boues de STEP comme seule source de substrat, variant entre 8 h et 35 h [186–189].

L'utilisation des boues biologiques digérées ne permet pas, en revanche, de produire efficacement de l'hydrogène. Ceci étant certainement dû à la consommation quasi-totale de la matière organique métabolisable pendant la phase de digestion anaérobie pour la production de biogaz ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$).

III.A. Inocula microbiens issus de la station d'épuration

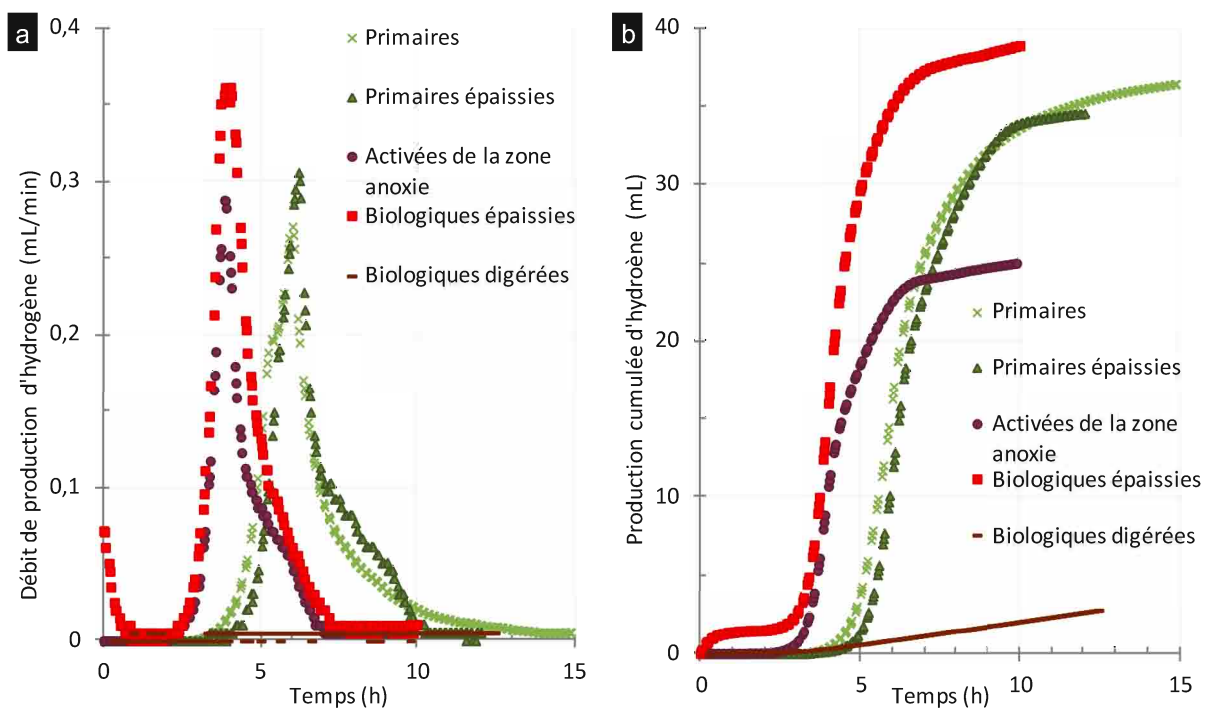


Figure 21. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différents inocula sans apport de substrat additionnel

Tests de fermentation réalisés à partir de différents inocula en RASB (1,0 L) ; volume d'inoculum de 0,8 L ; température de fermentation de 38°C ; aucun substrat additionnel ; débit de gaz de balayage (N_2) de 65 mL/min/ L_{milieu}

Les résultats présentés dans le Tableau 5 montrent que les volumes de production d'hydrogène sont du même ordre de grandeur pour les échantillons hormis pour les boues digérées, et non corrélés à la quantité de matières en suspension (MES), en particulier dans le cas des boues primaires et primaires épaissies qui produisent un volume d'hydrogène équivalent (respectivement 49 et 48 mL/ L_{milieu}) pour des concentrations en MES variant de 10 à environ 25 g/L. Les rendements en hydrogène calculés, en mole de H_2 par mole d'hexose, dans cette série de tests sans apport de substrat additionnel, sont non significatifs et très largement supérieurs au rendement maximal *in vivo* de 4 mol H_2 /mol $_{hexose}$, explicable par une consommation de matières organiques métabolisables autres que les glucides solubles, dans un milieu relativement pauvre en hexoses. En effet, le rendement en hydrogène est calculé à partir des résultats de dosage des glucides solubles (moles d'hexose consommés), or une part importante de l'hydrogène est produite à partir de matières métabolisables non dosées, expliquant les rendements élevés obtenus par mole d'hexose consommé. Un rendement affiché en mole d'hydrogène par gramme de DCO (demande chimique en oxygène) serait plus adapté.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 5. Valeurs des MES, des volumes produits de H_2 et de CO_2 , du rendement en H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose en fonction de l'inoculum sans apport de substrat additionnel

Type de boues	MES* (g/L)	Volume de H_2 produit (mL H_2 /L $_{milieu}$)	Volume de CO_2 produit (mL $_{CO_2}$ /L $_{milieu}$)	Rendement (mol $_{H_2}$ /mol $_{hexose}$ consommé)	H_{max} (mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$)	R_{max} (mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h)	λ (h)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
Primaires	10	48,9	182	n.a.	45,7	14,0	4,6	0,27	n.a.	n.a.	n.a.
Primaires épaissies	≈ 25	48,3	286	8,9	45,1	16,3	5,1	0,17	0,15	0,03	35,3
Activées de la zone anoxie	5	37,1	178	82,5	31,4	14,1	3,2	0,21	0,08	0,08	17,8
Biologiques épaissies	26	54,2	646	30,0	49,7	23,8	3,2	0,08	0,12	0,04	12,2
Biologiques digérées	≈ 25	4,7	328	n.s.	profil non modélisable			0,01	0,51	0,01	n.s.

n.a. : non analysé

n.s. : non significatif

* MES dans le milieu de fermentation, après dilution des boues épaissies et digérées à 50% V/V dans l'eau

On note que malgré une concentration initiale, mesurée en glucides solubles, deux fois plus importante dans les boues digérées par rapport à celle des boues activées de la zone anoxie (0,37 contre 0,17 mmol $_{hexose}$ /L $_{milieu}$), la production d'hydrogène est faible, mettant en évidence que sans apport de substrat, les bactéries productrices d'hydrogène ont peu de glucides directement métabolisables à disposition dans le milieu. La consommation d'autres matières métabolisables (protéines, matières complexes hydrolysées, etc.) est alors potentiellement très importante en proportion. Dans le cas des boues biologiques digérées, ces matières métabolisables ont été consommées pendant la phase de digestion anaérobie, le milieu est donc globalement plus pauvre en matières métabolisables que celui des autres types de boues. Pour les boues biologiques digérées, on peut également avancer l'argument de l'adaptation du *consortium* microbien aux conditions de fonctionnement du digesteur anaérobie, avec une limitation importante de la population en microorganismes hydrogénéogènes. Enfin, dans les conditions de fermentation obscure et après inhibition des bactéries hydrogénéotrophes par le traitement thermique, l'activité de ces boues est alors très limitée.

A l'exception de celui obtenu pour les boues digérées, les profils de production d'hydrogène obtenus lors de cette série de tests sont compatibles avec le modèle modifié de Gompertz [184], permettant d'accéder à la production maximale cumulée d'hydrogène H_{max} , exprimée en mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$, la vitesse maximale de production R_{max} en mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h et au temps de latence λ en heure. Les valeurs de H_{max} sont systématiquement inférieures, mais proches du volume total d' H_2 produit mesuré expérimentalement, ce qui permet de valider l'utilisation de ce modèle dans le cas actuel. Des productivités, R_{max} , assez élevées sont observées, entre 14 et 24 mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h par rapport aux résultats de l'étude de Xiao et Liu [186] obtenant un maximum de 12,3 mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h avec l'utilisation de boues activées de la zone aérée traitée thermiquement (121°C / 30 min). De même, à partir de boues biologiques épaissies de STEP et d'un *inoculum* cultivé issus d'un bioréacteur anaérobie, Wang *et al.* [187] obtiennent, en mode de fonctionnement batch, une productivité de 13,3 mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h.

La productivité maximale est obtenue pour le test de fermentation utilisant les boues primaires épaissies avec 24 mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h, ce qui représente une augmentation de 60% par rapport aux autres *inocula*. Il est possible que cette amélioration de la vitesse de métabolisation du substrat initial

III.A. *Inocula* microbiens issus de la station d'épuration

disponible soit liée à une quantité plus importante de microorganismes dans cet *inocula*, quantité liée à la quantité de MES présentes dans le milieu, qui est élevée (26 g/L). En revanche, les MES présentes dans les boues primaires étant de types différents, la quantité de microorganismes dans ces boues n'est pas corrélée à celle des matières en suspension.

Les principales voies métaboliques de production d'hydrogène sont la voie acétate (16), qui permet la production de 4 moles de H₂ par mole d'hexose, et la voie butyrate (17) qui ne permet de produire que 2 mol_{H₂}/mol_{hexose}.



Ces deux voies produisent 2 moles de CO₂ par mole d'hexose, mais la production d'autres métabolites secondaires non désirés comme l'éthanol, le succinate ou l'acétone peuvent conduire à une production de dioxyde de carbone importante. Le rapport molaire des gaz produits H₂/CO₂ permet alors de caractériser un métabolisme et de comparer son efficacité avec d'autres conditions.

La valeur des rapports molaires H₂/CO₂ de ces différents tests sont faibles et montrent que les boues épaissies produisent des volumes de CO₂ proportionnellement plus importants que les autres boues. Ceci montre que le traitement des boues dans les tambours d'épaississement est favorable au développement de *consortia* microbiens producteurs de CO₂, ce qui peut expliquer les faibles performances de ces *inocula* par rapport à leur forte concentration en MES.

Le rapport molaire de la quantité de butyrate sur celle d'acétate produite pendant la fermentation, appelé B/A, est un paramètre qui permet de caractériser le métabolisme suivi par le *consortium* microbien pour la production d'hydrogène, en comparant indirectement les voies de production de ces deux métabolites (16) et (17). Ce paramètre peut cependant être faussé par la production d'acétate par homoacétogénèse (26) consommant de l'hydrogène et du dioxyde de carbone. La production globale d'hydrogène observée est réduite, tandis que celle d'acétate augmente. Une production directe d'acétate peut également avoir lieu, par acétogénèse homo-fermentaire, directement à partir d'hexose, sans coproduction d'hydrogène ni de dioxyde de carbone (27).



L'utilisation d'un autre paramètre, H₂/2(B+A), permet de vérifier que le butyrate et l'acétate sont issus des voies coproductrices d'hydrogène (16) et (17) ; ces deux voies permettant la production de deux moles d'hydrogène pour une mole d'acide. Ce paramètre est donc le rapport molaire de la quantité d'hydrogène produite sur le double de la somme des quantités d'acétate et butyrate produites : H₂/2(B+A). Ce rapport est égal à 1 si seules les voies (16) et (17) sont utilisées pour la production d'acétate et de butyrate.

Les rapports molaires B/A mesurés lors de ces tests de fonctionnement sont relativement faibles, avec un maximum de 0,51 pour les boues biologiques digérées, ce qui correspond à une forte production d'acétate par rapport à celle de butyrate. Cependant, cette production importante d'acétate n'est pas accompagnée de celle de l'hydrogène, illustrée par les valeurs très faibles du rapport molaire H₂/2(B+A) ce qui permet d'envisager l'hypothèse de la consommation dans le milieu

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

réactionnel de la quasi-totalité de l'hydrogène produit pour la production d'acétate par homoacétogénèse (26).

Les résultats de production de métabolites obtenus pour ces tests de fermentation sont présentés dans le Tableau 6. Dans la liste des métabolites analysés, aucune quantité significative de citrate, tartrate, lactate, caproate et formiate n'a été détectée, ces métabolites n'ont donc pas été représentés dans ce tableau. Le code couleur utilisé permet de mettre en évidence les variations majeures pour chaque type d'*inoculum* utilisé. Les profils observés lors de ces tests de fermentation sont globalement similaires. Les produits majoritairement formés correspondent à l'acétate et au dioxyde de carbone, tandis que le seul métabolite consommé significativement est le propionate. En faible quantité, le valérate n'est détecté que dans le cas du test réalisé avec les boues activées de la zone anoxie et le butanol dans le cas du test avec les boues primaires épaissies. Les quantités faibles de pyruvate, succinate présentes initialement sont consommées au cours de la fermentation.

Tableau 6. Concentrations initiales d'hexose et valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de l'*inoculum* sans apport de substrat additionnel – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

<i>inoculum</i>	hexose initial (mmol /L _{milieu})	Production (mmol/L _{milieu})											
		éthanol	butanol	pyruvate	succinate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
Primaires épaissies	0,64	0,84	0,01	-0,02	< LD	20,03	-10,12	2,11	8,20	< LD	11,89	2,01	-0,23
Activées de la zone anoxie	0,17	0,17	< LD	-0,02	-0,36	10,11	-1,90	0,63	4,10	0,07	7,40	1,54	-0,03
Biologiques épaissies	0,62	0,71	< LD	-0,04	< LD	26,31	-13,87	0,09	4,37	< LD	26,98	2,26	-0,08
Biologiques digérées	0,37	< LD	< LD	0,00	-0,01	4,51	-1,88	2,02	2,76	< LD	13,63	0,19	0,48

La quantité d'acide propionique présente initialement dans les boues épaissies (primaires ou biologiques) est importante et pourrait être utilisée pour la production par acétogénèse d'acétate (28) avec coproduction de trois molécules d'hydrogène, soit une molécule supplémentaire d'H₂ par mole d'acétate produite par rapport à l'utilisation d'hexose comme substrat. Cependant, dans les conditions mises en œuvre, l'hydrogène produit est utilisé par le *consortium* microbien comme agent réducteur, en particulier pour la production d'acétate (26), ce qui pourrait être évité par l'utilisation d'un *inoculum* microbien différent, ou par l'inhibition des voies métaboliques hydrogénotrophes.



Une faible production d'éthanol et l'absence de lactate est notable. En effet, le lactate est typique du métabolisme des bactéries lactiques, consommatrices d'hydrogène, fréquemment présentes dans les cultures mixtes de STEP, même après prétraitement [97]. L'absence de bactéries lactiques et l'inhibition de certaines espèces par un prétraitement thermique [190] expliquent l'absence de production d'acide lactique dans notre étude.

Sans apport de substrat, la consommation des glucides (en équivalent hexose) est faible (< 0,23 mmol/L_{milieu}) et une augmentation de la quantité de glucides dosée dans le milieu fermentaire peut être observée pour le test utilisant les boues biologiques digérées, ce qui peut s'expliquer par une

III.A. *Inocula* microbiens issus de la station d'épuration

étape d'hydrolyse ayant lieu pendant la phase de fermentation, de molécules de polysaccharides complexes (cellulose, amidon, chitine, ...) non détectables lors de l'analyse du milieu réactionnel initial. La dégradation de molécules complexes non détectées lors de l'analyse du milieu initial explique ainsi pourquoi la quantité de matière finale en hexose mesurée est plus importante que l'initiale. Les *consortia* microbiens de boues de STEP contiennent typiquement des bactéries hydrolytiques, qui jouent un rôle important en permettant de fractionner et de solubiliser les molécules de tailles importantes, comme les polysaccharides, les protéines, les substances polymériques extracellulaire (SPE) et les lipides.

La production relativement importante d'acétate par rapport à celle de butyrate et d'hydrogène, confirme l'hypothèse d'une utilisation importante de la voie homoacétogénèse par des bactéries hydrogénotrophes. Une partie de la production d'acétate peut également être expliquée par la voie acétogène homo-fermentaire (27), consommant de la matière organique sans coproduction de gaz [70].

La Figure 22 montre le bilan carbone réalisé entre la composition de l'échantillon initial, après traitement thermique et celle de l'échantillon final à l'issue de la fermentation. De très fortes différences dans les quantités de carbone comptabilisées sont observées, allant jusqu'à de 506% pour le test réalisé avec des boues biologiques digérées comme *inoculum*. Comme décrit précédemment, ceci s'explique par la présence dans le milieu initial de matières organiques métabolisables non détectables (protéines, acides gras, etc.) par les méthodes analytiques utilisées, dans nos conditions. De plus, il est envisageable que certains des métabolites détectés en fin de fermentation soient en fait issus de la dégradation de molécules de taille importante, hydrolysées au cours du test de fermentation. Tous ces éléments font qu'il est difficile de caractériser le métabolisme utilisé par les microorganismes lors de ces tests de fermentation, les molécules utilisées comme substrat n'étant pas connues.

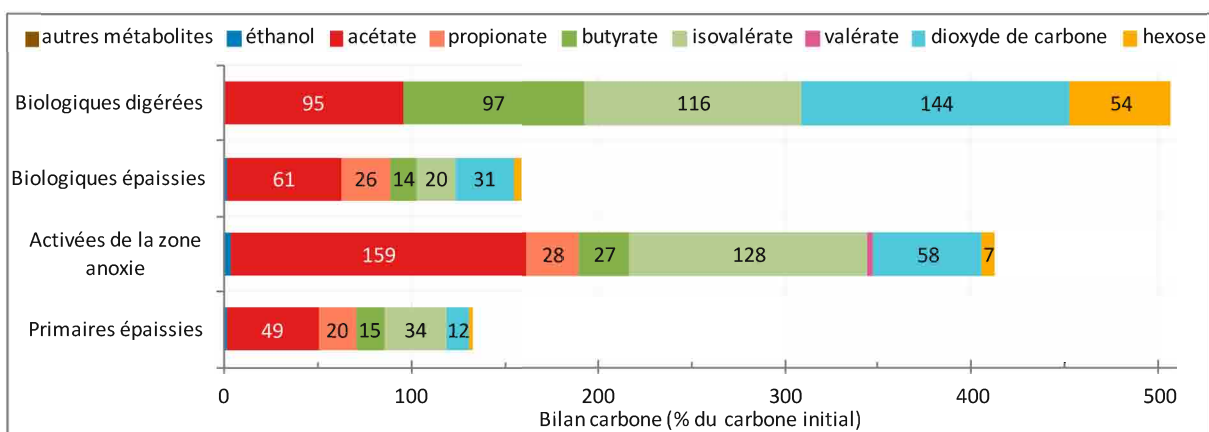


Figure 22. Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone initialement présent dans le milieu réactionnel, exprimé en pourcentage du carbone initial

Les boues primaires semblent les meilleures candidates pour la production d'hydrogène sans substrat, avec minimisation du volume de CO₂ coproduit. Cependant, contrairement aux boues activées de la zone anoxie, la composition des boues primaires est très dépendante de la composition des eaux usées arrivant à la STEP car il n'y a pas d'ensemencement continu du milieu, ce qui implique un risque plus important d'instabilité de l'activité microbologique dans le temps. Il serait également envisageable d'utiliser des boues épaissies comme simple substrat

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

pour l'alimentation d'un consortium plus efficace pour la production d'hydrogène, issu de boues primaires ou de boues activées de la zone anoxie.

Cette première étude exploratoire met en évidence un assez faible potentiel de production d'hydrogène à partir des boues de la station d'épuration sans ajout complémentaire de substrat. Avec un débit liquide d'environ 2700 m³/h sur les lignes de traitements biologiques (relatif aux boues activées de la zone anoxie) de la STEP de Strasbourg, une production d'hydrogène de l'ordre de 100 m³H₂/h pourrait être néanmoins possible. De plus, ces inocula, après traitement thermique, couplés à un effluent plus fortement chargé en matières métabolisables permettrait potentiellement de réaliser une production d'hydrogène plus importante.

III.A.2. Tests de fermentation avec apport de substrat modèle

Afin d'augmenter la quantité totale produite et la productivité en hydrogène, un apport complémentaire de substrat est nécessaire [97]. L'ajout d'un substrat modèle est particulièrement adapté pour cette étude, celui-ci étant directement accessible au métabolisme microbien et ne nécessite pas d'étape d'hydrolyse par rapport à d'autres substrats plus complexes. Le test des *consortia* de la station d'épuration, avec l'ajout de substrat modèle, permettra de déterminer leurs potentiels en tant qu'*inocula* pour la production d'hydrogène, indépendamment de leur teneur en matières organiques métabolisables. Ainsi, la vitesse et le rendement de la production d'hydrogène obtenus pour une quantité fixe de substrat nous permettront de sélectionner le *consortium* le plus adapté pour inoculer le bioréacteur, dans la perspective d'une alimentation continue en substrat.

Les tests présentés dans ce paragraphe ont ainsi été réalisés avec ajout de substrat modèle (glucose $11,2 \pm 0,3$ mmol_{hexose}/L_{milieu}) afin de tester le *consortium* présent dans chaque type de boues pour la production d'hydrogène. Les résultats obtenus pour les boues issues de la zone aérée et les boues biologiques ont été ajoutés à cette étude. **La concentration initiale en équivalent hexose dans le milieu réactionnel est en moyenne de $11,5 \pm 0,3$ mmol_{hexose}/L_{milieu}, cette valeur prenant en compte le substrat présent initialement dans les boues de STEP.**

Le suivi du débit de production d'hydrogène (Figure 23 a) montre des profils de production avec des différences au niveau du débit de production maximal et du temps de latence. Les boues biologiques épaissies donnent la production en hydrogène la plus rapide, avec le débit maximal le plus élevé (près de 6 mL_{H₂}/min). En revanche, dans le cas des boues biologiques digérées, comme cela a été observé sans substrat, un faible débit de production d'hydrogène est observé comparativement aux autres *inocula* microbien, avec un maximum de 1 mL_{H₂}/min, cette valeur étant néanmoins plus élevée que celles obtenues lors des tests réalisés sans apport de substrat, quelque soit l'*inoculum* utilisé. Le volume produit cumulé en hydrogène (Figure 23 b) est systématiquement inférieur dans le cas des boues épaissies par rapport aux boues non épaissies correspondantes. Le volume total d'hydrogène produit avec l'utilisation de boues digérées est le plus faible, avec moins de 200 mL, tandis que tous les autres *inocula* présentent des productions supérieures ou équivalentes à 400 mL d'hydrogène.

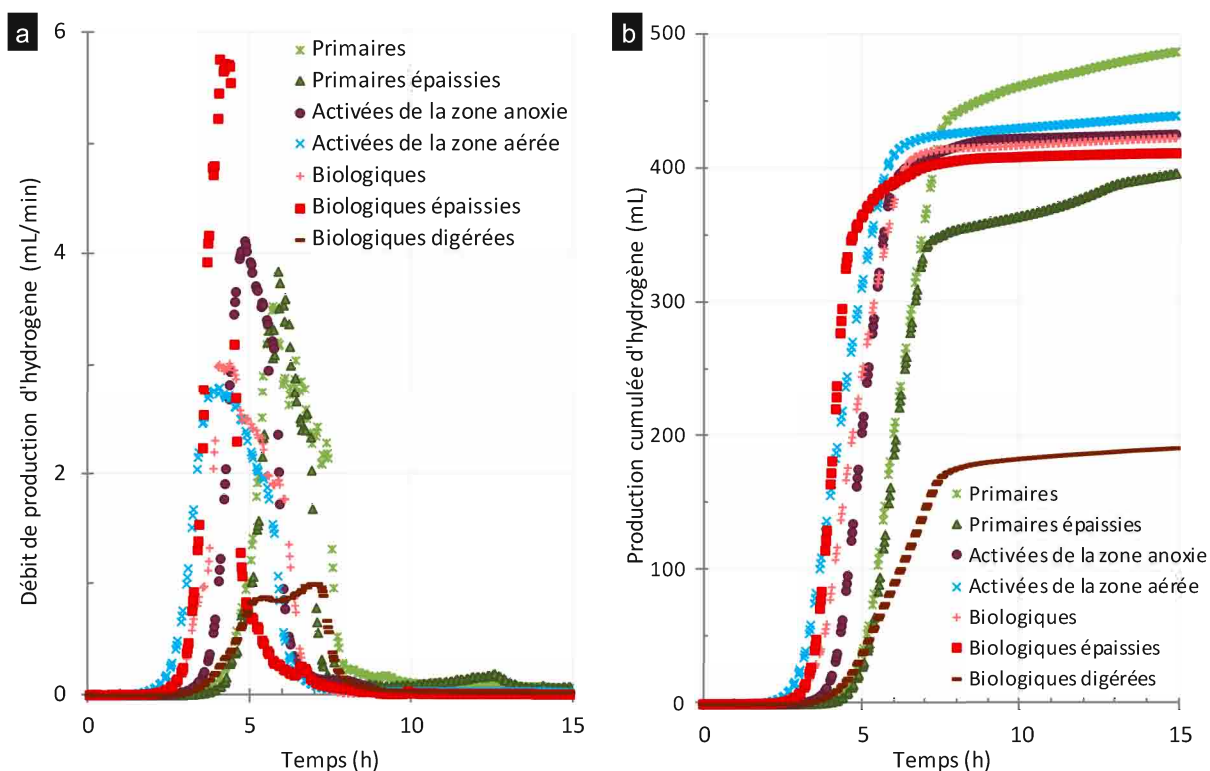


Figure 23. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différents inocula avec apport de substrat modèle

Tests de fermentation réalisés à partir de différents inocula en RASB (1,0 L) ; volume d'inoculum de 0,8 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($11,2 \pm 0,3 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$) ; débit gaz de balayage (N_2) de 65 mL/min/L_{milieu}

Le Tableau 7 montre que les boues primaires permettent d'obtenir le volume d'hydrogène le plus élevé et le meilleur rendement en hydrogène avec $2,40 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$. Les boues activées des zones anoxie et aérée se situent en seconde position avec des résultats très proches autour de $2,1 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$. Quant aux boues biologiques digérées, un rendement plus faible est observé ($0,95 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$). A l'instar des tests réalisés sans apport de substrat additionnel, la quantité de MES présente initialement dans les boues n'est pas corrélée avec la production d'hydrogène, qui dépend plus particulièrement de la quantité initiale de substrat et de la capacité du consortium pour le convertir en H_2 .

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 7. Valeurs des MES, des volumes produits de H₂ et de CO₂, du rendement en H₂, des paramètres H_{max}, R_{max} et λ, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose en fonction de l'inoculum avec apport de substrat modèle

Type de boues	MES* (g/L)	Volume de H ₂ produit (mL _{H2} /L _{milieu})	Volume de CO ₂ produit (mL _{CO2} /L _{milieu})	Rendement (mol _{H2} /mol _{hexose} ajouté)	Rendement (mol _{H2} /mol _{hexose} consommé)	Hmax (mL _{H2} /L _{milieu})	Rmax (mL _{H2} /L _{milieu} /h)	λ (h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
Primaires	19,0	633	742	2,40	n.a.	624	247	5,0	0,85	n.a.	n.a.	n.a.
Primaires épaissies	≈ 25	528	884	1,97	1,96	524	262	5,0	0,60	0,45	0,36	97,2
Activées de la zone anoxie †	4,9 ± 0,5	571 ± 35	664 ± 56	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	567 ± 36	263 ± 81	4,4 ± 0,3	0,86 ± 0,09	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	98,7 ± 0,6
Activées de la zone aérée	4,2	553	604	2,09	n.a.	541	232	3,2	0,91	n.a.	n.a.	n.a.
Biologiques	7,8	532	607	2,01	n.a.	530	240	3,6	0,88	n.a.	n.a.	n.a.
Biologiques épaissies	≈ 25	540	1077	2,03	2,13	539	416	3,5	0,50	0,28	0,39	90,4
Biologiques digérées	≈ 25	254	889	0,95	0,96	248	82	4,5	0,29	0,15	0,24	95,3

n.a. : non analysé

* MES dans le milieu de fermentation, après dilution des boues épaissies et digérées à 50% V/V dans l'eau

† résultats moyens et écarts-types sur 5 réplicats de fermentation

Les valeurs de H_{max} calculées avec le modèle modifié de Gompertz sont proches des valeurs de production d'hydrogène mesurées expérimentalement, ce qui permet de valider ce modèle. Les productivités en hydrogène (R_{max}) sont importantes pour ces tests réalisés avec apport de substrat modèle, par rapport à ceux réalisés sans apports de substrat, avec un facteur d'environ 17 pour chaque inoculum. La disponibilité directe du glucose pour le métabolisme producteur d'hydrogène permet d'expliquer ce résultat, par rapport à l'utilisation de matières organiques complexes, nécessitant un métabolisme plus élaboré.

L'étude de Venkata Mohan *et al.* [191] compare l'utilisation d'un déchet réel complexe composé d'eaux usées industrielles (5,6 g_{Dco}/L/jour) par rapport à un substrat modèle classique composé de glucose et de nutriment (4,8 g_{Dco}/L/jour) dans un réacteur avec alimentation séquencée, avec un seul ajout ponctuel de substrat par jour. Malgré la concentration supérieure en matières métabolisables du substrat complexe, une productivité plus importante a été observée pour le test réalisé avec glucose, respectivement de 30 contre 16 mL_{H2} /L_{milieu} /h, au maximum sur un cycle batch. Il montre également que la durée nécessaire à la métabolisation du substrat est différente, le maximum de production sur un cycle batch étant observé à 2 h pour un test avec substrat simple, et à 10 h pour un test avec substrat complexe. Ces observations confirment l'effet observé dans notre étude et montre que la matière organique métabolisable présente dans l'inoculum de la STEP est complexe.

Les productivités observées sont dans une gamme assez restreinte entre 232 et 263 mL_{H2} /L_{milieu} /h, à l'exception des tests avec boues biologiques épaissies et boues biologiques digérées, qui correspondent aux valeurs hautes et basses avec respectivement 416 et 82 mL_{H2} /L_{milieu} /h.

La valeur élevée de R_{max}, obtenue pour le test réalisé à partir des boues biologiques épaissies, est en moyenne 67% plus importante que pour les autres inocula, ceci corrobore l'hypothèse émise au

III.A. *Inocula* microbiens issus de la station d'épuration

paragraphe III.A.1, quant à la plus grande quantité de bactéries productrices d'hydrogène dans le milieu réactionnel, probablement liée à la matière en suspension concentrée dans cet *inoculum*. Cet effet n'est pas observé avec les boues primaires épaissies car les matières en suspension présentent sont d'une nature différente, issues de la décantation primaire, sans culture microbienne stabilisée par le traitement biologique.

Les rendements obtenus dans notre étude sont tous compris dans la partie supérieure de la gamme observée dans la littérature dont le maximum est $2,4 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ consommé dans l'étude de Lin et Lay [177] (Tableau 8) ; la même valeur étant atteinte dans notre étude lors de l'utilisation de boues primaires. Notre étude présente une production en hydrogène (de 248 à 624 $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}$) inférieure à la plupart des résultats de la littérature (Tableau 8), liée à une quantité initiale de substrat plus faible ($11,5 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$ contre 30 à 90 $\text{mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$). En revanche, cette production est proche de celle obtenue lorsqu'une quantité initiale de substrat équivalente est utilisée. Ainsi, Oh *et al.* [192] avec $15,6 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$ obtiennent une production de 372 $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}$; de même les tests réalisés par Xiao *et al.* [193] avec des quantités de substrat initiales allant de 8,9 à 16,6 $\text{mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$ donnent une production maximale de 407 $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}$. A l'exception de l'étude de Wang et Wan [194] dont la productivité ($1204 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) est quatre fois supérieure au reste de la littérature, un maximum de 271 $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$ est observé dans l'étude de Lin et Lay [177], avec l'utilisation de boues activées. Ceci est cohérent avec nos résultats, l'utilisation de boues biologiques épaissies (boues de type activées) donnant une productivité 54% plus importante que celle-ci.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 8. Recensement d'études portant sur la fermentation obscure à partir d'un consortium microbien issu de boues de station d'épuration, traitées thermiquement, et alimentées avec saccharose ou glucose

Inoculum	Prétraitement	Substrat	Concentration du substrat (mmol/L)	Réacteur (Volume du réacteur)	Volume de fermentation (L_{milieu})	Température de fermentation	pH initial	remarque	Production (ml_{H_2} / L_{milieu})	Productivité ($ml_{H_2} / L_{milieu} / h$)	Temps de latence (h)	Rendement (mol_{H_2} / mol_{hexose} ajouté)	Rendement (mol_{H_2} / mol_{hexose} consommé)	Ref
boues digérées	120 min à 104°C	glucose + nutriments	15,6	bouteille en verre (0,294 L)	0,25	25°C	7,5	/	372	n.i.	≈ 18	1,0	1,0	[192]
boues activées	45 min à 100°C puis acclimatation en RAC	saccharose + nutriments	52,1	bouteille de sérum (0,125 L)	0,060	35°C	7,5	/	1238	132	1,0	1,0	0,8	[100]
boues activées	45 min à 100°C puis acclimatation en RAC	saccharose + nutriments	31,8	bouteille de sérum (0,125 L)	0,060	35°C	6,8	C/N = 40	678	54	n.i.	0,9	1,1	[177]
			n.i. ≈ 52*					C/N = 47	2998	271	n.i.	n.i.	2,4	
boues activées	45 min à 100°C puis acclimatation en RAC	saccharose + nutriments	52,1	bouteille de sérum (0,125 L)	0,060	35°C	6,5	/	2533	53	< 4	2,0	1,7	[98]
boues digérées	20 min d'ébullition	saccharose + nutriments	41,6	bouteille de sérum (0,12 L)	0,040	35°C	7	/	1298	n.i.	< 20	1,3	n.i.	[195]
boues anaérobies	30 min à 100°C	glucose + nutriments	90,6	bouteille de sérum (n.i.)	0,023	35°C	n.i.	/	2189	n.i.	n.i.	1,0	n.i.	[196]
boues activées	30 min à 65°C	glucose + nutriments	55,5	bouteille de sérum (0,32 L)	0,12	37°C	6,7	/	2373	161	6,8	1,8	1,6	[190]
boues digérées									2817	219	9,3	2,1	2,3	
boues biologiques	20 min à 121°C	glucose + nutriments	55,5	Erlenmeyer (0,15 L)	0,10	35°C	6-7	/	1863	n.i.	11	1,4	n.i.	[197]
boues digérées	15 min à 100°C	glucose + nutriments	55,5	bouteille de sérum (0,15 L)	0,10	35°C	7	/	2154	1204	22,6	1,6	n.i.	[194]
boues activées	30 min à 65°C	glucose + nutriments	55,5	bouteille de sérum (0,32 L)	0,14	37°C	7	/	315	30	8,7	0,2	0,6	[185]
boues digérées									1965	56	9,9	1,5	2,2	
boues activées de zone aérée (culot issu du prétraitement)	30 min à 121°C puis centrifugation et lavage du culot	glucose + nutriments	8,9	réacteur (0,3 L)	0,15	37°C	7,8	/	200	n.i.	≈ 10	0,9	0,9	[193]
			13,6						300	n.i.	≈ 10	0,9	0,9	
			16,6						407	n.i.	≈ 10	1,1	1,1	

n.i. : data non indiqué dans l'étude citée

RAC : Réacteur agité continu

* valeur estimée par rapport à la consommation de substrat donnée

III.A. Inocula microbiens issus de la station d'épuration

Concernant le rapport molaire H_2/CO_2 , les résultats obtenus sont quatre fois plus élevés que pour les tests sans apport de substrat additionnel. Cette amélioration, en plus de celle observée pour la productivité grâce à l'ajout de substrat, corrobore le fait que sans apport supplémentaire de substrat, des matières métabolisables autres que les sucres simples sont consommées. L'utilisation de boues épaissies (primaires et biologiques) engendre systématiquement un rapport H_2/CO_2 inférieur à ceux des autres *inocula*, avec une baisse de 30 à 40% respectivement par rapport aux boues non épaissies correspondantes. Comme cela a été observé au paragraphe III.A.1, ces résultats montrent l'effet défavorable de l'étape d'épaississement des boues sur l'orientation des voies métaboliques ou sur la composition du *consortium* microbien lui-même. Comme pour les tests de fermentation sans substrat, les valeurs obtenues pour le rapport B/A, ne sont pas corrélées avec celles du rapport H_2/CO_2 si la seule voie de production d'acétate envisagée est la voie (16), puisqu'elle permettrait d'obtenir un rapport H_2/CO_2 élevé de 2, tandis que la voie de production de butyrate (17) permet au maximum un rapport H_2/CO_2 de 1. Ceci s'explique par les variations du rapport molaire $H_2/2(B+A)$, le plus élevé (0,66) pour le test utilisant les boues activées de la zone anoxie comme *inoculum*, tandis qu'il est réduit à environ 0,37 pour les tests utilisant les boues épaissies (primaires et biologiques), et jusqu'à 0,24 pour le test réalisé avec des boues digérées. Ainsi, bien que la quantité d'acétate produite soit plus importante pour les tests réalisés avec les boues biologiques épaissies (22,2 mmol/L_{milieu}) que pour les boues activées (zone anoxie) (9,6 mmol/L_{milieu}), la quantité d'hydrogène produite par la voie acétate (16) est réduite, l'acétate étant également produit par homoacétogénèse (26), avec consommation de l'hydrogène.



Quel que soit l'*inoculum* utilisé, l'ajout de substrat a permis d'obtenir un rendement et une productivité améliorés par rapport à ceux obtenus lors de l'étude réalisée sans apport de substrat supplémentaire. Malgré le rendement supérieur obtenu avec les boues primaires, il semble plus intéressant d'utiliser des boues issues des lignes de traitement biologiques, au potentiel de production légèrement plus faible, mais issues d'un bassin réensemencé en continu et donc plus stable pour une utilisation sur le long terme avec une bonne reproductibilité. L'utilisation des boues biologiques épaissies, permettant d'obtenir la productivité maximale, est peu intéressante, la coproduction de dioxyde de carbone coproduite étant très importante.

Avec les boues digérées, la quantité d'hydrogène produite est réduite de plus de la moitié et la quantité de dioxyde de carbone produit augmente d'environ 30% par rapport aux boues biologiques non épaissies, ce qui tend à confirmer l'hypothèse, réalisée au paragraphe III.A.1, d'une sélection d'un *consortium* méthanogène pendant la phase de digestion anaérobie au détriment du *consortium* producteur d'hydrogène. Aucune production de méthane n'est cependant détectée, le traitement thermique ayant supprimé l'activité des microorganismes méthanogènes lors du test.

Les résultats de production de métabolites (Tableau 9) montrent que la consommation du substrat initial est quasi-totale (> 95%), quelque soit l'*inoculum* utilisé (substrat initial: $11,5 \pm 0,3$ mmol_{hexose}/L_{milieu}). Pour l'ensemble des échantillons, les principaux métabolites produits sont l'acétate, le butyrate, le CO_2 et l' H_2 , ainsi que l'éthanol et l'isovalérate en plus faible quantité. Comme pour les tests sans apport de substrat, aucune quantité significative de citrate, tartrate, lactate et formiate n'est

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

détectée. Les quantités produites de valérate et butanol sont faibles. De même les quantités faible de pyruvate, succinate présentent initialement sont consommées au cours de la fermentation. Pour les tests avec les boues épaissies les quantités d'acétate produites sont plus élevées tandis que les quantités de butyrate produites sont plus faibles, expliquant l'évolution du rapport molaire B/A. Ces variations, bien que permettant globalement une augmentation de la quantité cumulée de butyrate et d'acétate ne résultent pas en l'augmentation de la production d'hydrogène, qui reste stable autour de 22 mmol/L_{milieu}, et est même réduite à 10,5 mmol/L_{milieu} pour le test avec boues digérées. En revanche, ces tests présentent une augmentation importante, d'au minimum 33%, de la production de dioxyde de carbone par rapport au test utilisant les boues activées de la zone anoxie. Plusieurs hypothèses semblent pouvoir expliquer ces variations, l'explication pouvant dépendre de l'inoculum initial.

Tableau 9. Valeurs de production des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de l'inoculum avec apport de substrat modèle – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

inoculum	Production (mmol/L _{milieu})											
	éthanol	butanol	pyruvate	succinate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
Primaires épaissies	0,58	0,07	-0,02	0,00	15,95	-5,83	7,71	1,56	0,00	36,74	21,95	-11,20
Activées de la zone anoxie	1,75	0,07	-0,01	-0,13	9,17	1,44	9,03	1,04	1,15	27,60	23,73	-11,33
Biologiques épaissies	2,44	0,08	-0,04	0,00	22,15	-15,33	3,27	2,63	0,32	44,70	22,40	-10,53
Biologiques digérées	0,58	0,04	0,00	-0,01	19,34	-0,30	2,55	3,99	0,00	36,94	10,54	-10,98

P.S. : Les échantillons de biomasses prélevés lors des tests avec boues primaires et boues activées de la zone aérée n'ont pas été analysés par GC-FID ou HPLC-UV, car ces tests de fermentation préliminaires ont été réalisés avant la mise au point des méthodes d'analyses et du protocole de stockage des échantillons.

La consommation de propionate, importante pour les tests avec boues primaires et biologiques épaissies, permet par acétogénèse la production d'acétate avec trois molécules d'hydrogène, soit une molécule supplémentaire d'H₂ par mole d'acétate produite (28), pouvant ensuite être reconsumée pour la production d'acétate par homoacétogénèse (26).



L'explication principale de cette distribution de métabolites semble ainsi être liée à la production d'acétate par acétogénèse homo-fermentaire (27) et homoacétogénèse (26), limitant la production d'hydrogène par la voie acétate, et réduisant la quantité d'hydrogène produit par la voie butyrate et la consommation du propionate. La quantité importante de dioxyde de carbone produit corrobore cette hypothèse puisque la voie d'homoacétogénèse ne consomme que deux moles de CO₂ pour quatre moles de H₂.



Les résultats obtenus pour l'établissement du bilan carbone (Figure 24) sur ces tests de fermentation sont intéressants. Les bilans carbone sont surévalués pour les tests réalisés à partir des

III.A. Inocula microbiens issus de la station d'épuration

boues activées de la zone anoxie et des boues biologiques digérées, indiquant bien la présence dans le milieu de matières organiques métabolisables, non détectées par nos méthodes analytiques, mais permettant la production de molécules organiques analysables. L'hypothèse émise selon laquelle une partie de la production est issue de la dégradation de molécules organiques complexes, semble donc confirmée.

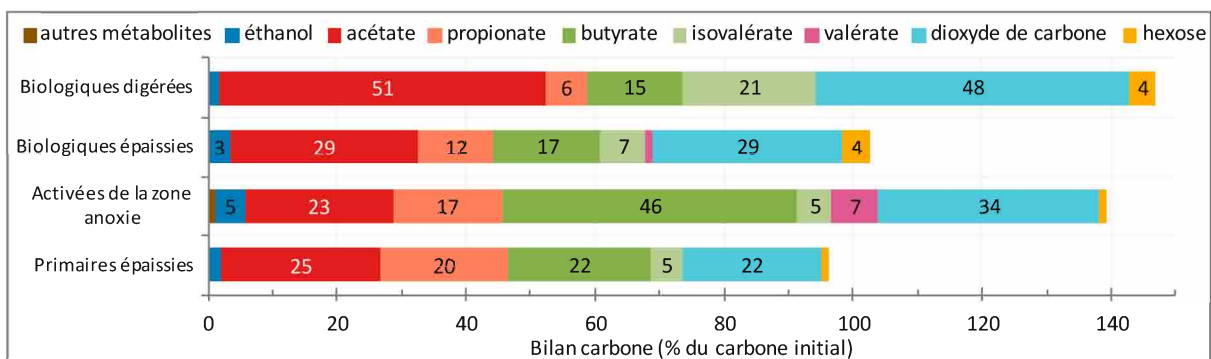


Figure 24. Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone initialement présent dans le milieu réactionnel, exprimé en pourcentage du carbone initial

Les quantités initiales de métabolites dans le milieu réactionnel étant différentes, la quantité initiale de carbone varie en fonction du type de boues utilisées, en particulier en ce qui concerne le propionate qui ne représente que 12% du carbone initial des boues de la zone anoxie, mais représente 42% du carbone des boues biologiques épaissies. Ainsi, bien qu'une consommation importante de propionate ait été observée lors de ce test, le pourcentage du carbone initial dû à ce métabolite reste important avec 12%.

En comparant la production de métabolites par rapport à la production d'hydrogène, pour 21 substrats complexes différents alimentant des cultures mixtes issues d'un digesteur anaérobie, Guo [198] a pu observer une forte corrélation de la quantité d'hydrogène produite avec celle de butyrate. Dans notre étude, parmi les échantillons analysés, ce sont les boues de la zone anoxie qui présente la plus forte production de butyrate, accompagnée de celle d'hydrogène, ces boues sont donc particulièrement adaptées au procédé de production de H₂ par fermentation obscure.

Cette étude a montré l'intérêt de l'utilisation des boues de la station d'épuration de Strasbourg pour la production d'hydrogène par fermentation obscure, en particulier celles issues des lignes de traitements biologiques, issues d'un bassin réensemencé en continu, adapté pour une utilisation sur le long terme. Parmi les boues du traitement biologique, l'utilisation de boues aérées comme inoculum microbien est la moins intéressante car on se place en conditions d'anaérobiose pour réaliser la fermentation obscure. De plus l'étape d'aération, réalisée à la STEP, vise à activer la dégradation des matières organiques métabolisables, sans gain énergétique, alors que celles-ci pourraient être utilisées pour la production d'hydrogène. L'utilisation des boues biologiques épaissies en tant qu'inoculum peut être un bon choix à la vue de la quantité de bactéries présentes dans celles-ci, liée à une concentration en MES plus importante. Cependant, ces concentrations rendent ces boues plus délicates à utiliser dans un système en fonctionnement continu. Les boues du bassin anoxie prélevées après le réensemencement microbien présentent un fort potentiel de production d'hydrogène, avec une coproduction équilibrée de butyrate et d'acétate. Celles-ci ont donc été choisies pour la suite de l'étude.

III.B. Stabilité de l'inoculum microbien issu des boues activées de la zone anoxie et impact du prétraitement thermique des boues

Afin de justifier l'utilisation des boues activées de la zone anoxie comme *inoculum* microbien dans cette étude, l'hypothèse de leur stabilité a été avancée. L'analyse chimique et microbiologique de différents échantillons de boues activées de la zone anoxie, dans leur état initial et après l'application du traitement thermique réalisé avant chaque test de fermentation (1 h 15 min à 70°C) a été réalisée afin de valider cette hypothèse.

III.B.1. Analyse de la composition chimique du milieu

L'analyse chimique des échantillons de boues prélevés dans le bioréacteur avant et après traitement thermiques (noté respectivement AvTT° et ApTT°) a été réalisée par trois méthodes complémentaires : l'analyse des glucides solubles par la méthode à l'antrone, l'analyse des alcools par GC-FID et l'analyse des acides organiques par HPLC-UV.

Avant traitement thermique, la quantité de glucides dosée par colorimétrie est très faible, avec environ $0,01 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$, tandis qu'après le traitement thermique, une quantité de glucides de $0,23 \pm 0,07 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$ est déterminée, soit plus de vingt fois supérieure. Cette augmentation de la concentration en hexose dans le milieu réactionnel semble donc liée à la solubilisation des sucres dans le milieu réactionnel et/ou à la dégradation de molécules organiques complexes en édifices moléculaires plus petits, grâce à l'élévation de la température pendant le traitement thermique ; ces premières molécules n'étant pas quantifiables par la méthode utilisée (dosage à l'antrone). Xiao et Liu [199] ont également observé un phénomène similaire avec le traitement thermique (121°C pendant 30 min) de boues activées de STEP ; la concentration en glucides solubles augmente de $0,04 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$ à $3,24 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$, le même phénomène étant observé sur la concentration en protéines qui augmente très fortement avec un facteur de 45.

L'absence totale d'éthanol et de butanol dans les échantillons de boues AvTT° et ApTT° a été observée par l'analyse par GC-FID. L'analyse du milieu fermentaire avant traitement thermique par HPLC-UV a également montré l'absence de métabolites (Figure 25) classiquement analysés dans ce travail (Annexe 2). En revanche, après traitement thermique, plusieurs composés organiques apparaissent : le propionate et le pyruvate, ainsi que trois composés non-identifiés parmi les 23 composés organiques testés (liste au paragraphe II.C.2.1.2) et dont les aires sont relativement importantes. Le pic ayant un temps de rétention de 13,6 min serait identifiable à l'acide fumarique dont le facteur de réponse est 300 fois plus élevé que celui de l'acide propionique.

III.B. Stabilité de l'inoculum microbien issu des boues activées de la zone anoxie et impact du prétraitement thermique des boues

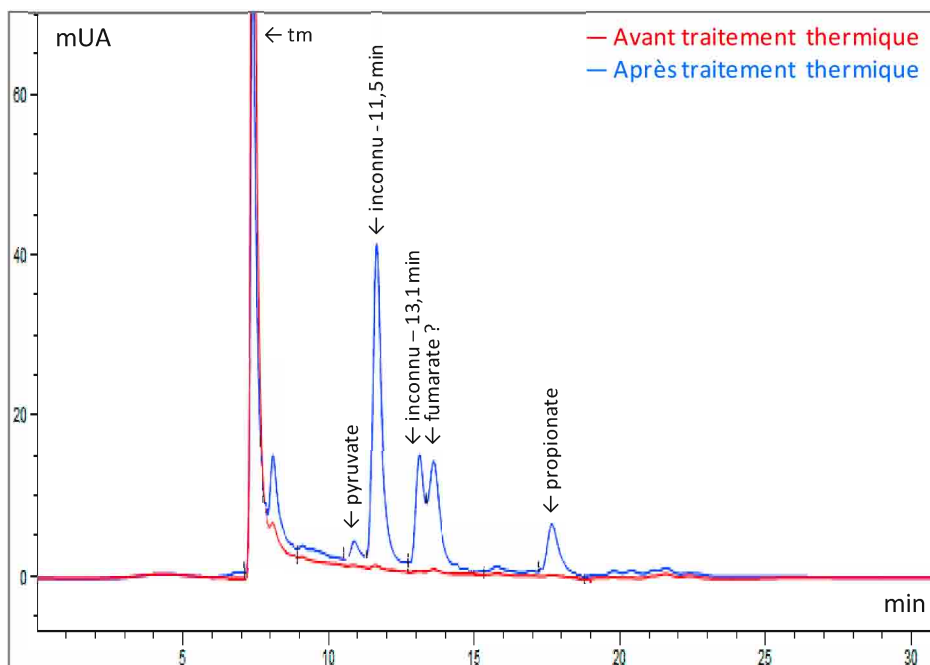


Figure 25 Chromatogramme de HPLC-UV du milieu réactionnel avant et après traitement thermique des boues activées de la zone anoxie – Le pic tm correspond à l'ensemble des composés présents dans l'échantillon, non retenus par la colonne de chromatographie, composés apolaires, alcool, etc. ce pic correspond au temps mort de la méthode.

Ces six métabolites pourraient avoir été produits par les bactéries présentes dans le milieu réactionnel ; cependant, le temps du traitement étant court et la concentration en glucides solubles augmentant également, il semble plus juste de supposer que l'origine de ces métabolites est la dégradation de molécules organiques complexes (protéines, acides gras, etc.).

Yan *et al.* [200] ont montré qu'après 1 h de traitement thermique de boues activées à 60°C, la concentration en enzymes protéases est multipliée par 20, suite à la lyse des cellules bactériennes sensibles à l'augmentation de la température. Cette libération est suivie d'une hydrolyse importante, accélérée par la température élevée ; des protéines présentes dans le milieu réactionnel dont les produits de dégradation pourraient correspondre à ces molécules inconnues.

Une étude de la reproductibilité des résultats obtenus pour l'échantillon ApTT[®] prélevé sur différents tests de fermentation au fur et à mesure de l'avancement des travaux a été réalisée. La Figure 26 présente les résultats normalisés obtenus pour l'aire des différents pics intégrés sur les chromatogrammes des analyses par HPLC-UV pour différents échantillons ApTT[®]. Sur l'ensemble de la période, une variation moyenne inférieure à 30% est obtenue pour l'ensemble des pics étudiés.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

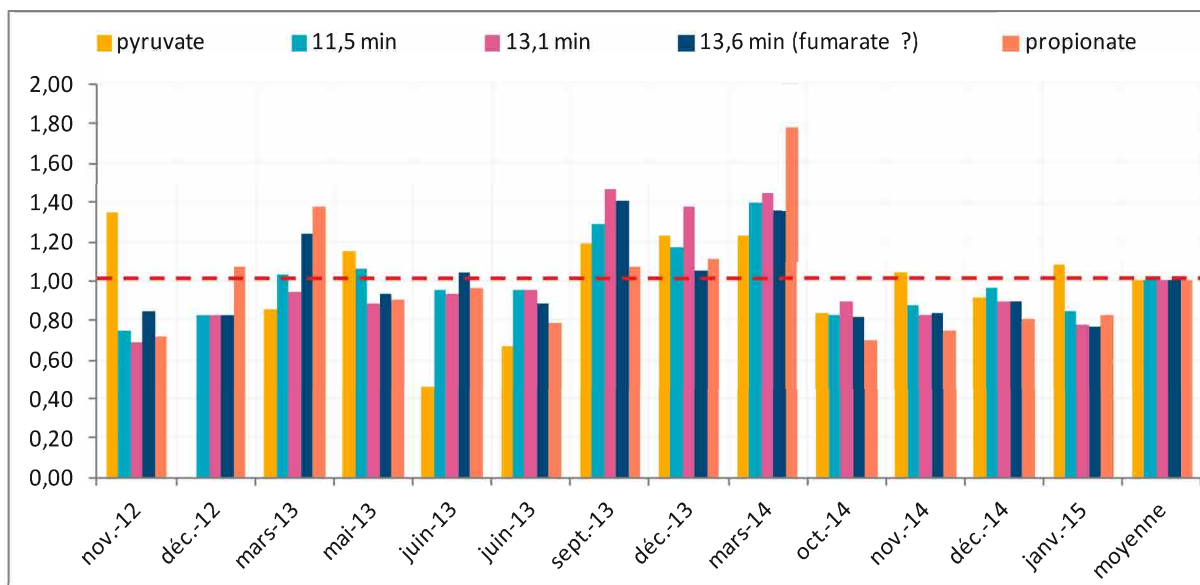


Figure 26. Evolution de la composition des échantillons prélevés dans le milieu réactionnel après traitement thermique sur la période des tests de fermentation présentés – Valeur normalisée par rapport à leur moyenne globale.

Globalement une bonne stabilité de la composition du milieu fermentaire après traitement thermique est observée, ce qui laisse supposer une stabilité similaire dans le bassin de la zone anoxie de la STEP. La suite de ce paragraphe porte sur l'étude de la composition et de la stabilité du consortium bactérien présent dans ces boues activées.

III.B.2. Analyse microbiologique du consortium microbien

Des échantillons de boues activées de la zone anoxie ont été analysés par polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP), dans leur état initial et après l'application du traitement thermique réalisé avant chaque test de fermentation (Figure 27). Cette méthode d'analyse microbiologique permet de recueillir des informations sur la diversité bactérienne par l'obtention d'électrophorégrammes sur lesquels les pics représentent l'abondance relative d'un fragment d'ADN du gène codant pour l'ARN 16s représentatif d'une ou plusieurs espèces bactériennes. En fonction des bactéries présentes dans le milieu réactionnel, les deux enzymes de restriction utilisées (AluI et HhaI) vont conduire à la formation de fragments de taille spécifique, allant par couples AluI - HhaI, pouvant être identifiés dans la base de données de T-RFLP [180].

NB : Les électrophorégrammes représentent l'intensité de fluorescence en fonction de la taille des fragments détectés. La taille des fragments est déterminée informatiquement en fonction du temps de rétention. Ces tailles de fragments sont ensuite corrigées afin de prendre en compte le changement de masse moléculaire dû aux fluorochromes différents dans l'échantillon et dans le marqueur de taille (6-FAM / ROX). Cette méthode n'est pas quantitative et les hauteurs de pic obtenues peuvent varier de manière importante (facteur > 10).

III.B. Stabilité de l'inoculum microbien issu des boues activées de la zone anoxie et impact du prétraitement thermique des boues

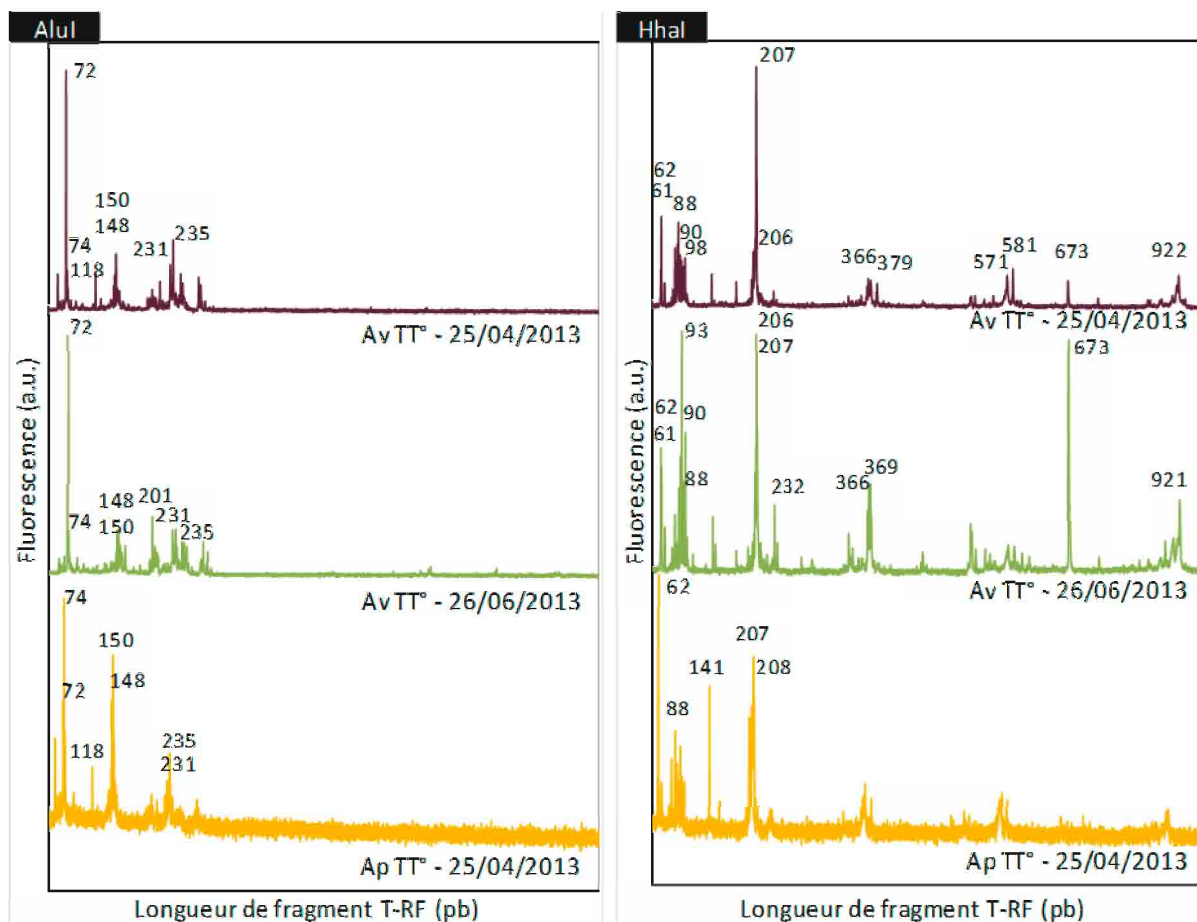


Figure 27. Electrophorogrammes obtenus par T-RFLP pour l'analyse des échantillons de boues activées de la zone anoxie, prélevés dans le bioréacteur avant et après traitement thermique

Pour les deux échantillons AvTT° analysés, issus de prélèvements réalisés à deux mois d'intervalle, on remarque un alignement des deux signaux permettant de confirmer la stabilité microbienne du consortium bactérien, du moins sur cette période de temps. Le nombre important de pics sur ces profils correspond à la présence d'une grande diversité de microorganismes dans les boues activées de la zone anoxie, mais dont l'identification est impossible liée à une trop grande quantité de correspondance dans la base de données [180] et à une multitude de couples de pics Alul - Hhal pouvant être formés. Des pics (Alul : 72, 201 et 235 pb et Hhal : 62, 88, 207 et 673 pb) se dégagent du signal des électrophorogrammes pour les échantillons AvTT°.

Après traitement thermique, on remarque peu de variations et une quantité de pics importante sur le profil de l'électrophorogramme avec conservation d'une grande diversité bactérienne, ce qui s'explique par la relative rapidité du traitement thermique et la très faible teneur en matières métabolisables : aucune croissance bactérienne significative n'a lieu dans le milieu. L'absence de différenciation pour l'analyse par T-RFLP entre les microorganismes vivants ou morts donne un profil à peu près identique à celui observé avant le traitement thermique. La disparition du pic Hhal à 673 pb peut cependant être notée, liée à la lyse rapide d'une espèce bactérienne instable à température élevée.

Après extraction d'ADN, réalisée au laboratoire GMGM (Adaptations et Interactions Microbiennes dans l'Environnement), une analyse par séquençage haut débit a été réalisée par INRA Transfert Environnement sur des échantillons prélevés avant et après le traitement thermique

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

préliminaire à chaque test de fermentation (Tableau 11). L'analyse a été réalisée sur les échantillons issus de deux tests de fermentation réalisés à 18 mois d'intervalle. Le test A a été réalisé le 26/06/2013 en été, tandis que le test B a été réalisé le 13/01/2015 en hiver. La comparaison du profil microbiologique de ces deux échantillons permettra d'évaluer la stabilité du *consortium* bactérien issu des boues activées de la zone anoxie. Les séquences présentant 97% d'homologie entre elles sont regroupées en OTU (operational taxonomic unit) ou phylotypes. Une quantité relativement importante d'OTU a été obtenue après traitement des données : 1305, 1416, 952 et 1084 OTU, respectivement pour les échantillons A-AvTT°, A-ApTT°, B-AvTT° et B-ApTT° (Tableau 10). L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux séquences sélectionnées au hasard appartiennent au même OTU, le maximum de diversité étant indiqué par une valeur nulle, le minimum de diversité par la valeur 1, soit une espèce unique dans le milieu. Les indices de Simpson déterminés pour ces quatre échantillons sont très faibles, systématiquement inférieur à 0,03. Ceci est significatif d'une grande diversité bactérienne dans ces échantillons de boues, avant comme après traitement thermique.

Tableau 10. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, avant et après traitement thermique - nombre d'OTU et indice de Simpson calculés sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
A - AvTT°	1305	0,017
A - ApTT°	1416	0,020
B - AvTT°	952	0,027
B - ApTT°	1084	0,021

III.B. Stabilité de l'inoculum microbien issu des boues activées de la zone anoxie et impact du prétraitement thermique des boues

Tableau 11. Résultats obtenus par séquençage des échantillons de boues activées de la zone anoxie A et B, avant et après traitement thermique - groupes ayant une abondance > 2% pour au moins un des échantillons - un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	A - AVTT°	B - AVTT°	A - ApTT°	B - ApTT°
Bacteroidetes	AKYH767	Fluviicola (100%)	Fluviicola sp.	98	KM052482	0,5	1,0	1,4	2,6
		Terrimonas (100%)	Terrimonas lutea	97	NR_041250	1,5	1,6	1,7	3,6
	Saprospiraceae (100%)	Flavobacterium (100%)	Flavobacterium noncentrifugens	97	NR_109531	2,4	4,3	4,5	4,7
		Halsicomenobacter (99%)	Halsicomenobacter hydrossis	< 97	NR_074420	0,8	0,9	1,0	2,4
		Lewinella (< 97%)	Lewinella spp. (nigricans / marina)	< 97	NR_115013	3,2	2,0	3,3	4,4
Comamonadaceae	Rhodoferax	Rhodoferax	Rhodoferax spp. (ferrireducens / saidenbachensis)	100	/	5,4	4,7	7,8	6,9
		Dechloromonas (100%)	Dechloromonas spp. (hortensis / denitrificans)	97	/	4,9	8,9	1,7	2,4
	Ferribacterium (100%)	Ferribacterium limneticum / Dechloromonas aromatica (genres affiliés)	99	/	1,4	5,5	0,1	0,3	
Rhodocyclaceae	Sulfuritalea	Sulfuritalea	Sulfuritalea hydrogenivorans	100	NR_113147	0,8	0,4	2,7	1,1
		Zoogloea	Zoogloea caeni	100	NR_043795	5,4	7,4	0,6	0,8
Chlorobi	SJA-28 / PHOS-HE36 (100%)	Ignavibacterium / Melioribacter (genres affiliés) (< 97%)	Ignavibacterium album / Melioribacter roseus	< 97	/	1,6	0,5	2,2	1,5
		Haliangium (100%)	Haliangium (ochraceum / tepidum)	< 97	/	6,0	5,2	7,6	7,3
Deltaproteobacteria	Nannocystaceae	Nannocystis (100%)	Nannocystis exedens	< 97	NR_040928	1,9	2,4	1,8	1,9
		Xanthomonadaceae	Dokdonella // Xanthomonas	100	/	2,6	1,9	0,7	0,3

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Les échantillons présentent une gamme importante d'espèces bactériennes, dont peu ressortent en quantité significativement importante. Pour un même traitement bioinformatique des données, les résultats obtenus permettent de confirmer la bonne reproductibilité de l'analyse microbiologique des échantillons de boues utilisés comme *inoculum* bactérien dans cette étude. Malgré une grande diversité, on retrouve les mêmes OTU dans les 4 échantillons analysés.

Le phylum bactérien *Betaproteobacteria* est le plus représentatif dans les échantillons AvTT° avec respectivement 25,5 et 32,8 % des séquences analysées, dont les trois quart des groupes détectés font parties de la famille des *Rhodocyclaceae*, avec les espèces *Dechloromonas spp. (hortensis / denitrificans)* et *Zoogloea caeni* comme principales représentantes. Le phylum *Bacteroidetes* est le second plus important (22,7% en moyenne), avec une variété importante d'espèces bactériennes différentes dont l'espèce *Flavobacterium noncentrifugens* est la plus abondante avec en moyenne 3,4% des séquences. Le troisième phylum majoritairement représenté est celui des *Deltaproteobacteria* (15,9% des séquences en moyenne) qui comprend l'espèce *Haliangium spp. (ochraceum / tepidum)* avec 5,6% en moyenne des séquences analysées dans les échantillons AvTT°.

Après traitement thermique, la diversité bactérienne reste très forte. Aucune disparition ni émergence de groupe ne sont cependant observées parmi les espèces détectées avant traitement thermique. Des variations sont observées entre les échantillons AvTT° et ApTT°, avec des tendances similaires pour les échantillons A et B, avec des proportions relatives de groupes OTU pouvant tripler, et des réductions allant à plus de 80%. Ces variations sont plus importantes que celles attendues après observation des profils de T-RFLP (Figure 27), ce qui n'est pas incompatible puisque l'analyse par T-RFLP donne un indice qualitatif de la diversité bactérienne.

Les OTU correspondant à *Haliangium spp. (ochraceum / tepidum)* ($\approx 7,4\%$) et *Rhodoferax spp. (ferrireducens / saidenbachensis)* ($\approx 7,3\%$) restent les plus représentés, tandis que la proportion moyenne de l'espèce *Zoogloea caeni*, parmi l'ensemble des séquences analysées, chute de 89%. Ces variations dans la distribution bactérienne permettent de discriminer les espèces thermophiles, ou du moins thermo-tolérantes, des espèces ne supportant pas les températures atteintes lors du traitement thermique. Les espèces *R. ferrireducens* et *saidenbachensis* sont des bactéries ayant une température de croissance maximale de 30°C [201,202], ce qui implique qu'il n'y a pas de croissance de ces bactéries pendant la phase de traitement thermique. Ainsi, l'augmentation de la proportion de ces bactéries dans le milieu réactionnel est nécessairement liée à une lyse d'autres espèces bactériennes, réduisant la population globale, et augmentant la proportion apparente de ces bactéries (*R. ferrireducens* et *saidenbachensis*) plus résistantes au traitement thermique. Ceci conforte l'idée que la durée du traitement thermique n'est pas suffisante pour observer des modifications importantes de populations dues à la croissance bactérienne. Il est attendu que les bactéries du genre *Rhodoferax* disparaissent rapidement du milieu réactionnel au cours du test de fermentation qui aura lieu à une température supérieure à 35°C.

Les bactéries du genre *Haliangium* sont des bactéries qui vont permettre l'hydrolyse de substrats complexes comme l'amidon, l'ADN, ou encore la chitine (*H. Ochraceum*) et les cellules de levures ou de bactéries, permettant la simplification des molécules présentes dans le milieu fermentaire et leur disponibilité pour le plus grand nombre d'espèces bactériennes [203]. L'activité de ces bactéries pourrait expliquer, notamment, l'augmentation de la teneur en sucres solubles pendant la phase de traitement thermique. Ces bactéries ont une température de croissance compatible avec les

III.B. Stabilité de l'inoculum microbien issu des boues activées de la zone anoxie et impact du prétraitement thermique des boues

conditions de fonctionnement du bioréacteur et sont capables de former des structures de survie appelées myxospores, pour résister aux conditions de stress, comme lors du traitement thermique. Cependant, le genre *Haliangium* est classé parmi les aérobies obligatoires ; on note en effet que le traitement thermique s'effectue sous atmosphère d'air statique. La présence de ces bactéries en fin de fermentation sera, en revanche, peu probable.

D'autres microorganismes fortement représentés avant traitement thermique ont une proportion relative dans le milieu après traitement thermique fortement réduite, le cas des OTU correspondants à *Dechloromonas (hortensis / denitrificans)* et *Zoogloea caeni* étant les exemples plus représentatifs, avec une baisse moyenne de leur proportion de 70% et 89% respectivement.

Les bactéries *Dechloromonas (hortensis / denitrificans)* sont anaérobies facultatives et leur optimum de développement se situe à 30°C à un pH de 7 [204,205]. Ce sont des bactéries réductrices de chlorate et perchlorate ainsi que de nitrate. La présence et l'action dépolluante de ces bactéries dans les eaux usées dans les boues de STEP est probable. De plus, ces bactéries ne croissent pas à partir du glucose ni de l'hydrogène, mais à partir d'acétate ou de propionate, voire de butyrate (*D. denitrificans*) [204,205], ce qui n'est pas incompatible avec la production d'hydrogène par fermentation obscure. *Zoogloea caeni* est une bactérie mésophile et aérobie facultative, isolée depuis des boues de STEP et liée à la floculation des matières en suspension dans celles-ci [84], par la production de matrice polymérique dont la présence doit limiter en partie l'hydrolyse des matières emprisonnées dans les floccs. Aucune information n'ayant été trouvée sur la résistance de ces bactéries à haute température, il n'est pas possible d'anticiper leur présence pendant la fermentation suite au traitement thermique.

Une majorité de bactéries issues des *phyla Alphaproteobacteria* (47,3%), *Betaproteobacteria* (25,6%) et *Gammaproteobacteria* (11,1%) ont été observées dans un consortium de boues activées de STEP, cultivé en réacteur batch séquencé, par Lu *et al.* [206], avec étapes anaérobie et aérobie permettant le traitement d'eaux usées. Ces trois *phyla* sont également observés dans l'inoculum utilisé dans notre étude, avec cependant des proportions différentes, *Alphaproteobacteria* (5,3%), *Betaproteobacteria* (25,5%) et *Gammaproteobacteria* (6,8%). De plus, d'autres *phyla* y sont présents en quantités relativement importantes, *Bacteroidetes* (21,7%) et *Deltaproteobacteria* (14,7%), indiquant une certaine variabilité dans la composition bactérienne des consortiums de STEP. Cui *et al.* [207] ont comparé la diversité microbienne de trois stations d'épuration municipales, utilisant différentes technologies d'épuration biologique : aérobie/anoxie avec boues activées, canal d'oxydation ou réacteur batch séquencé. Les proportions relatives de chaque *phyla* n'ont pas été déterminées, néanmoins la présence de bactéries communes aux trois stations a été observée, affiliées aux *phyla Gammaproteobacteria* (genre *Pseudomonas*) et *Bacteroidetes* (ordre des *Flavobacteriales*). Concernant la technologie d'épuration aérobie/anoxie avec boues activées, dont le principe est identique à celle utilisée à la STEP de Strasbourg, des bactéries de la famille *Saprospiraceae* et du genre *Nitrospira* (*phylum Nitrospirae*) ont également été observées, résultats concordant avec ceux de notre inoculum initial.

L'analyse microbiologique réalisée par Ren *et al.* [197], par électrophorèse sur gel, avant traitement thermique et après fermentation montre une évolution importante de la diversité bactérienne, les bactéries présentent en quantité importante après fermentation n'étant pas visibles sur les bandes d'électrophorèse en début de fermentation. Ceci s'explique par le traitement thermique

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

appliqué à l'*inoculum* et aux conditions de fermentation particulières, permettant la sélection de certaines bactéries, en particulier celle productrices d'hydrogène. Un tel phénomène de sélection bactérienne est attendu dans notre étude lors de l'analyse des échantillons prélevés en cours et en fin de fermentation. Une quantité très limitée de séquences des espèces du genre *Clostridium sensu stricto*, est observée, avec une proportion de 0,2% des séquences analysées, augmentant à 0,8% après le traitement thermique ; ce genre étant un acteur majeur de la production d'hydrogène par fermentation obscure. Une attention particulière sera portée à ce genre bactérien dans la suite de l'étude.

La forte stabilité des boues activées issues de la zone anoxie de la station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg a été prouvée, tant au niveau chimique que bactérienne, sur plusieurs mois. L'impact du traitement thermique sur le milieu réactionnel a également pu être observé, avec l'extraction de sucres solubles et générant une variabilité plus en termes d'abondance relative qu'en termes d'identité des communautés bactériennes présentes.

III.C. Régulation du pH de fonctionnement

Lors des tests précédents, le pH n'était pas régulé. Cependant, la production d'acides organiques au cours de la fermentation acidifie le milieu réactionnel, ce qui peut avoir un impact négatif sur la production d'hydrogène, en particulier si le pH descend en dessous de 5,0 [125,208,209]. Cette baisse peut être compensée par l'ajout d'une base pour permettre au milieu de conserver un pH optimal pour la production d'hydrogène, fixée ici à 5,5 selon les préconisations observée dans la littérature étudié au paragraphe I.B.4.2. En effet, avec un *inoculum* similaire et en réalisant des tests de fermentation en mode de fonctionnement batch, avec et sans régulation (pH initial à 8,5), Lee *et al.* [210] ont observé une amélioration importante du rendement en hydrogène de 0,87 à 1,49 mol_{H₂}/mol_{hexose} à un pH régulé à 5,5. Dans le but d'améliorer le rendement en hydrogène obtenu dans cette étude, un système de régulation du pH est ajouté au dispositif afin d'injecter une solution basique au milieu réactionnel lorsque le pH descend en dessous d'une valeur de 5,6. Notre choix s'est porté sur une base forte (NaOH) concentrée (3 mol/L) de façon à réguler le pH sans augmenter de façon significative le volume réactionnel et qui puisse être compatible avec une activité microbienne, comme cela est observé dans la littérature [137,140,211].

NB : Les tests de fermentation présentés dans cette étude sur la régulation du pH lors de la fermentation ont été réalisés dans un bioréacteur de 1,5 L, différent de celui de 1,0 L utilisé dans le reste de ce chapitre. Le volume de boues activées de la zone anoxie utilisé comme inoculum est augmenté proportionnellement à l'augmentation du volume du réacteur. La quantité de substrat initial est adaptée au volume du milieu fermentaire, en conservant donc une concentration initiale en hexose proche de 11 mmol_{hexose}/L_{milieu}. La géométrie du bioréacteur étant modifiée, des variations dans les performances de production d'hydrogène, de dioxyde de carbone et des autres métabolites sont probables.

Le profil de production des gaz (H₂ et CO₂) obtenu avec régulation du pH (Figure 28 b) est similaire au profil du test de référence sans régulation du pH (Figure 28 a). La variation de pH observée au cours de ces deux tests est identique jusque 4,5 h, avec la première injection de soude dans le milieu fermentaire. Le profil de pH débute avec une baisse de 7,10 à 6,35 due majoritairement à l'élévation de la température du milieu réactionnel de 20°C à 65°C durant le traitement thermique. L'ajout du substrat et la fermeture du réacteur sont suivis d'une augmentation de pH, qui s'explique par le stripping du dioxyde de carbone par le flux d'azote : la baisse de la concentration en acide

III.C. Régulation du pH de fonctionnement

carbonique dans le milieu réactionnel, confirmée par la diminution progressive de la concentration en CO_2 dans le gaz extrait du bioréacteur, engendre une augmentation du pH. Le début de la production d'hydrogène, accompagnée de la production de CO_2 et d'acides organiques, est responsable de l'inversion de la tendance de la courbe du pH à $\approx 2,5$ h, et jusqu'à la baisse de la production à environ 6 h, avec un pH minimal de 4,6.

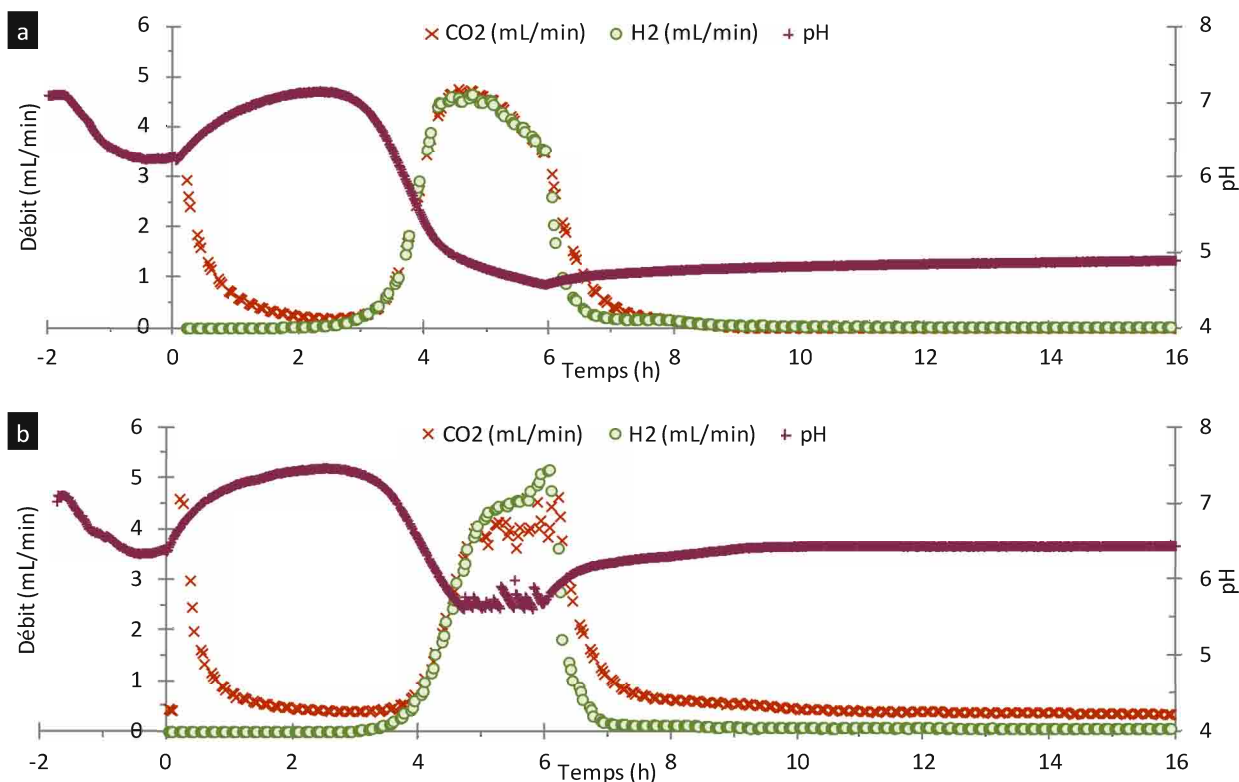


Figure 28. Débit de H_2 et CO_2 et suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps pour les tests sans (a) et avec régulation du pH (b)

Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en RASB (1,5 L) ; volume d'inoculum de 1,2 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($10,9 \pm 0,1 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $171 \text{ mL/min/L}_{\text{milieu}}$

Dans le cas du test avec régulation du pH, l'ajout de soude empêche la baisse du pH en dessous de la valeur de 5,6. Une discontinuité dans le profil de production du dioxyde de carbone peut être observée, ce qui n'était pas le cas sans régulation. En comparant la courbe de suivi du pH avec celle de production de CO_2 , une corrélation apparaît entre les augmentations rapides du pH dues à l'ajout de soude, et les discontinuités dans la production de CO_2 . En effet, lorsque de la soude est ajoutée, le pH augmente et une quantité plus importante d'acide carbonique se dissout dans le milieu réactionnel : globalement la courbe de production de CO_2 stagne au lieu d'augmenter, le CO_2 restant piégé dans le milieu réactionnel. La Figure 29 permet d'observer distinctement l'évolution parallèle du pH régulé et de la production de CO_2 lors d'un test de fermentation en continu, la plus longue durée de fermentation du test en continu permettant de mieux observer le phénomène.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

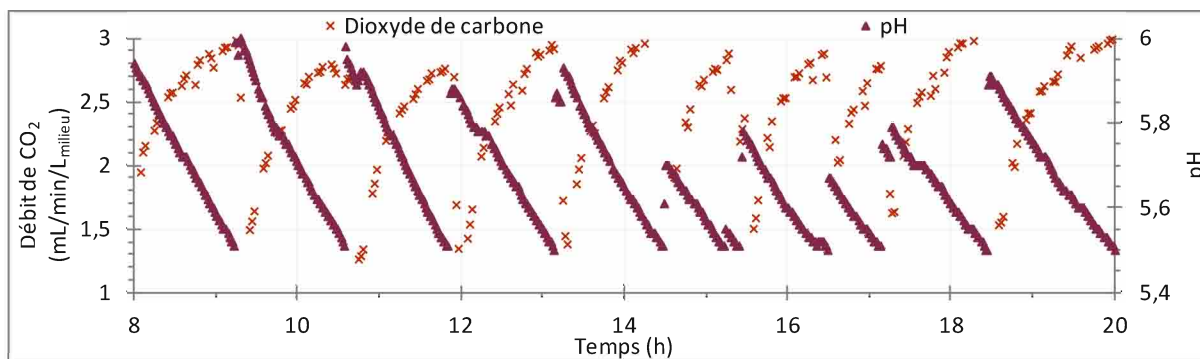


Figure 29. Débit de CO_2 et suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps lors d'un test de fermentation en continu (RAC-a) avec régulation du pH – détail des variations conjointes du pH et de la production de CO_2

Le diagramme de Bjerrum ou « Bjerrum Plot » [212] permet d'observer la relation entre pH et dissociation du dioxyde de carbone CO_2 en acide carbonique, H_2CO_3 , bicarbonate, HCO_3^- , et carbonate, CO_3^{2-} . En solution aqueuse, à 25°C , pour un pH inférieur à 5, l'espèce chimique majoritaire en solution est CO_2 (aq), en équilibre avec H_2CO_3 , ce dernier représentant cependant seulement 0,3 % de la quantité totale de CO_2 en phase aqueuse [212]. La concentration en CO_2 (aq) peut être déterminée par la loi de Henry et est donc directement liée à la pression partielle en CO_2 . En cours de fermentation, la pression partielle en CO_2 est faible, celui-ci étant constamment évacué par le gaz de balayage, la concentration en CO_2 (aq) dans le milieu réactionnel reste donc minimale lorsque le pH reste en dessous de 5, ce qui est le cas lors du test de fermentation sans régulation du pH. En revanche à partir d'un pH de 5,5 la quantité dans le milieu de HCO_3^- devient plus importante, les proportions de H_2CO_3 et HCO_3^- devenant équivalentes à un pH d'environ 6,5. La forme HCO_3^- n'étant pas volatile, la quantité de dioxyde de carbone extraite par le dégazage est plus faible. Or, c'est la forme HCO_3^- qui domine, théoriquement, à la fin du test de fermentation avec régulation du pH, avec un pH final proche de 6,5. Ainsi la quantité finale de dioxyde de carbone présente dans le milieu réactionnel est plus élevée en cas de régulation du pH.

Les paramètres de production obtenus avec ces différentes conditions sont comparés dans le Tableau 12. Un rendement en hydrogène de $1,86 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ a été obtenu avec régulation du pH, ce qui est inférieur à la moyenne des tests obtenus sans régulation de pH ($2,11 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$). De la même façon, le paramètre de production H_{max} est 11% inférieur dans le cas du test avec régulation du pH. Les valeurs de productivité en hydrogène sont quasi-identiques pour les deux configurations avec 268 et $270 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$ au maximum de production. La valeur du rapport H_2/CO_2 est 36% plus faible lorsque la régulation du pH est utilisée avec une production de CO_2 amplifiée de 656 à $914 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}$, auquel doit être ajouté l'acide carbonique potentiellement dissous dans le milieu réactionnel avec un pH final de 6,5 au lieu de 5,0 sans ajout de soude. En revanche, les résultats obtenus pour le rapport B/A, montre une augmentation de la production d'acétate avec l'utilisation de la régulation du pH, ce qui devrait en théorie augmenter la valeur du rapport H_2/CO_2 puisque la voie acétate (16) permet d'atteindre un rapport H_2/CO_2 de 2 tandis que la voie butyrate (17) ne permet qu'un rapport de 1. La diminution du rapport H_2/CO_2 observée, ne s'explique que par l'utilisation d'autres voies métaboliques, coproductrices de dioxyde de carbone plutôt que d'hydrogène, favorisées à pH plus élevé (test avec régulation du pH). La valeur du rapport molaire $\text{H}_2/2(\text{B}+\text{A})$ est plus faible pour le test avec régulation du pH, 0,54 contre 0,75, confirmant qu'une part plus importante des molécules d'acétate est produite par des voies non productrices d'hydrogène.



III.C. Régulation du pH de fonctionnement

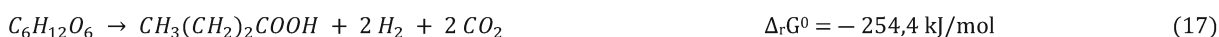


Tableau 12. Valeurs du rendement de H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ pour les tests sans et avec régulation du pH

	VOLUME de H_2 produit (mL_{H_2} / L_{milieu})	VOLUME de CO_2 produit (mL_{CO_2} / L_{milieu})	Rendement (mol_{H_2} / mol_{hexose} ajouté)	Rendement (mol_{H_2} / mol_{hexose} consommé)	H_{max} (mL_{H_2} / L_{milieu})	R_{max} (mL_{H_2} / L_{milieu} / h)	λ (h)	H_2 / CO_2	B/A	H_2 / $2(B+A)$	Hexose consommé (%)
Sans régulation du pH	549	656	2,09	2,11	547	268	3,98	0,84	0,54	0,75	98,0
Avec régulation du pH	497	914	1,89	1,86	491	270	4,49	0,54	0,22	0,54	98,6

L'écart de production en hydrogène (-10%) pour le test avec régulation de pH peut en partie s'expliquer par un pH plus élevé que pour le test sans régulation dont la valeur minimale atteinte est 4,6, valeur pourtant basse par rapport à la gamme optimale observée dans la littérature [125,208,209], mais atteinte en toute fin de production d'hydrogène dans notre test de fermentation, le pH du milieu pendant le reste de la fermentation étant plus proche de 5. Dans ces conditions de fonctionnement, en mode RASB, les performances du *consortium* microbien, issu des boues activées de la zone anoxie, sont optimales sans régulation du pH de fonctionnement, condition qui sera appliquée pour la suite de cette étude.

Ces résultats ne concordent pas avec l'observation réalisée par Lee *et al.* [210], montrant une amélioration de 72% du rendement en hydrogène avec la régulation du pH à 5,5. Cependant, dans leur étude, le milieu réactionnel du test sans régulation du pH était à un pH initial de 8,5, et le pH du test avec régulation était fixé à 5,5. Dans l'étude présente, le pH est régulé au dessus de 5,5, ce qui implique des conditions identiques dans la phase initiale du test de fermentation, comme cela a été observé sur les courbes d'évolution du pH (Figure 28). De plus, le pH initial, à la fermeture du réacteur, est proche de 6,5 soit dans une gamme de pH plus favorable à la production d'hydrogène que le pH de 8,5. Une régulation réelle du pH à 5,5 par ajout d'acide et de base, pendant l'ensemble du test de fermentation, pourrait donc avoir un impact positif sur la production d'hydrogène.

Les résultats de production de métabolites, présentés dans le Tableau 13 montrent que l'utilisation de la régulation de pH a un impact assez limité sur l'activité du *consortium* microbien. Une production 58% plus importante d'acétate est cependant observée lorsque la régulation du pH est utilisée, tandis que celle de butyrate est réduite. La production d'acétate supplémentaire peut être liée à la consommation de propionate qui est légèrement plus importante que pour le test sans régulation de pH. La surproduction de CO_2 avec régulation du pH corrobore en partie cette hypothèse, l'homoacétogénèse consommant plus d'hydrogène que de dioxyde de carbone.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 13. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, pour les tests sans et avec régulation du pH - un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

Production (mmol/L _{milieu})	éthanol	butanol	pyruvate	succinate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
avec régulation du pH	2,43	0,16	-0,02	-0,18	9,89	-1,92	5,18	0,59	0,58	27,30	22,84	-10,84
sans régulation du pH	2,42	0,13	-0,02	-0,33	15,63	-4,87	3,01	0,91	< LD	37,94	20,63	-11,08

Lors des tests réalisés sans régulation du pH, la quantité de substrat initialement introduite dans le bioréacteur est consommée avant qu'une acidification trop importante du milieu réactionnel par la production de métabolites se produise. Les résultats de production étant globalement meilleurs dans ces conditions, les tests suivants en mode RASB ont été réalisés sans régulation du pH du milieu réactionnel.

III.D. Influence de la température de fermentation

La température de fermentation a une influence importante sur la production d'hydrogène [122], cependant à partir d'un consortium microbien mixte, présentant une diversité microbienne très importante, il est nécessaire d'optimiser cette température pour s'assurer d'exploiter pleinement son potentiel de production d'hydrogène ; la température optimale de fermentation pouvant être différente selon l'inoculum utilisé [111,211]. Afin de ne pas altérer les résultats de production par un développement de microorganismes méthanogènes et/ou hydrogénotrophes, la réalisation d'un traitement thermique est particulièrement importante dans cette série de test. Une répartition des températures de fermentation testées avec un pas de 5°C semble suffisante selon les études déjà réalisées dans la littérature sur des cultures mixtes [213], pour obtenir une estimation de la zone adaptée au consortium utilisé.

Dans la littérature, les conditions optimales de fermentation ont été observées pour des températures comprises entre 30°C et 45°C (conditions mésophiles) et au-dessus de 55°C (conditions thermophiles) [214]. Les conditions thermophiles permettent d'optimiser la fermentation en inhibant certaines bactéries hydrogénotrophes, mais le gain de production obtenu est à mettre en opposition avec la consommation d'énergie mise en jeu pour maintenir l'enceinte du bioréacteur à température. C'est pourquoi, dans un souci d'efficacité du procédé, des températures supérieures à 60°C, conditions thermophiles extrêmes n'ont pas été testées, bien que de telles conditions puissent être envisageables pour la production d'hydrogène par fermentation obscure [111,113].

NB : Lorsqu'une température de fermentation plus élevée que 38°C est utilisée, le temps nécessaire pour l'équilibrage de la température de fermentation dans le milieu à la fin du traitement thermique est plus court, la différence de température étant inférieure. Une durée fixe entre la fin du traitement thermique et le t₀ de la fermentation (ajout du substrat) est cependant conservée (30 min) permettant une évaluation plus juste des temps de latence.

III.D.1. Suivi de la production d'hydrogène

Le profil de production d'hydrogène obtenu varie de manière importante avec l'augmentation de la température de fermentation (Figure 30). La température optimale de fermentation observée, correspondant à la production d'hydrogène cumulée la plus élevée, est 38°C. Le décalage de la

III.D. Influence de la température de fermentation

température de fermentation par rapport à cette valeur optimale provoque une baisse de production de 5 et 10% respectivement à 35°C et 44°C (Figure 30 b). Une baisse d'environ deux tiers de la production totale est observée lors de l'augmentation de la température de fermentation de 38°C à 49°C. Cette forte baisse de production peut, en première approche, s'expliquer par le fait que le *consortium* microbien responsable de la production à 38°C reste actif mais est moins efficace.

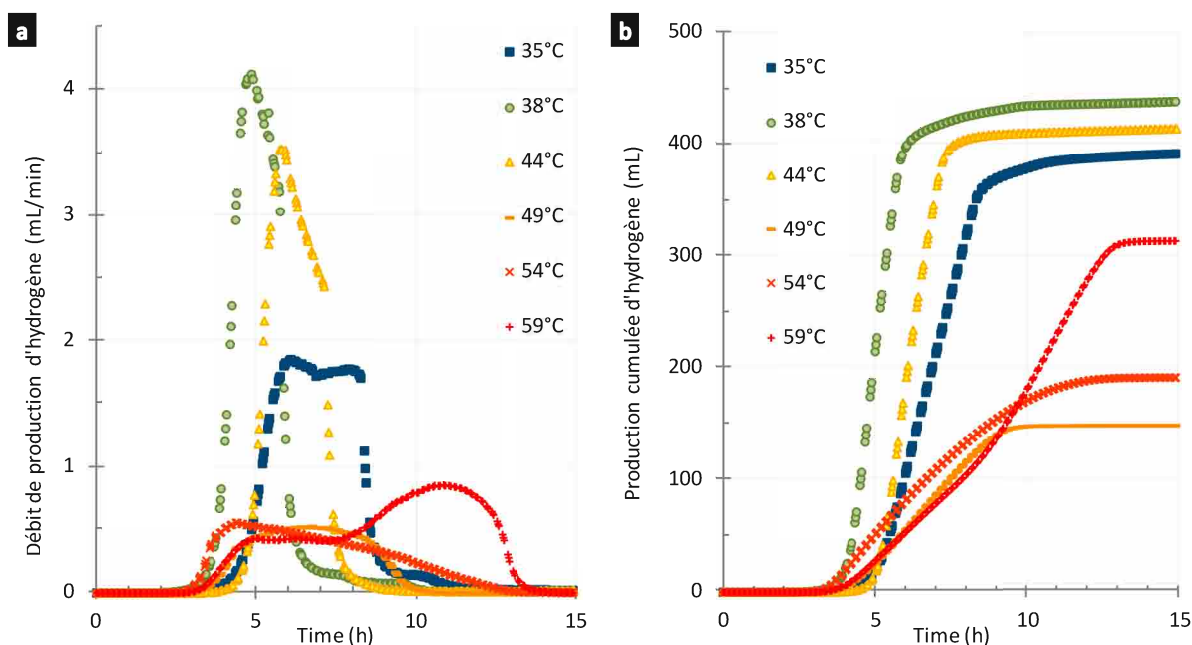


Figure 30. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différentes températures de fermentation. Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en RASB (1,0 L) ; volume d'inoculum de 0,8 L ; température de fermentation réglée entre 35°C et 59°C ; ajout de glucose ($11,2 \pm 0,3 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de 65 mL/min/L_{milieu}.

En revanche, à 59°C la production totale d'hydrogène est deux fois plus importante qu'à 49°C, mais reste inférieure par rapport au test à 38°C. Les profils de production à 49°C, 54°C et 59°C débutent de manière similaire et s'étendent sur une durée totale d'environ 9 h, alors que les tests à plus basses températures durent entre 6 et 7 h. Après 5 h de production, alors que le débit d'hydrogène décroît lentement pour les tests à 49°C ou 54°C, un second pic de production plus important apparaît à la température de fermentation de 59°C. Il semblerait qu'un second *consortium*, thermophile, émerge à une température de fermentation supérieure à 49°C et prend le relais du *consortium* mésophile fonctionnant de façon optimale à 38°C, ce dernier devenant minoritaire à 59°C.

Le Tableau 14 donne les résultats obtenus pour la production d'hydrogène aux différentes températures testées. Les meilleurs résultats en production d'hydrogène sont obtenus pour une température de fermentation de 38°C, ce qui correspond aux conditions mésophiles généralement utilisées dans la littérature. En comparaison, l'étude de Wang et Wan [213] (test de la température de fermentation entre 35°C et 45°C pour un pH initial de 7 en réacteur batch et avec un apport en glucose et nutriments) a trouvé un optimum à 35°C et 40°C avec $2,3 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$, et une productivité de $228 \text{ mL}_{H_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$, du même ordre que celle de notre étude. Le rendement en hydrogène chute de 2,1 à $0,79 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ avec l'augmentation de la température de 38°C à 49°C, mais augmente à nouveau à 59°C avec $1,32 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$. Une variation similaire du rapport H_2/CO_2 est également observée : diminution de 0,86 à 38°C à 0,60 à 49°C puis légère augmentation à 0,66 à 59°C. Cette variation peut s'expliquer par la présence d'un *consortium* microbien thermophile, dont l'activité de production différée est observable sur la courbe de production de H_2 (Figure 30). Un *inoculum* composé

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

en majorité de ce *consortium* pourrait être plus efficace en conditions thermophiles, sachant que dans notre étude une partie du substrat a été consommé lors de l'activité du premier type de *consortium* (mésophile). L'utilisation d'*inocula* d'origines différentes tend à expliquer les résultats parfois observés dans la littérature avec un optimum de production à 55°C [215] ou 60°C [110], voire 80°C [111], ces études utilisant des boues de digesteur anaérobie comme *inoculum* microbien.

Tableau 14. Valeurs du rendement de H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ en fonction de la température de fermentation – les incertitudes correspondent à l'écart type des réplicats de fermentation

Température de fermentation	Volume de H_2 produit (mL H_2 /L $_{milieu}$)	Volume de CO_2 produit (mL $_{CO_2}$ /L $_{milieu}$)	Rendement (mol $_{H_2}$ /mol $_{hexose}$ ajouté)	Rendement (mol $_{H_2}$ /mol $_{hexose}$ consommé)	H_{max} (mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$)	R_{max} (mL $_{H_2}$ /L $_{milieu}$ /h)	λ (h)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
35°C	516	522	1,92	1,91	513	171	5,2	0,76	0,5	0,68	98,2
38°C	571 ± 35	509 ± 43	2,1 ± 0,18	2,1 ± 0,18	567 ± 36	263 ± 81	4,4 ± 0,3	0,86 ± 0,09	1,0 ± 0,2	0,66 ± 0,13	98,7 ± 0,6
44°C	546	499	2,04	2,03	544	311	5,2	0,84	1,4	0,65	97,9
49°C	208 ± 20	267 ± 11	0,79 ± 0,07	0,79 ± 0,08	207 ± 20	50 ± 1	4,8 ± 0,3	0,6 ± 0,03	1,6	0,26	96,7
54°C	251	282	0,93	0,94	248	42	3,6	0,68	1,0	0,37	97,3
59°C	350 ± 86	406 ± 30	1,31 ± 0,33	1,32 ± 0,33	349 ± 88	34 ^a 65 ^b	6,6 ± 1,4	0,66 ± 0,11	1,3 ± 0,3	0,49 ± 0,09	97 ± 0,3

a : valeur de R_{max} à 59°C sur la première partie de la fermentation – de 5 h à 8 h

b : valeur de R_{max} à 59°C sur la seconde partie de la fermentation – de 9 h à 12 h

NB : Nous rappelons que les paramètres de modélisation H_{max} , R_{max} et λ sont déterminés par l'ajustement du modèle modifié de Gompertz {2} aux données expérimentales, de t_0 à 20 h. Dans le cas du test de fermentation réalisé à 59°C, le profil de production d'hydrogène présentant deux phases de production a été modélisé dans son ensemble pour obtenir les paramètres H_{max} et λ , tandis que deux modélisations supplémentaires ont été réalisées spécifiquement sur chaque phase pour déterminer la valeur du paramètre R_{max} correspondant.

Une cinétique de production rapide est obtenue à la température de 38°C, le temps de latence est assez court (4,4 h) et la vitesse de production importante (263 mL/L $_{milieu}$ /h), bien que moins élevée qu'à 44°C. La production d'hydrogène en deux étapes à 59°C débute avec une cinétique assez lente, avec un temps de latence de 6,6 h et une faible vitesse de production, R_{max} , de 34 mL/L $_{milieu}$ /h, suivie de l'augmentation de cette vitesse à 65 mL/L $_{milieu}$ /h, améliorée par rapport à celles observées à 49 et 54°C, respectivement 50 et 42 mL/L $_{milieu}$ /h.

La valeur du rapport B/A semble bien corrélée à l'évolution de la température, une augmentation de ce rapport est observée entre 35 et 49°C, jusqu'à la valeur de 1,6, qui correspond à une proportion importante de butyrate produit, coïncidant avec la baisse de production d'hydrogène observée dans le même temps, et la réduction du rapport H_2/CO_2 de 0,86 à 0,60. A partir de 54°C, alors qu'une augmentation de la production d'hydrogène est observée, par rapport à 49°C, une réduction du rapport B/A est observée, à une valeur proche de 1,0, similaire à celle observée à 38°C, ce qui indique que les proportions d'acétate et de butyrate produites sont proches, bien que le rapport H_2/CO_2 reste faible.

Le rapport molaire $H_2/2(B+A)$ est maximal dans la zone mésophile, autour de la température de 38°C, entre 0,65 et 0,68. Il diminue fortement à partir de 49°C à 0,26, puis remonte progressivement

III.D. Influence de la température de fermentation

jusqu'à 0,49 à 59°C, suivant une évolution proche de celle de la production d'hydrogène. Cela peut s'expliquer par une amélioration de la production d'hydrogène à haute température, avec l'émergence de bactéries productrices d'hydrogène thermophiles. A la température de 49°C, les conditions seraient défavorables aux bactéries productrices d'hydrogène, mésophiles ou thermophiles, les voies consommatrices d'hydrogène devenant donc plus importantes.

Les résultats obtenus permettent de définir clairement l'optimum de production d'hydrogène à 38°C, donc dans la zone de température mésophile. Le Tableau 15 résume les principales études réalisées dans la littérature sur l'optimisation de la température de fermentation obscure, avec l'utilisation d'un *consortium* mixte.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 15. Recensement d'études de l'impact de la température sur les performance de fermentation obscure à partir d'un consortium microbien mixte - Valeurs du rendement et de la productivité en H₂ et des rapports molaire H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A).

Réf.	Procédé	Substrat	Source de l'inoculum	Prétraitement	pH	Températures testées (°C)	Température optimale (°C)	Rendement (mol _{H₂} /mol _{hexose ajouté})	Productivité (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)
[109] a	RAC	Effluent de production d'alcool de riz	Boues activées de STEP	Acclimatation	5,5 r	20 - 30 - 35 - 55	≥ 55	1,94	4129	1,67	0,43	/
[216]	Batch	Sucrose + nutriments	Boues de STEP	85°C 60 min	5,5 r	33 - 35 - 37 - 39 - 41	≥ 41	1,65	432	1,09	0,59	1,05
[217] b	Batch	Sucrose + nutriments	Enrichie à partir de céréales	2 h cuisson + 100°C 30 min	8,0 i	25 - 35 - 40 - 45	35 - 40	1,36	/	0,7	0,66	0,91
[210]	Batch	Amidon + nutriments	Boues de STEP	95-100°C 60 min	8,5 i	37 - 55	37	0,79	477	/	1,45	0,92
[218]	Batch	Xylose + nutriments	Boues activées de STEP	100°C 45 min	7,1 i	30 - 35 - 40 - 45 - 50 - 55	40	1,49	1100	0,9	1,6	0,9
[113] a	Batch	Fourrage ensilé	Digester anaérobie (mésophile)	100°C 30 min	6,0 i	35 - 55 - 70	70	0,45	/	/	/	/
[213]	Batch	Glucose + nutriments	Digester anaérobie	100°C 15 min	7,0 i	20 - 25 - 30 - 35 - 40 - 45 - 50 - 55	35 - 40	2,00	318	/	0,06	3,30
[86]	RAC	Glucose + nutriments	Sources chaudes (hot spring) (45°C)	Acclimatation	5,0 r	37 - 40 - 45 - 50 - 55 - 65	45	1,71	342	/	≈ 1,4	/
[110] c	Batch	Vinasse de Cassava	Digester anaérobie (mésophile)	90°C 60 min	7,0 i	37 - 60 - 70	60	0,58	70,5	/	1,93	0,45
[211]	RASB	Glucose + nutriments	Boues activées de STEP	Acclimatation	5,0 r	26 - 33 - 40	26	1,02	54,3	≈ 1	0,56	1,19
[219]	Batch	Glucose + nutriments	Digester anaérobie	100°C 15 min	7,0 i	30 - 35 - 40 - 45	35 - 40	2,31	115	/	/	/
[111]	RAC	Cellulose + nutriments	Digester anaérobie	aucun	5,5 - 6,0	37 - 55 - 80	80	3,43	11,9	1,22	0,78	1,92
[118] a	Batch	Effluent d'un moulin de pressage d'huile de palme + nutriments	Digester anaérobie (42°C)	90-95°C 30 min	6,0 i	25 - 37 - 45 - 55	45	0,21	76,0	/	1,2	0,3
[215]	RAC	Cellulose + nutriments	Digester anaérobie	aucun	5,5 - 6,0	37 - 55 - 80	55	2,22	11,5	1,22	0,53	1,05
[112] c	Batch	Déchet de graines de jatropha déshuilées + nutriments	Boues de STEP	aucun	7,0 i	25 - 35 - 45 - 55 - 65	55	0,11	27,4	0,52	0,27	1,13
[119]	RAAS	Algue L. japonica	Digester anaérobie (36°C)	90°C 20 min	7,5 i > 5,5 r	35 - 50 - 65	35	59 mLH ₂ /gTS	/	/	0,13	/
[114] a	Batch	Vinasse de cane à sucre	Digester anaérobie (30°C)	90°C 10 min	5,5	37 - 55	37	0,43	14,6	/	/	/
Cette étude	RASB	Glucose	Boues activées de STEP	70°C 75 min	≈ 7 i	35 - 38 - 44 - 49 - 54 - 59	38	2,10	263	0,86	1,00	0,70

RAC réacteur agité

RASB Réacteur agité semibatch - extraction forcée des gaz

RAAS réacteur agité avec alimentation séquencé

i pH initial

r objectif de régulation

a résultats calculés en considérant le DCO en équivalent hexose

b résultats autour de 100-200 mg/L de FeSO₄

c résultats calculés en considérant l'ensemble des glucides en équivalent hexose

Sur les 17 études recensées, 11 ont mis en évidence une température optimale en conditions mésophiles, inférieure ou égale à 45°C, principalement situées entre 35 et 40°C, ce qui correspond aux résultats obtenus dans notre étude. Le rendement en hydrogène maximal observé est de

III.D. Influence de la température de fermentation

3,43 mol_{H₂}/mol_{hexose ajouté}, en conditions thermophiles extrêmes, 80°C [111], ce qui met en évidence une sélection importante de bactéries productrices d'hydrogène adaptées, mais dont l'identification n'a pas été réalisée. En conditions mésophiles, un rendement maximal de 2,3 a été observé, soit un résultat assez proche de celui obtenu dans notre étude.

Concernant la productivité en hydrogène, qui est plus fortement liée aux conditions expérimentales (type de procédé, concentration en bactéries du milieu, quantité de substrat ajoutée, etc.) que le rendement, de très grandes disparités sont observées, allant de 11,5 à 4129 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. Les performances obtenues dans la présente étude, 263 mL_{H₂}/L_{milieu}/h restent relativement bonnes. Globalement, les rapports molaires H₂/CO₂ obtenus aux températures de fermentation optimales dans ces différentes études, sont relativement bons, allant jusqu'à 1,67 dans l'étude de Yu *et al.* [109].

Le rapport molaire B/A obtenu dans notre étude (1,00) se situe dans la moyenne par rapport à ceux de la littérature, qui s'échelonnent de 0,06 à 1,93, ce qui démontre une diversité importante des métabolismes mis en œuvre, entre voies acétate (16) et butyrate (17). En revanche, le rapport H₂/2(B+A) obtenu à 38°C dans notre étude est assez bas par rapport à ceux obtenus dans la littérature, dont la moyenne est autour de 1,1. Ce résultat implique que la quantité d'hydrogène produite est supérieure à ce qui peut l'être par le procédé de fermentation obscure. En effet la limite maximale du rapport H₂/2(B+A) est 1, cas limite où les voies acétate (16) et butyrate (17) sont empruntées pour la production d'hydrogène, sans aucune consommation parasite d'hydrogène. Aucune corrélation générale ne semble pouvoir être extraite concernant les rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) en fonction de la température de fermentation optimale déterminée, la variabilité des résultats, liée aux microorganismes présents initialement dans le milieu réactionnel, étant très importante.

III.D.2. Analyse des métabolites et bilan carbone

L'analyse par GC-FID et HPLC-UV des échantillons de biomasse initiaux et finaux lors des tests de fermentation a permis d'établir la production de métabolites (Tableau 16) et d'effectuer des bilans carbone (Figure 31) pour les différentes températures testées. Dans la liste des métabolites analysés, aucune quantité significative de citrate, tartrate, pyruvate et caproate n'a été détectée, ces métabolites n'ont donc pas été représentés. Quelle que soit la température utilisée, une consommation quasi-totale du substrat modèle ajouté est observée, avec une part résiduelle systématiquement inférieure à 4% du carbone initial. Les résultats de production semblent relativement stables dans la zone mésophile, les productions d'acétate et de butyrate étant majoritaires, avec à 44°C l'apparition d'une production notable de propionate, significative d'un changement du métabolisme microbien à cette température, charnière entre les zones mésophile et thermophile.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 16. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de la température de fermentation – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

Température de fermentation	Production (mmol/L _{milieu})													
	éthanol	butanol	pyruvate	succinate	lactate	formiate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
35°C	1,5	0,040	-0,02	-0,36	< LD	< LD	10,6	1,2	5,0	< LD	< LD	28,3	21,4	-11,2
38°C	1,7 ± 0,5	0,071 ± 0,031	-0,01 ± 0,01	-0,13 ± 0,23	< LD	< LD	9,2 ± 2,1	1,4 ± 2,2	9,0 ± 1,3	1,0 ± 0,4	1,1 ± 1,2	27,6 ± 2,3	23,7 ± 1,4	-11,3 ± 0,4
44°C	3,1	0,042	0,01	-0,02	< LD	0,9	7,3	9,2	10,1	1,4	1,1	27,1	22,7	-11,2
49°C	1,5	0,001	0,03	-0,08	8,0	6,1	5,9	27,3	9,4	1,0	< LD	14,5 ± 0,6	8,7 ± 0,8	-10,9
54°C	2,4	0,002	0,03	-0,36	6,1	4,4	6,9	17,5	6,9	1,2	0,3	15,3	10,4	-11,1
59°C	2,9 ± 0,5	< LD	0,01 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	5,8 ± 1,3	1,8 ± 1,0	6,5 ± 0,5	23,2 ± 4,1	7,9 ± 1,4	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	22,0 ± 1,6	14,6 ± 3,6	-11,1 ± 0,1

Tandis que la production d'acétate et de butyrate reste relativement stable, des modifications importantes sont observées avec l'augmentation de la température. En particulier, la production de propionate (27,3 mmol/L à 49°C), consommatrice d'hydrogène, explique la réduction du rendement en H₂ et du rapport H₂/2(B+A), l'hydrogène produit par les voies acétate et butyrate étant consommé par la voie propionate. A partir de 49°C, on notera une production importante de lactate (8,0 mmol/L), celle-ci étant liée à celle de propionate, dont le lactate peut être un intermédiaire (Figure 124 sur l'Annexe 5). La production de lactate n'est pas consommatrice d'hydrogène, mais consomme du substrat, ce qui réduit le rendement en hydrogène par mole de substrat consommé. Une production significative de formiate peut également être observée à 49°C, ce qui implique donc une coproduction d'hydrogène et d'acétate (via l'acétyl-coenzyme A) [67] par une voie globalement différente de celle suivie à 38°C, potentiellement liée à d'autres espèces microbiennes.

Les proportions relatives des métabolites produits par rapport au carbone initial sont données sur la Figure 31. Une tendance à l'augmentation de la somme de tous les métabolites est observée avec l'augmentation de la température de fermentation, ce qui tend à confirmer l'hypothèse de la dégradation de la matière organique au cours du test de fermentation, permettant l'augmentation du carbone disponible au cours du test, par hydrolyse, l'activité des enzymes étant plus efficace à température plus élevée [124].

III.D. Influence de la température de fermentation

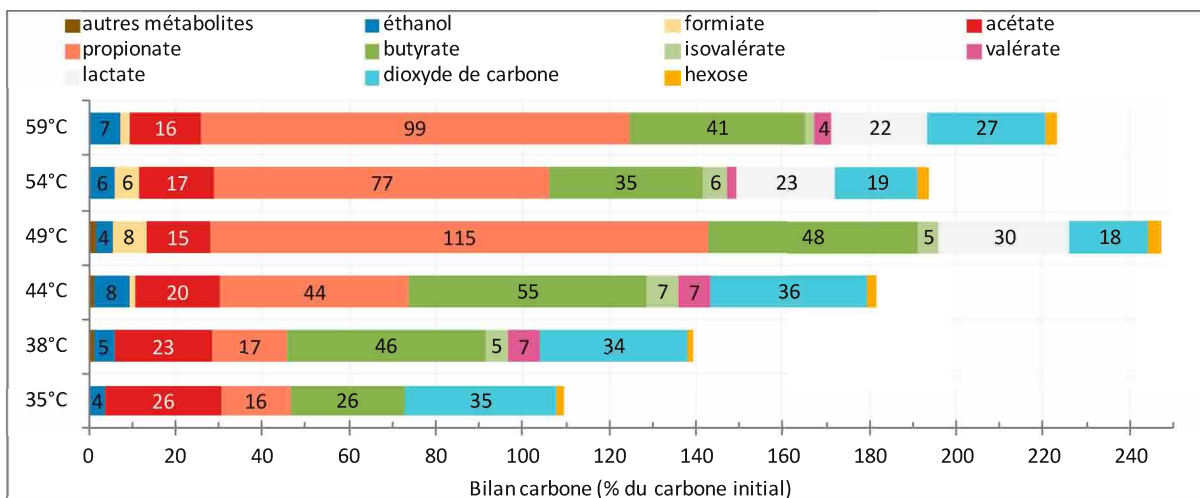


Figure 31. Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différentes températures de fermentation, exprimé en pourcentage du carbone initial

La part de carbone initial relative au propionate passe de 17% à 38°C, à environ 100% à partir de 49°C. Ces valeurs aberrantes de recouvrement peuvent être expliquées par la production massive de propionate via l'hydrolyse des protéines [220], présentes dans le milieu réactionnel, mais non quantifiées, donc non apparentes dans le bilan carbone. Le fait que cette production augmente avec la température, avec une valeur optimale autour de 50°C peut être lié à une amélioration de l'activité enzymatique à température élevée, accompagnée de l'inhibition des microorganismes consommateurs de propionate. La part du lactate est également significative, avec environ 25% du carbone initial, pour les tests réalisés à plus de 49°C. La température de 49°C apparaît donc comme une température particulière, défavorable à la production de gaz, mais présentant la quantité de métabolites la plus élevée, ce qui indique une activité microbienne importante. En revanche, c'est à la température de 35°C que la quantité de métabolites observée en fin de fermentation est la plus faible, expliquée par une activité efficacement orientée vers la production de gaz (H_2 et CO_2), bien qu'elle n'atteigne pas les valeurs de production observées à la température optimale de 38°C.

Karadag et Puhakka [86] observent une tendance similaire en testant la température de fermentation entre 37°C et 65°C, avec une production massive de lactate autour de 50°C seulement, en parallèle d'une diminution de la production d'acétate, de butyrate et d'hydrogène. Une chute de la production de lactate est cependant observée au dessus de 55°C, ce qui n'est pas le cas dans notre étude où la production de lactate est réduite de 25%. Aucune production de propionate n'est décrite dans cette étude, ce qui semble être dû à la présence de microorganismes différents dans les cultures mixtes utilisées comme *inoculum*. Entre 55°C et 60°C Oh *et al.* [221] ont également remarqué une baisse de la production de lactate, coïncidant avec l'augmentation de la production d'hydrogène (de 0,68 à 1,22 mol/mol_{glucose}), d'acétate (de 10,7 à 15,5 mmol/L) et de butyrate (de 15,0 à 20,0 mmol/L).

L'évolution de la production de métabolites en fonction de la température de fermentation est significative. Des modifications dans les proportions relatives et les quantités totales produites d'acétate et de butyrate sont observées, ainsi que des modifications claires dans le métabolisme avec surproduction de propionate et de lactate au-delà de 44°C. Ces surproductions sont très probablement significatives de l'émergence d'une espèce microbienne nouvelle, que l'analyse microbiologique permettra d'observer. Une modification importante du *consortium* microbien actif dans le milieu fermentaire est attendue, avec trois configurations particulières, autour des températures de 38°C avec des bactéries productrices d'hydrogène, 49°C avec l'émergence de bactéries thermophiles et

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

productrices de lactates, et 59°C avec une baisse de la population de bactéries productrices de lactate et un accroissement des bactéries thermophiles productrices d'hydrogène, pour lesquelles le profil de production de biogaz a montré qu'elles étaient différentes de celles fonctionnant à 38°C.

III.D.3. Analyse microbiologique

Des échantillons de biomasse prélevés en fin de la fermentation (18-20 h après t₀) ont été analysés par T-RFLP et par séquençage à haut débit Illumina pour des tests menés à différentes températures (38°C, 49°C et 59°C).

III.D.3.1. Analyse par T-RFLP

La Figure 32 montre les résultats obtenus pour les deux enzymes de restriction (AluI et HhaI) aux différentes températures de fermentation. Un changement de profil apparaît avec l'augmentation de la température de fermentation. Lors du test à 38°C, les pics à 60, 67, 190, 192 et 239 pb sont majoritaires sur l'électrophorogramme correspondant à la digestion de l'ADN par l'enzyme AluI, ainsi que les pics à 229, 233, 702, 880 et 898 pb pour l'enzyme HhaI. Le profil du test à 49°C montre l'émergence de pics supplémentaires à 74, 150, 158 et 244 pb pour l'enzyme AluI et à 206, 208, 238, 367, 514 et 673 pb pour l'enzyme HhaI. Le couple de pics AluI-HhaI 239-233 présent à 38°C peut être assimilé à celui détecté pour le test réalisé à 49°C (AluI-HhaI 244-238), le décalage pouvant provenir de l'analyse et du mode de calcul de la taille des fragments détectés. De même, les pics à 237 pb pour l'enzyme AluI et 230 pb pour l'enzyme HhaI, pour l'échantillon à 59°C peuvent être assimilés au couple AluI-HhaI 239-233 présent sur le profil du test à 38°C.

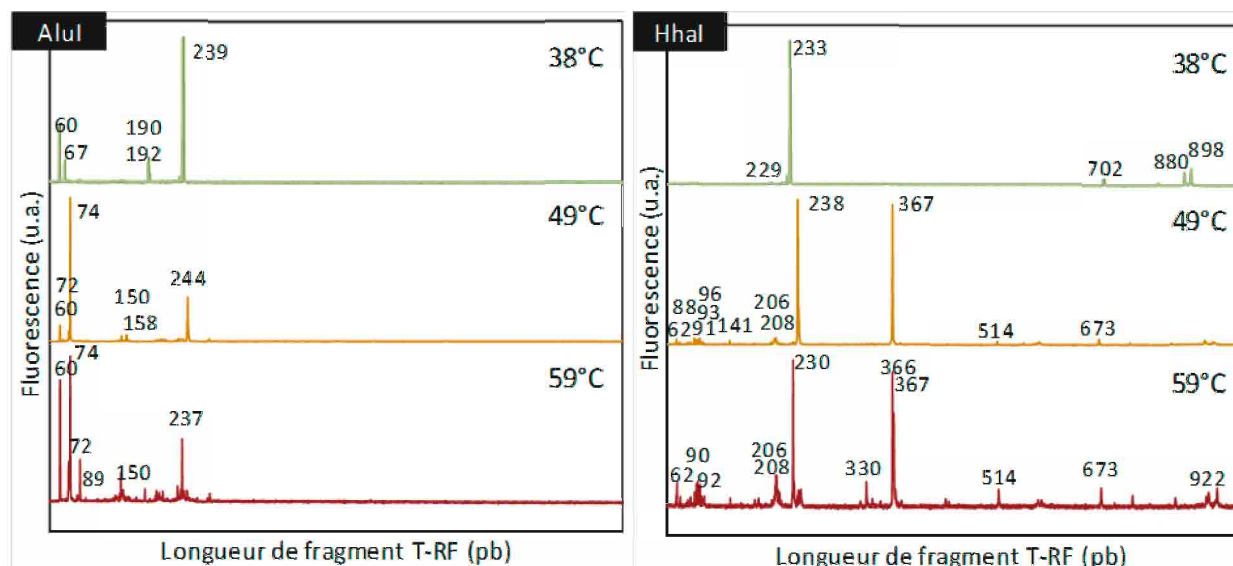


Figure 32. Evolution du profil de l'analyse par T-RFLP pendant les tests réalisés à différentes températures de fermentation

La confrontation de ces profils avec la base de données T-RFLP [180] permet de rechercher les genres et espèces bactériennes potentiellement présentes et responsables de la production d'hydrogène. Les couples de pics des enzymes AluI et HhaI ont potentiellement une ou plusieurs correspondances avec des espèces bactériennes. Les résultats obtenus pour ces correspondances sont donnés dans le Tableau 17. A 38°C, la présence du genre *Clostridium* est observée à plusieurs reprises (couples AluI-HhaI 239-233 ; 239-229 ; 67-233 et 67-234) dans le test à 38°C, avec en particulier l'identification de l'espèce *Clostridium butyricum* avec le couple différenciant AluI-HhaI 67-702. La présence du genre *Clostridium* n'est pas confirmée pour les tests à températures plus élevées, mais est

III.D. Influence de la température de fermentation

possible, d'après la base de données, avec les couples Alul-Hhal 244-238 et 244-367 pour le test à 49°C et Alul-Hhal 237-230 pour le test à 59°C.

Tableau 17. Correspondances des pics majeures de l'analyse T-RFLP à différentes température de fermentation avec la base de données [180]

	Pic Alul (pb)	Intensité relative	Pic Hhal (pb)	Intensité relative	Correspondances possibles avec la base de données [180]
38°C	239	1,00	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>Paenibacillus sp.</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>
	239	1,00	229	0,06	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i>
	60	0,38	879	0,07	<i>Peptostreptococcus genosp.</i> , 4
	190	0,15	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i>
	190	0,15	229	0,06	<i>Nodularia sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i>
	67	0,15	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i>
	67	0,15	234	0,06	<i>Clostridium sp.</i>
	67	0,15	235	0,04	<i>Clostridium butyricum</i>
	192	0,06	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i> ; <i>Tolypothrix sp.</i>
	192	0,06	229	0,06	<i>Nodularia sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i> ; <i>Tolypothrix sp.</i> ; <i>Brasilonema bromeliae</i>
49°C	74	1,00	238	1,00	Divers genres dont <i>Bacillus</i> - pas de <i>Clostridium</i>
	74	1,00	367	0,97	Divers genres dont <i>Caloramator</i> et <i>Enterobacter</i> - pas de <i>Clostridium</i>
	244	0,30	238	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Paenibacillus sp.</i> ; <i>Thermoactinomyces sp.</i> ; <i>Alloiococcus otitis</i> ; <i>Planococcus kocurii</i>
	244	0,30	367	0,97	<i>Actinomycetales sp.</i> , <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Caloramator uzoniensis</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Volucribacter amazonae</i>
	60	0,11	238	1,00	<i>Bacillus sp.</i>
	72	0,06	238	1,00	Divers genres dont <i>Bacillus</i> - pas de <i>Clostridium</i>
59°C	74	1,00	230	1,00	<i>Aquasalina asiatica</i> ; <i>Bacillus spp. (fusiformis; sphaericus)</i> ; <i>Photobacterium profundum</i> ; <i>Oxalophagus oxalicus</i>
	74	1,00	366	0,89	Divers genres dont <i>Caloramator</i> - pas de <i>Clostridium</i>
	74	1,00	367	0,60	Divers genres dont <i>Caloramator</i> et <i>Enterobacter</i> - pas de <i>Clostridium</i>
	74	1,00	206	0,17	Divers genres - pas de <i>Clostridium</i>
	237	0,42	230	1,00	<i>Brevibacillus sp.</i> , <i>Brevibacterium sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>Eubacterium sp.</i> , <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
	237	0,42	366	0,89	Divers genres - pas de <i>Clostridium</i>
	237	0,42	367	0,60	Divers genres - pas de <i>Clostridium</i>
	237	0,42	206	0,17	Divers genres - pas de <i>Clostridium</i>
	89	0,29	206	0,17	<i>Eubacterium ruminantium</i>
	72	0,24	230	1,00	<i>Anomalops katoptron</i> ; <i>Aquasalina asiatica</i> ; <i>Bacillus fusiformis</i> ; <i>Bacillus sphaericus</i> ; <i>Oxalophagus oxalicus</i>
	72	0,24	366	0,89	Divers genres - pas de <i>Clostridium</i>
	72	0,24	367	0,60	Divers genres - pas de <i>Clostridium</i>
72	0,24	206	0,17	Divers genres dont <i>Bacillus</i> - pas de <i>Clostridium</i>	

Les couples potentiels formés par les pics émergents avec l'augmentation de la température ne correspondent pas à un genre bactérien spécifique, mais à une grande diversité, dont le genre *Clostridium* est absent. En fin de fermentation, les bactéries des genres *Bacillus* (couple de pics Alul-Hhal 74-238 ; 74-230 ; 60-238 ; 72-238), *Caloramator* (Alul-Hhal 74-367, 74-366) et *Enterobacter* (Alul-Hhal 74-367) sont potentiellement présentes dans les échantillons issus des fermentations à 49°C et 59°C. Ainsi, la

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

seconde phase de production d'hydrogène, à haute température, pourrait être liée à l'activité de ces bactéries dont l'émergence a limité le développement des bactéries du genre *Clostridium* moins adaptées aux conditions thermophiles [222].

III.D.3.2. Analyse par séquençage

Les échantillons finaux issus des tests menés à 38°C, 49°C et 59°C ont été analysés par séquençage avec respectivement 947, 912 et 1034 différents phylotypes ou OTU (*operational taxon unit*) correspondant à des groupes de séquences analysées avec au moins 97% d'homologie (Tableau 20). Ces chiffres élevés montrent la forte diversité bactérienne du consortium utilisé. L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux séquences sélectionnées au hasard appartiennent au même OTU, le maximum de diversité étant indiqué par une valeur nulle. On rappelle que l'indice de Simpson ne dépassait pas la valeur de 0,03 avant et après traitement thermique (paragraphe III.B.2). Une diversité moins importante est donc observée dans ces échantillons finaux, avec des indices de Simpson proches et supérieurs à 0,2 pour les tests de fermentation réalisés à 38°C et 49°C, tandis que l'indice obtenu à 59°C n'atteint que 0,06, indiquant une diversité bactérienne dans le milieu plus importante. Les principaux résultats extraits sont présentés dans le Tableau 19, qui présente les correspondances des principaux phylotypes.

Tableau 18. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés à 38°C, 49°C et 59°C - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
38°C	947	0,22
49°C	912	0,21
59°C	1034	0,06

NB : Depuis la rectification de la classification des bactéries du genre *Clostridium* réalisée au début des années 2010 [77], grâce à la banalisation du séquençage génétique, les bactéries anciennement classifiées parmi les *Clostridium*, dorénavant notées [*Clostridium*], ont été divisées en plusieurs familles taxonomiques (*Peptoclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Lachnoclostridium*, etc.), tandis que les bactéries du genre *Clostridium* « réel » sont appelées *Clostridium sensu stricto* [76].

Ces résultats confirment la présence d'espèce du genre *Clostridium sensu stricto* dans le consortium bactérien présent pendant la production d'hydrogène à 38°C. Les espèces majoritaires sont *C. baratii* (44,2%) et *C. butyricum* (6,9%), cette dernière ayant également été identifiée par T-RFLP, tandis que *Clostridium baratii* n'était pas formellement identifiée, mais présente dans la liste des bactéries correspondantes pour les couples de pics AluI-HhaI 239-233, 244-238 et 237-230, ce qui confirme ce résultat. Le genre *Clostridium sensu stricto* représente 54,8% du total des séquences identifiées, à la température de fermentation de 38°C. L'espèce *C. butyricum* est, en effet, utilisée pour la production d'hydrogène en culture pure avec des rendements en hydrogène variant de 0,6 à 3,1 mol_{H₂}/mol_{hexose}, avec l'utilisation d'un substrat simple (glucose, fructose ou saccharose) [75].

III.D. Influence de la température de fermentation

Tableau 19. Résultats obtenus par séquençage des échantillons finaux de fermentation à 38°C, 49°C et 59°C - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible ou nulle

Phylum	Famille	Genre	meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	38°C (%)	49°C (%)	59°C (%)
Actinobacteria	Intrasporangiaceae	Tetrasphaera	Tetrasphaera sp.	100	GU552260	0,3	1,2	0,9
	Chitinophagaceae	Terrimonas (100%)	Terrimonas lutea	97	NR_041250	0,8	1,2	1,9
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Flavobacterium (100%)	Flavobacterium noncentrifugens	97	NR_109531	2,1	2,0	1,1
	Saprosiraceae	Haliscomenobacter (99%)	Haliscomenobacter hydrossis	< 97	NR_074420	0,8	1,2	1,8
		Lewinella (< 97%)	Lewinella spp. (nigricans / marina)	< 97	NR_115013	2,0	1,6	2,3
Betaproteobacteria	Comamonadaceae	Rhodoferrax	Rhodoferrax spp. (ferrireducens / saidenbachensis)	100	/	1,9	3,1	4,2
Chlorobi	SJA-28 / PHOS-HE36 (100%)	Ignavibacterium / Melioribacter (genre affilié)	Ignavibacterium album / Melioribacter roseus (genre affilié)	< 97	/	1,0	0,4	0,6
Chloroflexi (< 97%)	Chloroflexi (phylum)	Chloroflexi (phylum)	Chloroflexi (phylum)	< 97	JN038723	0,4	1,1	1,3
Firmicutes	Bacillaceae	Anoxybacillus	Anoxybacillus spp. (flavithermus / rupiensis / mongoliensis / kestanbolensis / beppuensis / voinovskiensis / amylolyticus / kaynarcensis / kamchatkensis / thermanum) / [Flavobacterium] thermophilum (genre affilié)	100	/	0,0	0,4	5,9
		Bacillus	Bacillus spp. (coagulans / badius)	100	/	0,0	39,6	5,6
		Caloramator	Caloramator proteoclasticus	100	LM999761	0,0	21,7	16,0
		Clostridium sensu stricto 1 (100%)	Clostridium baratii	98	NR_029229	44,2	0,2	0,1
Clostridiaceae 1 (100%)		Clostridium butyricum	Clostridium butyricum	99	LN828941	6,9	0,0	0,0
		Clostridium sensu stricto 12	Clostridium magnum	99	NR_119084	2,7	0,0	0,0
		Fonticella	Fonticella tunisiensis	100	NR_108870	0,0	0,1	8,5
	Caloramator // Fervidicella (98%)	Caloramator quimbayensis // Fervidicella metallireducens	< 97	/	0,0	0,1	12,2	
Peptostreptococcaceae		Peptoclostridium [Clostridium] (genre affilié)	Peptoclostridium sordellii [Clostridium]	100	KM657125	6,3	0,0	0,0
		Peptoclostridium [Clostridium] (genre affilié)	Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei)	100	/	9,8	0,0	0,0
Nitrospirae	Nitrospiraceae	Nitrospira	Nitrospira defluvii Candidatus	100	NR_074700	0,4	0,7	1,9

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Si l'on prend en compte les bactéries anciennement intégrées au genre [*Clostridium*], cette population monte à 70,8%, avec principalement les bactéries du genre *Peptoclostridium* : *Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei)* (9,8%) et *Peptoclostridium sordellii* (6,3%). Les genres *Clostridium sensu stricto* et *Peptoclostridium* sont en revanche pratiquement absents (< 0,4%) des échantillons issus des tests menés à plus hautes températures (49°C et 59°C). Le couple de pics de T-RFLP correspondant à l'espèce *Peptoclostridium sordellii* est AluI-HhaI 190-1061 dans la base de données [180] Or la méthode d'analyse est limitée à 1000 pb, seul le pic AluI est donc observable sur l'électrophorégramme de la Figure 32, pour le test réalisé à 38°C. Ceci confirme la présence de cette bactérie dans le bioréacteur. De la même façon, les combinaisons de couples de pics correspondantes à l'espèce *Peptoclostridium bifermentans* sont, selon la souche présente : AluI-HhaI 190-1066 et 190-578, seule la première étant potentiellement présente dans l'échantillon puisque le pic HhaI à 578 pb n'est pas observable sur l'électrophorégramme. En revanche, les espèces *Peptoclostridium hungatei* et *difficile* sont en réalité absentes du milieu fermentaire, en effet les couples de pics TRFLP correspondants à ces espèces sont respectivement AluI 245 pb - HhaI 737 pb et AluI 227 pb - HhaI 1061 pb, aucun de ces pics n'apparaissant sur l'électrophorégramme du test réalisé à 38°C. Cet OTU correspond donc à l'espèce *Peptoclostridium bifermentans*.

Les bactéries du genre *Bacillus*, non détectées à 38°C, sont majoritaires à la température de 49°C (39,6%), tandis que leur proportion diminue à 59°C (5,6%). Les couples de pics de T-RFLP correspondant au genre *Bacillus* sont AluI-HhaI 74-242 pour *B. coagulans* et AluI-HhaI 74-244 pour *B.adius* ; la proximité de ces deux couples ne permettant pas de différencier les deux bactéries. Ces couples correspondent aux couples de pics AluI-HhaI 74-238 et 74-241 observés, respectivement, à 49°C et 59°C sur les électrophorégrammes de la Figure 32, celui obtenu à 59°C étant plus faible, ce qui peut s'expliquer par la proportion réduite de cette bactérie observée par séquençage. Le rôle de *Bacillus coagulans* dans la production d'hydrogène a été démontré en conditions mésophiles (37°C), à partir de cultures pures alimentées en glucose, avec un rendement en H₂ maximal de 2,28 mol_{H₂}/mol_{hexose ajouté} [223]. La présence des bactéries du genre *Clostridium*, dans un *inoculum* complexe, peut expliquer que les bactéries du genre *Bacillus* ne se développent pas à 38°C, phénomène lié à un effet de compétition pour la consommation du substrat. Goud *et al.* ont rapporté l'activité conjointe de bactéries des genres *Clostridium* et *Bacillus* pour la production d'hydrogène dans un bioréacteur à lit fixe en fonctionnement continu avec une alimentation séquentielle dans un premier temps en substrat modèle (glucose - rendement maximal de 0,49 mol_{H₂}/mol_{hexose ajouté}) puis en substrat réel (extrait de végétaux). Alors qu'à partir du même *inoculum* de cultures mixtes, avec d'autres conditions (prétraitement, fonctionnement et substrat réel), seules les bactéries du genre *Clostridium* se sont développées [224,225]. Cela semble confirmer l'hypothèse du non développement des bactéries du genre *Bacillus* dans les conditions appliquées à 38°C, lié à une meilleure adaptation des bactéries de genre *Clostridium*, les conditions n'étant pas favorables à une croissance conjointe.

Le deuxième OTU majoritairement présent dans le milieu réactionnel à la température de 49°C correspond à l'espèce *Caloramator proteoclasticus* (21,7%). Il a été observé que *C. proteoclasticus* est une bactérie thermophile, active jusqu'à 68°C, avec un optimum autour de 55°C, et produit de l'hydrogène par voie acétate [16], du lactate et du formiate [120,121]. A une température de fermentation de 60°C, l'étude de Prasertsan *et al.* [120] a observé l'émergence de l'espèce *C. proteoclasticus*, entre autres microorganismes, à partir de cultures mixtes (boues de station d'épuration agroindustrielle) et avec une alimentation continue en substrat réel (effluent du site agroindustriel) et

III.D. Influence de la température de fermentation

atteignant une productivité de 117 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. Dans notre étude, l'espèce *Caloramator proteoclasticus* reste majoritaire à la température de fermentation de 59°C (16,0%), avec une autre espèce dont l'OTU représente 12,2% des séquences analysées et dont le genre est indéterminé entre deux correspondances (< 97% d'homologie), la première étant l'espèce *Caloramator quimbayensis* qui a été caractérisée comme bactérie thermophile potentiellement productrice d'hydrogène [226]. La seconde espèce associée à cet OTU est *Fervidicella metallireducens* qui est phylogénétiquement très proche du genre *Caloramator*, avec lesquelles elle partagent le caractère thermophile et la production d'hydrogène par voie acétate [227]. Ces trois espèces font partie de la famille *Clostridiaceae 1*, de même que le genre *Clostridium sensu stricto*. Les correspondances du genre *Caloramator* dans la base de données de T-RFLP TRFMA [180] sont limitées à trois espèces : *C. fervidus* (AluI-HhaI 178-189), *C. indicus* (AluI-HhaI 74-367), et *C. uzoniensis* (AluI-HhaI 243-367), ces deux dernières espèces étant les plus proches phylogénétiquement de l'espèce *C. proteoclasticus* [227]. La présence, à 49°C et 59°C, des couples de pics AluI-HhaI 74-367 et 244-367 (238-367 à 59°C) sur les électrophorogrammes de la Figure 32 permettent de confirmer la présence de ce genre bactérien dans le milieu fermentaire.



Karadag et Puhakka [86] ont également observé, dans un système de production continu alimenté en substrat modèle, que l'augmentation graduelle de la température avait un impact sur la composition du consortium bactérien actif : majoritairement composé d'espèces du genre *Clostridium* entre 37°C et 45°C (respectivement 0,9 et 1,71 mol_{H₂}/mol_{hexose ajouté}), puis de *Bacillus coagulans* autour de 50°C (0,1 mol_{H₂}/mol_{hexose ajouté}). Ils n'observent cependant pas de bactéries du genre *Caloramator* autour de 60°C, mais du genre *Thermoanaerobacterium* (0,85 mol_{H₂}/mol_{hexose ajouté}). Ils associent la présence de *Bacillus coagulans* avec la production de lactate et la chute de la production d'hydrogène, observée autour de 50°C, n'observant pas cette espèce aux autres températures de fermentation testées. Ceci semble être confirmé dans notre étude, où la présence potentielle de *Bacillus coagulans*, à 49°C et dans une moindre mesure 59°C coïncide avec la production de lactate. L'étude de Ma *et al.* [228] confirme ceci avec l'utilisation d'une souche pure de *B. coagulans* pour la production de L-lactate, optimale à 50°C. La production de propionate est certainement imputable à la bactérie *Caloramator proteoclasticus*, non détectée dans le consortium bactérien de l'étude de Karadag et Puhakka [86].

L'espèce bactérienne *Fonticella tunisiensis* apparaît parmi les espèces majoritaires (8,5%) lors du test de fermentation à 59°C. Cette espèce thermophile et strictement anaérobie a une température de croissance optimale de 55°C [229]. Cette espèce est phylogénétiquement proche de *Fervidicella metallireducens* et du genre *Caloramator* dans la famille *Clostridiaceae 1*. Le métabolisme de cette espèce bactérienne, à partir du glucose, permet la production de formate, acétate, éthanol et CO₂, mais sans coproduction observée d'hydrogène [229].

D'autres bactéries, du phylum *Bacteroidetes* sont représentées en quantité importante dans le milieu (somme de toutes les séquences du phylum > 12%), quelle que soit la température de fermentation utilisée. En revanche, la représentation de ce phylum est très variée, avec plusieurs familles, dont les *Saprospiraceae* (avec le genre *Lewinella*) et les *Flavobacteriaceae* (avec le genre *Flavobacterium*) sont les principales représentantes. Ces bactéries, de par leur quantité ne peuvent avoir qu'un rôle secondaire dans la production d'hydrogène. Le genre *Flavobacterium*, reconnu

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

comme aérobie ou anaérobie facultative, consommerait l'oxygène résiduel potentiellement présent dans le milieu réactionnel, limitant sa concentration et donc son effet néfaste sur les bactéries anaérobies strictes comme celles du genre *Clostridium* [230].

Bien que les espèces *Rhodoferax ferrireducens* et *saidenbachensis* aient une température maximale de croissance de 30°C, (même groupe OTU) ces espèces restent majoritaires après traitement thermique à 70°C. De plus, ce groupe OTU présente un profil assez surprenant, avec une quantité relative croissante de 1,9% à 4,2% avec l'augmentation de la température de fermentation de 38°C à 59°C. Il est possible que l'identification de l'espèce bactérienne présente dans le milieu soit différente de *Rhodoferax ferrireducens* et *saidenbachensis*; cependant, les bactéries du genre *Rhodoferax* présentent toutes une température maximale de 30°C pour leur croissance [202]. L'explication serait donc liée à une diminution de population bactérienne globale, à 59°C par rapport à 38°C. La proportion relative de cet OTU parmi l'ensemble serait donc plus élevée, leur présence réelle étant probablement en lente décroissance. Cette hypothèse est la plus probable, aucune information concernant la survie de ces espèces bactériennes à une température élevée n'ayant été trouvée dans la littérature.

Les échantillons de biomasses analysés étant prélevés en fin de fermentation (≈ 20 h), l'identification exacte des bactéries responsables du premier pic de production d'hydrogène dans le cas des tests réalisés à 49°C et 59°C n'est pas possible puisque des modifications importantes peuvent avoir lieu au cours de la fermentation. Cependant, le second pic semble être lié à l'activité des bactéries du genre *Caloramator*, dont la présence en quantité plus importante à 59°C qu'à 49°C explique les quantités d'hydrogène produit. L'impact majeur de la température de fermentation sur la production d'hydrogène est donc directement lié à une modification du consortium bactérien producteur. Des bactéries mieux adaptées aux conditions thermophiles, comme le genre *Caloramator*, relaient celles du genre *Clostridium* en fin de fermentation, mais sans permettre l'obtention des rendements et productivités atteints par ces dernières en conditions mésophiles.

La Figure 33 confronte la représentativité des principaux genres microbiens présents dans le milieu réactionnel, en fonction de la température de fermentation. La répartition des phyla (Figure 33 a) est relativement stable pour ces trois échantillons, avec une tendance à la diminution de la part des *Firmicutes* de 71,5% (38°C) à 50,5% (59°C) au profit des autres phyla. Les principales modifications au niveau des familles bactériennes (Figure 33 b) se situent au niveau du phylum *Firmicutes* avec la quasi-disparition des *Peptostreptococcaceae*, remplacée par la famille *Bacillaceae* au dessus de 38°C, celle des *Clostridiaceae 1* étant majoritaire à 38°C et 59°C. On note que la diversité bactérienne est plus élevée à des températures plus importantes (Figure 33 c), la quantité d'espèces observées en proportion supérieure à 2% augmentant avec la température. Ceci est particulièrement visible avec l'augmentation de la part des « autres < 2% », de 5,1% à 38°C à 7,5% à 49°C puis 12% à 59°C, cette part correspondant à l'ensemble des bactéries dont l'OTU représente moins de 2% de l'ensemble de la diversité bactérienne.

III.D. Influence de la température de fermentation

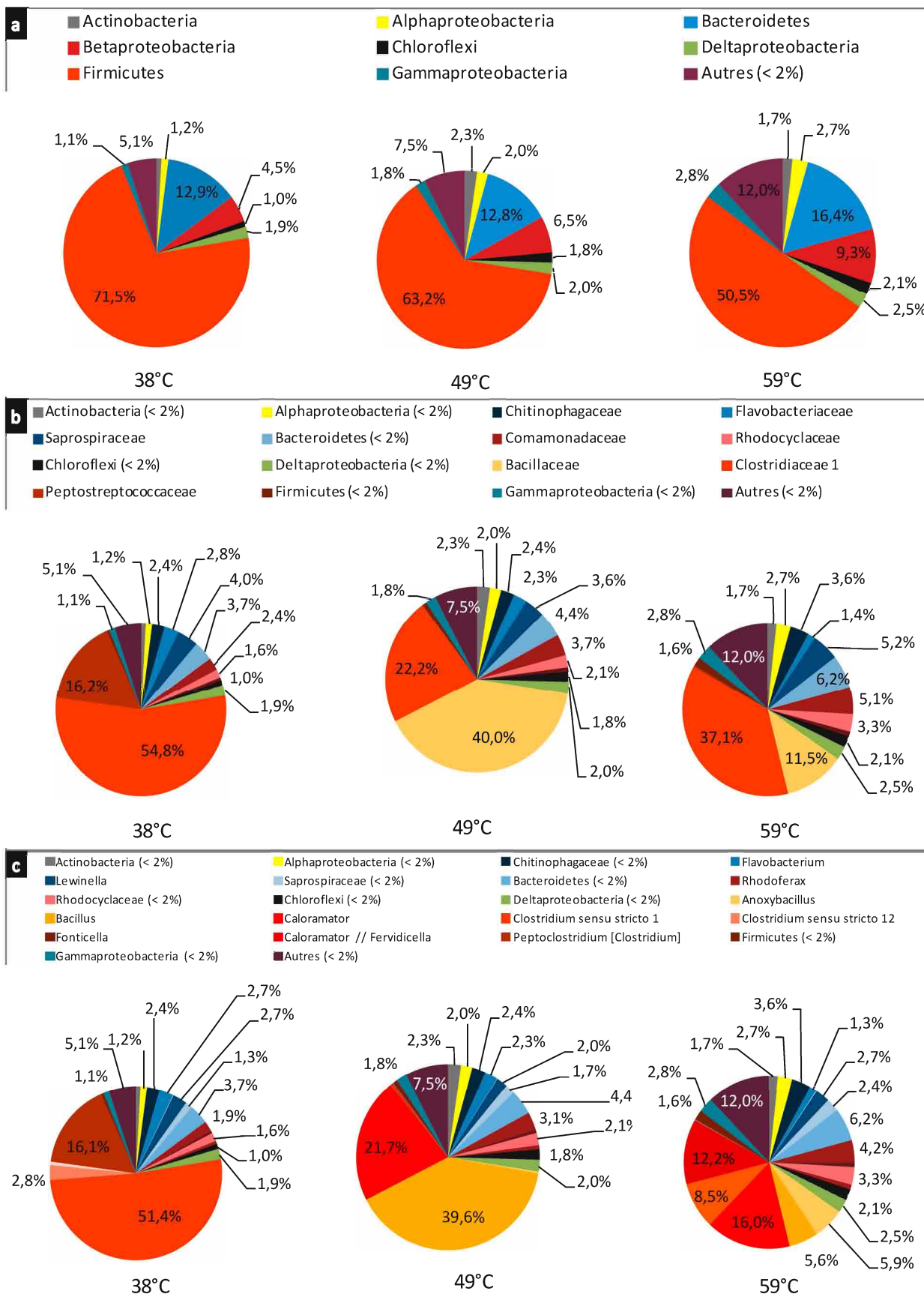


Figure 33. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons finaux de fermentation à 38°C, 49°C et 59°C - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

L'étude de l'impact de la température de fermentation sur l'activité du consortium bactérien a permis de mettre en évidence la spécificité de l'inoculum de la station d'épuration de Strasbourg. La température de fermentation optimale a été déterminée à 38°C, dans la gamme mésophile, avec le rendement optimal de 2,1 mol_{H2}/mol_{hexose}. Les principaux métabolites observés à 38°C sont l'acétate et le butyrate. Les genres bactériens prédominants sont Clostridium (54,1%) et Peptoclostridium (16,1%). La température de fermentation de 49°C présente les performances de production d'hydrogène les plus faibles (0,79 mol_{H2}/mol_{hexose}), tandis qu'une production importante de propionate et l'apparition de lactate est observée dans le milieu réactionnel, ces modifications étant attribuées à l'émergence à cette température de la bactérie Bacillus coagulans (39,6%). Puisque la population de bactéries de genre Clostridium chute à 0,27%, la production d'hydrogène à 49°C est attribuée aux bactéries du genre Caloramator (21,7%) phylogénétiquement proche du genre Clostridium. Les bactéries de genre Caloramator qui restent majoritaires à 59°C avec jusqu'à 28,2% de la population bactérienne analysée, accompagnées de bactéries du genre Fonticella (8,5%). Ces bactéries en proportions plus importantes qu'à 49°C sont responsables d'une remontée de la production d'hydrogène avec un rendement de 1,31 mol_{H2}/mol_{hexose}. Cependant la présence de bactéries de la famille Bacillaceae (11,5%) reste probablement responsable d'une coproduction importante de propionate et de lactate, défavorable à la production d'hydrogène.

Les performances des cultures mixtes issues des boues activées de la zone anoxie, à 38°C avec glucose sans régulation du pH ont ainsi été démontrées. Cette configuration constitue ainsi la référence de notre étude, étudiée plus en détail dans le paragraphe suivant.

III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu

La dernière partie de ce chapitre porte sur l'évolution au cours du temps du processus fermentaire des cultures mixtes de la STEP pour la production d'hydrogène, avec l'application des conditions de fermentation sélectionnées au cours de la phase d'optimisation :

- utilisation de boues activées de la zone anoxie,
- pas de régulation de pH,
- température de fermentation de 38°C

Un suivi analytique d'un test de fermentation réalisé avec le prélèvement d'échantillons du milieu réactionnel toutes les heures à partir de t₀, correspondant à l'ajout de substrat et à la mise sous flux de gaz inerte. Les concentrations en métabolites et en glucides solubles sont analysées pour chaque échantillon par HPLC-UV, GC-FID et dosage colorimétrique. Un échantillon final est prélevé vers 20 h de fermentation.

III.E.1. Evolution temporelle de la composition du milieu fermentaire et de la production de gaz

L'évolution de la concentration en métabolites et substrat et la production de gaz permet de visualiser la cinétique de fermentation (Figure 34). Une émission de CO₂ est observée dès le début de la fermentation et dure environ 2 h avec une quantité de 1,9 mmol_{CO2}/L_{milieu}. Ceci s'explique par le dégazage par stripping du CO₂ présent initialement dans le réacteur sous l'effet du passage du gaz de

III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu

balayage. Une production en H₂ et en CO₂ est ensuite observée à partir de 4 h de fermentation et dure environ 8 h. Les quantités de gaz produits par la fermentation sont de 19,8 mmolH₂/L_{milieu} et 25,3 mmolCO₂/L_{milieu}. Le ratio final H₂/CO₂ est typiquement de 0,8.

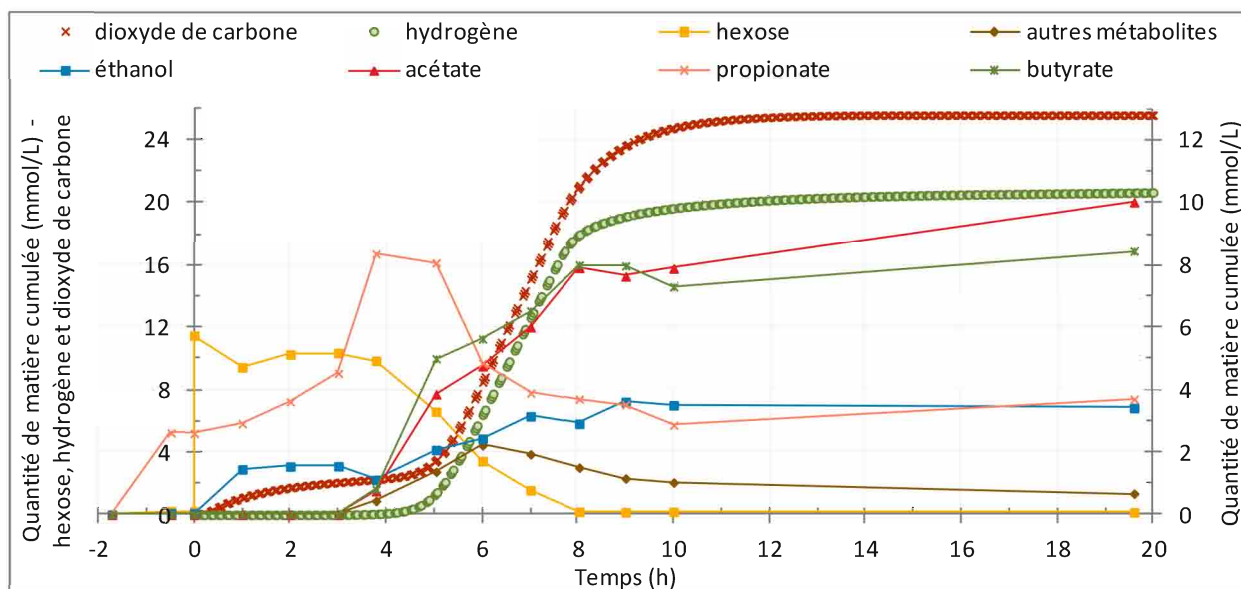


Figure 34. Evolution de la concentration en métabolites et substrat, et de la production cumulée de gaz pendant la fermentation obscure en fonction du temps

Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en RASB (1,0 L) ; volume d'inoculum de 0,8 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($11,2 \pm 0,1$ mmol_{hexose}/L_{milieu}) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 65 mL/min/L_{milieu}

Le Tableau 20 montre les résultats obtenus pour la quantification des métabolites dans le milieu réactionnel en fonction du temps, ainsi que la valeur de production globale par différence entre les quantités de matière finale et initiale. Aucune trace de citrate, tartrate, succinate, lactate ou caproate n'a été observée pendant toute la période de fermentation, ces composés n'apparaissent donc pas dans le tableau.

La quantité de glucides présents dans les boues après traitement thermique est de 0,23 mmol_{hexose}/L_{milieu}. Après ajout du substrat modèle (glucose) la quantité totale d'hexose en début de fermentation est de 11,5 mmol/L. Une légère baisse de $\approx 1,5$ mmol/L est observée pendant les deux premières heures de fermentation suivie d'une stabilisation de la concentration. Après 5 h, la concentration en hexose chute rapidement pour se stabiliser à environ 0,17 mmol/L après 8 h. Cette chute puis stabilisation de concentration correspond parfaitement à la production de gaz. La consommation en sucres solubles au cours de cette fermentation est de 98,5%.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 20. Quantité de matière des métabolites analysés en fonction de la durée de fermentation – un code par dégradé de couleur est utilisé, allant du jaune pâle pour l'absence du métabolite au vert pour les quantités de matière importantes.

Et valeurs de production globale correspondant à la quantité de matière finale moins initiale – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

Quantité de matière (mmol/L _{milieu})	éthanol	butanol	pyruvate	formiate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
AvTT°	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,02
ApTT°	0,05	< LD	0,02	< LD	< LD	2,6	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,23
t0	0,05	< LD	0,02	< LD	< LD	2,6	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	11,5
1 h	1,5	< LD	0,02	< LD	< LD	2,9	< LD	< LD	< LD	1,1	< LD	9,4
2 h	1,5	< LD	0,01	< LD	< LD	3,6	< LD	< LD	< LD	1,7	< LD	10,3
3 h	1,6	< LD	0,01	< LD	< LD	4,5	< LD	< LD	< LD	2,1	0,01	10,4
4 h	1,1	< LD	0,02	0,42	0,76	8,4	0,81	< LD	< LD	2,7	0,26	9,9
5 h	2,1	0,004	0,05	1,0	3,9	8,1	5,0	< LD	< LD	6,5	4,2	6,6
6 h	2,4	0,06	0,07	0,65	4,8	4,9	5,6	0,30	1,2	8,5	6,4	3,4
7 h	3,2	0,12	0,07	0,33	6,0	3,9	6,5	0,26	1,2	15,1	12,6	1,6
8 h	2,9	0,09	0,06	< LD	7,9	3,7	8,0	0,23	0,89	22,1	18,2	0,19
9 h	3,6	0,12	0,04	< LD	7,7	3,5	8,0	0,43	0,81	23,6	19,1	0,16
10 h	3,5	0,11	0,02	< LD	7,9	2,9	7,3	0,19	0,70	24,8	19,7	0,18
20 h	3,4	0,28	< LD	< LD	10,0	3,7	8,5	0,19	0,30	25,3	19,8	0,16
Production (mmol/L_{milieu})	3,4	0,28	< LD	< LD	10,0	1,1	8,5	0,10	0,30	25,3	19,8	-11,3

La quantité de propionate initialement présente dans le milieu réactionnel après le traitement thermique (2,6 mmol/L) augmente progressivement jusqu'à 5 h de fermentation, donc dans la phase précédant la production d'hydrogène, ce qui est cohérent avec la voie de production du propionate, consommatrice d'hydrogène. Une production d'éthanol et de dioxyde de carbone par solvantogénèse (18) est également observée lors des deux premières heures de fermentation (respectivement 1,5 et 1,7 mmol/L). Ces productions expliquent la baisse initiale de substrat observée.

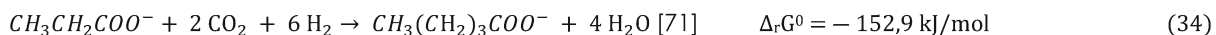
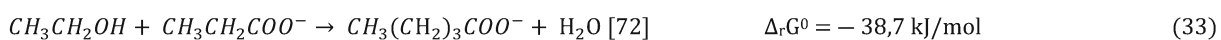


Entre 4 et 5 h de fermentation, une baisse de la quantité de propionate est observée, de 8,4 à 3 mmol/L à 10 h de fermentation, significative d'une consommation. Alors que la production d'éthanol, qui s'était interrompue, reprend pour atteindre une concentration finale de 3,5 mmol/L. C'est également à partir de 4 h que débute la production d'acétate et de butyrate, directement liée à la production d'hydrogène et de dioxyde de carbone. Les concentrations maximales, correspondantes à des quantités cumulées, de 10,0 mmol/L d'acétate et de 8,5 mmol/L de butyrate sont obtenues après 20 h.

Les métabolites secondaires, pyruvate, formiate et isovalérate suivent un profil similaire à celui du propionate, c'est-à-dire qu'ils sont produits pendant la fermentation, en quantité faible, et sont consommés par la suite. Le cas du butanol est différent, produit à partir d'acide butyrique, donc seulement à partir de 5 h, il n'est pas consommé. Le valérate, produit à partir de propionate et d'éthanol (33) ou d'hydrogène (34) est en partie consommé avec l'avancement de la fermentation. La

III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu

production de valérate permet de limiter l'acidification du milieu réactionnel par équilibre chimique, en limitant le nombre total de molécules d'acide.



La normalisation du bilan carbone a été réalisée à partir des résultats d'analyses de l'échantillon obtenu après traitement thermique, ajout de substrat compris (Figure 35). Le métabolite principalement présent dans le milieu initial est le propionate, avec 10% du carbone, les 90% restant étant liés à l'ajout de substrat modèle. Un recouvrement final de 132% est obtenu pour le bilan carbone. L'écart observé est sans doute le résultat de la dégradation de matières organiques métabolisables dans le milieu réactionnel, non identifiées. La part du valérate, molécule en C₅, est assez importante (jusqu'à 8% du carbone initial vers 6 h), malgré sa quantité limitée dans le milieu (< 1,2 mmol/L).

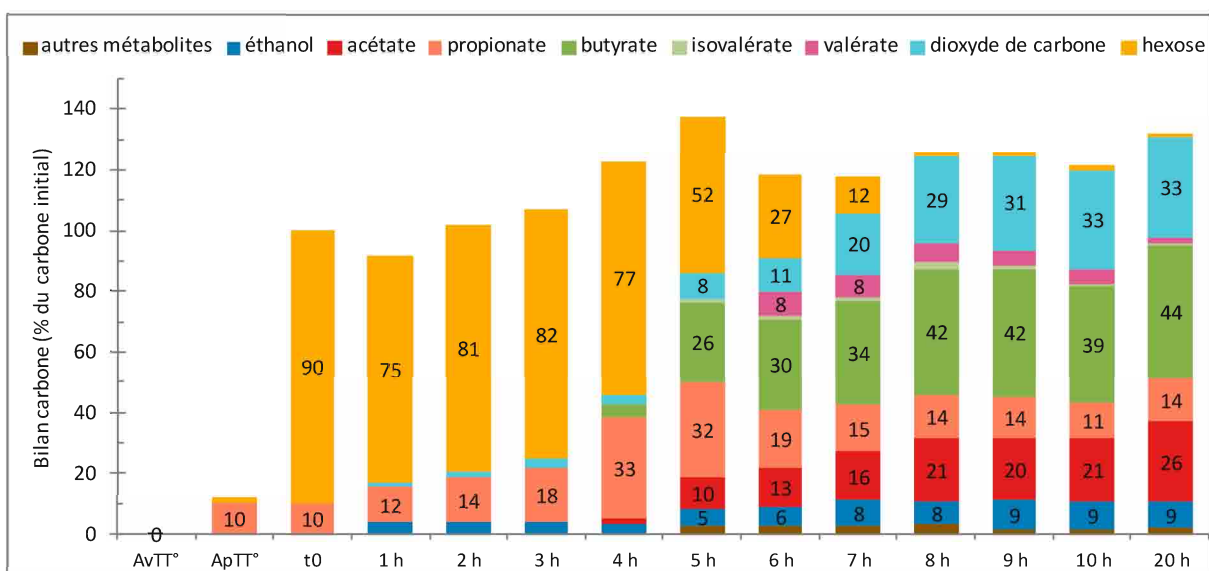


Figure 35 Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone présent dans le milieu réactionnel à t0 pour le suivi temporel de la fermentation obscure, exprimé en pourcentage du carbone à t0

Jusqu'à 4 h de fermentation, le bilan carbone reste stable autour de 100%, avec la production de propionate et d'éthanol à partir d'hexose. A 4 h de fermentation, une production de propionate est observée, non compensée par une baisse d'hexose ; ce propionate semble donc issu d'une autre source que le glucose ajouté au t0 de la fermentation. Ceci peut s'expliquer par la production de propionate via l'hydrolyse des protéines [220], présentes dans le milieu réactionnel, mais non quantifiées.

Les chromatogrammes, issus de l'analyse des échantillons du milieu réactionnel (Figure 36), permettent d'envisager une autre explication possible. En effet, le chromatogramme de l'échantillon à 4 h, proche de celui obtenu après le traitement thermique (voir paragraphe III.B), montre clairement, à 11,4 et 13,1 min, deux pics inconnus d'aire importante. Ces pics sont déjà en partie réduits par rapport à l'état initial, puis totalement à partir de 5 h de fermentation, avant l'apparition des autres métabolites présents dans l'échantillon final. Ces molécules ne sont cependant pas des protéines, mais de petites molécules organiques polaires (< 6 carbone). Un bilan carbone maximal de 138% du carbone initial est observé à 5 h de fermentation, au maximum de la production d'hydrogène, correspondant à la baisse des concentrations d'hexose et de propionate, et à l'apparition des métabolites principaux, butyrate et acétate.

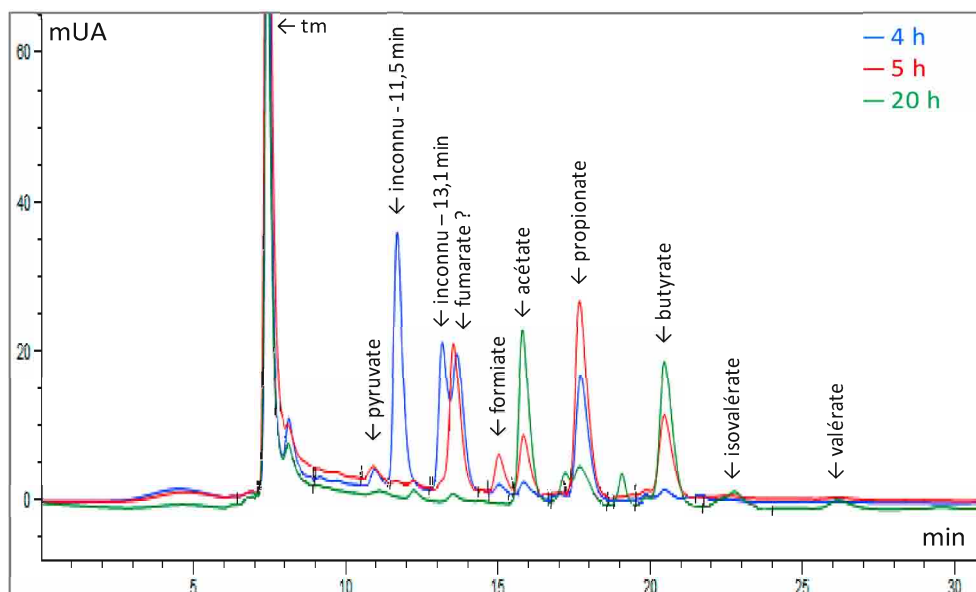


Figure 36 Chromatogramme de HPLC-UV du milieu réactionnel à 4 h, 5 h et 20 h de fermentation

Le pic t_m correspond à l'ensemble des composés présents dans l'échantillon, non retenus par la colonne de chromatographie, composés apolaires, alcools, etc. ce pic correspond au temps mort de la méthode.

Ces résultats de production de métabolites ont montré la complexité du mécanisme mis en œuvre pendant la fermentation obscure, nécessitant plusieurs étapes et empruntant de nombreuses voies métaboliques, impliquant donc une variété importante d'espèces microbiennes, dont la diversité a également été étudiée dans le paragraphe suivant.

III.E.2. Analyse microbiologique

Trois techniques d'analyse microbiologique ont été utilisées pour étudier l'évolution du consortium bactérien au fur et à mesure du test de fermentation. Dans un premier temps, l'analyse par T-RFLP est réalisée pour observer les modifications du profil bactérien, puis dans un second temps, une analyse par pyroséquençage et séquençage à haut débit a permis de compléter les résultats précédents jusqu'à l'identification des bactéries présentes dans le milieu réactionnel.

III.E.2.1. Analyse par T-RFLP

Des échantillons de biomasse prélevés à différentes étapes de la fermentation ont été analysés par T-RFLP : avant traitement thermique (AvTT°), après traitement thermique (ApTT°), au début de la fermentation (3,5 h), au maximum de la fermentation (5 h), en fin de fermentation (8 h), ainsi que 20 h après le début de la fermentation (Figure 37). La Figure 38 montre l'évolution des résultats obtenus pour les deux enzymes de restriction (AluI et HhaI).

III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu

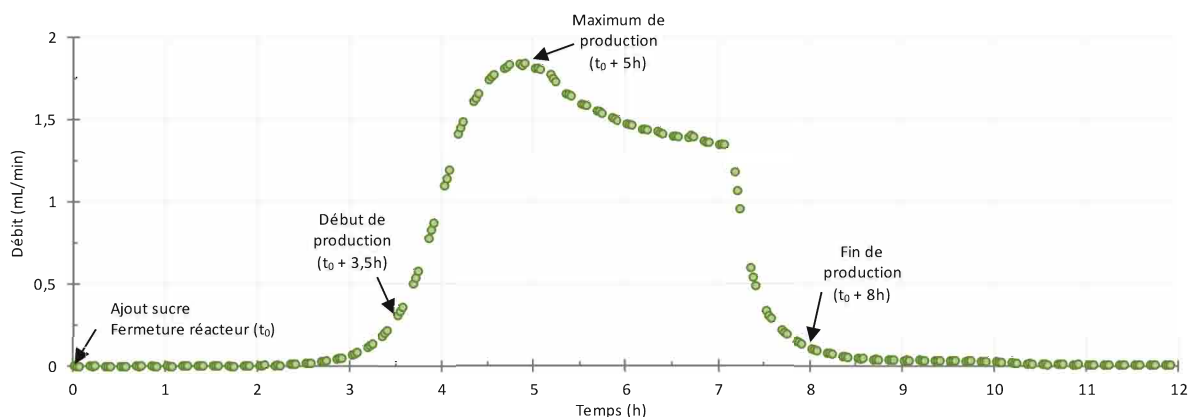


Figure 37. Evolution de la production de H_2 (mL/min) pendant le test de fermentation de référence

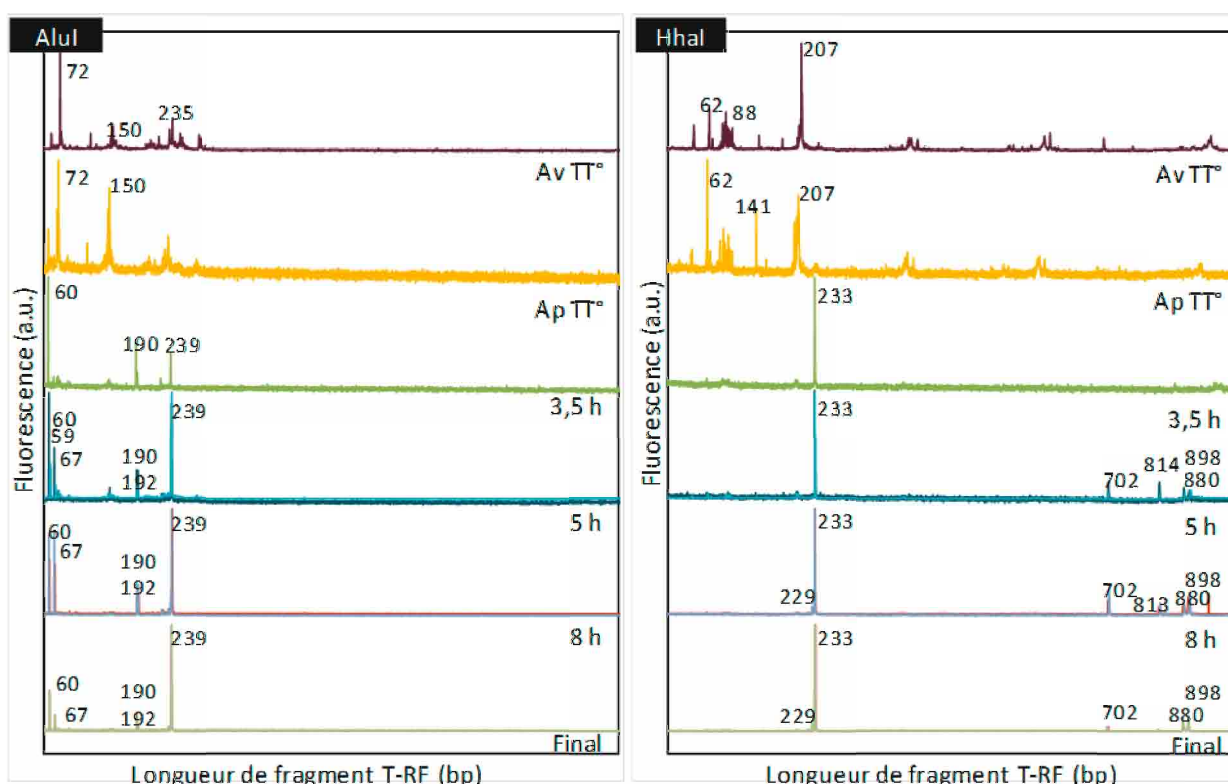


Figure 38. Evolution du profil de l'analyse par T-RFLP pendant le test de fermentation de référence

Les échantillons AvTT° et ApTT°, ont d'ores et déjà étudiés au paragraphe III.B. Le bruit de fond est important, ce qui est significatif d'une diversité bactérienne importante, de plus, aucune espèce bactérienne prédominante ne peut être identifiée à partir des pics principaux observés. En revanche, après 3,5 h de fermentation, des modifications dans le profil de l'électrophorégramme apparaissent : les pics à 60, 190 et 239 pb se distinguent sur celui correspondant à la digestion de l'ADN par l'enzyme AluI, ainsi que le pic à 233 pb pour l'enzyme HhaI. Ceci est significatif du développement de bactéries adaptées aux conditions opératoires. La suite de la fermentation confirme cet effet avec l'émergence de pics supplémentaires à 67 et 192 pb pour AluI et à 702, 814, 880 et 898 pour HhaI. Ce profil est ensuite conservé jusqu'à l'arrêt du réacteur après 20 h de fermentation, bien que l'intensité de certains pics s'atténue, les bactéries du *consortium* producteur d'hydrogène, une fois privé de substrat, entrent en compétition avec les bactéries métabolisant d'autres sources de carbone, les bactéries productrices d'hydrogène perdent alors une part importante de leur population.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

La confrontation de ces profils avec la base de données [180] pour les électrophorégrammes au maximum de la production d'hydrogène (5 h) est donnée dans le Tableau 21. Malgré un profil de T-RFLP relativement épuré par rapport à celui de la biomasse initiale (AvTT°), peu de correspondances ont pu être établies dans la base de données pour identifier clairement la présence d'une espèce bactérienne précise. La présence du genre *Clostridium* est confirmée par la présence de plusieurs couples de pics correspondants, en particulier avec l'espèce *Clostridium butyricum* (AluI 67 pb – HhaI 702 pb). D'autres genres bactériens : *Eubacterium*, *Pasteuria*, *Lactobacillus* entre autres sont également potentiellement présents dans le consortium puisqu'ils ont le couple des pics majoritaires AluI 239 pb – HhaI 233 pb, en commun avec le genre *Clostridium*.

Tableau 21. Correspondances des pics majeurs de l'analyse T-RFLP à 5 h de fermentation avec la base de données [180]

Pic AluI (pb)	Intensité relative	Pic HhaI (pb)	Intensité relative	Correspondances possibles avec la base de données [180]
239	0,95	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>Paenibacillus sp.</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>
60	0,33	880	0,07	<i>Peptostreptococcus genosp. 4</i>
67	0,30	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i>
67	0,30	702	0,11	<i>Clostridium butyricum</i>
190	0,19	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i>
192	0,18	233	1,00	<i>Tolypothrix sp.</i> ; <i>Conexibacter woesei</i>
192	0,18	814	0,05	<i>Clostridium lituseburense</i>
150	0,11	233	1,00	<i>Paenibacillus sp.</i>
72	0,06	233	1,00	<i>Bacillus sp.</i> ; <i>Solobacterium sp.</i> ; <i>Aquasalina asiatica</i> ; <i>Bulleidia moorei</i> ; <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> ; <i>Oxalophagus oxalicus</i> ; <i>Saccharococcus thermophilus</i>

L'analyse par T-RFLP a permis d'observer l'évolution de la diversité bactérienne au cours des phases de traitement thermique puis pendant la fermentation, avec une stabilisation de l'évolution du profil microbiologique à partir de 5 h de fermentation. Cependant l'identification précise des espèces présentes dans le milieu n'est pas possible, bien que la présence du genre *Clostridium* ait été mise en évidence. L'analyse par séquençage des échantillons d'ADN extraits du culot du milieu réactionnel permettra d'obtenir plus d'informations concernant la composition du consortium bactérien.

III.E.2.2. Analyse par séquençage

Certains échantillons de biomasse prélevés à différents moments d'un test de production d'hydrogène de référence (AvTT°, ApTT°, 5 h et final) ont été analysés par séquençage à haut débit (pyroséquençage pour l'échantillon de 5 h) par l'INRA Transfert Environnement. Une quantité relativement importante d'OTU a été obtenue après traitement des données : 1305, 1416, 1076, 930 OTU respectivement pour les échantillons AvTT°, ApTT°, 5 h et final (Tableau 22). Tout comme cela a été observé lors des analyses par T-RFLP, la diversité bactérienne dans le consortium est plus importante avant fermentation, ce qui s'explique par une sélection par les conditions opératoires particulières pendant le fonctionnement du bioréacteur. La valeur de l'indice de Simpson passe, en effet, de la valeur de 0,02 après traitement thermique à 0,1 à 5 h de fermentation, puis à 0,2 après 20 h de fermentation. Les principaux résultats extraits sont présentés dans le Tableau 23, qui présente les correspondances des principaux genres et espèces présents et la Figure 39, qui confronte l'évolution de

III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu

la représentativité des principaux genres présents dans le milieu réactionnel, en fonction de l'avancement de la fermentation.

Tableau 22. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, avant et après traitement thermique, à 5 h et 20 h de fermentation - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
AvTT°	1305	0,02
ApTT°	1416	0,02
5 h	1076	0,10
20 h	930	0,22

Les échantillons prélevés avant et après traitement thermique, présentés au paragraphe III.B, montrent une gamme importante d'espèces bactériennes, dont peu sont communes avec l'échantillon en cours de production (5 h). Après traitement thermique, *Haliangium spp. (ochraceum / tepidum)* (7,6%) et *Rhodofera spp. (ferrireducens / saidenbachensis)* (7,8%) restent parmi les correspondances les plus représentées, mais leur présence est réduite au cours de la fermentation, à cause de l'incompatibilité des conditions de fermentation avec celles nécessaires à leur développement, une température maximale de 30°C pour le genre *Rhodofera* et des conditions aérobies pour *Haliangium*. Les proportions relatives de ces OTU restent cependant plus élevées qu'attendu en fin de fermentation, ce qui semble indiquer que ces bactéries, bien qu'incapables de se développer, restent dans le milieu en état de dormance, avec une population stable ou en légère décroissance, diluée dans la population globale microbienne en légère croissance. Dans le cas d'*Haliangium* cela peut également être expliqué par la formation au cours du traitement thermique initial de myxospores, restant en dormance pendant la fermentation. Ces espèces bactériennes ne jouent donc aucun rôle dans le métabolisme bactérien.

Globalement, l'étape de traitement thermique permet une réduction de la proportion du phylum *Betaproteobacteria* (de 25,5% à 20,0%), tandis que la proportion des *Bacteroidetes* augmente (de 21,7% à 32,1%), avec en particulier différentes espèces du genre *Flavobacterium*, dont la représentativité augmente après le traitement thermique de 3,2 à 5,8%. La proportion du phylum *Firmicutes* reste très faible, autour de 2%. La grande diversité bactérienne peut à nouveau être observée avant et après traitement thermique avec la quantité relativement importante (14,5% en moyenne) de bactéries dont le phylum représente moins de 2% de l'ensemble des OTU identifiées dans les échantillons prélevés avant et après le traitement thermique.

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Tableau 23. Résultats obtenus par séquençage des échantillons AvTT°, ApTT°, 5 h et 20 h de fermentation - groupes ayant une abondance > 2% pour au moins un des échantillons – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible

Phylum	Famille	Genre	meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	AVTT°	ApTT°	5 h	20 h
Bacteroidetes (100%)	Flavobacteriaceae	Flavobacterium (100%)	Flavobacterium noncentrifugens	< 97	NR_109531	2,4	4,5	4,9	2,1
	Saprospiraceae (< 97%)	Lewinella (< 97%)	Lewinella sp.	< 97	/	3,2	3,3	1,9	2,0
	Comamonadaceae	Rhodoferrax	Rhodoferrax spp. (ferrireducens / saidenbachensis)	100	/	5,4	7,8	0,2	1,9
Betaproteobacteria	Rhodocyclaceae (100%)	Dechloromonas (99%)	Dechloromonas spp. (hortensis / denitrificans)	97	/	4,9	1,7	0,1	0,4
		Sulfuritalea	Sulfuritalea hydrogenivorans	100	NR_113147	0,8	2,7	0,4	0,4
	Zoogloea	Zoogloea caeni	100	NR_043795	5,4	0,6	0,0	0,0	0,1
Chlorobi	SIA-28 / PHOS-HE36 (100%)	Meliobacter (genres affiliés) (< 97%)	Ignavibacterium album / Melioribacter roseus (genres affiliés)	< 97	/	1,6	2,2	0,0	1,0
	Haliangiaceae (< 97%)	Haliangium (< 97%)	Haliangium spp. (ochraceum / tepidum)	< 97	/	6,0	7,6	3,0	0,8
Deltaproteobacteria (98%)	Clostridiaceae 1 (100%)	Clostridium sensu stricto 1 (100%)	Clostridium spp. (baratii / perfringens)	98	/	0,0	0,1	26,7	44,2
		Clostridium sensu stricto 1 (98%)	Clostridium butyricum	99	/	0,0	0,0	13,7	6,9
	Clostridium sensu stricto 12 (100%)	Clostridium sensu stricto 1 (98%)	Clostridium saccharobutylicum	97	NR_122061	0,0	0,0	2,7	0,0
Firmicutes	Peptostreptococaceae	Clostridium sensu stricto 12 (100%)	Clostridium spp. (puniceum, saccharoperbutylacetonicum, beijerinckii, diolis, roseum)	97	/	0,0	0,0	2,6	0,0
		Clostridium sensu stricto 12 (100%)	Clostridium magnum	99	/	0,0	0,0	2,8	2,7
	Peptoclostridium [Clostridium]	Peptoclostridium sordellii [Clostridium]	100	KM657125	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3
Gammaproteobacteria	Xanthomonadaceae	Peptoclostridium [Clostridium]	Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei) [Clostridium]	100	/	0,0	0,0	0,0	9,8
		Dokdonella // Xanthomonas	Dokdonella sp. // Xanthomonas sp.	100	/	2,6	0,7	0,0	0,1

III.E. Suivi de fermentation en mode discontinu

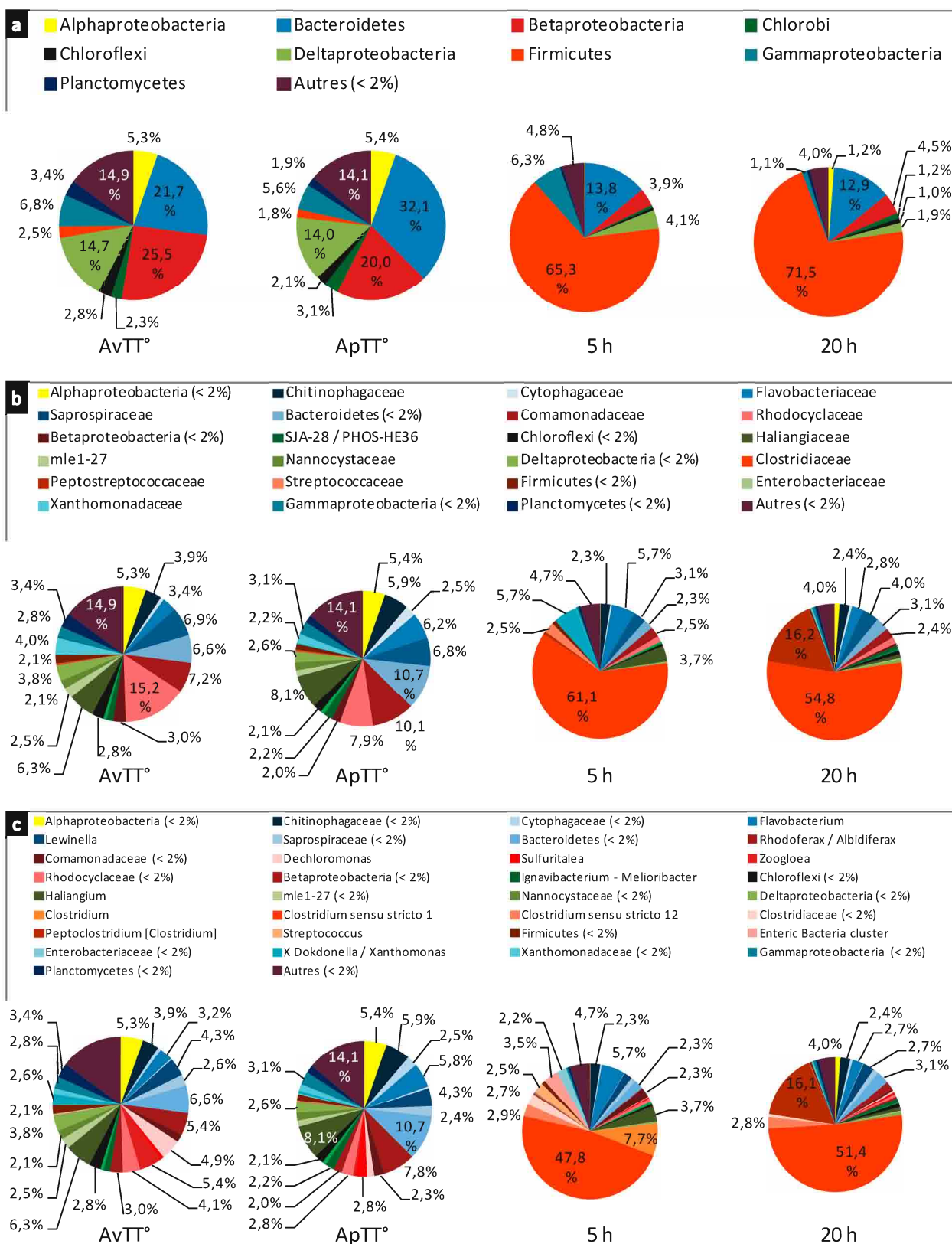


Figure 39. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons AvTT°, ApTT°, 5 h et 20 h de fermentation - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

III. Optimisation du procédé de fermentation obscure en réacteur agité semibatch (RASB)

Concernant l'échantillon au maximum de production d'hydrogène, 5 h, l'espèce majoritaire est *Clostridium spp. (baratii / perfringens)* avec 26,7%, accompagnée de *Clostridium butyricum* avec 13,7%, le genre *Clostridium sensu stricto 1* représentant 47,8% du total des séquences identifiées. Le profil bactérien de l'échantillon final à 20 h de fermentation est assez proche de celui observé à 5 h, comme l'analyse par T-RFLP le présumait. Les OTU majoritaires sont *Clostridium spp. (baratii / perfringens)* avec 44,2%, et *Clostridium butyricum* avec 6,9%, le genre *Clostridium sensu stricto* représentant 51,4% des séquences identifiées. Une nouvelle correspondance apparaît dans cet échantillon, *Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei)* avec 9,8% des séquences analysées. Ces espèces ne font pas parties du genre *Clostridium sensu stricto*, mais étaient précédemment incluses parmi les *Clostridium*, à cause de leurs ressemblances phénotypiques, comme la production de biohydrogène par fermentation obscure [231]. L'apparition de cette espèce en fin de fermentation peut être liée à une vitesse de croissance et/ou de germination des spores plus lente, ou à l'évolution des conditions du milieu de fermentation (pH, concentration en métabolites) plus favorables.

Peu d'autres correspondances sont observées en quantités importantes à 5 h et 20 h de fermentation ; la proportion des bactéries majoritaires, avant et après le traitement thermique, ayant été fortement réduite par les conditions sélectives appliquées dans le bioréacteur. La présence non négligeable des bactéries du genre *Flavobacterium* est à noter à 5 h (5,8%) comme à 20 h (3,2%). La présence de ces bactéries anaérobies facultatives permet de limiter la concentration en O₂ dans le milieu réactionnel, permettant de conserver des conditions anaérobies, favorables aux *Clostridia* [230].

Une certaine correspondance de nos résultats est observée avec la littérature. A partir d'un *inoculum* composé de boues biologiques, traitées thermiquement à 121°C / 20 min, Ren *et al.* [197], observent l'émergence de différentes bactéries du genre *Clostridium* : *C. tyrobutyricum*, *C. vincentii* et *C. longisporum*, alors qu'aucune d'entre elles n'était identifiée dans l'échantillon de biomasse initial. A partir de boues de station d'épuration, la présence majoritaire des bactéries du phylum *Firmicutes*, et en particulier du genre *Clostridium* est systématiquement observée dans le milieu de fermentation obscure avec alimentation en substrat modèle : *Clostridium pasteurianum* [98] ; *Clostridium acetobutylicum*, *C. butyricum* et *Bacillus thuringiensis* [190] ; *Lactobacillus delbrueckii*, *L. fermentum*, *Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum* [185] ; *Clostridium butyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. perfringens* [232] ; *Peptoclostridium bifermentans* [188].

L'analyse microbiologique du consortium bactérien présent dans le bioréacteur avant, pendant et en fin de test de fermentation a montré la sélection de microorganismes spécifiques. La diversité bactérienne dans le milieu réactionnel reste assez importante au cours de la fermentation, mais cette diversité est inférieure à celle observée avant fermentation grâce au développement important de certains microorganismes. Comme dans la plupart des études de fermentation obscure utilisant des boues de station d'épuration comme inoculum microbien, une majorité de bactéries du genre *Clostridium sensu stricto* se développent, l'espèce majoritaire étant ici *C. spp. (baratii / perfringens)* représentant 44,2% de la population bactérienne 20 h après le début de la fermentation.

III.E.3. Bilan du suivi de fermentation

Le suivi analytique de ce test de fermentation réalisé avec les conditions sélectionnées au cours de ce chapitre a permis de mettre en avant plusieurs points importants de l'activité et du métabolisme microbien au cours de la fermentation obscure, à partir des boues de STEP. La complexité du mécanisme mis en œuvre pendant la fermentation obscure, nécessitant plusieurs étapes et empruntant de nombreuses voies métaboliques a été mise en évidence. L'analyse microbiologique par T-RFLP et séquençage a permis d'observer l'évolution de la diversité bactérienne au cours des phases de traitement thermique puis pendant la fermentation, avec une stabilisation de l'évolution du profil microbiologique à partir de 5 h de fermentation avec la sélection de microorganismes spécifiques. La diversité bactérienne, très importante avant et après traitement thermique est fortement réduite à 5 h de fermentation, phénomène qui s'accroît à 20 h de fermentation avec probablement la disparition progressive des microorganismes les moins adaptés. Une majorité de bactéries du genre *Clostridium sensu stricto* se développe, les espèces majoritaires étant ici *C. spp. (baratii / perfringens)* et *C. butyricum*.

III.F. Conclusion du chapitre

Cette première partie de l'étude a permis de mettre au point les paramètres optimaux de fermentation, qui seront conservés pour la suite de l'étude. Le *consortium* microbien issu de la zone anoxie des lignes de traitements biologiques de la STEP a été sélectionné. Ce *consortium* est alimenté avec le glucose comme substrat modèle, sans régulation de pH et avec une température de fermentation mésophile de 38°C. Le suivi analytique du test de fermentation de référence a permis d'observer les profils de production de gaz et de métabolites, accompagnés de la consommation du glucose, stabilisés au bout de 8 h avec un bilan carbone systématiquement calculé comme excédentaire, les métabolites principalement présents en fin de test étant l'acétate et le butyrate, tandis que d'autres métabolites, comme le propionate, sont produits puis consommés pendant la fermentation. La présence majoritaire des bactéries du genre *Clostridium sensu stricto* (> 50%) a été mise en évidence par séquençage à haut débit dans le *consortium* bactérien actif pendant la fermentation.

Le chapitre suivant portera sur l'intensification du procédé de production d'hydrogène par l'amélioration des conditions d'extractions des gaz produits au cours de la fermentation.

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

La présence d'hydrogène et de dioxyde de carbone dans le milieu réactionnel a un effet limitant sur la production de gaz. Cet effet peut être atténué, voire éliminé, par la réduction de la pression partielle de H₂ pour limiter les voies métaboliques hydrogénotrophes [233] et/ou de CO₂ permettant, en particulier, de limiter l'homoacétogénèse (26) [145].



En plus de limiter la consommation des gaz produits, leur extraction permet de limiter la déviation du métabolisme vers la production de produits plus réduits que l'acétate et le butyrate, comme les alcools, le lactate ou le succinate [50].

Pour réaliser cet objectif, différentes stratégies ont été mises en œuvre dans la littérature pour améliorer les performances du mode de fonctionnement fondamental avec un réacteur totalement clos (mode de fonctionnement batch). Dans cette configuration, Alshiyab *et al.* [145] ont permis l'amélioration du rendement en hydrogène de 4% grâce à l'utilisation d'un piège à CO₂ alcalin placé dans le ciel du bioréacteur. Cependant ce type de fonctionnement n'est pas transposable à grande échelle, et ne permet pas la production continue de gaz. L'utilisation de mode de fonctionnement semibatch, avec ouverture du ciel du bioréacteur, permettant une extraction libre ou forcée du biogaz est donc nécessaire. Logan *et al.* [143] ont ainsi montré que l'utilisation d'un réacteur ouvert avec extraction libre permettait une amélioration de la production en H₂ (+ 42%) par rapport à un mode avec extraction intermittente, alternant des phases d'ouverture et de fermeture de la sortie des gaz.

L'extraction forcée des gaz produits permet en théorie d'améliorer les performances de production d'hydrogène, en réduisant plus efficacement la pression partielle de H₂ et de CO₂. L'utilisation d'un mode d'extraction des gaz par dépression a été testée à plusieurs reprises, avec des résultats assez peu reproductibles, parfois favorables à la production d'hydrogène [132] ou sans amélioration significative par rapport à l'extraction libre [65], ceci indiquant une forte dépendance par rapport aux autres conditions expérimentales et en particulier au *consortium* microbien présent.

Mandal *et al.* [132] indiquent que l'utilisation d'un mode d'extraction par balayage du ciel gazeux par un gaz neutre, sans bullage dans le milieu réactionnel (aussi appelé stripping), favorise la dissolution des gaz dans le milieu réactionnel puisqu'une légère surpression est générée dans le ciel gazeux, rendant ce mode moins efficace. En revanche, le bullage d'un gaz neutre azote ou argon dans le milieu réactionnel (gas sparging) est systématiquement à l'origine d'une amélioration du rendement et de la productivité en hydrogène [136–139,142].

Il a également été montré que le débit de gaz de balayage utilisé pour le barbotage avait un impact significatif ; son augmentation permettant une amélioration des performance de production [137]. Kim *et al.* [139] ont montré que l'utilisation du dioxyde de carbone comme gaz de balayage permettait d'améliorer la production de H₂ (+ 30%) par rapport à l'utilisation de N₂ grâce à l'effet inhibiteur du CO₂ sur certaines bactéries hydrogénotrophes. L'ajout de CO₂ à N₂, voire la possibilité de l'utilisation exclusive de CO₂ comme gaz de balayage, permettrait en effet de limiter l'utilisation d'un

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

gaz externe au procédé de fermentation ; le dioxyde de carbone produit par la fermentation pouvant alors être ainsi partiellement recyclé.

Dans cette étude, l'impact de différentes méthodes d'extraction des gaz produits par la fermentation est donc testé. En plus du mode d'extraction par barbotage d'un gaz de balayage dans le milieu réactionnel, utilisé au chapitre III des tests sans gaz de balayage avec extraction libre et extraction forcée par une faible dépression ont été réalisés. De plus, le fonctionnement du bioréacteur avec extraction par gaz de balayage est étudié plus en détail, les performances de production avec ce mode étant variables en fonction des paramètres opératoires utilisés. Dans un premier temps, l'influence du débit de N_2 comme gaz de balayage sur la production d'hydrogène est étudiée. La possibilité du remplacement de N_2 par CO_2 en tant que gaz de balayage a été évaluée ; la mise en place d'un recyclage du CO_2 produit par la fermentation pouvant être envisagée pour des études ultérieures. Afin de tester la reproductibilité de nos résultats, chaque configuration du bioréacteur a été testée en triplicat.

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

Le mode d'extraction des gaz produits par fermentation hors du milieu réactionnel a un impact sur l'efficacité du procédé de production d'hydrogène. Afin d'optimiser cette extraction, trois modes de fonctionnement ont été testés et comparés au mode batch :

- mode ouvert, avec extraction libre des gaz produits par la fermentation (sans système d'extraction),
- mode d'extraction par dépression, avec une pression absolue dans le bioréacteur proche de la pression atmosphérique (800 mbar),
- mode d'extraction utilisant l'azote comme gaz de balayage, avec un débit moyen de 174 mL/ L_{milieu} /min.

Ces trois modes d'extraction des gaz ont été testés en réacteur agité semibatch (RASB) à partir des mêmes conditions de fermentation initiales, dans les conditions optimisées dans le chapitre III. Cette série de tests a été réalisée dans le bioréacteur d'un volume de 1,5 L, avec 1,2 L de boues activées de la zone anoxie de la station d'épuration comme *inoculum* microbien.

IV.A.1. Suivi de la production de gaz

Pendant la phase de fermentation, les débits et volumes d'hydrogène produit les plus importants sont observés avec l'utilisation du gaz de balayage, avec respectivement 4,65 mL H_2 /min et 550 mL H_2 / L_{milieu} (Figure 40). Cet effet positif a été également observé par Mizuno *et al.* [140] avec un test en fonctionnement continu, sans et avec gaz de balayage (à un débit de 48 mL/ L_{milieu} /min), avec une amélioration du rendement de 0,85 à 1,43 mol H_2 /mol $glucose$ consommé. De même, l'ajout d'un système d'extraction par gaz de balayage au réacteur batch utilisé par Nguyen *et al.* [141] a permis une amélioration significative du rendement de 78%. Le test avec extraction des gaz par dépression présente un volume de H_2 produit nettement plus faible (-36%) que le test avec l'utilisation d'un gaz de balayage et relativement équivalent (+19%) au test avec extraction libre.

Concernant le test mené en mode de fonctionnement batch (réacteur hermétiquement clos), le suivi de la production de gaz n'a pas pu être réalisé en fonction du temps. Les gaz produits par la fermentation créent une surpression dans le réacteur dont l'évolution peut être associée à celle du volume total de gaz produit (Figure 40 b). On notera que la pression relative finale moyenne est de

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

2,0 bar et que le profil d'évolution de la pression est proche de celui obtenu pour l'évolution du volume total d'hydrogène produit avec les autres modes de fonctionnement ; ce qui permet de le modéliser par le modèle modifié de Gompertz {2}.

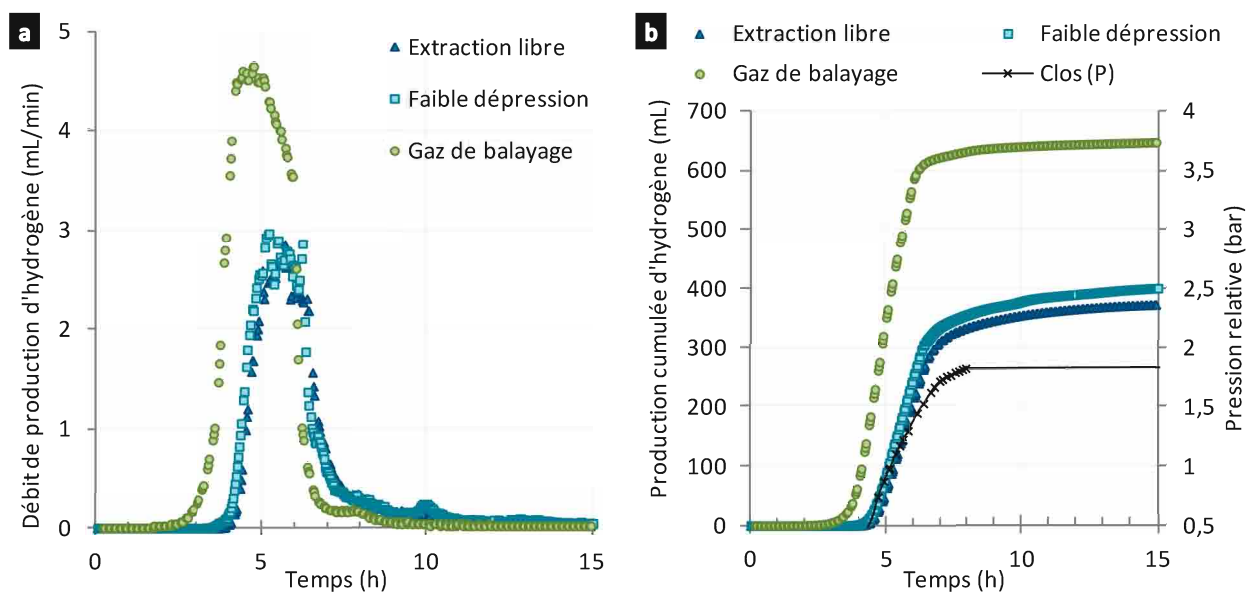


Figure 40. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différents modes d'extraction des gaz – concernant le mode du réacteur clos, seule la pression dans le bioréacteur est représentée (b)

Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en RASB (1,5 L) ; volume d'inoculum de 1,2 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($10,9 \pm 0,1 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}$) ; les trois modes d'extraction des gaz produits sont testés indépendamment

Une fois la fermentation terminée, le gaz en surpression dans le bioréacteur clos est évacué puis analysé en ligne par GC-TCD, et assimilé au volume de gaz produit en phase de production. Cette quantité s'est révélée la plus faible de cette série de tests, avec un rendement de 0,9 contre 1,12 $\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$ avec le mode de fonctionnement avec extraction libre (Tableau 24).

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Tableau 24. Valeurs des volumes produits de H_2 et de CO_2 , du rendement en H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , du rapport H_2/CO_2 en fonction du mode d'extraction des gaz produits, avant dégazage du milieu réactionnel - et valeurs des volumes produits de H_2 et de CO_2 , du rendement en H_2 et des rapports H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ en fonction du mode d'extraction des gaz produits, après dégazage du milieu réactionnel

Les incertitudes correspondent à l'écart type des répliqués de fermentation

Phase de production – avant dégazage du milieu réactionnel								
Mode d'extraction	Volume de H_2 produit normalisé (mL/L _{milieu})	Volume de CO_2 produit normalisé (mL/L _{milieu})	Rendement (mol _{H₂} / mol _{hexose} ajouté)	Rendement (mol _{H₂} / mol _{hexose} consommé)	H_2/CO_2	H_{max} (L _{H₂} / L _{milieu})	R_{max} (mL _{H₂} / L _{milieu} /h)	λ (h)
Clos	226 ± 56	109 ± 45	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	2,5 ± 0,5	/	/	3,8 ± 0,1
Extraction libre	296 ± 20	179 ± 19	1,12 ± 0,08	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	294 ± 21	104 ± 24	5,0 ± 0,5
Faible dépression	350 ± 17	269 ± 15	1,32 ± 0,06	1,3 ± 0,1	1,30 ± 0,04	349 ± 18	129 ± 25	4,7 ± 0,3
Gaz de balayage	549 ± 13	657 ± 17	2,11 ± 0,04	2,11 ± 0,04	0,84 ± 0,01	547 ± 10	268 ± 14	4,0 ± 0,1
Total – après dégazage du milieu réactionnel								
Mode d'extraction	Volume de H_2 produit normalisé (mL/L _{milieu})	Volume de CO_2 produit normalisé (mL/L _{milieu})	Rendement (mol _{H₂} / mol _{hexose} ajouté)	Rendement (mol _{H₂} / mol _{hexose} consommé)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/ 2(B+A)$	Hexose consommé (%)
Clos	383 ± 104	687 ± 32	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,4	0,56 ± 0,15	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,3 ± 0,6
Extraction libre	524 ± 104	693 ± 175	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	0,77 ± 0,14	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1	98,4 ± 0,5
Faible dépression	427 ± 34	570 ± 57	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,75 ± 0,08	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	98,5 ± 0,4
Gaz de balayage	549 ± 12	656 ± 16	2,11 ± 0,04	2,11 ± 0,04	0,84 ± 0,01	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	98,0 ± 0,4

Le pH du milieu réactionnel est suivi en temps réel pendant les tests de fermentation (Figure 41). Les conditions de fonctionnement étant identiques durant cette période, la variation de pH observée pendant la phase initiale de traitement thermique est identique pour tous les tests. L'augmentation visible du pH après la fermeture du bioréacteur ($t = 0$ h), due au dégazage du CO_2 , apparaît pour tous les modes de fonctionnement, mais plus faiblement sans l'utilisation d'un gaz de balayage, ce qui s'explique par l'efficacité du gaz de balayage pour le stripping du CO_2 . Dans le cas du test batch, l'augmentation de la pression au sein du réacteur ne permet pas l'utilisation de la sonde pH, seul le début du test a pu être suivi, avec une évolution très similaire à celle du test avec extraction libre (résultats non représentés sur la Figure 41). Le pH baisse ensuite au cours de la fermentation avec la production d'acides organiques pour atteindre un pH minimal à une valeur plus faible pour les tests n'utilisant pas de gaz de balayage, ce qui est dû à la présence de CO_2 dans le milieu réactionnel en quantité plus importante, en plus des métabolites acides, en l'absence de flux de gaz.

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

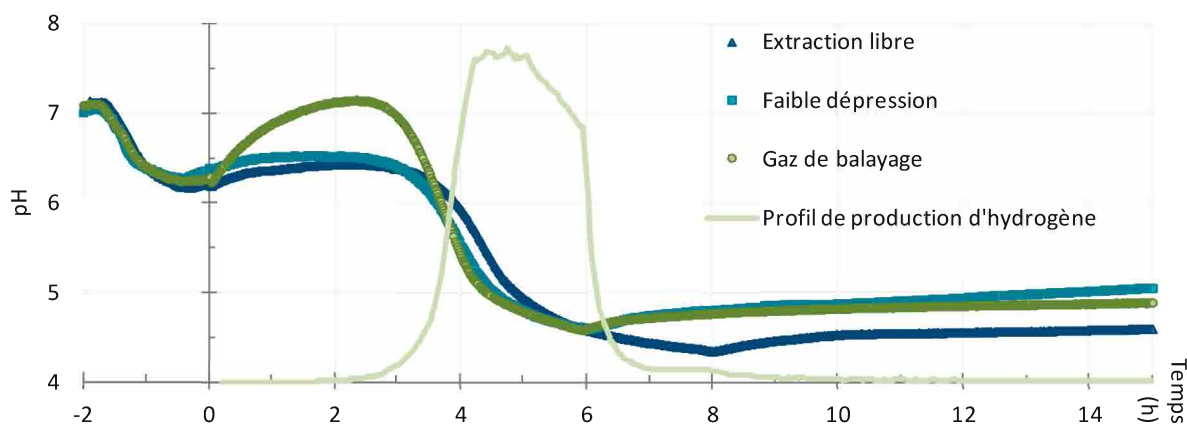


Figure 41. Suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps pour différents mode d'extraction des gaz

Cette présence de CO_2 importante dans le milieu réactionnel lors des tests de fonctionnement sans gaz de balayage est clairement observable sur la Figure 42 montrant les pressions partielles d'hydrogène, de dioxyde de carbone et d'azote dans le ciel gazeux en fonction du mode d'extraction utilisé, au maximum de production d'hydrogène. Lorsque le gaz de balayage est utilisé, une pression partielle de CO_2 minimale (0,02 bar) est observée, tandis qu'elle est supérieure à 0,30 bar pour les autres modes d'extraction ouverts. La pression partielle en CO_2 étant plus élevée, la quantité dissoute de ce gaz dans le milieu réactionnel est d'autant plus élevée.

Dans le cas du mode de fonctionnement avec réacteur clos, l'absence totale d'extraction des gaz ne permet pas la mesure au maximum de production du gaz ; les valeurs correspondent à la composition du gaz au début de la détente du réacteur membranaire (valeur normalisée sur 1 bar). Une pression partielle en hydrogène importante dans le ciel gazeux à 0,78 bar est alors observée, avec une quantité de CO_2 dans le ciel plus faible (0,21 bar) ; ce dernier étant plus soluble que H_2 . Les performances améliorées de production d'hydrogène pour le mode de fonctionnement avec gaz de balayage sont cohérentes avec les faibles pressions partielles de H_2 et de CO_2 dans le ciel gazeux lors de ces tests de fermentation (0,02 bar). Malgré l'utilisation d'une extraction forcée pour le test avec dépression, la pression partielle de H_2 dans le milieu reste élevée (0,49 bar) bien que 25% plus faible par rapport à celle observée lors du test avec extraction libre des gaz produits.

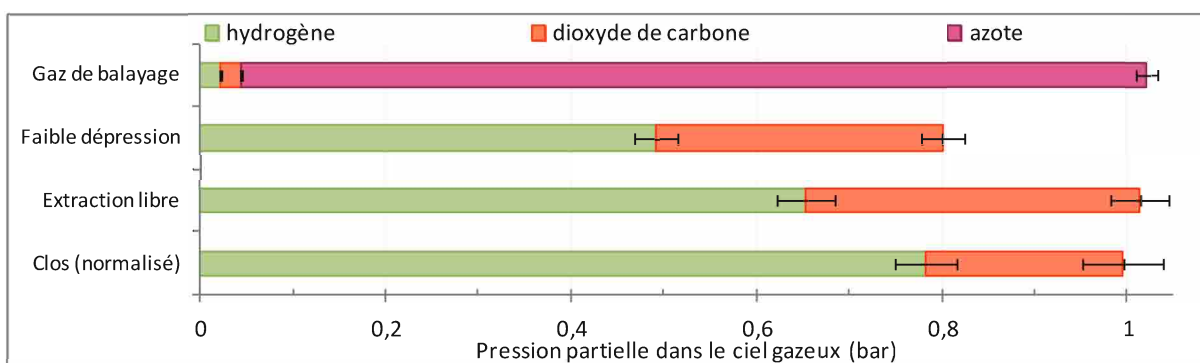


Figure 42. Pressions partielles des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur en fonction du mode d'extraction des gaz (valeur au maximum de la production d'hydrogène pour les modes de fonctionnement semibatch - valeur au début du dégazage pour le mode de fonctionnement avec réacteur clos, normalisée sur 1 bar) - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliquats de fermentation

A partir des potentiels électrochimiques des couples d'oxydoréduction impliqués dans les réactions de production d'hydrogène, Clark *et al.* [65] ont calculé les pressions partielles minimales à partir desquelles la production de H_2 n'est plus favorable pour différentes voies métaboliques. Une pression limite très basse de 0,85 mbar pour la voie [NADH : ferrédoxine

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

oxydoréductase : hydrogénase], qui n'est donc globalement pas favorisée dans le milieu, quelles que soient les conditions utilisées. En revanche, pour la voie [ferrédoxine : hydrogénase], des valeurs limites allant de 0,024 à 4,56 bar sont calculées, en fonction de l'espèce de *Clostridium* envisagée, ce qui peut expliquer les différences observées dans la littérature, pour des modes d'extraction différents, mais avec des *inocula* variables. Il est ainsi probable que la pression partielle très basse obtenue avec l'utilisation du gaz de balayage dans cette étude permette d'activer des voies métaboliques bloquées par une pression partielle plus élevée en hydrogène dans les autres configurations.

Les gaz résiduels présents dans le milieu réactionnel en fin de fermentation, pour les modes de fonctionnement ouvert et en dépression, et suite à la dépressurisation du réacteur clos, sont évacués avec l'utilisation d'un flux de gaz de balayage N₂. Ces gaz sont analysés en ligne par GC-TCD, permettant d'obtenir le volume total de gaz produit au cours de la fermentation, résultats « totaux » sur la Figure 43 et le Tableau 24. Les rendements calculés sur la phase de production avant dégazage sont sensiblement impactés, avec après dégazage, des augmentations allant jusqu'à 77% (cas du test avec extraction libre). Après dégazage, le mode avec réacteur clos conserve les résultats les plus faibles, tandis que le mode utilisant un gaz de balayage permet toujours l'obtention des meilleurs résultats avec un rendement 46% plus élevé que celui du réacteur clos.

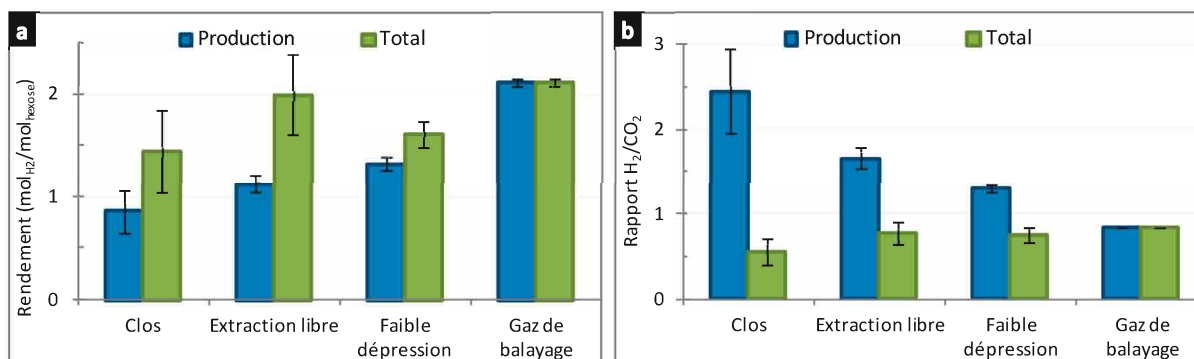


Figure 43. Rendement en H₂ (a) et rapport molaire H₂/CO₂ (b) en fonction du mode d'extraction des gaz, avant et après dégazage du milieu réactionnel - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliqués de fermentation

Le mode d'extraction des gaz par dépression présente, après dégazage, un rendement final inférieur à celui obtenu pour le réacteur avec extraction libre (-19%), tandis qu'il lui était supérieur pendant la phase de production (+17%). Ce changement démontre l'efficacité du mode de fonctionnement par dépression pour extraire les gaz produits du milieu réactionnel, par rapport à une extraction libre, cependant aucune augmentation significative du volume de gaz produit n'est observée.

Après équilibrage des conditions de dégazage du milieu réactionnel obtenu en appliquant un flux de gaz de balayage continu et identique pour tous les modes de fonctionnement (extraction totale du CO₂ gazeux), le rapport H₂/CO₂ maximal peut être déterminé. Ce rapport molaire H₂/CO₂ est également fortement impacté par l'étape de dégazage du milieu réactionnel, ce qui s'explique par la solubilité relative des deux gaz, plus élevée pour le CO₂ qui s'équilibre dans le milieu réactionnel sous forme d'acide carbonique. Sans gaz de balayage, durant la phase de production, la quantité de CO₂ dans le gaz produit est faible par rapport à la quantité réellement produite. Ceci explique la baisse très importante observée du rapport H₂/CO₂ après dégazage du milieu, avec jusqu'à -77% pour le réacteur clos, passant de 2,5 à 0,6. Le rapport H₂/CO₂ maximal, après dégazage, est obtenu pour le

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

test avec gaz de balayage (0,84), supérieur d'environ 10% aux tests avec extraction libre ou en dépression modérée.

Concernant les paramètres de modélisation, il faut tenir compte du fait que seule la phase de production est prise en compte pour les tests réalisés sans gaz de balayage, le profil observé pendant le dégazage de l'hydrogène résiduel ne pouvant être intégré au modèle de Gompertz. Le paramètre H_{max} est ainsi plus faible de 46% pour le test avec extraction libre par rapport au test avec gaz de balayage. De même, la productivité R_{max} augmente de 104 à 268 $mL_{H_2}/L_{milieu}/h$ avec l'ajout d'un gaz de balayage, soit une augmentation de 158%. Par rapport au test avec gaz de balayage, une augmentation du temps de latence λ est observée pour les tests avec extraction libre et en dépression (respectivement + 0,7 et + 1,0 h), ce qui peut s'expliquer par une réduction de la solubilité du gaz dans le milieu réactionnel lorsqu'un système d'extraction des gaz est utilisé, ce qui accélère l'évacuation du gaz du milieu réactionnel. Un temps de latence proche (3,8 h) est également obtenu pour le système sans extraction, cette valeur de λ étant obtenue par modélisation de la pression.

En mode de fonctionnement continu RAC, avec un *consortium* mixte traité thermiquement et alimenté en saccharose, Lee *et al.* [131] ont montré qu'une réduction progressive de la pression absolue dans le milieu réactionnel permettait une amélioration limitée (+ 8 %) du rendement et de la productivité en H_2 , jusqu'à 507 mbar par rapport à la pression atmosphérique avec un mode de fonctionnement avec extraction libre. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus, ici, en mode de fonctionnement RASB, pour lesquels l'utilisation du mode d'extraction par dépression a permis une amélioration du rendement et de la productivité en hydrogène de respectivement 17% et 24% sur la phase de production par rapport au mode avec extraction libre.

Ces résultats ont montré l'efficacité de trois modes d'extraction des gaz produits pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. Le mode de fonctionnement présentant les meilleurs résultats est le mode utilisant un gaz de balayage (azote) pour entrainer les gaz produits, celui-ci permettant de réduire fortement la pression partielle en hydrogène (0,02 bar) dans le milieu réactionnel. Le mode d'extraction avec extraction libre permet également d'atteindre des performances de production en hydrogène intéressantes avec un rendement autour de 2,0 mol_{H2}/mol_{hexose}, tout comme, en phase de production, le mode en dépression permet de produire un volume d'hydrogène substantiel. Ceci permet également d'envisager ces techniques pour une production industrielle de biohydrogène, dont l'aspect positif est l'absence de dilution du gaz produit par un gaz externe.

IV.A.2. Analyse des métabolites et bilan carbone

Une corrélation entre les deux rapports molaires B/A et H_2/CO_2 est constatée (Tableau 24). En effet, un faible rapport B/A correspond à un fort rapport H_2/CO_2 , comme dans le cas du test avec gaz de balayage (B/A = 0,5 et H_2/CO_2 = 0,84), alors qu'un rapport élevé B/A (1,1) et un faible rapport H_2/CO_2 (0,56) sont obtenus pour le test avec réacteur clos. Cette corrélation s'explique par les voies de fermentation acétate (16) et butyrate (17) : la production d'une mole d'acétate conduit à la production de 4 moles de H_2 et 2 moles de CO_2 (H_2/CO_2 = 2), tandis que la production de butyrate est accompagnée de la production de 2 moles de H_2 et 2 moles de CO_2 (H_2/CO_2 = 1). Ainsi, une

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

production importante de butyrate par rapport à l'acétate donnera un rapport B/A élevé et un rapport H₂/CO₂ faible.



Concernant les variations du rapport molaire H₂/2(B+A), la valeur supérieure obtenue avec le mode d'extraction par gaz de balayage (0,8) tranche avec celles obtenues avec les autres modes (environ 0,5). Ceci indique un métabolisme plus efficace pour la production d'hydrogène par les voies (16) et (17) dans le cas de l'utilisation du gaz de balayage ; celui-ci permettant d'extraire rapidement et efficacement les gaz produits, qui stagnent en partie dans le milieu et dans le ciel gazeux pour les tests avec extraction libre ou par dépression, et restent piégés dans celui-ci pour les tests avec réacteur clos. L'hydrogène restant dans le milieu réactionnel en plus grande quantité, une consommation plus importante de H₂ est donc observée lors de ces tests, en particulier par homoacétogénèse (26).



Les résultats de production de métabolites obtenus pour ces tests de fermentation sont présentés dans le Tableau 25. Dans la liste des métabolites analysés, aucune quantité significative de citrate, tartrate et lactate n'a été détectée, ces métabolites ont donc été exclus de ce tableau. Le code couleur utilisé permet de bien percevoir les variations majeures pour chaque mode d'extraction. Les profils observés lors de ces tests de fermentation sont très similaires. Les métabolites majoritairement produits sont l'acétate et le butyrate, ainsi que l'éthanol dans une moindre mesure. Une consommation du propionate présent initialement dans les boues de la zone anoxie est observée dans la majorité des tests de fermentation, à l'exception de certains tests réalisés en mode de fonctionnement avec réacteur clos ou avec extraction libre ; ces modes présentant une variation aléatoire de la concentration en propionate dans le milieu réactionnel.

Tableau 25. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction du mode d'extraction des gaz produits – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

Mode d'extraction	Production (mmol/L _{milieu})												
	éthanol	butanol	pyruvate	succinate	formiate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
Clos	3,7 ± 2,8	0,05 ± 0,04	-0,018 ± 0,001	-0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,4	7,9 ± 0,6	1,2 ± 2,6	8,6 ± 0,6	0,6 ± 0,3	1,2 ± 0,1	29 ± 1	16 ± 4	-11,0 ± 0,1
Extraction libre	2,4 ± 0,5	0,10 ± 0,06	-0,016 ± 0,003	-0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,1	9,4 ± 0,5	0,0 ± 4,3	7,4 ± 2,8	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,7	29 ± 7	22 ± 4	-11,0 ± 0,1
Faible dépression	2,3 ± 1,0	0,11 ± 0,08	-0,019 ± 0,002	-0,15 ± 0,01	< LD	10,9 ± 1,2	-2,8 ± 0,2	5,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	< LD	24 ± 2	18 ± 1	-11,1 ± 0,1
Gaz de balayage	2,4 ± 0,5	0,16 ± 0,06	-0,019 ± 0,002	-0,2 ± 0,3	< LD	9,9 ± 1,4	-1,9 ± 0,5	5,2 ± 0,7	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,1	27,3 ± 0,7	22,8 ± 0,5	-10,8 ± 0,1

Comme le montraient les variations des rapports molaires B/A et H₂/2(B+A), les variations majeures au niveau du métabolisme microbien peuvent s'observer au niveau des deux métabolites acétate et butyrate. La production d'acétate est assez stable, quelque soit le mode d'extraction utilisé, bien qu'une valeur plus faible soit observée dans le cas du réacteur clos. En revanche, la production de butyrate est plus variable, et semble être déterminée par l'efficacité du mode d'extraction du gaz

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

produit pendant la phase de production, allant de 8,6 mmol/L_{milieu} pour le test sans extraction, à 5,2 mmol/L_{milieu} pour le test réalisé avec gaz de balayage. La production d'hydrogène évoluant dans le sens opposé, il semblerait donc que dans le cas des tests sans gaz de balayage, l'hydrogène supplémentaire coproduit par la voie butyrate (17) soit utilisé pour la production d'acétate par homoacétogenèse (26), la proportion de la voie acétate (16) étant réduite.

La Figure 44 montre, pour chaque mode de fonctionnement, le bilan carbone moyen, réalisé entre l'échantillon initial, après traitement thermique et l'échantillon final de chaque test de fermentation. Un recouvrement proche de 100% est observé pour les tests réalisés avec un mode d'extraction des gaz « actifs » (tests avec gaz de balayage et dépression à 800 mbar). Le recouvrement final maximal observé, de 139% pour le réacteur clos, restant dans la gamme des recouvrements observés lors des tests en RASB réalisés dans le chapitre III. Cette surévaluation du bilan carbone proviendrait de la quantité initiale de matières organiques métabolisables non prise en compte dans le carbone initial (protéines, molécules non identifiées par les analyses réalisées lors de cette étude) dont la dégradation est améliorée lorsque la pression partielle en gaz produit dans le milieu est plus élevée. Une autre hypothèse consisterait à dire que la croissance microbienne est plus importante lorsque les gaz sont extraits activement du milieu ; le carbone utilisé pour cette croissance n'apparaissant pas dans ce bilan.

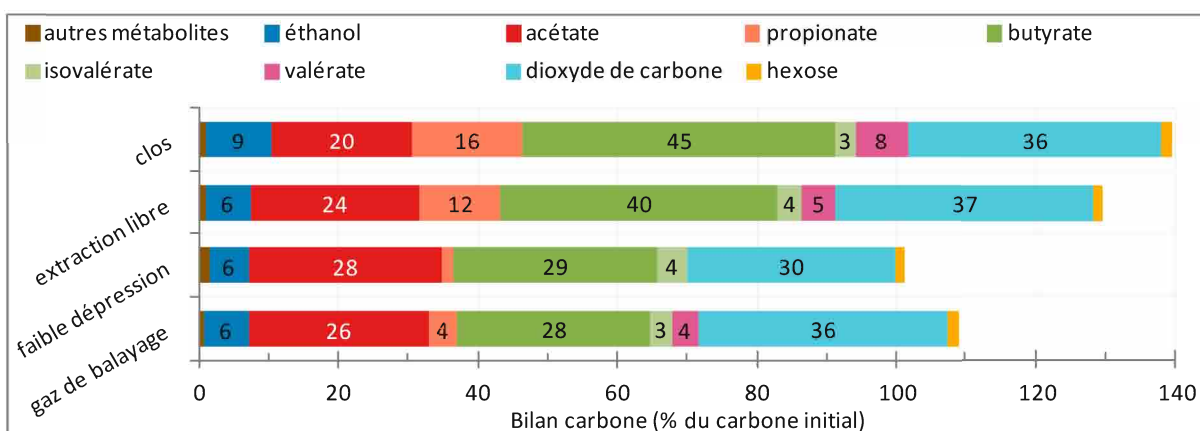


Figure 44. Bilan carbone final réalisé par rapport au pourcentage de carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différents modes d'extraction des gaz produits

Quel que soit le mode d'extraction des gaz utilisé, une forte consommation du substrat a été observée, supérieure à 98%. Une augmentation des proportions d'éthanol et de valérate dans le bilan carbone est observée pour le test réalisé avec réacteur clos, ce qui participe à expliquer les résultats moins performants obtenus pour ce test. De même, la présence de H₂ en plus grande quantité dans le milieu réactionnel favorise la voie de production du propionate (20), consommatrice de ce gaz.



Bien que le suivi de la composition du milieu réactionnel n'ait été réalisé que pour le mode de fonctionnement avec gaz de balayage (paragraphe III.E), l'hypothèse d'un processus similaire peut être posée. Le propionate serait alors produit massivement lors des cinq premières heures du test de fermentation, puis reconstitué pour la production d'acétate ou de butyrate, avec coproduction d'hydrogène. Or, dans le cas des tests en réacteur clos et par extraction libre, l'absence d'extraction forcée du gaz produit provoque une pression partielle en hydrogène importante dans le ciel gazeux (> 0,65 bar) et dans le milieu réactionnel, qui n'est pas favorable thermodynamiquement à la

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

reconsommation du propionate. Il n'est donc pas consommé et reste présent dans le milieu fermentaire.

Les métabolites coproduits majoritairement lors de la production d'hydrogène et de dioxyde de carbone par fermentation obscure sont le butyrate, l'acétate et l'éthanol, quelque soit le mode d'extraction des gaz utilisé. Une production de propionate est également observée pour les tests réalisés avec le mode de fonctionnement clos, probablement liée à une consommation de l'hydrogène accumulé en quantité importante dans le milieu. Les faibles variations de production de métabolites laissent supposer assez peu de variations dans les consortia microbiens actifs lors de ces tests de fermentation. Les modes de fonctionnement présentant les performances les plus distinctes (mode d'extraction par gaz de balayage et réacteur clos) ont été analysés par pyroséquençage afin de vérifier cette hypothèse.

IV.A.3. Analyse microbiologique

Les échantillons finaux issus de tests de fermentation réalisés avec le mode d'extraction par gaz de balayage et avec le réacteur clos, ainsi qu'un échantillon prélevé lors d'un test en réacteur clos à 5 h de fermentation, ont été analysés par séquençage Illumina par *INRA Transfert Environnement*. Une quantité relativement importante de phylotype, ou OTU (*operational taxon unit*) correspondant à des groupes de séquences analysées avec au moins 97% d'homologie, a été obtenue après traitement des données : 1015, 797 et 1064 OTU respectivement pour les échantillons des tests avec gaz de balayage, et réacteur clos à 5 h et final (Tableau 26). L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux séquences sélectionnées au hasard appartiennent au même OTU, le maximum de diversité étant indiqué par une valeur nulle, le minimum de diversité par la valeur 1, soit une espèce unique dans le milieu. Le nombre important d'OTU et les faibles valeurs d'indice de Simpson (< 0,3) montre la diversité bactérienne importante du consortium utilisé, quel que soit le mode de fonctionnement mis en œuvre. Le nombre d'OTU inférieur à 5 h de fermentation dans le cas du test en réacteur clos, 797 OTU contre 1064 à 20 h, montre probablement la prédominance de certaines bactéries lors de la phase de fermentation la plus intense, leur quantité relative importante limitant la détection des autres bactéries minoritaires, ce qui n'est plus le cas en fin de fermentation, où les conditions de carence en substrat conduisent à un « rééquilibrage » du milieu réactionnel. On notera également qu'une valeur réduite de l'indice de Simpson est observée dans le réacteur clos (0,18) par rapport au réacteur utilisant le gaz de balayage (0,25), ce qui semblerait indiquer une sélection bactérienne plus importante lors de l'utilisation du gaz de balayage.

Tableau 26. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés avec gaz de balayage et réacteur clos - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
Gaz de balayage – 20 h	1015	0,25
Clos – 5 h	797	0,19
Clos – 20 h	1064	0,18

Les principaux résultats extraits sont présentés sur la Figure 45, qui donne l'évolution de la représentativité des principaux genres bactériens présents dans le milieu réactionnel et le Tableau 27,

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

qui présente les correspondances des principaux phylotypes, en fonction du mode de fonctionnement. A l'exception de quelques espèces, la répartition bactérienne dans les *consortia* est très similaire. La grande majorité du *consortium* est composée d'espèces du phylum *Firmicutes*, avec plus de 56% des séquences analysées, l'espèce bactérienne principale étant *Clostridium baratii* pour plus de 40%. La seconde espèce majoritaire, également commune aux deux modes de fonctionnement, est *Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei)*, avec 5% pour l'échantillon du test batch, mais plus de 10% pour les deux échantillons prélevés en fin de fermentation, cette évolution montrant que cette espèce se développe plutôt en fin de fermentation, comme cela pouvait être observé dans le paragraphe III.E.2.

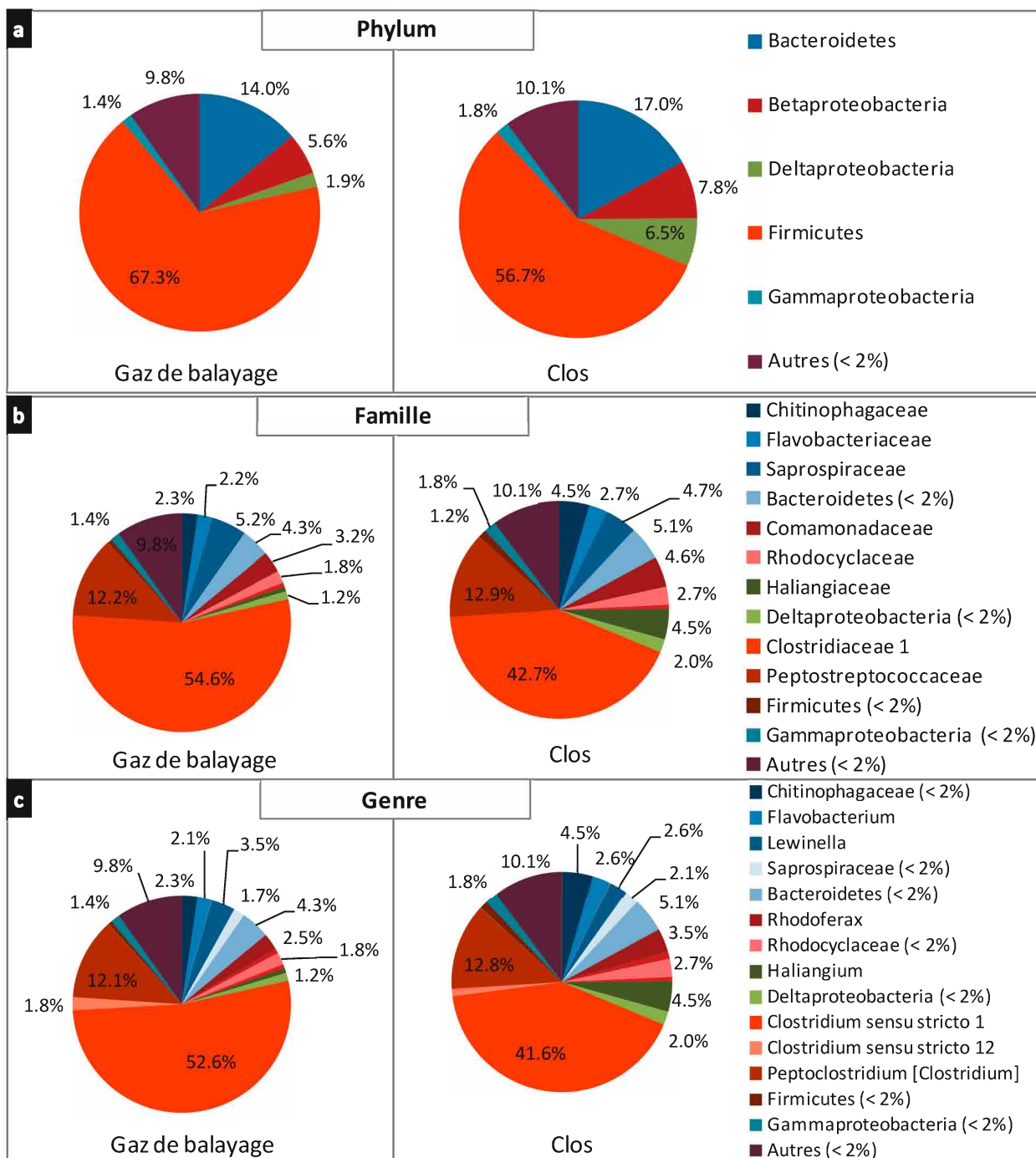


Figure 45. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons finaux (20 h) de fermentation clos et avec gaz de balayage - Abondance > 2% pour au moins un des échantillons

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Tableau 27. Résultats obtenus par séquençage des échantillons de fermentation en réacteur clos et avec gaz de balayage - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons - un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible

Phylum	Famille	Genre	meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	Gaz de balayage 20 h (%)	Clos 5 h (%)	Clos 20 h (%)
Bacteroidetes	AKYH767 (100%)	<i>Fluviicola</i> (98%)	<i>Fluviicola</i> sp.	98	KM052482	1,1	1,2	1,0
	Chitinophagaceae	<i>Terrimonas</i> (100%)	<i>Terrimonas lutea</i>	97	NR_041250	0,8	1,7	1,8
	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> (100%)	<i>Flavobacterium noncentrifugens</i>	97	NR_109531	1,9	1,8	2,0
	Saprospiraceae (100%)	<i>Haliscomenobacter</i> (99%)	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	< 97	NR_074420	1,1	1,4	1,5
		<i>Lewinella</i> (< 97%)	<i>Lewinella</i> spp. (<i>nigricans</i> / <i>marina</i>)	< 97	NR_115013	2,7	2,3	2,2
Betaproteobacteria	Comamonadaceae	<i>Rhodiferax</i>	<i>Rhodiferax</i> spp. (<i>ferrireducens</i> / <i>saidenbachensis</i>)	100	/	2,5	4,9	3,5
		<i>Variovorax</i> // <i>Acidovorax</i> // <i>Simplicispira</i>	<i>Variovorax</i> sp. // <i>Acidovorax</i> sp. // <i>Simplicispira</i> sp.	100	/	0,5	1,1	0,8
	Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas</i> (100%)	<i>Dechloromonas</i> spp. (<i>hortensis</i> / <i>denitrificans</i>)	97	/	0,4	1,1	0,9
	Haliangiaceae	<i>Haliangium</i> (100%)	<i>Haliangium</i> sp.	100	/	0,0	1,3	1,0
Firmicutes			<i>Haliangium</i> spp. (<i>ochraceum</i> / <i>tepidum</i>)	< 97	/	0,6	5,0	3,4
	Clostridiaceae 1	<i>Clostridium sensu stricto 1</i> (100%)	<i>Clostridium baratii</i>	98	NR_029229	48,4	42,7	40,6
		<i>Clostridium sensu stricto 12</i> (100%)	<i>Clostridium butyricum</i>	99	LN828941	4,2	0,4	0,9
	Peptostreptococcaeae	<i>Peptoclostridium</i> [<i>Clostridium</i>]	<i>Peptoclostridium sordellii</i>	100	KM657125	2,0	0,6	1,5
			<i>Peptoclostridium</i> spp. (<i>bifermentans</i> / <i>difficile</i> / <i>hungatei</i>)	100	/	10,2	5,7	11,3

IV.A. Influence de différents modes d'extraction des gaz

La majeure différence entre les deux modes de fonctionnement est observée sur la Figure 45 a, avec l'augmentation de la proportion des *Deltaproteobacteria*, de 1,9 à 6,5% dans l'échantillon final des deux tests. Le genre *Haliangium* est le principal représentant de ce phylum (69% de *Deltaproteobacteria*). Il s'agit d'une espèce assez présente dans le consortium bactérien initial (7,5% après le traitement thermique) cependant classée parmi les aérobies obligatoires. Sa présence relativement importante en fin de fermentation est surprenante, mais pourrait s'expliquer par la présence dans le milieu de fermentation de leur structure de survie appelée myxospores, contenant leur ADN. Les conditions en réacteur clos sont probablement moins hostiles que celles du réacteur avec gaz de balayage pour la survie de ces bactéries qui peuvent être dégradées par d'autres microorganismes lors de la phase finale de carence. Cette espèce bactérienne ne joue donc aucun rôle dans le métabolisme bactérien. Par contre l'espèce butyricum, active dans la production d'hydrogène est la troisième espèce majoritaire pour le mode avec gaz de balayage (4,2%) alors qu'elle est très minoritaire pour le réacteur clos (0,9%).

Les consortia bactériens observés avec les deux modes de fonctionnement étudiés ici (mode d'extraction par gaz de balayage et réacteur clos) sont très proches, présentant l'espèce Clostridium baratii avec plus de 40% des séquences analysées. La présence en proportion supérieure du phylum Deltaproteobacteria dans les échantillons issus du test réalisé avec réacteur clos est cependant notable avec en particulier la présence d'espèces du genre Haliangium pour environ 5% des séquences, contre moins de 1% pour les tests réalisés avec gaz de balayage. Au contraire, on note une quantité relative de l'espèce Clostridium butyricum plus forte dans le test avec gaz de balayage pour lequel celle-ci représente le troisième OTU le plus abondant (4,2%) par rapport au test avec réacteur clos (0,9%). L'utilisation d'un même inoculum microbien complexe pour l'ensemble de nos tests de fermentation permet une certaine homogénéité des résultats avec cependant l'émergence spécifique de certaines espèces liées aux conditions de fonctionnement utilisées.

IV.A.4. Bilan de l'influence des différents modes d'extraction

Ces résultats ont permis de vérifier le fonctionnement efficace de la production d'hydrogène avec différents modes d'extraction des gaz (extraction libre ou dépression), différents du mode utilisant un gaz de balayage. Ces modes de fonctionnement ne permettent cependant pas d'atteindre les volumes et les productivités obtenus avec gaz de balayage et nécessitent le dégazage final du réacteur. Sur la phase de production, le gain de rendement en H₂ avec gaz de balayage est entre 57 et 147% par rapport aux modes de fonctionnement avec dépression et réacteur clos, respectivement. Néanmoins, ces trois modes sans gaz de balayage présentent l'avantage de ne pas nécessiter l'apport d'un gaz externe et de produire un mélange gazeux H₂ : CO₂ sans dilution. De plus, à l'exception du mode avec réacteur clos, une production de gaz continue est envisageable. Les métabolites produits majoritairement lors de ces tests sont le butyrate, l'acétate et l'éthanol, classiquement coproduits avec l'hydrogène et le dioxyde de carbone lors de la fermentation obscure, quel que soit le mode d'extraction des gaz utilisé. L'analyse par séquençage de l'ADN a été réalisée pour le mode d'extraction par gaz de balayage et pour le mode batch. Les consortia bactériens observés sont très proches, avec l'espèce *Clostridium baratii* majoritaire avec plus de 40% des séquences analysées. De

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

faibles variations sont observées, avec en particulier la présence d'espèces du genre *Haliangium* pour environ 5% des séquences dans le milieu réactionnel du test avec réacteur clos et au contraire, une quantité relative de l'espèce *Clostridium butyricum* plus forte dans le test avec gaz de balayage.

La suite de ce chapitre est dédiée à l'optimisation du mode d'extraction le plus efficace, c'est-à-dire avec gaz de balayage, en jouant, dans un premier temps, sur l'un des paramètres clés, le débit du gaz et dans un second temps sur la nature du gaz en testant l'ajout de dioxyde de carbone à l'azote, dans l'optique d'utiliser à terme le CO₂ produit par le procédé.

IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

Le mode d'extraction des gaz produits par gaz de balayage est le plus performant pour permettre une production efficace d'hydrogène. De nombreux paramètres peuvent cependant influencer ces performances, et permettre de limiter les contraintes qu'apporte l'utilisation de ce gaz extérieur, en particulier en ce qui concerne la dilution du gaz produit, et l'adjonction d'un gaz externe au procédé.

Tanisho *et al.* [136] ont montré que même l'utilisation d'hydrogène comme gaz de balayage permettait d'améliorer la production de manière équivalente à un gaz inerte (argon), ce qui semble indiquer que cette amélioration est plus liée à un phénomène physique que biochimique. L'étude réalisée par Kim *et al.* [139] a cependant clairement montré l'impact de la composition du gaz de balayage utilisé sur les performances de production d'hydrogène, avec l'utilisation du CO₂ pur pour un rendement et une productivité optimaux par rapport aux résultats obtenus avec l'azote ou avec le gaz produit par la fermentation mis en recirculation (respectivement + 28% et + 59%) ; ces trois gaz ou mélanges de gaz permettant une amélioration de la production de H₂ par rapport au mode de fonctionnement avec extraction libre. Cette dernière étude a de plus montré que le débit de gaz de balayage avait également un impact sur la productivité comme sur le rendement de la fermentation, avec un débit optimal de 60 mL/L_{milieu}/min permettant jusqu'à 30% d'amélioration par rapport à un débit de 20 mL/L_{milieu}/min.

Une étude paramétrique a donc été réalisée sur notre système (*consortium* de station d'épuration + substrat modèle) pour optimiser le fonctionnement du bioréacteur avec ce mode d'extraction. Dans un premier temps, l'influence du débit de N₂ comme gaz de balayage a été étudiée, puis dans un second temps, différents mélanges CO₂ : N₂ ont été testés.

IV.B.1. Influence du débit de gaz de balayage

Les effets de la variation du débit d'azote dans le bioréacteur en tant que gaz de balayage sont testés pour des valeurs de débit allant de 13 à 259 mL/L_{milieu}/min, correspondantes à une gamme très étendue de ce qui a été testé dans la littérature. Cette série de test a été réalisée dans le bioréacteur de 1,0 L, différent de celui utilisé pour la série de test du paragraphe précédent IV.A.

L'augmentation du débit de gaz de balayage a mis en évidence une augmentation du débit maximum de production (de 2 à 4 mL_{H₂}/min) et du volume total d'hydrogène produit, ainsi qu'une diminution du temps de latence d'environ une heure (Figure 46).

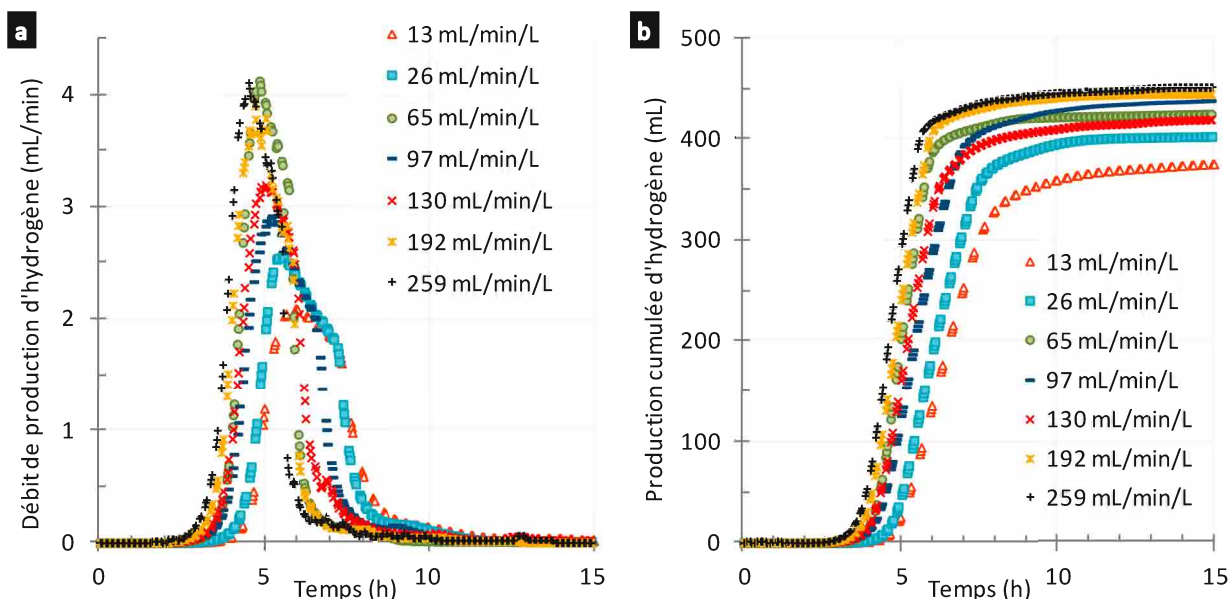


Figure 46. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différents débits de gaz de balayage

Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en RASB (1,0 L) ; volume d'inoculum de 0,8 L ; température de fermentation de $38^\circ C$; ajout de glucose ($11,2 \pm 0,2 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}$) ; débits de gaz de balayage (N_2) allant de 13 à $259 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$

L'évolution de la pression partielle des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur (Figure 47) montre que l'augmentation du débit de gaz de balayage permet clairement de réduire les pressions partielles d'hydrogène et de dioxyde de carbone, qui diminuent en parallèle de 0,15 à 0,02 bar. Cette évolution concorde avec l'amélioration de la production d'hydrogène observée, ceci est cohérent avec le résultat attendu lorsque la pression partielle de H_2 est réduite dans le milieu. L'utilisation d'un faible débit de gaz de balayage ($13 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$) permet d'obtenir une pression partielle en H_2 et CO_2 proche de 0,15 bar, ce qui reste très inférieur à la valeur observée lors de l'utilisation des modes d'extraction libre (0,65 bar) ou par faible dépression (0,49 bar).

En augmentant le débit de gaz de balayage de 20 à $80 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$, Kim *et al.* [139] ont réduit la valeur de la pression partielle de H_2 moyenne lors de leur test en fonctionnement continu, de 0,12 à 0,04 bar. Tandis que dans l'étude de Kraemer et Bagley [137], également réalisée en mode de fonctionnement continu, la pression partielle de H_2 diminue de 0,54 à 0,07 bar entre 4 et $86 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$. Ces valeurs de pressions partielles sont donc directement liées au débit de gaz de balayage, mais également à la configuration du bioréacteur et à la production d'hydrogène effective dans le milieu fermentaire.

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

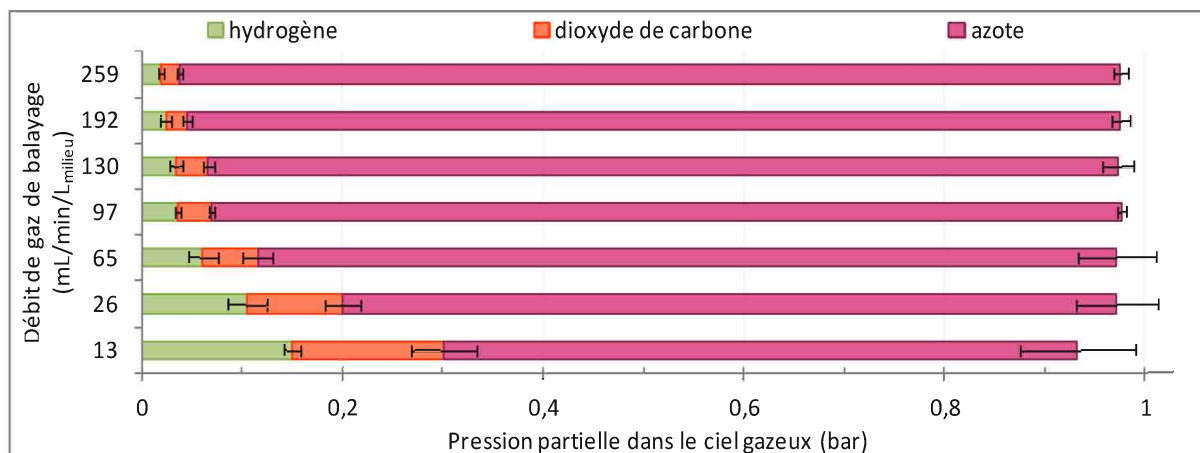


Figure 47. Pressions partielles des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur en fonction du débit de gaz de balayage (valeur au maximum de la production d'hydrogène) - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliqués de fermentation

L'évolution des différents paramètres de production en fonction du débit de gaz de balayage est donnée sur la Figure 48. Les volumes totaux de H₂ et de CO₂ produits suivent deux tendances différentes avec l'augmentation du débit de gaz de balayage, entre 13 et 259 mL/L_{milieu}/min. En effet, le volume de H₂ augmente de 36% tandis que celui de CO₂ diminue de 9%. Une augmentation du rendement de H₂ (Figure 48 c) est observée avec un débit de gaz de balayage (N₂) croissant avec un maximum à 2,2 mol_{H₂}/mol_{hexose} à partir d'un débit de 130 mL/L_{milieu}/min. Kraemer et Bagley [137] observent un effet similaire sur un bioréacteur en fonctionnement continu, avec une asymptote de production en H₂ autour de 2 mol_{H₂}/mol_{hexose}, mais dès l'utilisation d'un débit de gaz de balayage de 12 mL/L_{milieu}/min (débit de N₂ de 24 mL/min diffusé via un cylindre fritté dans un volume de milieu réactionnel de 2 L). Le rapport H₂/CO₂ (Figure 48 g) augmente notablement de 0,68 à 0,99 avec l'augmentation du débit d'azote. Cette variation s'explique par une probable modification des voies métaboliques de production du *consortium* microbien pour la production de H₂ et de CO₂. Ainsi, l'extraction de l'hydrogène du milieu réactionnel permet de limiter l'inhibition partielle du métabolisme des bactéries productrices d'hydrogène lorsque H₂ s'accumule dans le milieu fermentaire.

L'évolution du rendement en hydrogène est inversement proportionnelle à celle de la pression partielle en hydrogène dans le ciel gazeux du bioréacteur, les deux courbes ayant pour point d'inflexion la valeur de 65 mL/L_{milieu}/min avec une pression partielle en H₂ oscillant entre 0,04 et 0,07 bar, ce qui correspond à la valeur limite maximale pour favoriser la production d'hydrogène dans nos conditions expérimentales.

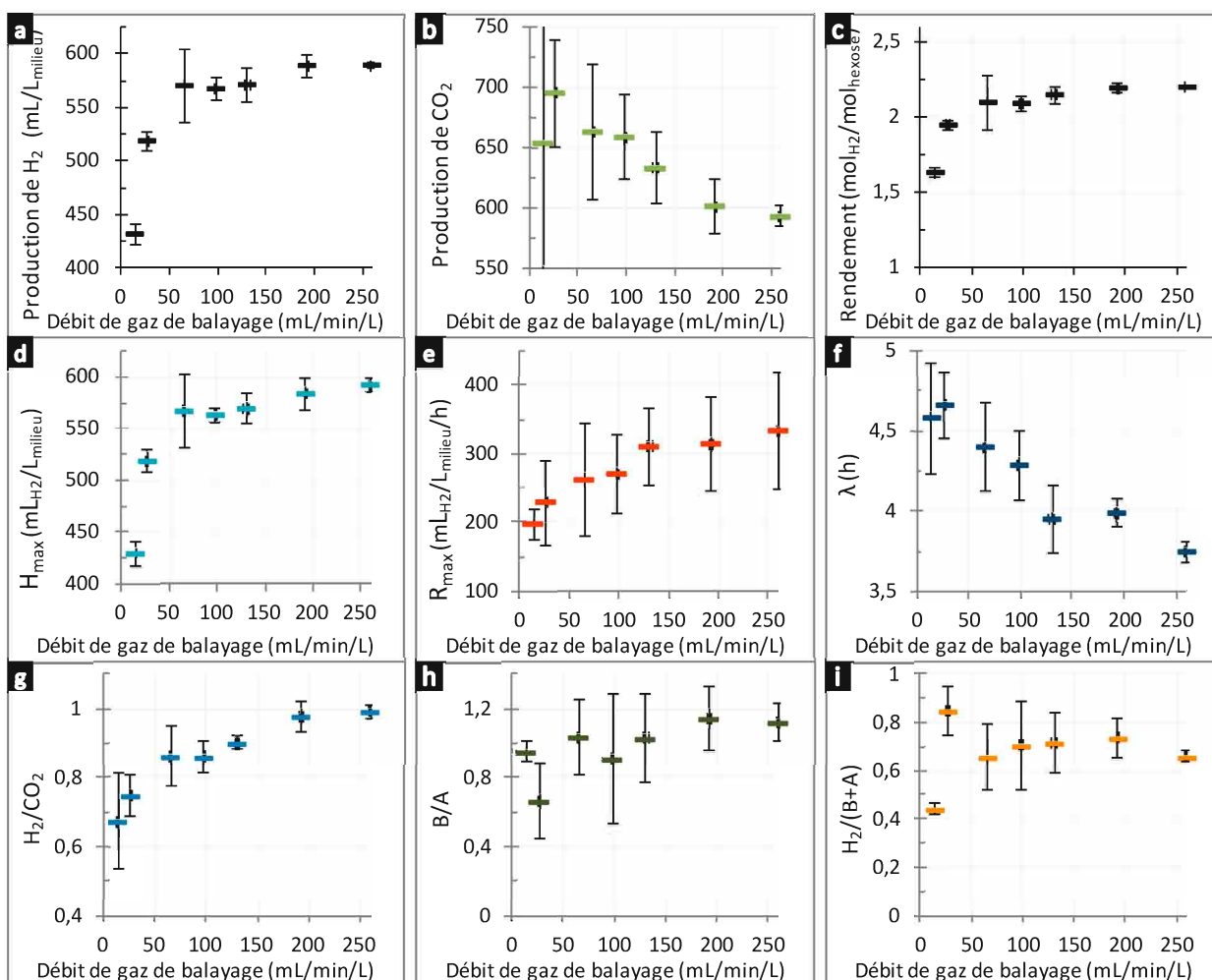


Figure 48. Evolution des volumes produits de H₂ (a) et de CO₂ (b), du rendements en H₂ (c), des paramètres H_{max} (d), R_{max} (e) et λ (f), et des rapports H₂/CO₂ (g), B/A (h) et H₂/(B+A) (i) en fonction du débit de gaz de balayage - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliquats de fermentation

Concernant les paramètres de l'équation de Gompertz, le profil de variation du volume total d'hydrogène produit (H_{max}) (Figure 48 d) présente une forte augmentation (+ 32%) lorsque le débit de gaz de balayage varie de 13 à 65 mL/L_{milieu}/min, puis tend vers une asymptote jusqu'à une production de 590 mL_{H₂}/L_{milieu} pour un débit de 259 mL/L_{milieu}/min. Une augmentation progressive de la vitesse de production R_{max} est observée avec l'augmentation du débit de gaz de balayage (Figure 48 e). Cette vitesse de production, bien que variable selon les expériences, augmente très sensiblement de 198 à 334 mL_{H₂}/L_{milieu}/h pour un débit de gaz de balayage allant de 13 à 259 mL/L_{milieu}/min, le temps de latence (λ) étant décroissant de 4,6 à 3,7 h (Figure 48 f) alors que le renouvellement du ciel gazeux est respectivement de 36 min et 2 min pour un débit de 13 et 259 mL/L_{milieu}/min. Ainsi, l'augmentation du débit de gaz de balayage joue un rôle bénéfique sur la cinétique de production d'hydrogène.

NB : On notera qu'aucun impact du débit de gaz de balayage sur le pH n'est observé dans cette série de tests (résultats non montrés), avec un pH final moyen de $5,1 \pm 0,2$. Ce paramètre clé de la fermentation obscure n'est donc pas à l'origine de l'amélioration de la production en H₂.

Le rapport molaire B/A (Figure 48 h) augmente progressivement avec l'augmentation du débit de gaz de balayage, de 0,96 à 1,13, lié à une diminution de la production d'acétate, celle de butyrate étant relativement stable (Tableau 28). La production d'hydrogène étant améliorée en parallèle de ces variations, la baisse de la production d'acétate est donc liée à une limitation de l'activité homoacétogène (26). L'augmentation du débit de gaz de balayage permet de réduire la pression partielle de H₂ dans le milieu, et ainsi sa disponibilité comme pour les bactéries homoacétogènes. En

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

revanche, la voie de production butyrate (17) ne semble pas être impactée. Le rapport B/A déterminé par Kraemer et Bagley [137] est également assez stable, autour d'une valeur de 1,0, sur la gamme de débit de gaz de balayage testée, mais avec une augmentation parallèle des productions d'acétate et de butyrate. L'étude de Bastidas-Oyanedel *et al.* [234], montre avec deux régulations de pH distinctes (4,5 et 6,5), deux variations opposées du rapport B/A par rapport à l'augmentation du débit de gaz de balayage (de 1 à 31 mL_{N2}/min/L_{milieu}) ; l'une croissante (de 0,80 à 0,89), à pH 4,5 ; l'autre décroissante à pH 6,5 (de 0,11 à 0,06). Ceci indique bien l'impact majeur des autres paramètres de la fermentation sur l'évolution du métabolisme, le débit de gaz de balayage appliqué au milieu étant un paramètre relativement peu impactant du métabolisme microbien.



L'évolution du rapport $H_2/2(B+A)$ est moins claire, mais les valeurs se situant entre 0,6 et 0,9 démontrent d'un métabolisme relativement efficace, à l'exception de la valeur plus basse obtenue pour le débit de 13 mL_{N2}/min/L_{milieu}.

Les résultats obtenus montrent le bénéfice lié à l'utilisation d'un débit de gaz de balayage, l'augmentation du débit de gaz de balayage améliorant l'efficacité de la production d'hydrogène, tant en rendement (jusqu'à + 35%) qu'en productivité (jusqu'à + 65%) avec un rapport H₂/CO₂ amélioré ; ces paramètres suivant une évolution asymptotique. Dans les conditions du bioréacteur utilisé dans cette étude, une valeur optimale de débit de gaz de balayage est observée autour de 65 mL/L_{milieu}/min, en accord avec la littérature [139], valeur minimale permettant d'atteindre les plateaux de performance de production.

IV.B.1.1. Analyse des métabolites et bilan carbone

L'étude analytique des métabolites produits au cours de la fermentation est présentée dans le Tableau 28. Le profil de métabolites produits est assez similaire pour tous les tests de fermentations réalisés, à l'exception de la tendance à la baisse de la production d'acétate (- 25%) et de CO₂ (- 9%), accompagnant l'augmentation de la production d'hydrogène (+ 36%) lorsque le débit de gaz de balayage augmente. A une plus petite échelle, une augmentation de 50% de la production d'éthanol est observée de 13 à 259 mL/L_{milieu}/min, passant respectivement de 1,8 à 2,6 mmol/L_{milieu}. Cette dernière évolution peut s'expliquer par l'utilisation du gaz de balayage avec un débit plus important, permettant d'extraire plus rapidement le dioxyde de carbone, coproduit de la voie de solvantogénèse (18), alors thermodynamiquement favorisée. Bien que la voie propionate soit défavorable à la production d'hydrogène, la production de celui-ci est variable en fonction du débit de gaz de balayage ; celle-ci restant globalement faible avec un maximum de 2,0 mmol/L_{milieu}.



IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

Tableau 28. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction du débit de gaz de balayage – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

Débit de gaz de balayage (mL/min/L)	Production (mmol/L _{milieu})											
	éthanol	butanol	pyruvate	succinate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
13	1,8 ± 0,3	0,18 ± 0,05	-0,02 ± 0,01	-0,2 ± 0,2	10,3 ± 0,8	0,6 ± 0,6	9,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	< LD	27,2 ± 4,5	18,0 ± 0,4	-11,0 ± 0,2
26	2,2 ± 0,7	0,11 ± 0,02	-0,02 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	7,7 ± 0,1	-2,0 ± 1	4,9 ± 1,7	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	28,9 ± 1,9	21,6 ± 0,4	-11,2 ± 0,1
65	1,7 ± 0,5	0,07 ± 0,03	-0,01 ± 0,01	-0,1 ± 0,2	9,2 ± 2,1	1,4 ± 2,2	9,0 ± 1,3	1,0 ± 0,4	1,1 ± 1,2	27,6 ± 2,3	23,7 ± 1,4	-11,3 ± 0,4
97	2,0 ± 0,3	0,07 ± 0,03	-0,02 ± 0,01	-0,3 ± 0,2	9,3 ± 2,6	-0,2 ± 2,4	8,3 ± 3,8	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,7	27,4 ± 1,5	23,6 ± 0,4	-11,3 ± 0,2
130	2,0 ± 0,1	0,04 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	-0,3 ± 0,2	8,3 ± 1,3	0,2 ± 2,3	8,3 ± 1,9	0,9 ± 0,5	1,5 ± 0,1	26,3 ± 1,2	23,8 ± 0,6	-11,1 ± 0,1
192	2,5 ± 0,5	0,06 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	-0,32 ± 0,08	7,8 ± 1,2	1,2 ± 1,7	8,6 ± 0,6	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,8	25,0 ± 0,9	24,5 ± 0,4	-11,2 ± 0,1
259	2,6 ± 0,7	0,06 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	8,8 ± 0,6	2,0 ± 1,1	9,6 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,5	24,7 ± 0,4	24,5 ± 0,1	-11,2 ± 0,1

La Figure 49 présente les résultats obtenus pour le calcul du bilan carbone pour ces tests de fermentation avec variation du débit de gaz de balayage. Un recouvrement global lors de ces tests de fermentation d'environ 130% est observé pour l'ensemble des tests, sauf lors de l'utilisation d'un débit de 26 mL/L_{milieu}/min qui présente un recouvrement de 106%, lié à une quantité de butyrate et de propionate produites réduites par rapport aux autres tests de fermentation. Ces derniers résultats étant plus proches de ceux qui ont été observés pour le test en réacteur avec gaz de balayage dans l'étude réalisée au paragraphe IV.A.2, avec un débit de 86 mL/L_{milieu}/min, mais avec un bioréacteur de volume plus important, ce qui démontre à nouveau l'importance de la configuration du bioréacteur, en particulier sur le métabolisme.

L'ensemble de ces débits permet d'obtenir une consommation quasi-totale du substrat, avec une part résiduelle inférieure à 2%. Une très forte part du recouvrement est liée à la production de butyrate, environ 45%, dont la voie de production, est coproductrice d'H₂ (17), et participe à environ la moitié de sa production, avec la voie acétate (16).



On peut noter l'importance relative du propionate dans ce bilan carbone, alors que ce métabolite n'était produit qu'en quantité relativement faible par rapport à l'acétate et au butyrate. Cet effet est dû à la présence de propionate dans le milieu fermentaire initial (environ 10% du carbone initial mesuré), celui-ci n'apparaît donc pas dans le Tableau 28, ne montrant que les productions nettes de chaque métabolite, mais apparaît clairement sur la Figure 49, où la composition finale du milieu est prise en compte. La voie de production du propionate est consommatrice de H₂ (20), d'autres voies de production pouvant cependant également être à l'origine d'une part de cette production, comme

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

l'hydrolyse des protéines présentes dans le milieu réactionnel initial [220], non prise en compte dans la quantité de matière initiale et pouvant donc en partie expliquer la surévaluation du bilan.



Le bilan carbone met en évidence une production de valérate favorisée par l'augmentation du débit d'azote.

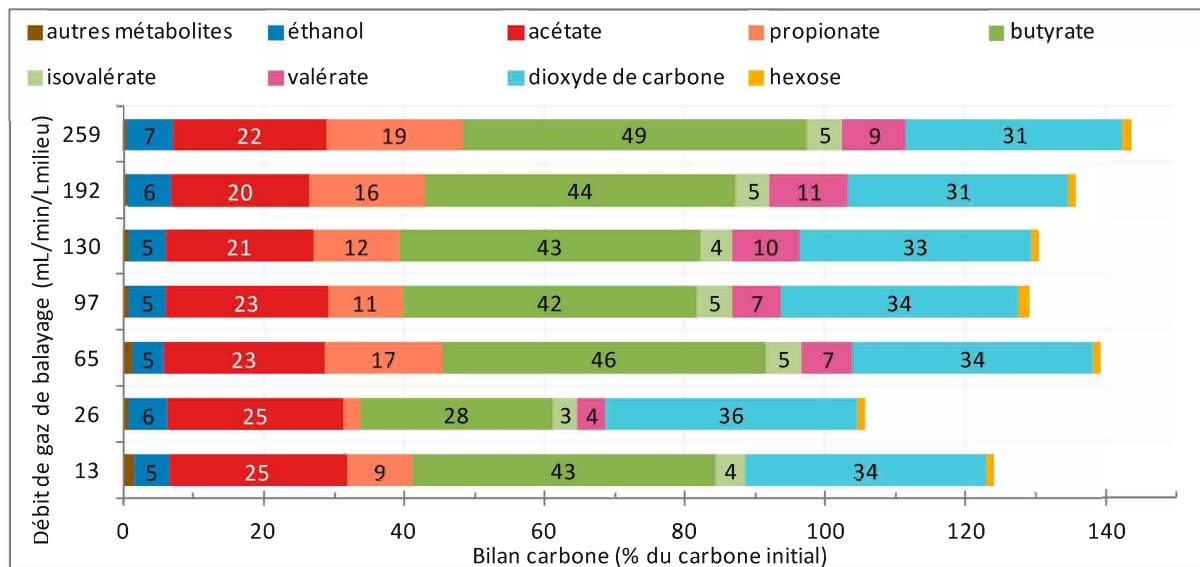


Figure 49. Bilan carbone final réalisé par rapport au pourcentage de carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différents débits de gaz de balayage

Les variations relativement faibles de production de métabolites laissent supposer que le consortium microbien actif dans le milieu réactionnel est stable par rapport au débit de gaz de balayage, les modifications observées résultant probablement plutôt d'une modification de l'environnement (pH exclu) avec en particulier la réduction de la pression partielle des gaz H_2 et CO_2 . L'étude du consortium bactérien présent dans le milieu réactionnel en fin de fermentation, à deux débits de gaz de balayage différents permettra de vérifier cette hypothèse.

IV.B.1.2. Analyse microbiologique

Deux techniques d'analyse microbiologique ont été ici utilisées pour étudier les modifications dans l'évolution du consortium bactérien en fonction du débit de gaz de balayage. Dans un premier temps, l'analyse par T-RFLP afin d'observer les modifications du profil bactérien, puis une analyse par séquençage Illumina a permis de compléter les résultats précédents jusqu'à l'identification des bactéries présentes dans le milieu réactionnel. Il est à noter, cependant, que les deux échantillons analysés ont été testés dans des réacteurs de volumes différents : 1,0 L et 1,5 L, ce qui peut avoir un impact supplémentaire sur d'éventuelles variations d'activités.

IV.B.1.2.1. T-RFLP

Des échantillons de biomasse prélevés en fin de fermentation ont été analysés par T-RFLP et séquençage pour des tests menés avec un débit de gaz de balayage N_2 régulé à 65 et 174 mL/Lmilieu/min, issus des réacteurs de 1,0 et 1,5 L, respectivement.

IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

Les profils obtenus pour les tests réalisés à différents débits de N₂ sont très proches (Figure 50), le consortium responsable de la production d'hydrogène ne semble donc pas impacté significativement par une augmentation du débit de gaz de balayage. L'augmentation de la production et de la productivité en H₂ avec l'augmentation du débit de gaz de balayage n'est donc pas due à une modification du consortium. Les populations bactériennes identifiées (Tableau 29) sont donc les mêmes que celles décrites précédemment au paragraphe III.E.2.1 (échantillon correspondant au test utilisant un débit de 65 mL/L_{milieu}/min).

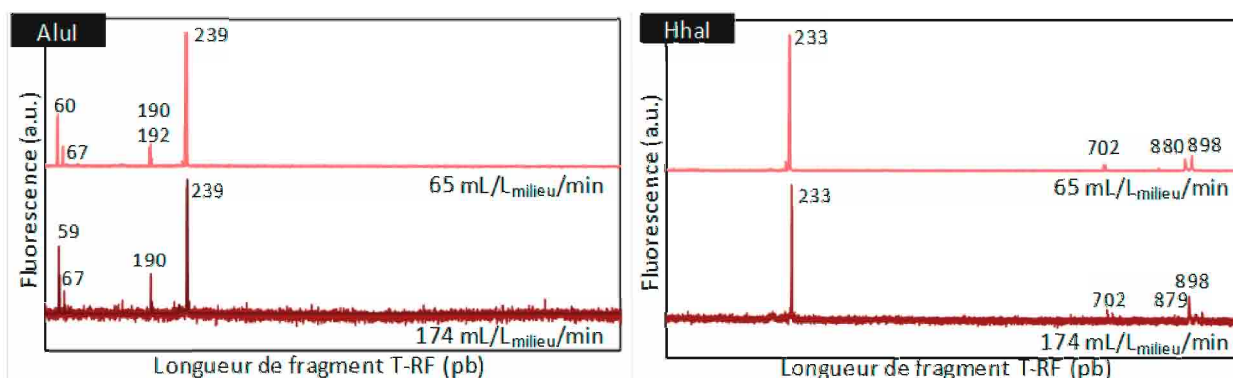


Figure 50. Profil d'analyse par T-RFLP pour les tests de fermentation à différents débits de gaz de balayage

Les principales espèces suspectées sont donc issues des genres *Clostridium*, *Eubacterium*, *Pasteuria*, *PaeniBacillus* et *Lactobacillus* pour le couple formé par les deux pics principaux (AluI 239 pb – HhaI 233 pb). Tandis que le genre *Clostridium* est clairement identifié dans le milieu fermentaire à partir des couples (AluI 67 pb – HhaI 233 pb), (AluI 192 pb – HhaI 814 pb) et (AluI 67 pb – HhaI 702 pb) ; ce dernier étant significatif de l'espèce *Clostridium butyricum*.

Tableau 29. Correspondances des pics majeurs de l'analyse T-RFLP avec la base de données T-RFLP [180] pour le test de fermentation avec un débit de gaz de balayage de 65 mL/L_{milieu}/min

Pic AluI (pb)	Intensité relative	Pic HhaI (pb)	Intensité relative	Correspondances possibles avec la base de données [180]
239	1,00	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>PaeniBacillus sp.</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>
239	1,00	229	0,06	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i>
60	0,38	879	0,07	<i>Peptostreptococcus genosp. 4</i>
190	0,15	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i>
190	0,15	229	0,06	<i>Nodularia sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i>
67	0,15	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i>
67	0,15	234	0,06	<i>Clostridium sp.</i>
67	0,15	235	0,04	<i>Clostridium butyricum</i>
192	0,06	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i> ; <i>Tolypothrix sp.</i>
192	0,06	229	0,06	<i>Nodularia sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i> ; <i>Tolypothrix sp.</i> ; <i>Brasilonema bromeliae</i>
235	0,04	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>
235	0,04	229	0,06	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>Anaerobacter sp.</i> ; <i>Bacillus coagulans</i> ; <i>BreviBacillus sp.</i> ; <i>AlicycloBacillus disulfidooxidans</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>SulfoBacillus disulfidooxidans</i>

Les résultats obtenus par analyse T-RFLP montrent une très forte similarité des profils microbiologiques avec les deux débits de gaz de balayage utilisés. La présence d'espèces du

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

genre *Clostridium* a été observée, en particulier de l'espèce *C. butyricum*. L'analyse microbiologique par séquençage à haut débit permettra de compléter cette analyse.

IV.B.1.2.2. Séquençage par synthèse Illumina

Ces échantillons ont également été analysés par séquençage à haut débit Illumina par INRA Transfert Environnement. Une quantité relativement importante d'OTU a été obtenue après traitement des données : 947 et 1039 OTU respectivement pour les échantillons à 65 et à 174 mL/L_{milieu}/min de débit de gaz de balayage (Tableau 30). L'indice de Simpson est similaire pour les deux échantillons.

Tableau 30. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés avec N₂ comme gaz de balayage, à 65 et 174 mL/L_{milieu}/min - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Débit de gaz de balayage	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
65 mL/L _{milieu} /min	930	0,22
174 mL/L _{milieu} /min	1015	0,25

Les correspondances obtenues pour les principaux OTU sont présentées dans le Tableau 31. Une forte similitude est observée entre ces deux échantillons. Environ 70% des séquences analysées correspondent au phylum *Firmicutes*, et environ 13% à celui des *Bacteroidetes*.

IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

Tableau 31. Résultats obtenus par séquençage des échantillons finaux de fermentation avec les gaz de balayage de 65 et 174 mL/min - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons - un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible

Phylum	Famille	Genre	meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	65 mL/min/L (%)	174 mL/min/L (%)
Bacteroidetes	AKYH767 (100%)	<i>Fluviicola</i> (98%)	<i>Fluviicola sp.</i>	98	KM052482	0,7	1,1
	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> (100%)	<i>Flavobacterium noncentrifugens</i>	97	NR_109531	2,1	1,9
	Saprosiraceae (100%)	<i>Haliscomenobacter</i> (99%)	<i>Haliscomenobacter hyarossis</i>	< 97	NR_074420	0,8	1,1
Betaproteobacteria	Comamonadaceae	<i>Lewinella</i> (< 97%)	<i>Lewinella spp. (nigricans / marina)</i>	< 97	NR_115013	2,0	2,7
		<i>Rhodofera</i>	<i>Rhodofera</i> spp. (<i>ferrireducens / saidenbachensis</i>)	100	/	1,9	2,5
Firmicutes	Clostridiaceae 1	<i>Clostridium sensu stricto 1</i> (100%)	<i>Clostridium baratii</i>	98	NR_029229	44,2	48,4
			<i>Clostridium butyricum</i>	99	LN828941	6,9	4,2
		<i>Clostridium sensu stricto 12</i> (100%)	<i>Clostridium magnum</i>	99	NR_119084	2,7	1,7
Peptostreptococaceae		<i>Peptoclostridium</i> [<i>Clostridium</i>]	<i>Peptoclostridium sordellii</i>	100	KM657125	6,3	2,0
			<i>Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei)</i>	100	/	9,8	10,2

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Cette analyse confirme la stabilité du *consortium* bactérien, avec une majorité de bactéries du genre *Clostridium sensu stricto* observée pour les deux tests, avec respectivement 54,8% et 54,6% des séquences analysées, avec les espèces majoritaires *C. baratii* (environ 46%) et *C. butyricum* (environ 5%). En prenant les bactéries intégrées auparavant au genre [*Clostridium*], cette population monte à 70,8% et 66,7% respectivement pour les échantillons à 65 et à 174 mL/L_{milieu}/min, avec principalement les bactéries du genre *Peptoclostridium* : *P. spp. (bifermentans / difficile / hungatei)* (environ 10%) et *P. sordellii* (environ 4%).

Dans la base de données T-RFLP [180], l'espèce bactérienne *C. baratii* correspond au couple de pics AluI 239 pb - HhaI 233 pb, les deux pics majoritaires sur les électrophorogrammes de la Figure 50, ceci permettant de valider la présence de cette bactérie dans cet échantillon. Le couple de pics correspondant à l'espèce *Peptoclostridium sordellii* est AluI 190 pb - HhaI 1061 pb, dont seulement le pic AluI est observable sur les électrophorogrammes, l'analyse étant limitée à 1000 pb. Ceci confirme donc la présence de cette bactérie dans le bioréacteur. De la même façon, les combinaisons de couples de pics correspondants à l'espèce *Peptoclostridium bifermentans* sont, selon la souche présente : AluI 190 pb - HhaI 1066 pb et AluI 190 pb - HhaI 578 pb, seule la première étant potentiellement présente dans l'échantillon puisque le pic HhaI à 578 pb n'est pas observable sur l'électrophorogramme. En revanche, les espèces *Peptoclostridium hungatei* et *difficile* sont en réalité absentes du milieu fermentaire, en effet les couples de pics TRFLP correspondant à ces espèces sont respectivement AluI 245 pb - HhaI 737 pb et AluI 227 pb - HhaI 1061 pb, aucun de ces pics n'apparaissant sur les électrophorogrammes.

Plusieurs bactéries de la famille des *Saprospiraceae* sont représentées dans le *consortium* bactérien, avec 4,0% et 5,2% des séquences OTU, respectivement pour les tests à 65 et à 174 mL/L_{milieu}/min. Certaines de ces bactéries, en particulier *Haliscomenobacter hydrossis*, sont reconnues pour leur action d'hydrolyse de protéines présentes dans le milieu réactionnel [80] ; cette particularité n'est pas particulièrement importante dans le contexte actuel avec un fonctionnement sur substrat modèle, mais serait un point positif avec l'utilisation de déchets organiques comme substrat. Des bactéries du genre *Flavobacterium* sont également présentes en quantité relativement faible (2%), mais dont l'action permettant de limiter l'oxygène présent dans le milieu réactionnel est importante pour le maintien des conditions d'anaérobie indispensables à la production d'hydrogène par fermentation obscure.

Les résultats obtenus par séquençage à haut débit confirment l'observation réalisée grâce à l'analyse par T-RFLP quant à la forte similitude des consortia bactériens présents dans le milieu réactionnel de ces deux tests de fermentation utilisant des débits de gaz de balayage de 65 et 174 mL/L_{milieu}/min. Les espèces majoritairement observées sont du genre *Clostridium sensu stricto* avec environ 55% de l'ensemble des séquences analysées, *C. baratii* étant largement majoritaire avec plus de 44% des séquences, suivie de *C. butyricum* avec environ 5%.

IV.B.1.3. Bilan de l'optimisation du débit de gaz de balayage

Les résultats obtenus montrent l'intérêt de l'utilisation d'un gaz de balayage. L'augmentation du débit de gaz de balayage améliore l'efficacité de la production d'hydrogène avec une évolution asymptotique et un bénéfice, tant en rendement qu'en productivité en H₂ et un rapport H₂/CO₂

IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

amélioré. Dans les conditions du bioréacteur utilisé dans cette étude, une valeur optimale de débit de gaz de balayage est observée autour de 65 mL/L_{milieu}/min, valeur permettant d'atteindre les plateaux de performance de production d'H₂. Des variations relativement faibles de production de métabolites sont observées, ces modifications résultant probablement d'une modification de l'environnement avec en particulier la réduction de la pression partielle des gaz H₂ et CO₂. Les résultats obtenus par deux méthodes d'analyses microbiologiques montrent une très forte similarité des profils bactériens pour les échantillons issus de tests distincts utilisant deux débits de gaz de balayage différents, 65 et 174 mL/L_{milieu}/min, permettant par ailleurs de valider la robustesse des méthodes d'analyses microbiologiques. Les espèces majoritairement observées sont du genre *Clostridium* sensu stricto avec environ 55% de l'ensemble des séquences analysées, *C. baratii* étant largement majoritaire avec plus de 44% des séquences, suivie de *C. butyricum* avec environ 5%. L'étude suivante de l'optimisation du procédé d'extraction des gaz produits porte sur la composition du gaz de balayage utilisé, enrichi en dioxyde de carbone, ceci dans la perspective de recyclage d'une partie du CO₂ produit par la fermentation.

IV.B.2. Influence de la composition (CO₂ : N₂) du gaz de balayage

L'ajout de dioxyde de carbone en tant que gaz de balayage peut être intéressant à différents niveaux. Il est possible de modifier favorablement l'équilibre thermodynamique de voies métaboliques secondaires non productrices d'hydrogène, avec notamment une inhibition de la production d'éthanol par solvantogénèse (18). De plus, dans une optique de recyclage d'une partie du CO₂ produit, il ne serait plus nécessaire d'ajouter au milieu réactionnel un gaz externe au procédé. Et enfin, le post-traitement de purification de l'hydrogène serait facilité, se faisant exclusivement sur le mélange gazeux de H₂ et CO₂. L'ajout de CO₂ a donc été testé en tant que gaz de balayage en mélange avec de l'azote à 50% et 75% en volume ; l'utilisation du dioxyde de carbone seul a également été testée et sera comparée au fonctionnement observé avec l'azote seul. Ces tests ont été réalisés en triplicat avec un débit total de gaz de balayage moyen de 182 ± 8 mL/L_{milieu}/min, donc dans le plateau optimum de production d'H₂ observé avec N₂ comme gaz de balayage au paragraphe IV.B.1.



IV.B.2.1. Suivi de la production d'hydrogène

La Figure 51 présente les profils de production de H₂ obtenus pour les 4 compositions de gaz de balayage testés. L'ajout de CO₂ au gaz de balayage donne lieu à une légère augmentation du volume d'hydrogène produit, sans changement significatif au niveau de la cinétique de production. Le débit maximum, le volume total produit en hydrogène ainsi que le temps de latence augmentent avec la fraction de CO₂ utilisé dans le gaz de balayage. Lors de l'utilisation de CO₂ seul, une production plus importante est observée que lors de l'utilisation de l'azote seul, mais inférieure au résultat obtenu avec le mélange (CO₂ : N₂) à (75 : 25).

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

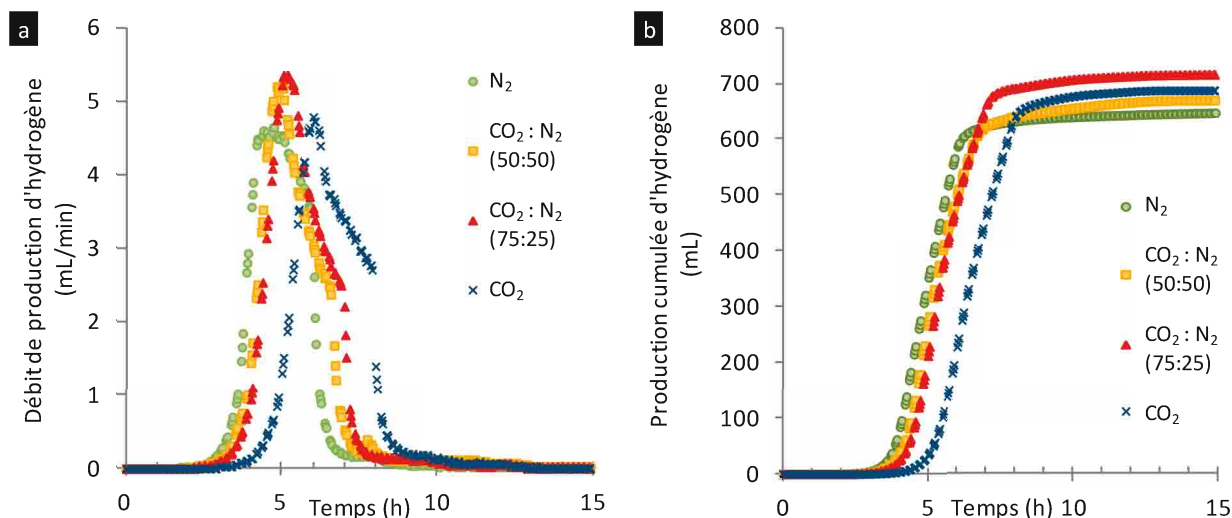


Figure 51. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différentes compositions du gaz de balayage

Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en RASB (1,5 L) ; volume d'inoculum de 1,2 L ; température de fermentation de $38^\circ C$; ajout de glucose ($10,9 \pm 0,1 \text{ mmol}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}$) ; quatre compositions de gaz de balayage ($CO_2 : N_2$) à (0 : 100), (50 : 50), (75 : 25) ou (100 : 0) utilisées pour l'extraction des gaz avec un débit de $182 \pm 8 \text{ mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$

Les profils de pH du milieu réactionnel en fonction du temps (Figure 52) sont différents lorsque du dioxyde de carbone est ajouté au gaz de balayage, par rapport à l'azote seul. A partir de t_0 (temps = 0 h), à la mise en fonctionnement du gaz de balayage, une baisse du pH est observée, due à l'augmentation de la concentration en acide carbonique (H_2CO_3 et HCO_3^-) dans le milieu réactionnel lorsque CO_2 est présent dans le gaz de balayage. Le pH se situe alors autour de 5,5, tandis qu'il monte à plus de 7 lors des tests utilisant N_2 seul, correspondant au dégazage de la phase liquide avec extraction du CO_2 dissous. Ainsi, le milieu réactionnel se situe dans une gamme de pH typiquement reconnue comme favorable à la production d'hydrogène par fermentation obscure [102], ce qui peut expliquer l'augmentation de la production de H_2 .

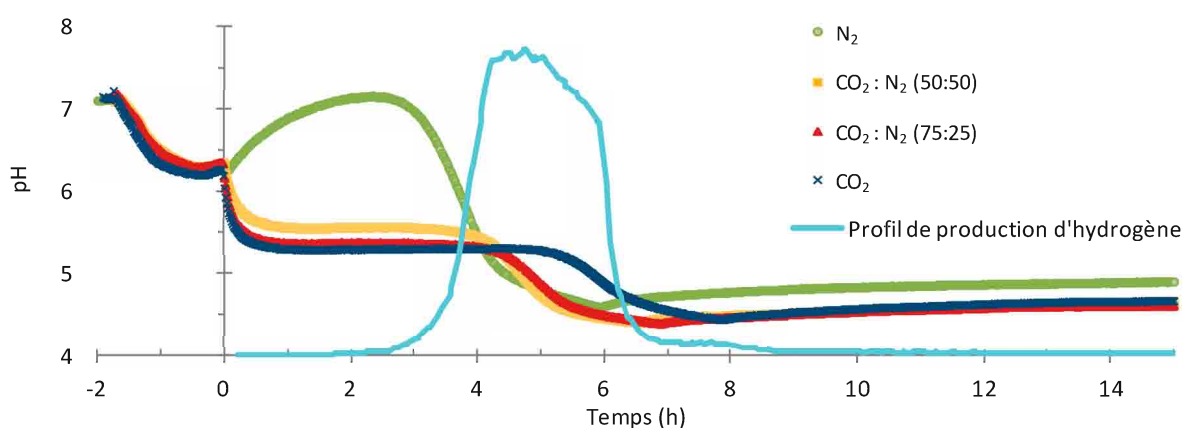


Figure 52. Suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps pour différentes compositions du gaz de balayage

Les modifications de la composition de l'atmosphère du bioréacteur sont observées sur la Figure 53, avec le changement progressif de la composition du gaz de balayage de N_2 à CO_2 . En toute logique, avec l'utilisation du CO_2 dans le gaz de balayage, la pression partielle en CO_2 est plus élevée, la quantité dissoute de ce gaz dans le milieu réactionnel est donc d'autant plus élevée, en équilibre avec l'acide carbonique, ce qui explique le pH plus bas observé lors de ces tests de fermentation. En effet, la pression partielle maximale relative au dioxyde de carbone, lors de ces tests de fermentation, passe de 0,02 à 0,99 bar. En revanche, celle de l'hydrogène reste relativement stable autour de 0,023 bar. La part de CO_2 dans le ciel gazeux relative à la production d'hydrogène peut être calculée

IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

à partir des débits de gaz utilisés pour le gaz de balayage, bien que l'incertitude soit relativement élevée : un maximum de 12% est obtenu pour le test utilisant CO₂ : N₂ (50 : 50) et un minimum de 6% pour le CO₂ seul.

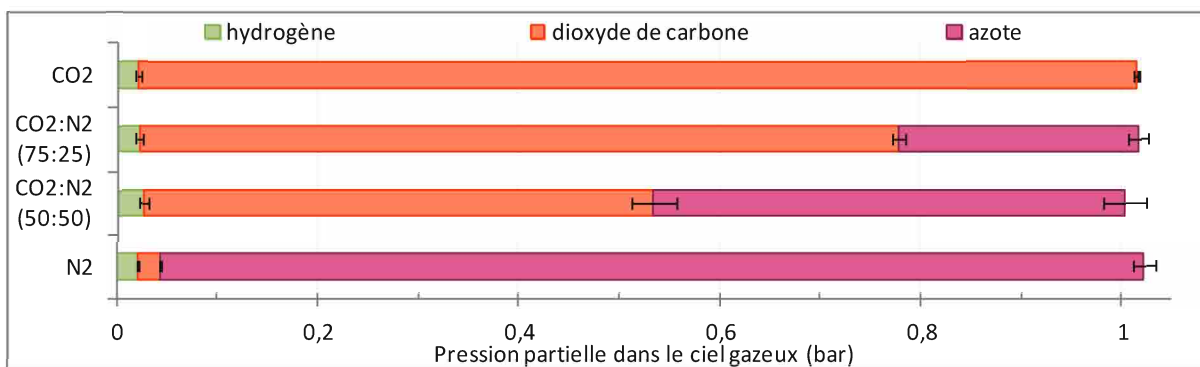


Figure 53. Pressions partielles des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur pour différentes compositions du gaz de balayage (valeur au maximum de la production d'hydrogène) - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliquats de fermentation

L'évolution des volumes de H₂ et CO₂ produits, du rendement de H₂, des paramètres de modélisation, H_{max}, R_{max} et λ , et des rapports H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) en fonction de la composition du gaz de balayage est donnée dans le Tableau 32. Afin d'obtenir les valeurs réelles pour le volume de CO₂ produit et le rapport H₂/CO₂, la quantité corrigée de CO₂ est utilisée. Après suppression du CO₂ ajouté via le gaz de balayage, l'incertitude sur la mesure de cette valeur est cependant importante en raison de la dilution du flux de CO₂ produits dans celui utilisé comme gaz de balayage.

Le dioxyde de carbone utilisé comme gaz de balayage donne des résultats de production de H₂ supérieurs au test avec N₂ seul. L'apport de CO₂ via le gaz de balayage semble provoquer une modification dans le métabolisme du *consortium* microbien permettant une amélioration de la production d'hydrogène. Il s'agit donc d'un effet complémentaire à la réduction de la pression partielle en H₂, responsable de l'amélioration de la production avec gaz de balayage inerte, par rapport au réacteur avec extraction libre. Le rendement en H₂ entre les tests avec N₂ seul et les tests utilisant un mélange CO₂ : N₂ augmente de 3% à (50 : 50) et de 13% à (75 : 25). Le rendement obtenu lors de l'utilisation de CO₂ seul en tant que gaz de balayage est de 2,29 mol_{H2}/mol_{hexose} consommé, soit 9% supérieur au test avec N₂ seul. Avec l'utilisation d'un gaz de balayage dans un réacteur de 5 L en mode de fonctionnement continu, Kim *et al.* [139] ont observé un effet similaire avec des rendements de 0,91 et 1,19 mol_{H2}/mol_{hexose} ajouté, respectivement pour l'utilisation de N₂ et CO₂ à 80 mL/Lmilieu/min.

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Tableau 32. Valeurs du rendement en H₂, des paramètres H_{max}, R_{max} et λ, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose en fonction de la composition du gaz de balayage - les incertitudes correspondent à l'écart type des répliquats de fermentation

Gaz de balayage	Volume de H ₂ produit (mL/L _{milieu})	Volume de CO ₂ produit (mL/L _{milieu})	Rendement (mol _{H₂} /mol _{hexose consommé})	H _{max} (mL _{H₂} /L _{milieu})	R _{max} (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	λ (h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
N ₂	549 ± 12	656 ± 16	2,11 ± 0,04	547 ± 10	268 ± 14	4,0 ± 0,1	0,84 ± 0,01	0,54 ± 0,13	0,75 ± 0,06	98,0 ± 0,4
CO ₂ : N ₂ (50 : 50)	576 ± 12	1015 ± 194	2,18 ± 0,03	574 ± 10	285 ± 34	4,2 ± 0,1	0,58 ± 0,09	0,80 ± 0,15	0,72 ± 0,2	98,2 ± 0,1
CO ₂ : N ₂ (75 : 25)	618 ± 8	1254 ± 456	2,37 ± 0,03	617 ± 7	265 ± 20	4,5 ± 0,2	0,53 ± 0,17	0,89 ± 0,03	0,75 ± 0,13	98,2 ± 0,1
CO ₂	597 ± 7	1273 ± 169	2,29 ± 0,03	595 ± 7	254 ± 23	5,3 ± 0,5	0,48 ± 0,07	1,04 ± 0,21	0,67 ± 0,03	98,3 ± 0,2

Un effet favorable de l'utilisation d'un mélange CO₂ : N₂ est observé sur le coefficient H_{max} avec une augmentation de 547 à 574 puis 617 mL_{H₂}/L_{milieu} avec ajout respectif de 50% et 75% de CO₂ à N₂ dans le gaz de balayage. Cependant, ce mélange ne semble pas modifier la productivité maximale R_{max} avec une valeur relativement stable autour de 270 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. Le temps de latence λ augmente avec la fraction de CO₂ dans le gaz de balayage de 4,0 h avec N₂ à 5,3 h avec CO₂.

Une baisse du rapport H₂/CO₂ est mise en évidence avec l'augmentation de la production de dioxyde de carbone dans le milieu, ce rapport passant de 0,84 avec N₂ seul à 0,48 avec CO₂, soit une baisse de 43%, à moduler car la précision sur la teneur en CO₂ peut être affectée par des variations de débits de gaz en sortie du milieu réactionnel. De même, en ce qui concerne le rapport B/A, une modification importante est observée, avec une forte augmentation de la valeur du rapport avec l'utilisation de CO₂ dans le gaz de balayage, la valeur passant de 0,54 à 1,04 pour les tests avec N₂ et CO₂ seuls, respectivement. Ceci est lié à l'augmentation de la production de butyrate en parallèle de l'augmentation de la pression partielle en CO₂ dans le milieu (Tableau 33). Cet effet est directement lié à l'acidification du milieu réactionnel lorsque celui-ci est saturé en acide carbonique. En effet, quelle que soit la voie acétate (16) ou butyrate (17) utilisée, 2 moles de CO₂ par mole de glucose seront produites, tandis que pour la voie butyrate, une seule mole d'acide est produite, contre deux pour la voie acétate. Le métabolisme se régule pour limiter la formation totale d'acides. L'évolution du rapport H₂/2(B+A) ne montre pas de tendance significative, stable autour de 0,7, ce qui indique que le métabolisme global de production/consommation de H₂ reste équilibré, les voies métaboliques responsables pouvant être cependant modifiées.



L'utilisation du dioxyde de carbone, seul ou en mélange, dans le gaz de balayage permet efficacement d'extraire l'hydrogène produit par la fermentation, avec une amélioration systématique du rendement en H₂ par rapport aux tests utilisant l'azote seul. Le mélange de gaz de balayage testé met en évidence un optimum de production est CO₂ : N₂ (75 : 25) avec un rendement en hydrogène amélioré de 13% par rapport à l'utilisation de N₂ seul. Le dioxyde de carbone permet de plus de saturer le milieu en acide carbonique, ce qui réduit la valeur du pH à

environ 5,5 dès le début du test de fermentation. Une cinétique de production plus longue est cependant observée lors de l'utilisation du dioxyde de carbone comme gaz de balayage, avec un allongement du temps de latence et un léger fléchissement de la productivité en hydrogène.

IV.B.2.2. Analyse des métabolites et bilan carbone

L'analyse par GC-FID et HPLC-UV des échantillons de biomasse initiaux et finaux des tests de fermentation a permis d'établir la production de métabolites (Tableau 33) et les bilans carbone (Figure 54) pour cette série de tests, réalisées avec différentes compositions CO₂ : N₂ de gaz de balayage. Le profil global de la fermentation est identique pour les différentes conditions testées, les métabolites principaux produits sont les mêmes, avec l'acétate et le butyrate autour de 8 mmol/L_{milieu} en composés majoritaires et l'éthanol avec environ 2 mmol/L_{milieu}, tandis que le propionate est consommé à hauteur de 1,5 mmol/L_{milieu}.

Des variations de production sont cependant observées en parallèle de l'évolution de la composition du gaz de balayage. Comme mentionné précédemment, l'augmentation de la proportion de dioxyde de carbone dans le gaz de balayage a conduit à une augmentation progressive de la production de butyrate de 77% entre les tests réalisés avec CO₂ seul et à N₂ seul. L'analyse des métabolites montre également une légère baisse de la production d'éthanol de 2,4 à 1,5 mmol/L_{milieu} entre les tests avec N₂ et CO₂ seul, ce qui semble s'expliquer par une limitation de la solvantogénèse (18) comme attendu, grâce à l'augmentation de la pression partielle en CO₂ dans le milieu.

Tableau 33. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de la composition (CO₂ : N₂) de gaz de balayage – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure

Production (mmol/L _{milieu})	éthanol	butanol	pyruvate	succinate	formiate	acétate	propionate	butyrate	isovalérate	valérate	dioxyde de carbone	hydrogène	hexose
N ₂	2,4 ± 0,5	0,2 ± 0,1	-0,019 ± 0,002	-0,2 ± 0,3	< LD	9,9 ± 1,4	-1,9 ± 0,5	5,2 ± 0,7	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,1	27,3 ± 0,7	22,8 ± 0,5	-10,8 ± 0,1
CO ₂ : N ₂ (50 : 50)	2,2 ± 1,0	0,08 ± 0,04	-0,018 ± 0,001	-0,36 ± 0,01	< LD	9,7 ± 2	-2,3 ± 1,1	7,7 ± 3,1	0,6 ± 0,2	0,7 ± 1,0	42 ± 8	24,0 ± 0,4	-11,1 ± 0,3
CO ₂ : N ₂ (75 : 25)	2,3 ± 0,6	0,09 ± 0,05	-0,014 ± 0,005	-0,31 ± 0,08	0,1 ± 0,1	9,2 ± 1,4	-1,6 ± 1,2	7,9 ± 1,6	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	52 ± 19	25,7 ± 0,3	-10,8 ± 0,1
CO ₂	1,5 ± 0,4	0,06 ± 0,03	-0,018 ± 0,001	-0,36 ± 0,01	0,1 ± 0,2	9,1 ± 1,3	-0,8 ± 0,9	9,1 ± 0,7	0,5 ± 0,2	1,5 ± 1,6	53 ± 7	24,8 ± 0,3	-10,8 ± 0,1

Les bilans carbone mesurés pour cette étude montrent un fort taux de recouvrement, avec une augmentation progressive de la valeur entre le minimum avec N₂ seul (109%) et le maximum de 166% pour le CO₂ comme gaz de balayage. Les principaux acteurs de cette augmentation sont le butyrate et le dioxyde de carbone. La présence d'acide carbonique dans le milieu réactionnel, avec la diminution rapide du pH autour de la valeur de 5,5 est sans doute à l'origine de la surproduction de butyrate, dont la proportion relative dans le bilan carbone passe de 28 à 48%. La surproduction de CO₂ observée avec l'augmentation de la proportion de CO₂ dans le gaz de balayage n'est cependant pas totalement explicable par l'augmentation de la production de butyrate. L'incertitude sur la valeur de la quantité de CO₂ réellement produite est relativement importante, et ne permet donc pas de conclure.

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Une augmentation en parallèle des proportions du propionate et du valérate dans le bilan carbone total est également observée avec l'augmentation de la pression partielle en CO₂ dans le ciel gazeux. L'augmentation de la quantité finale dans le milieu fermentaire de ces deux métabolites est significative d'une consommation de l'hydrogène produit par d'autres voies. Ceci indique donc que la quantité d'hydrogène produit mesurée lors de ces tests est inférieure au potentiel de production d'hydrogène réel. En effet, la production de valérate est réalisée à partir du propionate sans coproduction d'hydrogène, soit via la voie (33) avec consommation d'éthanol, soit par la voie (34) consommant une quantité importante d'hydrogène ; la production de propionate nécessitant également de l'hydrogène (20). Une amélioration de la production totale de H₂ est donc envisageable avec la réduction de ces voies de production.

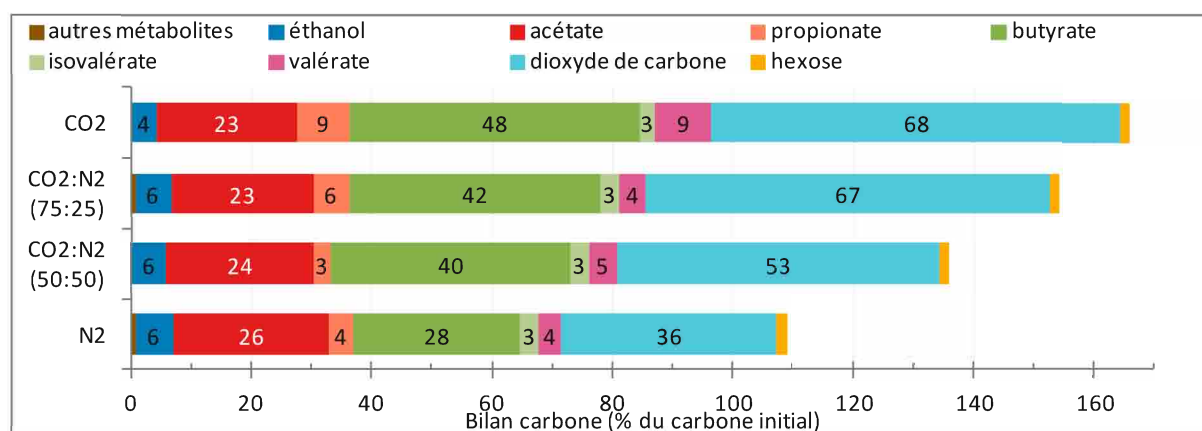
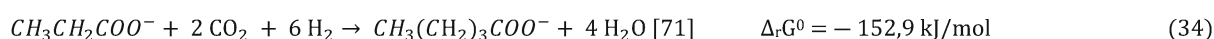
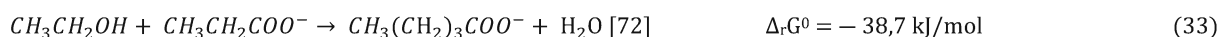


Figure 54. Bilan carbone final réalisé par rapport au pourcentage de carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différentes compositions (CO₂ : N₂) de gaz de balayage

Ces résultats montrent que l'utilisation du dioxyde de carbone comme gaz de balayage donne de meilleurs résultats que pour l'azote seul. Lors de l'utilisation de N₂ et de CO₂ comme gaz de balayage dans un réacteur en mode continu Kim *et al.* [139] ont observé un effet similaire aux nôtres avec des rendements de 0,91 et 1,19 mol H₂/ mol_{hexose} consommé respectivement pour N₂ et CO₂ à 80 mL/L_{milieu}/min. L'utilisation de CO₂ comme gaz de balayage conduit à une réduction de la quantité produite d'acétate (-75%) et une augmentation de celle de butyrate (+34%) par rapport à N₂, l'augmentation de la production de butyrate étant également observée dans notre étude.

De leur côté, Dipsquale *et al.* [147] ont observé une amélioration du rendement en H₂ et de la productivité en mode semibatch, lorsque CO₂ était utilisé comme gaz de balayage en remplacement de N₂. Cependant, l'utilisation de cultures pures (*Thermotoga neapolita*) produisant de l'acétate et du lactate, sans coproduction de butyrate, ce qui ne permet pas de comparer ces métabolismes bactériens. Cette étude montre néanmoins que l'impact bénéfique de l'utilisation du CO₂ en tant que gaz de balayage n'est pas spécifique au *consortium* microbien utilisé dans notre étude. Les modifications éventuelles de ce *consortium* en fonction du gaz de balayage utilisé sont étudiées dans le paragraphe suivant.

En conservant un profil similaire, la distribution des métabolites produits évolue légèrement lorsque le dioxyde de carbone est utilisé comme gaz de balayage, en mélange avec l'azote, puis seul. La quantité d'éthanol produit diminue, tandis que celle de butyrate augmente avec celles des gaz, H₂ et CO₂.

IV.B.2.3. Analyse microbiologique

A nouveau, les deux techniques d'analyses microbiologiques, T-RFLP et séquençage par synthèse Illumina, sont utilisées pour étudier les modifications du *consortium* bactérien en fonction des conditions de fermentation. Des échantillons finaux des tests menés avec N₂ seul et un mélange CO₂ : N₂ (75 : 25) comme gaz de balayage ont été analysés.

IV.B.2.3.1. T-FRLP

Les profils obtenus par l'analyse par T-RFLP de ces deux échantillons sont très proches (Figure 55), à l'exception du pic à 190 pb pour l'enzyme AluI et le pic à 702 pb pour l'enzyme HhaI. Cette variation peut s'expliquer par l'atténuation de certaines espèces après fermentation, l'échantillon de biomasse étant prélevé environ 15 h après le maximum de fermentation. Il est également probable que la pression partielle élevée en CO₂ dans le milieu soit défavorable à certaines espèces bactériennes, dont le développement est ainsi inhibé. Le *consortium* bactérien ne semble cependant pas être impacté massivement par l'ajout de CO₂ en quantité importante dans le gaz de balayage. L'amélioration du rendement en H₂ avec l'utilisation de CO₂ n'est donc pas due au développement de bactéries différentes plus adaptées, mais plutôt à l'inhibition de voies métaboliques secondaires du *consortium* déjà actif avec N₂ seul, ou alors, à une restriction de la croissance de microorganismes hydrogénotrophes et/ou non producteurs d'hydrogène.

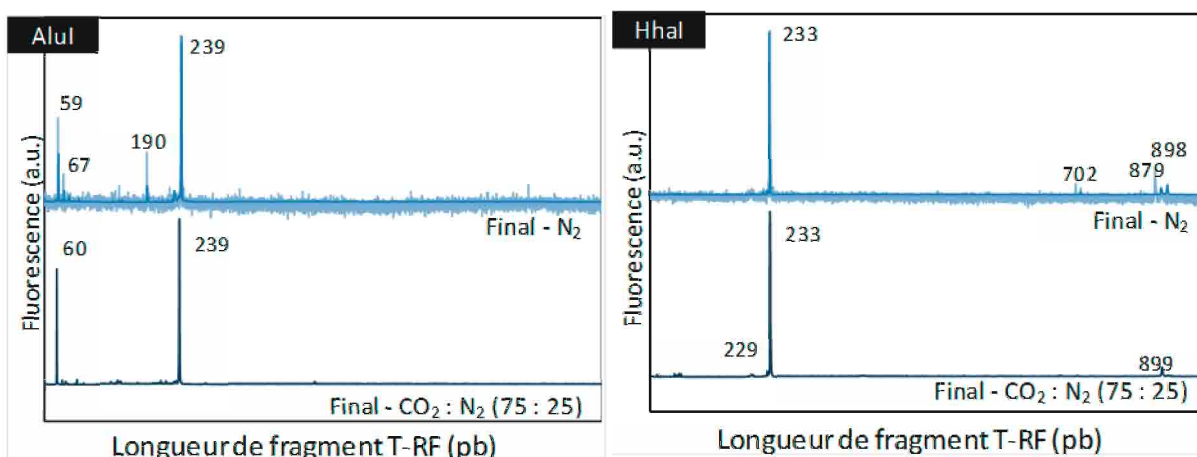


Figure 55. Profil d'analyse par T-RFLP pour les tests de fermentation pour différentes compositions du gaz de balayage

La confrontation des pics de ces profils avec la base de données T-RFLP [180] est présentée dans le Tableau 34. La présence de bactéries du genre *Clostridium* peut être confirmée, lors de l'utilisation du CO₂ dans le gaz de balayage, par la présence, entre autres, du couple AluI 67 pb - HhaI 233 pb, également observable sur l'électrophorégramme obtenu avec N₂. En revanche, l'absence du pic HhaI à 702 pb semble indiquer l'absence de l'espèce *Clostridium butyricum* (AluI 67 pb – HhaI 702 pb), présente lors des tests utilisant N₂ seul comme gaz de balayage. L'absence du pic AluI à 190 pb montre également l'absence d'autres bactéries, *Conexibacter woesei*, *Nodularia* sp., *Scytonema* sp., dont la présence était suspectée lorsque N₂ est utilisé seul comme gaz de balayage.

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Tableau 34. Correspondances des pics majeurs de l'analyse T-RFLP pour différentes compositions de gaz de balayage avec la base de données T-RFLP [180]

Gaz de balayage	Pic Alul (pb)	Intensité relative	Pic Hhal (pb)	Intensité relative	Correspondances de la base de données [180]
N ₂	239	1,00	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>PaeniBacillus sp.</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>
	239	1,00	229	0,02	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacteriumsp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i>
	59	0,41	879	0,11	<i>Peptostreptococcus genosp. 4</i>
	190	0,21	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i>
	190	0,21	229	0,02	<i>Nodularia sp.</i> , <i>Scytonema sp.</i>
	67	0,07	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i>
	67	0,07	229	0,02	<i>Clostridium sp.</i>
	228	0,06	233	1,00	<i>Phytoplasma sp.</i> ; <i>Candidatus Phytoplasma fraxini</i> ; <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
	228	0,06	879	0,11	<i>Lactobacillus sp.</i>
	74	0,03	233	1,00	<i>Bacillus sp.</i> ; <i>Solobacterium sp.</i> ; <i>Aquasalina asiatica</i> ; <i>Bulleidia moorei</i> ; <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> ; <i>Oxalophagus oxalicus</i> ; <i>Photobacterium profundum</i> ; <i>Saccharococcus thermophilus</i> ;
	74	0,03	229	0,02	<i>Bacillus sp.</i> ; <i>Aquasalina asiatica</i> ; <i>Photobacterium profundum</i>
	192	0,02	233	1,00	<i>Conexibacter woesei</i> ; <i>Tolypothrix sp.</i>
	192	0,02	229	0,02	<i>Nodularia sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i> ; <i>Scytonema sp.</i> ; <i>Tolypothrix sp.</i> ; <i>Brasilonema bromeliae</i>
CO ₂ : N ₂ (75:25)	239	1,00	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacterium sp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i> ; <i>PaeniBacillus sp.</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>
	239	1,00	229	0,03	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Eubacteriumsp.</i> ; <i>Pasteuria sp.</i>
	67	0,03	233	1,00	<i>Clostridium sp.</i>
	67	0,03	229	0,03	<i>Clostridium sp.</i>

L'analyse par T-RFLP a permis d'observer une réduction de la diversité bactérienne lors de l'utilisation de CO₂ dans le gaz de balayage. Cependant, l'identification précise des espèces présentes dans le milieu n'est pas possible. L'analyse par séquençage des échantillons à haut débit de l'ADN extrait du culot du milieu réactionnel permettra d'obtenir plus d'informations concernant la composition du consortium bactérien.

IV.B.2.3.2. Séquençage par synthèse Illumina

Les échantillons prélevés en fin de fermentation dans des bioréacteurs utilisant N₂ seul et un mélange CO₂ : N₂ (75 : 25) comme gaz de balayage ont été analysés par séquençage à haut débit. Une quantité relativement importante d'OTU a été obtenue après traitement des données : 1015 et 797 OTU respectivement pour les échantillons avec N₂ seul et CO₂ : N₂ (75 : 25). Une plus forte diversité est observée dans le cas du test réalisé avec l'azote seul comme gaz de balayage, avec un indice de Simpson de 0,25 contre 0,37 avec le mélange de gaz CO₂ : N₂ (75 : 25). Cette observation est confirmée par la quantité plus faible d'OTU dans le cas du test utilisant du dioxyde de carbone dans le gaz de balayage. Une plus forte pression sélective semble donc s'opérer dans le cas du test avec CO₂, la présence de CO₂ dans le milieu pouvant limiter la croissance de certaines bactéries, probablement hydrogénotrophes, ce qui confirme les observations réalisées lors de l'analyse par T-RFLP.

IV.B. Optimisation du mode d'extraction par gaz de balayage

Tableau 35. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés avec N₂ et CO₂ : N₂ (75 : 25) comme gaz de balayage - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Gaz de balayage	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
N ₂	1015	0,25
CO ₂ :N ₂ (75:25)	796	0,37

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 56 et dans le Tableau 36. Ils confirment les observations faites lors de l'analyse T-RFLP, avec une majorité de bactéries du genre *Clostridium sensu stricto* dans les deux configurations, avec respectivement 54,6% et 64,9% des séquences OTU analysées. La présence de la bactérie *C. butyricum* est confirmée dans les deux échantillons, mais en quantité inférieure dans le cas du test avec CO₂ dans le gaz de balayage (1,3% contre 4,2% pour le test utilisant N₂ seul), ce qui explique pourquoi elle n'avait pas été identifiée par l'analyse par T-RFLP.

Une forte augmentation de la proportion de l'espèce *Clostridium baratii* est observée avec l'utilisation du mélange de gaz CO₂ : N₂, 60,8% contre 48,4% lorsque N₂ est utilisé seul comme gaz de balayage. Cette espèce de *Clostridium* semble donc plus adaptée à la production d'hydrogène que les espèces du genre *Peptoclostridium* dont la proportion dans l'échantillon issu du réacteur sous flux de CO₂ : N₂ est très réduite : 0,5% contre 12,1% des séquences avec N₂ seul comme gaz de balayage. Ce genre, anciennement intégré à celui des *Clostridium* est halophile (pouvant vivre en milieu salin) et est utilisé pour la production d'hydrogène par fermentation obscure, avec l'acétate comme coproduit majeur [231]. L'élimination de cette espèce dans le milieu peut donc potentiellement expliquer la diminution de la production d'acétate avec l'augmentation de la production de CO₂ dans le gaz de balayage.

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

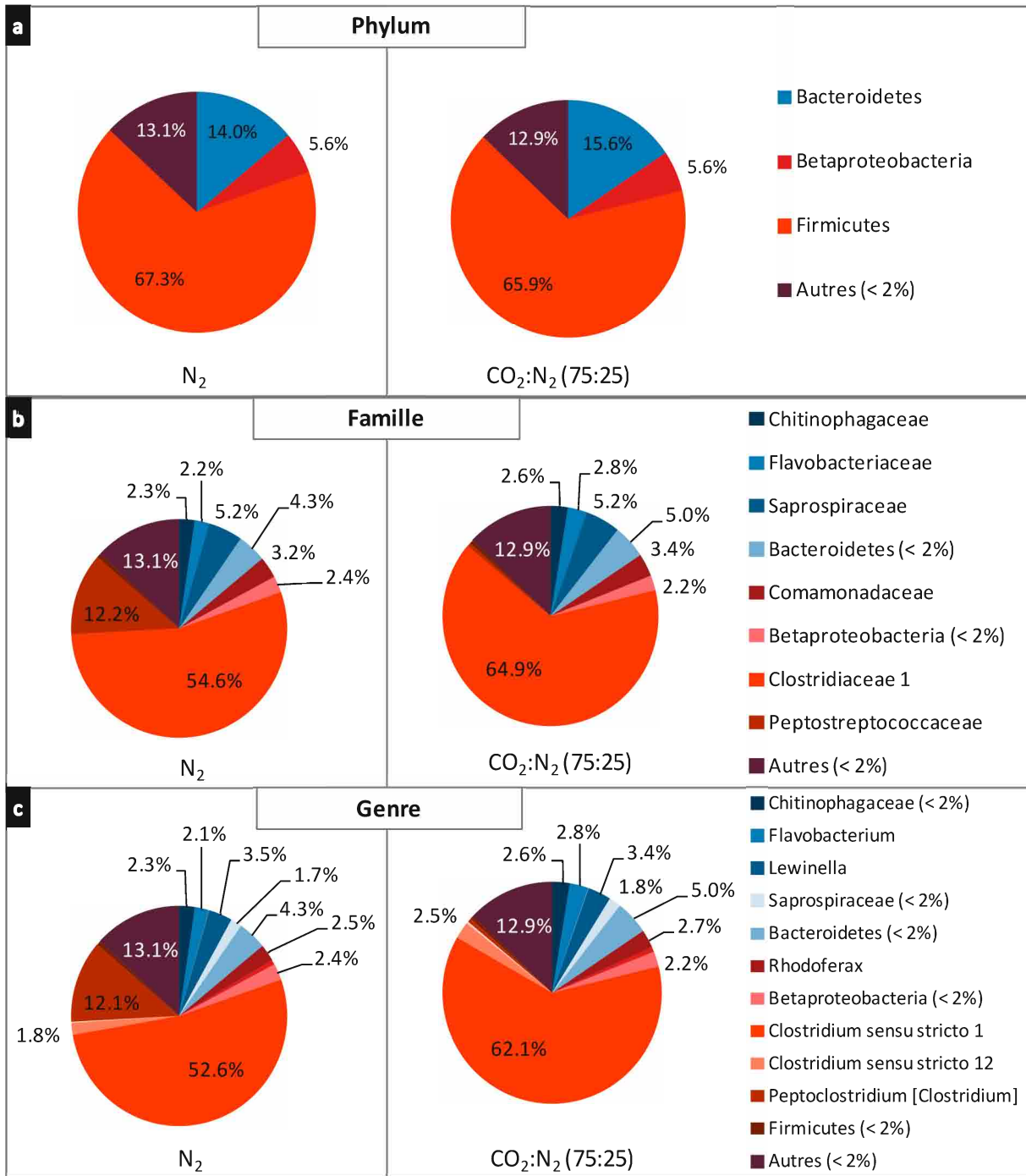


Figure 56. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons finaux de fermentation avec les gaz de balayage N₂ et CO₂ : N₂ (75 : 25) - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Tableau 36. Résultats obtenus par séquençage des échantillons finaux de fermentation avec les gaz de balayage N₂ et CO₂ : N₂ (75 : 25) - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons - un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible

Phylum	Famille	Genre	meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	N ₂ (%)	CO ₂ :N ₂ (75:25) (%)
Bacteroidetes	AKYH767 (100%)	Fluviicola (98%)	Fluviicola sp.	98	KM052482	1,1	1,2
			Flavobacterium noncentrifugens	97	NR_109531	1,9	2,4
	Saprosiraceae (100%)	Haliscamenobacter (99%)	Haliscamenobacter hydrossis	< 97	NR_074420	1,1	1,0
			Lewinella (< 97%)	< 97	NR_115013	2,7	2,7
Betaproteobacteria	Comamonadaceae	Rhodofera	Rhodofera spp. (ferrireducens / saidenbachensis)	100	/	2,5	2,7
Firmicutes	Clostridiaceae 1	Clostridium sensu stricto 1 (100%)	Clostridium baratii	98	NR_029229	48,4	60,8
			Clostridium butyricum	99	LN828941	4,2	1,3
	Peptostreptococcaceae	Peptoclostridium [Clostridium]	Clostridium magnum	99	NR_119084	1,7	1,9
			Peptoclostridium sordellii	100	KM657125	2,0	0,0
			Peptoclostridium spp. (bifermentans / difficile / hungatei)	100	/	10,2	0,5

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

Comme cela a été montré précédemment au paragraphe IV.B.1.2, en ce qui concerne l'échantillon utilisant N₂ comme gaz de balayage, l'espèce *Peptoclostridium sordellii* dont le couple de pics correspondant à AluI 190 pb - HhaI 1062 pb est observable sur les électrophorégrammes de la Figure 55, de même que l'espèce *Peptoclostridium bifermentans* (couple AluI 190 pb - HhaI 1066 pb) ; les espèces *Peptoclostridium hungatei* et *difficile* étant absentes du milieu fermentaire. L'absence notable du pic de T-RFLP AluI 190 pb sur les électrophorégrammes correspondants au gaz de balayage CO₂ : N₂ confirme l'absence de ces espèces du genre *Peptoclostridium* dans cet échantillon.

Des bactéries des familles *Flavobacteriaceae* et *Saprospiraceae*, importantes pour l'activité générale du consortium, sont également présentes avec respectivement ≈ 2,5% et ≈ 5,2%, en quantités similaires quel que soit le gaz de balayage utilisé.

Kim *et al.* [139] dans leurs conditions de fermentation observent également l'inhibition de certaines espèces bactériennes, dont certaines productrices d'hydrogène (*Clostridium butyricum*, *pasteurianum* et *collagenovorans*), mais également d'acétate par homoacétogénèse (*Gluconacetobacter europaeus*) et de lactate (*Lactobacillus sp.*), permettant de limiter la compétition avec les bactéries productrices d'hydrogène résistantes à la pression partielle élevée de dioxyde de carbone. Ainsi, l'effet de l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage est donc globalement bénéfique, les bactéries productrices d'H₂ étant globalement plus résistantes à une pression partielle en CO₂ élevée. De plus, il est reconnu que la présence de CO₂ dans le milieu réactionnel stimule la croissance de ces bactéries anaérobies, celui-ci pouvant être utilisé en tant qu'accepteur d'électron [76].

A l'exception de certaines bactéries, les profils bactériens observés dans les deux conditions expérimentales sont très proches. L'impact négatif du dioxyde de carbone sur la diversité bactérienne (augmentation de 49% de l'indice de Simpson) a été prouvé ici, avec en particulier l'élimination des Peptoclostridium du consortium bactérien. L'élimination de ces bactéries productrices ou non d'hydrogène peut être à l'origine de l'amélioration du rendement et de la productivité en H₂. La disparition des Peptoclostridium du milieu réactionnel peut être directement à l'origine du développement plus important de Clostridium baratii avec laquelle elle entrait en compétition pour la consommation du substrat et la production d'hydrogène.

IV.B.2.4. Bilan sur l'utilisation du dioxyde de carbone dans le gaz de balayage

La composition du gaz de balayage est un des paramètres déterminants pour le procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure. L'utilisation du dioxyde de carbone, seul ou en mélange, dans le gaz de balayage permet efficacement d'extraire l'hydrogène produit par la fermentation, avec une amélioration systématique du rendement en H₂ par rapport aux tests utilisant l'azote seul. L'utilisation d'un gaz de balayage composé d'un mélange CO₂ : N₂ (75 : 25) correspond aux conditions optimales identifiées, avec un rendement en hydrogène amélioré de 13% par rapport à l'utilisation de N₂ seul. Une cinétique de production plus longue est cependant observée lors de l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage, avec un allongement du temps de latence mais avec un

IV.C. Conclusion du chapitre

maintien de la productivité en hydrogène. La nature des métabolites produits, lors de l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage, est similaire à celle observée avec l'azote seul. La distribution des métabolites évolue légèrement lorsque la proportion de dioxyde de carbone augmente dans le gaz de balayage, la quantité d'éthanol produite diminuant, tandis que la quantité produite de butyrate augmente pour une production de H₂ et CO₂ en hausse. A l'exception de certaines bactéries, les profils bactériens observés dans les deux conditions expérimentales sont proches. La présence de CO₂ dans le milieu réactionnel a en effet un effet inhibiteur sur la croissance de certains microorganismes hydrogénotrophes permettant probablement d'améliorer l'efficacité du métabolisme général, expliquant l'amélioration du rendement en hydrogène. Un recyclage du CO₂ est donc envisageable, à terme, dans une perspective de réduction des coûts de fonctionnement liés à l'ajout d'un gaz externe, avec de plus une amélioration sensible du rendement en hydrogène.

IV.C. Conclusion du chapitre

Le fonctionnement de la production d'hydrogène en réacteur clos et avec extraction libre a été vérifié. L'efficacité du procédé de production est cependant améliorée avec l'utilisation d'un gaz de balayage pour l'extraction des gaz produits, en particulier l'hydrogène, permettant ainsi la réduction de sa pression partielle dans le milieu, limitant sa consommation par les microorganismes homoacétogènes. Le bénéfice lié à l'extraction des gaz produits en augmentant le débit de gaz de balayage porte non seulement sur le rendement mais également sur la productivité en H₂, avec respectivement + 29% et + 37% entre des tests réalisés aux débits de 13 et 97 mL/L_{milieu}/min, attestant de l'effet inhibiteur des gaz produits (H₂) dans le milieu.

Cependant ce mode de fonctionnement pose le problème de l'ajout d'un gaz externe au procédé, l'azote, qui de plus dilue le biogaz produit. Cela rend donc nécessaire l'utilisation d'un procédé de séparation gaz/gaz pour séparer les différents gaz, et réutiliser l'azote pour un nouveau cycle de production. L'utilisation de modes d'extraction des gaz sans dilution, extraction libre, dépression, est possible, et permet d'atteindre des volumes de production d'hydrogène relativement importants, bien qu'inférieurs à ceux obtenus avec le procédé par gaz de balayage : 1,1 et 1,3 mol_{H₂}/mol_{hexose} pour les modes par extraction libre et en dépression, respectivement, contre 2,1 mol_{H₂}/mol_{hexose} avec gaz de balayage sur la phase de production, donc avant l'ajout du gaz externe pour le dégazage final. De plus, lors de l'utilisation du gaz de balayage pour l'extraction des gaz produits, un bénéfice sur les voies métaboliques peut être observé, celles-ci étant redirigées plus spécifiquement vers la production d'H₂.

L'utilisation de dioxyde de carbone a également été testée pour le remplacement de l'azote comme gaz de balayage, avec un impact positif sur la production d'hydrogène, liée à l'inhibition de certaines bactéries. Une amélioration nette du rendement en H₂ a ainsi pu être constatée, avec cependant une augmentation de la production de dioxyde de carbone, parallèle à une légère baisse des quantités produites d'éthanol et d'acétate et à une augmentation de celle de butyrate. Ces variations ne semblent pas liées à une modification du *consortium*, les profils bactériens observés étant très proches, à l'exception de l'inhibition de certaines bactéries.

Cette solution serait la plus intéressante pour la production d'hydrogène, dans la mesure où le CO₂ utilisé est issu de la fermentation et peut-être recyclé. L'utilisation d'un procédé de séparation des

IV. Intensification du procédé par extraction des gaz

gaz $H_2 : CO_2$ est cependant indispensable pour atteindre cet objectif. Des procédés industriels efficaces existent (PSA, TSA, cryogénie) mais nécessitent d'être utilisés à grande échelle pour être économiquement rentables [25,49]. La séparation membranaire offre également des alternatives intéressantes (polyimides, PEBA/PEG, copolymère de PEG, etc.) à ces procédés coûteux [171], afin de s'insérer sur une ligne de production d'hydrogène à plus petite échelle.

Dans la perspective d'une production efficace d'hydrogène à échelle industrielle, la mise en continu du procédé de production est nécessaire, car ce mode de fonctionnement est plus efficace énergétiquement et permet de simplifier les opérations et l'automatisation du procédé. Afin de limiter l'incertitude sur les résultats de production de CO_2 et de permettre une comparaison avec l'ensemble des résultats obtenus dans le reste de l'étude, l'azote est conservé comme gaz de balayage pour la suite de l'étude.

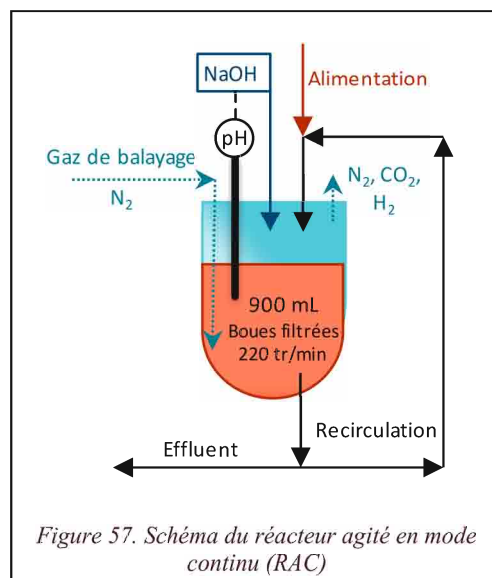
La mise en place d'un module membranaire permettra de réaliser efficacement l'extraction des gaz du milieu réactionnel. Ce module sera utilisé seul en tant que bioréacteur membranaire, ce qui constitue la configuration ultime de ce projet.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Dans la perspective d'une production efficace d'hydrogène à l'échelle industrielle, la mise en continu du procédé de production est nécessaire, car ce mode de fonctionnement permet de réaliser des gains de productivité à plus grande échelles [64]. Un mode d'alimentation à flux continu est mis en place pour réaliser un renouvellement du milieu réactionnel. Les résultats présentés dans ce chapitre concerne la mise en fonctionnement et l'optimisation du réacteur agité en fonctionnement continu (RAC) et du bioréacteur à membrane (BRM). L'optimisation du RAC dans le but de le rendre opérationnel a permis la mise en fonctionnement du BRM. L'impact de différents paramètres clés du fonctionnement continu a été testé : le temps de séjour hydraulique (TSH) et l'utilisation d'une boucle de recirculation.

V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)

La mise en continu du système de production d'hydrogène nécessite une phase d'acclimatation du *consortium* microbien utilisé, phase incluant le temps de latence et le début de la production de gaz. L'*inoculum* microbien utilisé pour l'apport des microorganismes producteurs d'hydrogène est composé des boues activées de station d'épuration, dont les paramètres de fonctionnement optimaux ont été étudiés au chapitre III. L'acclimatation des boues activées, filtrées sur un tamis grillagé (vide de maille de 0,6 mm), est effectuée en réacteur agité semibatch (RASB), avec les paramètres correspondant au test de référence. Le choix de la durée d'acclimatation est établi à cinq heures, correspondant au



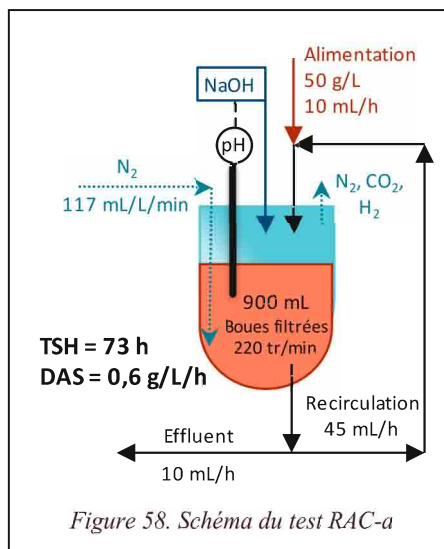
temps nécessaire pour atteindre le maximum de production de gaz. Une fois ce palier atteint, le réacteur est alimenté en continu avec une solution de substrat tandis qu'une extraction du milieu réactionnel excédentaire, l'effluent, est réalisée pour conserver un volume dans le réacteur sensiblement constant. Le RAC est alors en mode de fonctionnement continu. Une boucle de recirculation est mise en place, sur laquelle l'effluent est extrait et le substrat est ajouté. L'azote est utilisé comme gaz de balayage pour l'extraction des gaz produits lors de la fermentation (Figure 57). La production d'hydrogène étant réalisée en continu, une acidification du milieu réactionnel a lieu. La régulation du pH du milieu réactionnel du système est réalisée par l'ajout de NaOH par le système de régulation automatique utilisé pour le test de fermentation avec régulation du pH (paragraphe III.C). Deux tests préliminaires de fermentation sont effectués et seront comparés dans des conditions très différentes :

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

- un test alliant les conditions les plus favorables à une production en hydrogène avec un temps de séjour hydraulique élevé (73 h) et un fort débit d'extraction de gaz (117 mL/L_{milieu}/h)
- un test dans des conditions plus proches des données de la littérature avec un TSH six fois plus faible (12 h) et un débit de gaz de balayage réduit dix fois (12 mL/L_{milieu}/h) afin de minimiser le facteur de dilution des gaz produits.

V.A.1. Test préliminaire de fermentation RAC-a

Le premier test de fermentation **RAC-a** a été réalisé avec un débit d'alimentation en substrat (DAS) de 0,62 g_{hexose}/L_{milieu}/h (soit 3,4 mmol_{hexose}/L_{milieu}/h) et un TSH de 73 h (Figure 58). Ce test a permis la production d'hydrogène sur une durée supérieure à 240 h (Figure 59). Une diminution de la production d'hydrogène est observée après environ 60 h, suivie d'une remontée importante vers un palier de production relativement stable. Cependant, une augmentation significative de la production en dioxyde de carbone est observée, celle-ci étant nettement supérieure à celle d'hydrogène à partir 140 h. Le profil de production a été divisé en trois phases de production dont les paramètres de production correspondants sont donnés dans le Tableau 37.



Les résultats moyens obtenus pour les tests en mode de fonctionnement RASB (paragraphe III.E) sont donnés pour comparaison.

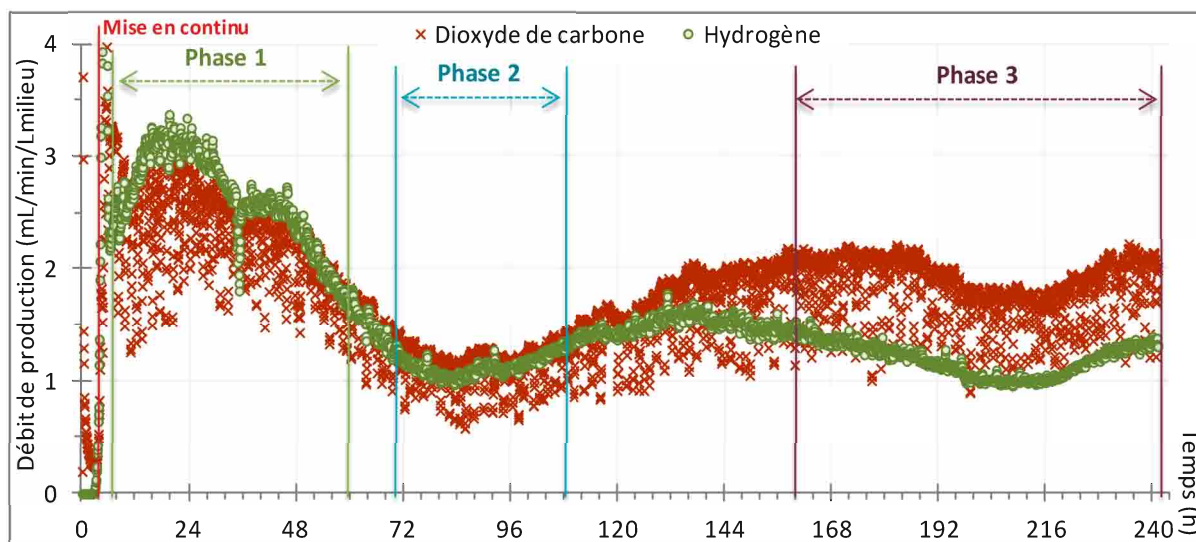


Figure 59. Débits de H₂ et CO₂ en fonction du temps pour le test de fermentation RAC-a

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en RAC (1,5 L) ; volume d'inoculum de 0,9 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose (DAS = 0,6 g_{hexose}/L_{milieu}/h) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 117 mL/min/L_{milieu} ; un TSH de 73 h ; taux de recirculation de 3,7

La première phase de fermentation étudiée, entre 7 h et 60 h, présente le rendement en hydrogène le plus élevé obtenu avec 1,95 mol_{H₂}/mol_{hexose} consommé avec une productivité moyennée sur la période de 158 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. Cette première phase de fonctionnement présente de plus un rapport H₂/CO₂ important 1,13, supérieur aux résultats observés lors des tests de fermentation en RASB.

V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)

Tableau 37. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test RAC-a, comparées aux résultats obtenus en RASB

Etape	phase étudiée	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
Phase 1	De 7 à 60 h	1,95	1,95	158	1,13	0,99	5,27	100
Phase 2	De 70 à 108 h	0,84	0,89	68	0,98	1,41	1,03	95
Phase 3	De 160 à 241 h	0,89	0,94	72	0,65	1,08	0,91	94
RASB	ensemble du test	2,10	2,10	263	0,86	1,04	0,66	99

La seconde phase de production identifiée (après un temps de séjour hydraulique) se situe entre 70 h et 108 h de fermentation après une baisse importante du rendement et de la productivité en hydrogène (respectivement – 54% et – 57%) dont la valeur minimale correspond à peu près au TSH appliqué au système (73 h) soit un renouvellement total du milieu réactionnel. Enfin, une troisième phase, plus longue, s'établit après 160 h (soit deux TSH) avec un rendement et une productivité similaire à ceux de la deuxième phase et un rapport H₂/CO₂ stabilisé autour de 0,65, réduit de plus de 30% par rapport aux deux phases précédentes.

La baisse de productivité en hydrogène entre les deux phases peut s'expliquer par le fait qu'aucun nutriment hormis le glucose n'est additionné au milieu réactionnel (pas de source d'azote ou de phosphore) et qu'une partie du *consortium* microbien est extrait du RAC par le renouvellement du milieu réactionnel. La solution de substrat étant stockée sous air statique, l'hypothèse selon laquelle le milieu réactionnel se trouve en condition de microaérobie peut être également avancée ; l'introduction d'oxygène dans le milieu réactionnel pouvant induire une modification du *consortium* microbien, expliquant la réduction de la production de H₂ au profit de celle du CO₂. Enfin, une troisième hypothèse concerne l'accumulation de métabolites de fermentation dans le milieu réactionnel, avec des concentrations élevées en éthanol, acétate et butyrate. La présence de métabolites en concentration importante limite thermodynamiquement leur production et donc la coproduction d'hydrogène (16) et (17).



En effet, les principaux métabolites produits au cours de ce test de fermentation en mode de fonctionnement continu sont le butyrate et l'acétate, ainsi que le lactate et l'éthanol dans une moindre mesure (Figure 60). Une augmentation progressive du débit de production d'acétate et de butyrate est observée dans le milieu réactionnel pendant les 68 premières heures de fermentation, ce qui correspond donc au temps d'équilibrage du milieu lors du premier TSH. Cette augmentation accompagne la baisse de production de gaz, ce qui semble confirmer l'hypothèse de l'effet négatif de la présence de ces métabolites dans le milieu réactionnel.

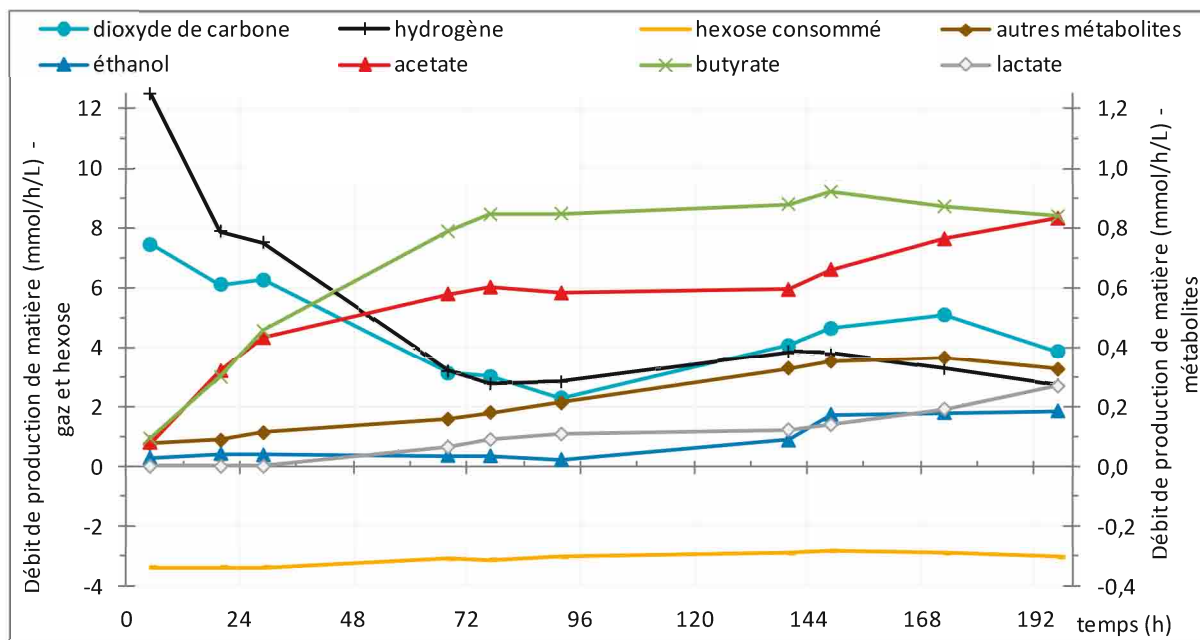


Figure 60. Valeurs de productions de gaz, d'hexose, et de métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du système, en fonction du temps pour le test de fermentation RAC-a

La quantité relative de butyrate produit par rapport à celle d'acétate est en augmentation entre la phase initiale, avant 60 h, et la seconde phase de fermentation, avec une augmentation du rapport B/A de 0,99 à 1,41 (Tableau 37). Entre ces deux phases, le rapport $H_2/2(B+A)$ passe de la valeur très importante de 5,27 à la valeur plus cohérente de 1,03. En effet, durant les 60 - 70 premières heures de fonctionnement (phase de fermentation initiale), le système n'est pas en équilibre, et les métabolites extraits du système ne reflète pas la totalité de la production, contrairement à celle de gaz dont l'extraction par gaz de balayage est rapide. Le rapport $H_2/2(B+A)$ sur la première phase de fermentation n'est donc pas significatif. En revanche, sur la seconde phase de fermentation, le rapport $H_2/2(B+A)$ est juste, avec une valeur proche de 1, donc des conditions optimales de fonctionnement, avec une production très limitée d'acétate par des voies métaboliques non productrices d' H_2 .

A partir de 68 h de fermentation, les concentrations en acides acétique et butyrique atteignent des valeurs importantes supérieures à 60 et 80 mmol/L_{milieu}, respectivement. Ces concentrations sont 6 à 10 fois plus importantes que celles observées dans le RASB en fin de fermentation. Cette observation confirme l'hypothèse selon laquelle la concentration élevée en métabolites est responsable de la baisse de production de gaz dans le milieu réactionnel.

L'inversion des courbes de production de H_2 et CO_2 , vers 120 h, est accompagnée d'une augmentation de la production d'acétate, celle de butyrate restant relativement stable. Le rapport B/A passant de 1,41 à 1,08 entre la seconde et la troisième phase de fermentation de ce test. En revanche, le rapport $H_2/2(B+A)$ ne diminue que très légèrement, restant proche de 1. L'augmentation de la production de CO_2 et d'acétate, ne semble donc pas être due à l'homoacétogénèse (26), qui aurait pour effet de diminuer la production d' H_2 .



D'autres métabolites, le valérate, l'isovalérate, le succinate, sont présents dans le milieu réactionnel en quantités assez faibles, inférieures à 0,15 mmol/L. La production d'éthanol et de lactate, faible pendant les deux premières phases de production, augmente fortement sur la troisième phase

V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)

de fonctionnement, concordant avec l'augmentation de la production de CO_2 , coproduit par leurs voies métaboliques (18) et (19). Contrairement aux résultats observés en mode de fonctionnement RASB, aucune production de propionate n'est observée dans le milieu réactionnel, à l'issue des vingt premières heures de fermentation. L'absence de production de propionate est un point positif important, car celle-ci est consommatrice d'hydrogène (20) et ce métabolite présente un effet inhibiteur sur le métabolisme hydrogénogène [235].



Le bilan carbone de la production est réalisé entre la quantité de matière entrante dans le système (exclusivement du glucose pour ce test) et celle effluant du système. Le calcul est réalisé pour chaque échantillon de biomasse prélevé en sortie du système, une moyenne des résultats obtenus sur les deux dernières phases de fonctionnement est donnée sur la Figure 61. Les résultats obtenus pour le test de fermentation de référence RASB (paragraphe III.E) sont donnés avec une valeur moyenne, en cours de fermentation, entre 6 et 7 h de fonctionnement.

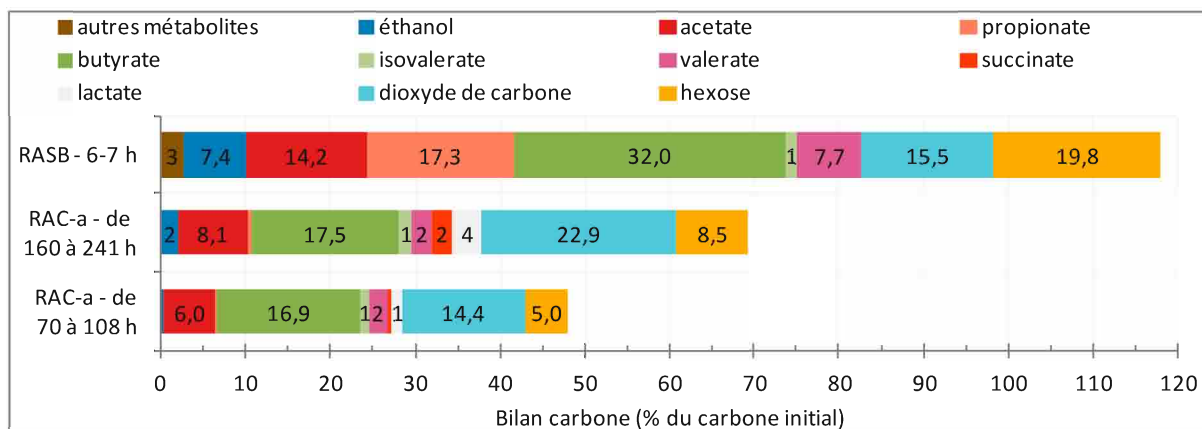


Figure 61. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée

Le faible recouvrement du bilan carbone sur les première et seconde phases de fermentation indique que le système n'a pas atteint pleinement le régime stationnaire, une partie du substrat et des métabolites produits restant dans le milieu réactionnel, après seulement deux renouvellements de celui-ci (à environ 150 h). Sur la troisième phase, une bonne consommation du substrat peut être observée, avec 8,5% du carbone initial restant sous la forme d'hexose. Une différence importante de recouvrement total reste observée entre le RASB (118%) et le RAC (69%). Ceci semble être lié au mode de fonctionnement continu avec un long temps de séjour, permettant une croissance microbienne importante, qui est plus limitée en mode de fonctionnement RASB. La croissance des bactéries, consommant du substrat, n'a pas été pas étudiée ici, mais a pu être observée macroscopiquement dans le milieu réactionnel lors des prélèvements au fur et à mesure du test de fermentation avec une modification visible du culot obtenu par centrifugation du milieu réactionnel (diminution des matières en suspension et apparition d'un culot microbien). La quantité de carbone nécessaire à cette croissance est donc déduite du bilan carbone, ce qui peut expliquer, au moins en partie, les 30% de carbone non recouverts.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Une hypothèse complémentaire consiste en la production de métabolites non identifiés par les méthodes analytiques utilisées dans cette étude, le mode de fonctionnement continu favorisant la production de métabolites différents du mode semibatch. De plus, les matières métabolisables présentent dans les boues activées de la zone anoxie, initialement, deviennent très rapidement négligeables par rapport au débit d'alimentation en substrat, ce qui n'est pas le cas lors du test de fermentation RASB, où ces matières métabolisables impliquent un surplus de carbone initial dans le métabolisme.

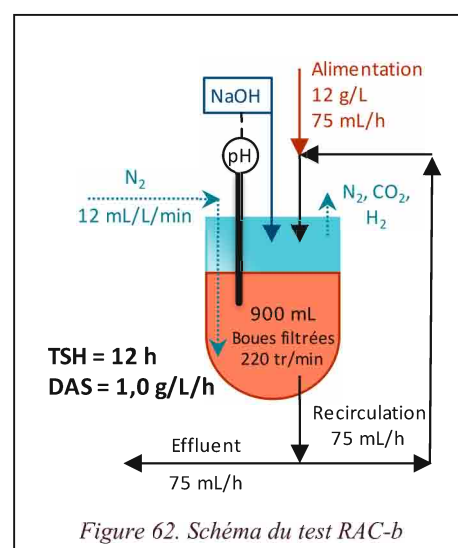
Les proportions de métabolites produits, acétate et butyrate sont assez cohérentes avec celles observées en RASB, compte tenu de la différence de recouvrement total. Les proportions d'éthanol et de valérate sont réduites et celle de propionate est quasi-nulle, alors que ce métabolite représentait une proportion plus importante de carbone que l'acétate dans le RASB. En revanche, les acides succiniques et lactiques n'étaient pas détectés dans le milieu réactionnel au cours du test de fermentation RASB. Une modification importante du métabolisme est donc clairement visible avec la mise en continu du procédé de fermentation obscure.

Les résultats obtenus lors de ce test préliminaire ont montré :

- **une mise en œuvre en continu réussie de la fermentation dans les conditions de fonctionnement optimisées aux chapitres précédents en RASB : consommation quasi-totale de l'hexose avec cependant un rendement et une productivité en hydrogène diminués de moitié par rapport au mode semibatch, ce qui est une tendance conforme à la littérature,**
- **une production en métabolites cohérente pour les majoritaires (acétate et butyrate) avec le fonctionnement en mode discontinu,**
- **des limites des conditions appliquées lors des tests avec en particulier l'absence de dégazage de la solution de substrat induisant une micro-aération de milieu réactionnel potentiellement préjudiciable au maintien des performances et l'accumulation importante de métabolites dans le milieu réactionnel,**
- **des conditions favorables de croissance microbienne permettant le renouvellement continu de bactéries productrices d'hydrogène jusqu'à une durée de 3 fois le temps de séjour hydraulique.**

V.A.2. Test de fermentation RAC-b

Dans l'optique de proposer un système de fonctionnement conforme à la littérature pour le TSH, un test de fermentation a été réalisé avec une configuration utilisant un TSH global de 12 h (augmentation du débit volumique



d'alimentation en solution de substrat) (Figure 62). Pour ce test, noté **RAC-b**, la concentration de la solution d'alimentation a été réduite à 12 g_{hexose}/L contre 50 g_{hexose}/L pour le test RAC-a, afin d'obtenir un DAS d'environ 1 g_{hexose}/L_{milieu}/h et le débit de gaz de balayage (N₂) a été réduit à 12 mL/L_{milieu}/h. La réduction du TSH doit permettre d'augmenter le renouvellement du milieu réactionnel, en limitant

V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)

l'accumulation des métabolites et leur impact potentiellement inhibiteur sur la production d'hydrogène. Le phénomène de microaérobie, pouvant être générée par un apport faible mais continu d'oxygène dissous dans la solution d'alimentation, crée des conditions favorables à l'émergence de voies métaboliques concurrentes. Afin d'éviter l'apport d'oxygène dans le milieu réactionnel, un dégazage continu est réalisé dans le réservoir de substrat.

Le profil de production obtenu pendant le test de fermentation RAC-b (Figure 63) est globalement plus stable que pour le test de fermentation RAC-a, après deux renouvellements du milieu (2 fois le TSH). Les débits de production de H₂ et de CO₂ restent proches pendant toute la fermentation, sans inversion significative, ce qui permet de confirmer l'impact positif des conditions opératoires mises en œuvre.

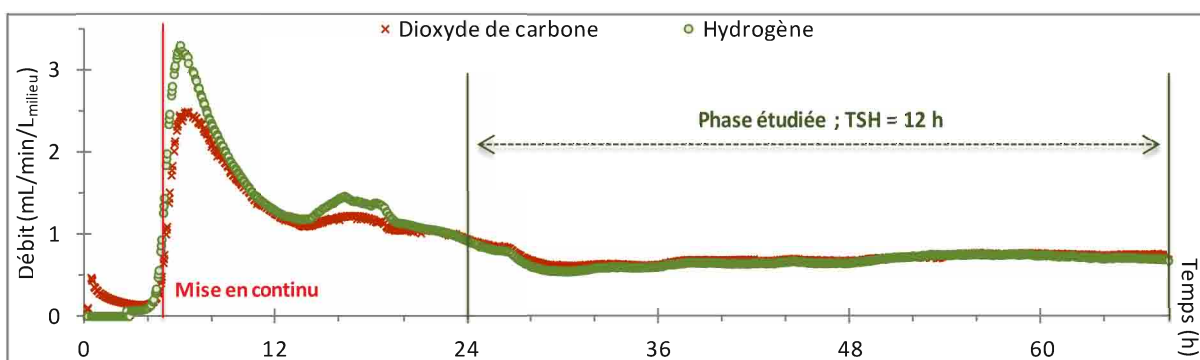


Figure 63. Débits de H₂ et CO₂ en fonction du temps pour le test de fermentation RAC-b

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en RAC (1,5 L) ; volume d'inoculum de 0,9 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose (DAS = 1,0 g_{hexose}/L_{milieu}/h) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 12 mL/min/L_{milieu} ; TSH de 12 h ; taux de recirculation de 1,0

Le Tableau 38 donne les résultats obtenus pour le TSH de 12 h utilisé pour le test RAC-b. Les résultats obtenus pour un TSH de 73 h (test RAC-a) sont également rappelés, ces résultats correspondant à la période finale stable du test (de 160 à 241 h) après établissement du régime stationnaire (après deux TSH comme pour le test RAC-b). Les résultats moyens obtenus pour les tests en mode de fonctionnement RASB (paragraphe III.E) sont donnés pour comparaison.

Tableau 38. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose pour les tests RAC-a et RAC-b sur la phase de production stabilisée après deux TSH, comparées aux résultats obtenus en RASB

Test	phase étudiée	TSH (h)	DAS (g _{hexose} /L _{milieu} /h)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
RAC-b	de 24 à 68 h	12	1,01	0,29	0,80	41	0,96	1,39	0,82	38
RAC-a	de 160 à 241 h	73	0,62	0,89	0,94	72	0,65	1,08	0,91	94
RASB	ensemble du test	/	/	2,10	2,10	263	0,86	1,04	0,66	99

Au cours du test de fermentation RAC-b, le TSH de 12 h permet d'obtenir un rendement de 0,80 mol_{H₂}/mol_{hexose consommé} et une productivité de 41 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. Cependant une part relativement faible de l'hexose ajouté est consommée par la fermentation (38%). Le rapport H₂/CO₂ est bon (0,96).

Comparé au résultat obtenu sur la phase stabilisée du test RAC-a, le rendement en hydrogène par mole d'hexose consommé est similaire, mais la productivité en H₂ est fortement réduite de 72 à 41 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. L'influence majeure du TSH est la diminution de la consommation en hexose, très importante (94%) avec un TSH de 73 h, et réduite à 38% à 12 h. Ceci s'explique par le renouvellement

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

rapide du milieu réactionnel avec un TSH court, la population microbienne initialement présente dans l'*inoculum* microbien est lessivée. Elle n'a pas, en effet, le temps de se développer suffisamment pour consommer la totalité du substrat, ce qui était déjà le cas lors du test RAC-a pour lequel le milieu réactionnel est renouvelé plus lentement (TSH = 73 h).

La réduction du TSH a permis une diminution considérable de la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel (Figure 64), d'un facteur 10 au minimum pour le butyrate, l'acétate et l'éthanol à un TSH de 12 h par rapport à 73 h. Les concentrations en métabolites observées à la sortie du RAC sont alors proches de celles obtenues en cours de fermentation lors du test de référence RASB, à l'exception du propionate qui reste quasi absent et de la quantité importante d'hexose restant dans le milieu réactionnel lors du test en mode continu.

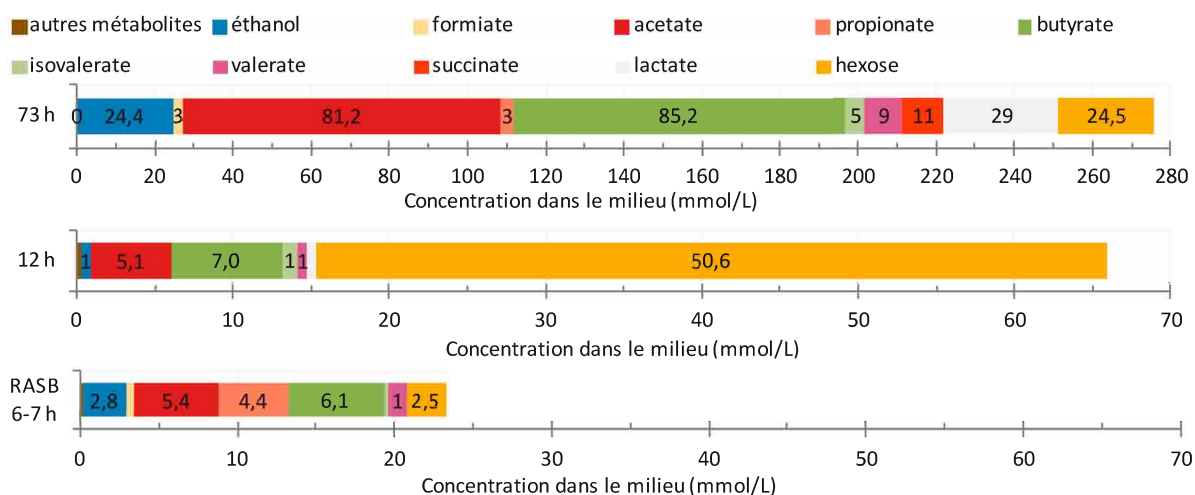


Figure 64. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, en fonction du TSH pour le RAC et pour le test de référence RASB (moyenne à 6-7 h)

L'augmentation du lessivage des microorganismes avec la réduction du TSH est un paramètre important limitant la production d'hydrogène ; la population microbienne étant de moins en moins importante. La réduction du TSH a également permis de limiter l'accumulation de métabolites dans le milieu, limitant ainsi leurs effets inhibiteurs potentiels. Cependant, aucune amélioration significative du rendement en hydrogène n'a pu être observée et une diminution de la consommation en hexose s'est produite, limitant la productivité en hydrogène. Une production stable est cependant rapidement établie, sans inversion des courbes de production de H₂ et de CO₂. De plus, on notera qu'une quantité de substrat trop importante dans le milieu peut avoir un effet inhibiteur sur l'activité microbienne générale [160], ce qui est observé ici avec l'accumulation d'hexose dans le milieu, liée à l'augmentation du débit d'alimentation en substrat.

La Figure 65 présente la production de gaz et de métabolites observés durant ce test de fermentation, comparé au test RAC-a. Une baisse des débits de production de l'ensemble des métabolites est observée lors du passage d'un TSH de 73 h à 12 h, avec -48% pour l'acétate et -33% pour le butyrate, concordant avec les baisses de production d'H₂ et de CO₂. Le lessivage important du milieu réactionnel observé lors du test avec un TSH de 12 h et la saturation du milieu en hexose peuvent être responsables de cette évolution.

V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)

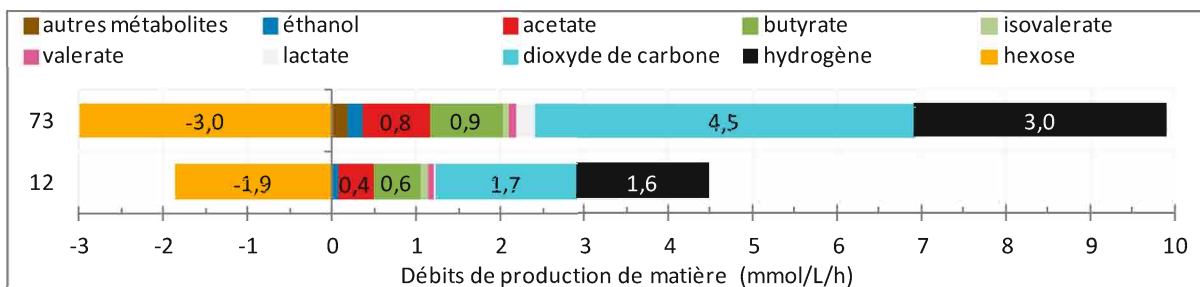


Figure 65. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du RAC, en fonction du TSH

Le rapport B/A le plus important est obtenu pour le test de fermentation RAC-b, avec 1,39, 30% plus élevé que celui obtenu pour le test RAC-a et en mode de fonctionnement RASB, avec respectivement 1,08 et 1,04. Ceci est lié à une augmentation de la production relative de butyrate par rapport celle d'acétate avec le TSH de 12 h (Tableau 38). Le rapport $H_2/2(B+A)$ est équivalent pour les deux modes de fonctionnement continu avec une valeur importante (0,91 et 0,82 respectivement pour les tests RAC-a et RAC-b), supérieure à celle obtenue à la fin du test en mode semibatch (0,66).

Les bilans carbone réalisés pour les tests de fermentation en continu après deux TSH RAC-a, RAC-b et le test RASB sont présentés sur la Figure 66. La répartition finale du carbone introduit par le substrat dans le milieu est très différente pour ces trois configurations. Comme cela a été observé précédemment, le TSH de 12 h présente la quantité de substrat résiduelle la plus élevée (67,1%), non consommé par les microorganismes, ceux-ci étant lessivés en quantité plus importante par le renouvellement plus rapide du milieu que lors du test RAC-a, dont la part de substrat résiduel est de 8,5%. Les principaux métabolites produits restent cependant les mêmes avec le butyrate et l'acétate, à l'exception du propionate, qui n'est pas observé lors des tests de fermentation en continu. On note que le recouvrement global pour le test de fermentation RAC-b est de 83,8%, contre 69,2% pour le test RAC-a, Cette différence pouvant être attribuée au développement microbien dans le milieu réactionnel, favorisé dans le cas d'un TSH élevé.

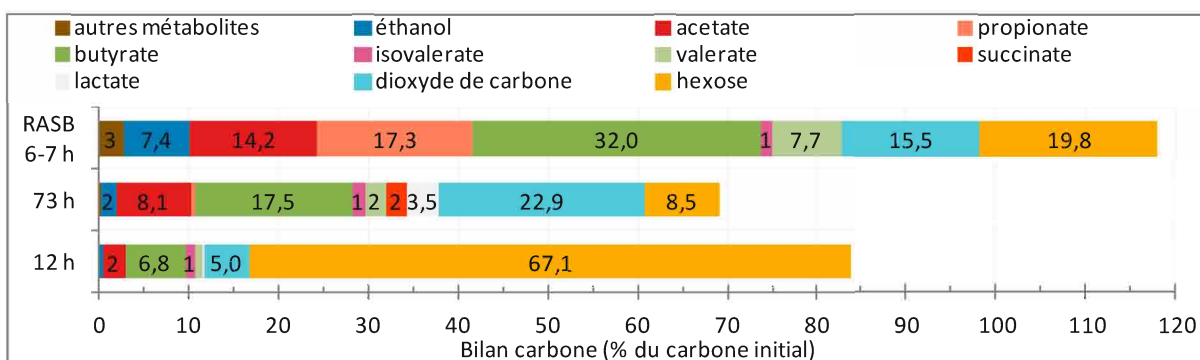


Figure 66. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel en fonction du TSH pour le RAC et pour le test de référence RASB - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée

En conclusion, une production stable de gaz, sans inversion des courbes de production de H_2 de CO_2 , a été établie lors de ce test de fermentation RAC-b après suppression des conditions de microaérobie du substrat et diminution de la concentration des métabolites dans le milieu réactionnel. Des paramètres importants pouvant restreindre l'activité microbienne ont été mis en évidence, en particulier l'augmentation du lessivage des microorganismes avec ce TSH de 12 h. L'utilisation d'un module membranaire avec extraction des gaz in situ et la possible stabilisation

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

du consortium bactérien pourrait dans une certaine mesure réduire cet effet. L'analyse microbiologique du consortium bactérien actif lors des tests de fermentation RAC-a et RAC-b a été réalisée par séquençage haut débit, afin de caractériser la composition de celui-ci et son évolution par rapport à son utilisation en RASB.

V.A.3. Analyse microbiologique – tests RAC-a et RAC-b

Une analyse microbiologique du consortium bactérien présent dans le milieu réactionnel du RAC a été réalisée, pour trois échantillons : avec un TSH de 73 h (RAC-a) à 29 h, soit 0,39 fois le TSH, donc en phase d'acclimatation, et à 241 h de fermentation, soit 3,3 fois le TSH, donc après stabilisation du consortium, comparés à ceux obtenus avec un TSH de 12 h (RAC-b) à 68 h, soit après 5,7 fois le TSH (Tableau 10). Le nombre d'OTU déterminé pour ces trois échantillons semble diminuer avec le nombre de renouvellement du milieu réactionnel subi par le consortium par rapport au nombre d'OTU déterminé pour le test RASB (930 OTU). L'OTU le plus élevé des trois échantillons issus du RAC correspond au RAC-a à 29 h avec 511 OTU et le plus faible correspond au RAC-b à 68 h avec seulement 172 OTU. Ceci confirme le lessivage progressif du consortium bactérien par les renouvellements du milieu, plus important et plus rapide avec un TSH faible. L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux séquences sélectionnées au hasard appartiennent à un même OTU, le maximum de diversité (infini) étant indiqué par une valeur tendant vers zéro, le minimum de diversité par la valeur 1, soit une espèce unique dans le milieu. L'échantillon présentant la diversité la moins élevée est RAC-b à 68 h (0,35). Pour les échantillons du test RAC-a, on observe une augmentation de la diversité bactérienne avec le temps, l'indice de Simpson diminuant de 0,27 à 0,11, de 29 h à 241 h de fermentation, bien que le nombre d'OTU diminue. La population bactérienne à 241 h est donc moins riche en nombre d'espèces différentes, mais avec une répartition plus équilibrée (en nombre de séquences par OTU) qu'à 29 h.

Tableau 39. Paramètres correspondant aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation RAC-a à 29 h et 241 h et RAC-b à 68 h – nombre de TSH écoulé avant échantillonnage, nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Phase du test étudiée	TSH (h)	Nombre de TSH écoulés avant l'échantillonnage	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
RAC-a à 29 h	Phase 1	73	0,39	511	0,27
RAC-a à 241 h	Phase 3	73	3,3	203	0,11
RAC-b à 68 h	Phase 2	12	5,7	172	0,35
RASB à 20 h	fin de fermentation	/	/	930	0,22

La Figure 67 présente la répartition, pour les trois échantillons, des *phyla*, familles et genres principaux. Ces résultats montrent que la majorité du consortium bactérien est composé de bactéries du phylum *Firmicutes*, avec plus de 75% des séquences analysées. Sur la phase de fermentation initiale du TSH de 73 h et avec un TSH de 12 h (phase avancée), le profil du consortium bactérien est très similaire, avec une large majorité de bactéries des genres *Clostridium sensu stricto 1 et 10* (environ 91% des séquences analysées), ce qui explique la moindre diversité de ces échantillons par rapport à celui du RAC-a à 241 h de fermentation. Ces genres ne représentent que 15,4% des séquences analysées, pour l'échantillon du RAC-a à 241 h, les autres genres bactériens majoritairement présents étant *Ruminiclostridium* (17,4%), *Sporolactobacillus* (13,7%) et *Olsenella/Atopobium* (12,7%). Cette diversité

peut potentiellement être liée à la microaération du milieu réaction mais aussi à l'inversion des courbes H₂ et CO₂.

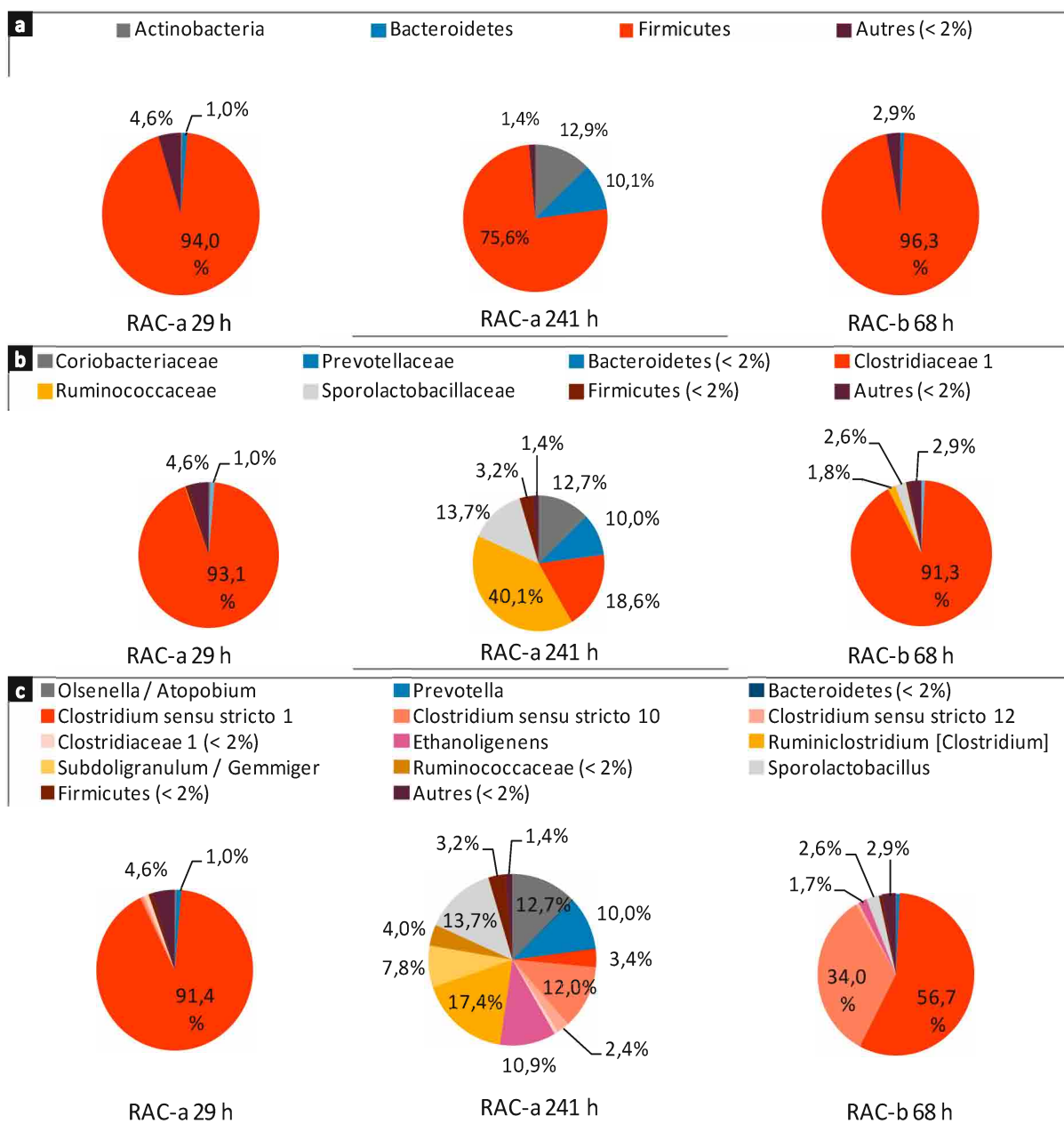


Figure 67. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation de test RAC-a et RAC-b - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

Le Tableau 41 donne les espèces bactériennes principales (abondance > 1%) détectées dans les trois échantillons de biomasse analysés.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 40. Résultats obtenus par séquençage des échantillons de biomasses des tests de fermentation RAC-a et RAC-b - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons

Phylum	Famille	Genre	meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	RAC-a 29 h phase 1 (%)	RAC-a 241 h phase 3 (%)	RAC-b 68 h phase 2 (%)
Actinobacteria	Coriobacteriaceae	<i>Olsenella</i> - <i>Atopobium</i> (genres affiliés)	<i>Olsenella</i> sp. / <i>Atopobium</i> sp.	100	/	0,0	12,7	0,0
Bacteroidetes	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> (100%)	<i>Prevotella paludivivens</i>	< 97	NR_113122	0,0	10,0	0,0
			<i>Clostridium baratii</i>	98	NR_029229	26,9	0,6	3,2
		<i>Clostridium sensu stricto 1</i> (100%)	<i>Clostridium butyricum</i>	99	LN828941	29,2	2,0	52,8
			<i>Clostridium</i> sp.	100	LC020510	33,1	0,8	0,7
	<i>Clostridiaceae 1</i>		<i>Clostridium</i> spp. (<i>carnis</i> / <i>quinii</i>)	99	/	1,8	0,1	0,0
		<i>Clostridium sensu stricto 10</i> (100%)	<i>Clostridium</i> spp. (<i>subterminale</i> / <i>thiosulfatireducens</i> / <i>sulfidigenes</i>)	97	/	0,3	12,0	25,0
			<i>Clostridium subterminale</i>	97	KJ950289	0,0	0,0	9,0
Firmicutes		<i>Clostridium sensu stricto 12</i> (100%)	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	99	LC037226	0,0	1,9	0,0
		<i>Ethanoligenens</i> (100%)	<i>Ethanoligenens harbinense</i> / [<i>Clostridium</i>] sp. <i>Rennanqily3</i> / <i>Linmingia china</i> (genres affiliés)	99	/	0,0	10,9	1,7
		<i>Ruminococcaceae</i> (famille)	<i>Ruminococcaceae</i> (famille)	100	FJ671845	0,0	1,0	0,0
	<i>Ruminococcaceae</i> (100%)	<i>Ruminiclostridium</i> [<i>Clostridium</i>] (100%)	<i>Ruminiclostridium</i> spp. (<i>sporosphaerooides</i> / <i>leptum</i>) [<i>Clostridium</i>]	< 97	/	0,0	16,4	0,0
		<i>Subdoligranulum</i> - <i>Gemmiger</i> (genres affiliés)	<i>Subdoligranulum</i> sp.	100	/	0,0	7,8	0,0
		<i>Acetivibrio</i> (98%)	<i>Acetivibrio</i> sp.	98	KM244774	0,0	1,1	0,0
	<i>Sporolactobacillaceae</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100	NR_112769	0,0	13,5	2,6

V.A. Mise en œuvre du réacteur agité en mode continu (RAC)

Les espèces bactériennes de genre *Clostridium* présentes dans les deux échantillons (RAC-a 29 h et RAC-b 68 h) diffèrent dans leur répartition, avec une part importante, quasi équivalente en abondance relative de *C. butyricum* (29,2%), *C. baratii* (26,9%) et *C. sp.* (n° accession : LC020510) (33,1%) pour le TSH de 73 h (RAC-a 29 h) et une espèce majoritaire (commune aux deux échantillons), *C. butyricum* (52,8%) et une espèce indéterminée *C. (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)* (25,0%) pour le TSH de 12 h (RAC-b 68 h). Cette variabilité peut s'expliquer par l'évolution du consortium en fonction du temps et du renouvellement différent du milieu réactionnel. En effet, l'échantillon du test RAC-a est prélevé à 29 h (soit 0,39 fois le TSH) tandis que le celui du test RAC-b est prélevé à 68 h (soit 5,7 fois le TSH). Sachant que l'espèce majoritairement identifiée lors des tests RASB est *C. baratii* (44,2% à 20 h de fermentation (paragraphe III.E)), celle-ci reste encore importante à 29 h de fermentation, alors que moins de la moitié du milieu réactionnel a été renouvelé. Tandis que dans le cas de l'échantillon utilisant un TSH de 12 h, le prélèvement à 68 h est réalisé après plusieurs renouvellements du milieu réactionnel, les bactéries présentes sont donc les mieux adaptées au mode de fonctionnement continu. L'espèce *C. baratii* semble donc être moins bien adaptée au mode de fonctionnement continu et sa population diminue au fur et à mesure du renouvellement du milieu réactionnel, pour devenir relativement minoritaire (3,2% dans l'échantillon RAC-b à 68 h). En revanche, l'espèce *C. butyricum*, dont la population représentait moins de 10% en mode de fonctionnement RASB, est en évolution dans la phase initiale du RAC-a (29,2%) et devient l'espèce majoritaire après établissement du mode de fonctionnement continu dans l'échantillon du RAC-b (52,8%). Un raisonnement similaire peut être réalisé concernant l'apparition des espèces *C. subterminale* et (*subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes*) et la disparition de l'espèce *C. sp.* (n° accession : LC020510).

L'échantillon obtenu à 241 h de fermentation lors du test de fermentation RAC-a, donc après l'augmentation relative de la production de CO₂ par rapport à celle de H₂, présente une diversité microbiologique plus importante, avec la présence d'espèces issues d'autres *phyla* (*Actinobacteria* et *Bacteroidetes*) en quantité importante (> 10%) et la réduction importante de la proportion des espèces, qui étaient majoritaires dans l'échantillon prélevé à 29 h de fermentation : *Clostridium butyricum* (2%), *Clostridium sp.* (0,8%) et *Clostridium barati* (0,6%). En revanche, d'autres bactéries du genre *Clostridium* ont émergé par rapport à l'échantillon de la phase initiale, en particulier l'espèce indéterminée *Clostridium (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)* dont la représentativité augmente de 0,3 à 12,0%. L'émergence d'autres espèces du phylum *Firmicutes* est également observée, avec des espèces des genres *Ruminiclostridium* (16,4%), *Sporolactobacillus* (13,5%) et *Ethanoligenens* (10,9%).

La présence de certaines espèces dans le milieu de fermentation final (241 h), alors qu'elles étaient non détectables en début de fermentation (29 h), montre l'évolution du consortium bactérien, avec la croissance d'espèces adaptées aux conditions de fonctionnement. Le cas des espèces (anaérobies strictes) *Ethanoligenens harbinense* et *Prevotella paludivivens* dont l'abondance relative augmente de 0% à 29 h, à environ 10% à 241 h est particulièrement intéressant et n'est pas liée à la microaérobie du milieu réactionnel. Ces deux espèces, non sporulantes, sont donc résistantes aux conditions de températures appliquées au système durant le traitement thermique. Le temps nécessaire à la croissance de la population avant d'être détectable peut expliquer qu'elles n'aient pas été observées lors des tests de fermentation RASB et qu'elles soient minoritaires dans le test de fermentation RAC-b. De plus, les conditions optimales de croissance de ces bactéries diffèrent plus fortement des conditions opératoires dans le cas du fonctionnement en RASB, avec une température de 30°C pour *Prevotella paludivivens* [236], et un pH de 4,5 – 5,0 pour *Ethanoligenens harbinense* [237].

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

L'apparition de ces deux espèces *a*, en effet, également été remarquée dans une étude en RAC, avec un TSH de 36 h [151]. *Prevotella paludivivens* est reconnu pour la production de succinate (observé dans le milieu fermentaire) et d'acétate, mais sans coproduction de gaz [236]. L'espèce *Ethanoligenens harbinense* est productrice d'hydrogène, d'acétate et d'éthanol, mais sans production de butyrate [237].

Bien que provenant d'un inoculum microbien identique, les consortia bactériens présents dans les tests de fermentation RAC-a et RAC-b sont différents. Le lessivage du milieu réactionnel par son renouvellement à chaque TSH est un premier paramètre de sélection des microorganismes, en fonction de leur vitesse de croissance, influant fortement sur la population présente ; la richesse bactérienne (nombre d'OTU) diminuant au fur et à mesure du renouvellement du milieu. Les conditions opératoires appliquées dans le RAC sont globalement favorables au phylum Firmicutes, représentant au minimum 75% du total des séquences, mais avec des variations dans la répartition des espèces bactériennes entre les échantillons. Une évolution progressive de la population de Clostridium est observée, C. baratii, majoritaire (44,2%) en mode RASB, diminue en population (26,9%) en phase initiale du test RAC-a, et chute (3,2%) en phase avancée du test RAC-b, C. butyricum suivant un profil inverse, allant de 6,9% dans le RASB à 52,8% en phase avancée du test RAC-b. Une dégradation de la production d'hydrogène observée en phase 3 du test RAC-a, avec inversion des courbes de production de H₂ et de CO₂ est accompagnée au niveau bactérien d'une augmentation de la diversité, avec l'émergence de genres non détectés dans le consortium pendant la phase 1 (Ruminiclostridium, Sporolactobacillus, Ethanoligenens, etc.) pouvant entre autres être expliquée par les conditions déstabilisantes de microaérobie appliquées au milieu et le long temps de séjour favorable aux bactéries ayant une croissance lente.

V.A.4. Bilan du mode de fonctionnement RAC

La mise en œuvre en continu du procédé de fermentation obscure a été réalisée avec succès en mode de fonctionnement RAC, dans les conditions de fonctionnement optimisées aux chapitres précédents en RASB. La première configuration mise en œuvre (RAC-a) avec un long temps de séjour hydraulique a permis d'acclimater efficacement le consortium microbien dans le bioréacteur, sur plus de 240 h, permettant une consommation quasi-totale de l'hexose avec cependant un rendement et une productivité en hydrogène diminués de moitié par rapport au mode semibatch, ce qui est une tendance conforme à la littérature.

Une production en métabolites cohérente pour les majoritaires (acétate et butyrate) avec le fonctionnement en mode discontinu a été observée. Ce test a permis de mettre en lumière certaines limites, en particulier l'absence de dégazage de la solution de substrat induisant une micro-aération de milieu réactionnel potentiellement préjudiciable au maintien des performances et l'accumulation importante de métabolites dans le milieu réactionnel, conduisant à une inversion des courbes de production de H₂ et de CO₂, accompagnée d'une augmentation de la diversité bactérienne et un temps de séjour long finalement peu favorable au développement des bactéries du genre *Clostridium*, qui sont connues pour leurs capacités de production d'hydrogène.

V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

Le temps de séjours hydraulique a ainsi été réduit à 12 h et un système de dégazage du substrat a été mis en place dans une seconde configuration (RAC-b). Une production stable de gaz, sans inversion des courbes de production de H₂ de CO₂, a été établie avec diminution de la concentration des métabolites dans le milieu réactionnel.

L'impact important du lessivage du milieu, s'accroissant avec la diminution du temps de séjour hydraulique, a été mis en évidence avec une forte diminution de la consommation des sucres et la sélection des microorganismes. En effet, la diminution du TSH influe fortement sur la richesse bactérienne (nombre d'OTU) qui diminue au fur et à mesure du renouvellement du milieu mais permet tout de même un maintien d'une population productrice d'H₂. De même qu'en mode de fonctionnement semibatch, le phylum *Firmicutes* est majoritaire dans le *consortium* bactérien en mode continu avec au minimum 75% des séquences identifiées.

L'utilisation d'un module membranaire avec extraction des gaz *in situ* et la possible stabilisation du *consortium* bactérien pourrait dans une certaine mesure réduire le lessivage du *consortium* bactérien, en plus de proposer une surface d'échange gaz/liquide importante, pour évacuer rapidement les gaz produits.

V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

L'utilisation de bioréacteurs membranaires (BRM) ou le couplage de bioréacteurs avec des modules membranaires pour la fermentation obscure s'est développée, depuis le début des années 2000 [150], dans l'objectif d'améliorer la production d'hydrogène. Pour cela, différentes stratégies de mise en œuvre ont été testées, le module membranaire pouvant être utilisé pour augmenter la concentration de matière en suspension (séparation liquide/solide) ou pour améliorer l'extraction des gaz (séparation gaz/liquide).

La séparation liquide/solide est l'utilisation la plus répandue des bioréacteurs membranaires pour la production d'H₂, c'est une méthode de fixation du *consortium* microbien au sein du bioréacteur avec découplage des temps de séjour hydraulique (TSH) et temps de séjour solide (TSS) ; les particules solides, avec le *consortium* microbien, étant conservées dans la calandre. La diminution du TSH peut ainsi être réalisée sans perte de production liée au lessivage du *consortium* avec le liquide extrait, permettant en théorie d'augmenter le potentiel de productivité en H₂. Les modules à fibres creuses qui offrent une surface d'échange très importante sont donc particulièrement adaptés à ce système, qui doit permettre la circulation du liquide tout en limitant le colmatage de la membrane par les matières en suspension [11,13,17].

Seul Shen *et al.* [13,17] placent un module membranaire à fibres creuses directement au sein d'un bioréacteur, permettant un contact direct du milieu fermentaire avec les fibres. Avec des boues digérées comme *inoculum*, alimentées en continu en substrat modèle (0,86 g/L/h de glucose avec nutriments) Shen *et al.* observent un rendement en hydrogène stable à 1,79 mol_{H₂}/mol_{hexose consommé}, et une augmentation de la productivité en hydrogène, de 127 à 198 mL_{H₂}/L_{milieu}/h, lors de la mise en fonction du BRM avec des TSH et TSS découplés (respectivement de 8 h et 24 h) par rapport au même bioréacteur en mode RAC, avec agitation et sans découplage (TSH = 8 h). Cependant ce type de configuration engendre l'accumulation de particules sur la membrane limitant les performances du système sur le long terme. De plus, les substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries dans le milieu réactionnel augmentent considérablement en concentration avec

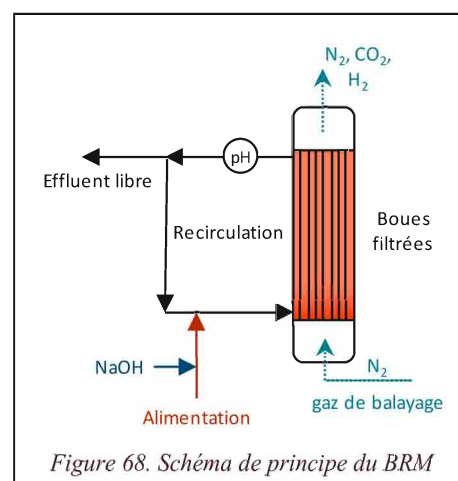
V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

l'augmentation du TSH [12] et produisent un biofilm sur la surface des membranes. La mise en place d'un fonctionnement séquencé alors est nécessaire, avec par exemple une phase d'inversion du flux de liquide (*backpulsing*), voire l'utilisation d'un contre flux réalisé avec le biogaz produit par la fermentation (*backflushing*). L'utilisation d'un barbotage du gaz (produit ou inerte) peut également limiter l'accumulation de particules sur la membrane [13,17] mais sans action réelle sur le biofilm.

Le brevet US 7 083 956 [10] présente une configuration proche de celle décrite précédemment, un module membranaire à fibres creuses étant utilisé comme bioréacteur pour la production d'hydrogène, et les bactéries étant situées dans la calandre dans un biofilm en développement sur les fibres. Le gaz produit ainsi que l'effluent liquide est alors entraîné dans le jour des fibres et évacué. Un décanteur permet ensuite la séparation liquide/solide pour extraire les gaz produits. Il s'agit donc d'un mode d'extraction liquide/liquide, mais le flux de gaz produit est également extrait via les fibres creuses. On notera que ce dispositif est l'adaptation du dispositif brevet US 6 887 692 [238] permettant la production d'hydrogène par photo fermentation d'acides gras volatils au sein de la calandre à parois transparentes ; le gaz et l'effluent liquide étant extraits via le jour des fibres.

Le mode de fonctionnement du BRM en fermentation obscure fondé sur la séparation gaz/liquide est très peu étudié dans la littérature. Pourtant, cette configuration permet de réduire la pression partielle en H_2 à proximité de la membrane, ce qui tend à améliorer la production et à limiter la consommation de ce gaz par les microorganismes hydrogénotrophes, permettant l'augmentation du rendement en hydrogène. L'étude réalisée, en 2010, par Zheng *et al.* [21], sur l'utilisation en mode batch, d'un réacteur scindé en deux parties (liquide au dessus et gaz au dessous) par un disque membranaire (tamis moléculaire CTMSS) a montré la faisabilité de ce mode de fonctionnement, malgré la surface d'échange limitée. L'utilisation d'un module membranaire à fibres creuses, offrant une surface d'échange très importante, est plus adaptée, la fermentation étant réalisée au sein même du module, à proximité de la paroi membranaire. Avec ce type de configuration avec des fibres creuses en silicone, en mode de fonctionnement semibatch, et une extraction transmembranaire par dépression (pression absolue de 108 mbar), Liang *et al.* [22], en 2002, observe une augmentation de 9% du rendement en H_2 par rapport à un réacteur sans membrane (respectivement 0,93 et 0,84 mol H_2 /mol $_{hexose}$). L'utilisation d'un tel procédé en utilisant un mode de fonctionnement continu est pertinent et constitue le cœur de notre travail.

Ainsi, dans notre étude, la configuration gaz/liquide est mise en œuvre, avec l'utilisation d'un module membranaire à fibres creuses, faisant office de bioréacteur membranaire (Figure 68). Le milieu fermentaire est mis en circulation dans la calandre du module, à l'extérieur des fibres creuses. Une extraction non sélective du gaz est alors réalisée via le jour des fibres pour améliorer l'extraction du gaz produit et potentiellement augmenter la production d'hydrogène ; le gaz produit étant ainsi évacué séparément du liquide effluent. Une séparation de type liquide/solide permettant d'éviter le lessivage des matières en suspension avec le renouvellement de la phase liquide est également partiellement réalisé par décantation dans le module membranaire. Ceci est permis par la géométrie du module, présentant un volume mort sous l'arrivée de liquide.



Une séparation de type liquide/solide permettant d'éviter le lessivage des matières en suspension avec le renouvellement de la phase liquide est également partiellement réalisé par décantation dans le module membranaire. Ceci est permis par la géométrie du module, présentant un volume mort sous l'arrivée de liquide.

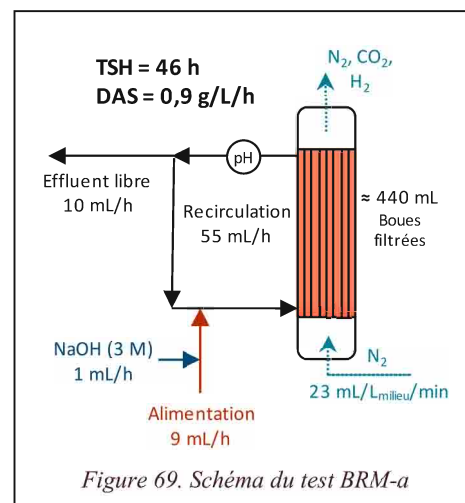
V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

De la même façon que pour le RAC, la mise en fonctionnement du BRM est dans un premier temps réalisée avec un TSH long, assurant l'installation d'un *consortium* microbien. Puis, dans un second temps, une fois la mise en œuvre du module membranaire effectuée, une comparaison avec le mode de fonctionnement RAC sera réalisée avec des paramètres de fonctionnement équivalents. Enfin, une optimisation de la production d'hydrogène sera réalisée, selon différents paramètres. La reproductibilité de nos résultats de fermentation sera testée, et l'utilisation de TSH différents permettra d'optimiser les conditions de fonctionnement du BRM.

De la même façon que pour le RAC, une acclimatation des boues est effectuée en mode RASB, puis une fois le palier de production en hydrogène atteint, une partie des boues acclimatées est transférée vers la calandre du module membranaire, le RAC est séparé de la boucle de recirculation. Le milieu fermentaire est mis en circulation via la boucle de recirculation sur laquelle le pH est mesuré, le substrat et la soude sont ajoutés et le surplus de liquide est extrait (Figure 68). Dans cette configuration sans agitation, l'ajout de soude ne peut pas être réalisé automatiquement par le régulateur de pH, celui-ci est réalisé par une pompe péristaltique dont le débit est manuellement modifié au fur et à mesure du test. Le TSH local de 6 h dans la calandre diffère ainsi dans le temps le contrôle du pH, l'effet de l'action sur la pompe d'alimentation en NaOH n'étant visible sur le pH que 6 h plus tard. Ce TSH local calculé pour la calandre n'est pas à confondre avec le TSH global du système, dont la valeur a été modifiée lors des tests suivants.

V.B.1. Mise en fonctionnement – test préliminaire BRM-a

Un test préliminaire en mode de fonctionnement BRM, appelé **BRM-a** est réalisé avec un TSH de 46 h, utilisant les mêmes débits d'alimentation et de recirculation que pour le test RAC-a dont le TSH était de 73 h, mais avec un volume de milieu réactionnel réduit, avec un volume du BRM d'environ 440 mL (Figure 69). Un DAS de 0,9 g_{hexose}/L_{milieu}/h a été utilisé pour ce test de fermentation. De même que pour le test de fermentation RAC-a, le réservoir de substrat n'a pas été dégazé pendant le test de fermentation.



La configuration initiale utilisée pour le test de fermentation BRM-a comprenait une pompe péristaltique d'extraction du milieu réactionnel excédentaire. Cependant, au cours des premières heures de ce test, des augmentations temporaires de pression ont été observées dans la calandre, suivies d'une chute de pression rapide à 16,5 h (Figure 70). Ce phénomène est dû à une surpression dans la calandre, liée à un déséquilibre entre la quantité de liquide injectée et la quantité de liquide extraite du module. Afin d'éviter ces variations de pression, une dépressurisation manuelle (19,3 h) puis une extraction libre du volume excédentaire du milieu réactionnel a été mise en place à partir de 29 h. Cette modification permet d'éviter les variations rapides des quantités d'hydrogène dues aux montées et chutes de pression dans la calandre, observées entre 14 h et 19,3 h. Il est à noter qu'aucune sortie de boues ni de liquide n'a été observée dans les voies d'extraction de gaz en aval du BRM dans les pièges froids, cela malgré la pression relative assez importante observée, jusqu'à 710 mbar, ce qui atteste du

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

caractère hydrophobe du matériau des fibres, bien adapté à la séparation gaz/liquide dans cette configuration.

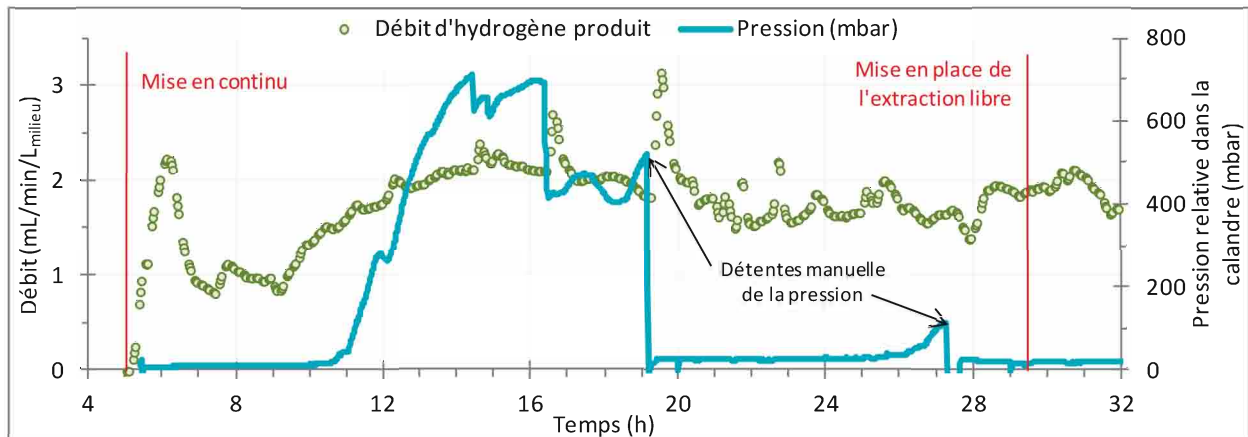


Figure 70. Pression relative dans la calandre du BRM et débit de H₂ pour le test de fermentation BRM-a

La Figure 71 montre l'évolution de la production de H₂ et CO₂ en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-a. Après transfert des boues acclimatées dans la calandre (durée de remplissage d'environ 30 min), la production de gaz reprend dans le BRM, un pic de production est observé avec un débit correct jusqu'à 7 h de fermentation, correspondant à la fin de la phase de production semibatch, utilisant le substrat initialement introduit dans le milieu réactionnel à t₀. Cette production d'hydrogène est suivie d'un ralentissement durant une période de 4 h, ce qui peut s'expliquer par une période d'adaptation du *consortium* au changement de conditions opératoires (alimentation continue, réacteur non agité, extraction transmembranaire des gaz produits, etc.). Après cette période, une phase de production stable est observée avec un rendement en H₂ de 0,77 mol_{H2}/mol_{hexose} ajouté (Tableau 41) ce qui est relativement faible par rapport à la production initiale dans le RAC-a (1,95 mol_{H2}/mol_{hexose} ajouté) pour une durée correspondante à 1 TSH pour chacune des configurations. La productivité en hydrogène obtenue sur la phase initiale est de 97 mL_{H2}/L_{milieu}/h ce qui est 38% plus faible que pour le test RAC-a. Le rapport H₂/CO₂ est bon (1,01) et similaire aux autres tests en mode RAC.

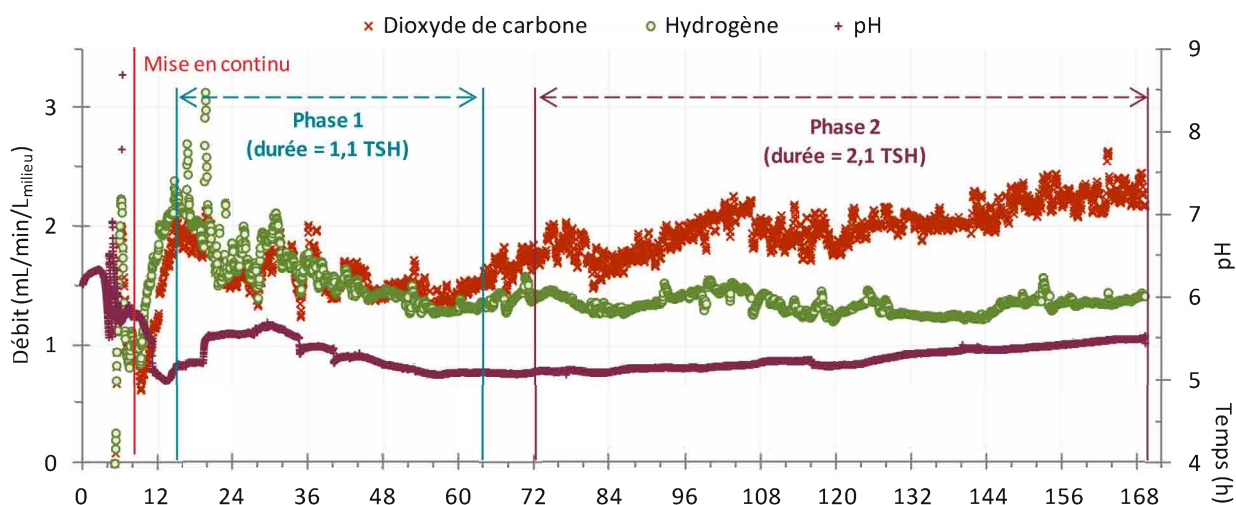


Figure 71. Débits de H_2 et CO_2 et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-a en mode de fonctionnement BRM

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de $38^\circ C$; ajout de glucose ($DAS = 0,9 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $23 \text{ mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$; TSH de 46 h ; taux de recirculation de 5,8

NB : La concentration en hexose en sortie du BRM a été analysée approximativement car l'échantillonnage a été effectué sur la boucle de recirculation, en aval du point d'alimentation, ce qui augmente l'erreur sur les valeurs affichées. L'approximation sur cette mesure impacte les résultats calculés pour les rendements en H_2 par mole d'hexose consommé, et le taux de consommation du substrat. Ces résultats sont identifiés par un astérisque, *, dans les tableaux de résultats.

Tableau 41. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour les tests de fermentation BRM-a et RAC-a

Test	Etape	Phase étudiée	Rendement ($\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ ajouté}$)	Rendement ($\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$)	Productivité ($\text{mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
BRM-a	Phase 1	de 15 à 64 h	0,77	1,28*	97	1,01	1,01*	1,23*	60*
	Phase 2	de 72 à 169 h	0,64	1,41*	81	0,67	0,56*	0,79*	45*
RAC-a	Phase 1	de 7 à 60 h	1,95	1,95	158	1,13	0,99	5,27	100
	Phase 3	de 70 à 108 h	0,89	0,94	72	0,65	1,08	0,91	94

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

Une phase de fermentation stable, beaucoup plus longue, est observée entre 72 h et 169 h de fermentation, avec un rendement en H_2 de $0,64 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ ajouté}$ ce qui est inférieur au rendement obtenu sur la troisième phase de production du test RAC-a ($0,89 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ ajouté}$) pour une durée correspondant à trois fois le TSH pour chacune des configurations. De même, la productivité en hydrogène obtenue pour le BRM-a ($81 \text{ mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$) est supérieure à celle du test RAC-a. Le rapport H_2/CO_2 est équivalent à celui obtenu après inversion des productions d' H_2 et de CO_2 en mode de fonctionnement continu lorsque le dégazage du réservoir de substrat n'est pas utilisé (test de fermentation RAC-a). Le phénomène de microaérobie lié à l'apport d'oxygène via la solution d'alimentation semble donc être la cause de cette augmentation de la production de CO_2 , car indépendant de la configuration du bioréacteur.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Un point important à noter par rapport au profil de fermentation obtenu lors de ce test BRM-a est la quasi-stabilité du débit de production d'hydrogène sur toute la période de production, autour de 1,5 mL_{H₂}/L_{milieu}/min. En revanche, comme observé lors du test RAC-a, le débit de production de CO₂ augmente pendant le test et dépasse celui de H₂, ici à partir de 48 h, ce qui est plus rapide que pour le test RAC-a. Ces observations peuvent donc être corrélées au TSH, supérieur pour le fonctionnement du test RAC-a (73 h) par rapport au fonctionnement de ce test BRM-a (46 h).

Le TSH étant relativement élevé, une accumulation de métabolites a lieu dans le BRM, avec, sur la phase de production stable, des concentrations en acétate, butyrate et éthanol atteignant respectivement 71, 46 et 38 mmol/L_{milieu}, tandis que la concentration en substrat culmine à plus de 100 mmol/L_{milieu} alors que dans la configuration RAC, les concentrations respectives en acétate, butyrate et éthanol sont de 81,2, 85,2 et 24,4 mmol/L_{milieu} et une concentration en hexose de 24,5 mmol/L_{milieu}. L'effet cumulé de la présence de métabolites et plus encore de la concentration élevée en hexose dans le BRM peut expliquer les rendements assez faibles observés.

La valeur obtenue pour le rapport B/A est réduite de 1,01 à 0,56 entre la phase initiale et la phase stabilisée du test de fermentation, ce qui indiquerait une augmentation relative de la production d'hydrogène par la voie acétate, ce qui ne concorde cependant pas avec l'augmentation de la production de dioxyde de carbone. Cette augmentation de la production de CO₂ semble donc liée à l'augmentation de la production d'éthanol dans le BRM par rapport au RAC. Cette augmentation de la production d'acétate semble donc provenir d'une production par homoacétogénèse (26). Rappelons que le débit de gaz de balayage assurant l'extraction des gaz dans le BRM est de 23 mL/L_{milieu}/min alors que pour le RAC-a, un débit de 117 mL/L_{milieu}/min a été utilisé.



Comme pour le test RAC-a, lors du test BRM-a, la valeur du rapport H₂/2(B+A), sur la première phase de fonctionnement, est faussée à cause d'un TSH élevé ne permettant pas d'observer la totalité de l'acétate et du butyrate produit, par rapport à celle d'hydrogène. La valeur obtenue sur la seconde phase de fermentation, en conditions quasi-stationnaires, est de 0,79 (0,91 pour le RAC-a), ce qui indique que le métabolisme est assez bien régulé sur cette période, bien qu'une part non négligeable du butyrate, ou plus probablement de l'acétate est produit par des voies non coproductrices d'hydrogène, ce qui confirme l'hypothèse de la présence d'homoacétogénèse (26) sur cette phase.

L'évolution de la production de métabolites dans le milieu réactionnel (Figure 72) permet de confirmer ces variations. La présence d'une production d'éthanol, plus importante sur la seconde phase de production stabilisée et par rapport à la configuration RAC, permet d'apporter une explication complémentaire à l'augmentation de la production de dioxyde de carbone (18).



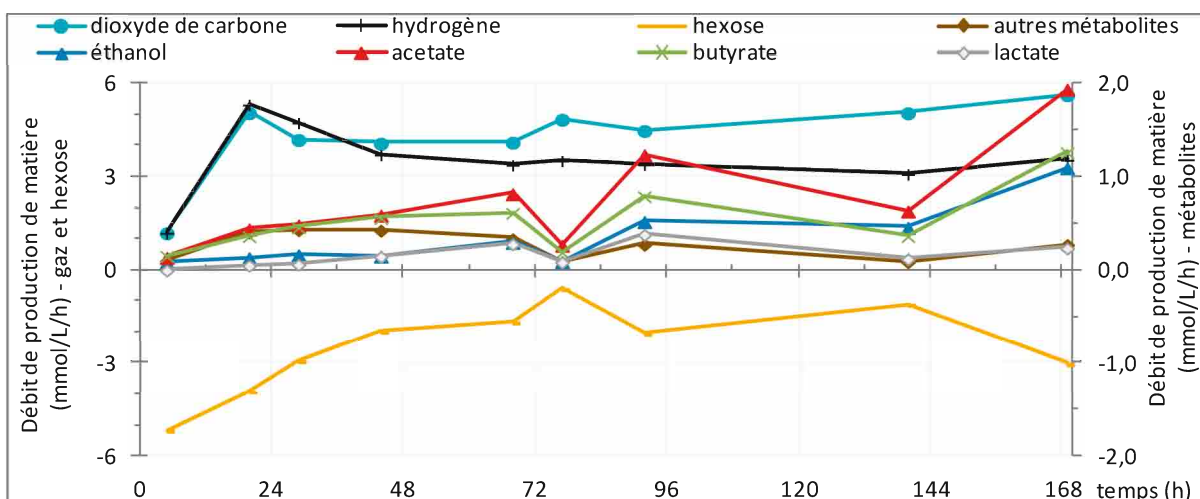


Figure 72. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du système, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-a

NB : La baisse de production de métabolites et de consommation de substrat observée pour l'échantillon prélevé à 77 h est lié à un problème d'alimentation du bioréacteur en solution de substrat sur une période d'environ 12 h. La réduction des débits d'alimentation et d'extraction des liquides ont mathématiquement conduit à une réduction des quantités entrantes et sortantes de produit. La quantité de substrat résiduelle dans le milieu avant la coupure d'alimentation étant importante, la production de gaz n'a pas été impactée significativement. En effet, le substrat résiduel a été consommé par les bactéries conservant une production de métabolites importante, s'accumulant dans le milieu. A la remise en fonctionnement normal, ces métabolites ont été évacués, expliquant la hausse observée pour l'échantillon prélevé à 92 h.

Un bilan carbone a été établi sur la phase de fonctionnement stabilisée (Figure 73), les résultats montrent un bon recouvrement global avec 110% du carbone initial. Le substrat résiduel représente une part très importante de ce bilan (45%). La proportion relative de butyrate par rapport à celle d'acétate est faible par rapport aux résultats observés en mode de fonctionnement RASB ou dans le RAC, pour lesquels environ deux fois plus de butyrate était analysé. L'absence de propionate peut à nouveau être remarquée. Il semble que les voies de production de ce métabolite ne soient pas adaptées au mode de fonctionnement continu, dans la mesure où le métabolisme de production d'hydrogène est efficace. Une quantité non négligeable d'éthanol est à noter, la production de cet alcool étant plus faible lors du test en RAC. Le dépassement de 10% du bilan carbone peut être attribué à l'erreur sur l'estimation de la concentration en substrat dans le milieu fermentaire.

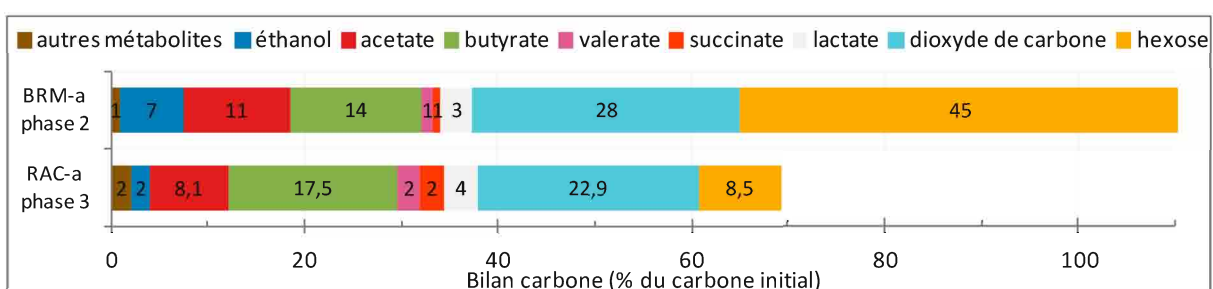


Figure 73. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel – moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée

A durée de fonctionnement, en temps de séjours, équivalents, on peut conclure que la configuration du BRM n'apporte visiblement pas un bénéfice notable pour la production d'hydrogène, toute proportion gardée liée à la différence de TSH utilisé. En revanche, la configuration du BRM présente l'avantage de maintenir les microorganismes dans la calandre, limitant ainsi le lessivage et la perte de performance avec l'avancée du test de fermentation,

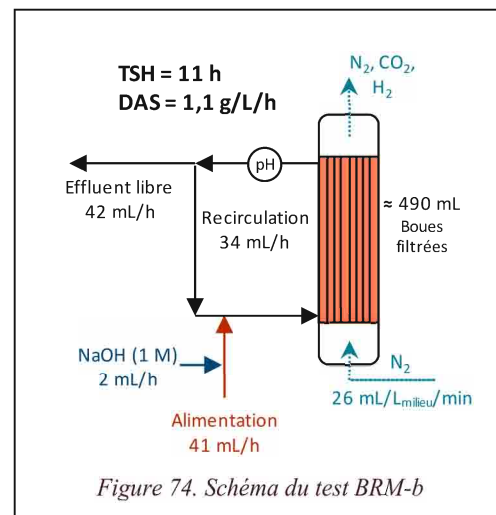
V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

une plus forte réduction du temps de séjours hydraulique est ainsi envisageable. La mise en place d'un dégazage continu du réservoir d'alimentation et le test de différents TSH ont été réalisés à la suite de cette étude pour permettre d'améliorer le rendement et la productivité en hydrogène de ce mode de fonctionnement sur de plus longues périodes.

V.B.2. Amélioration du fonctionnement – test BRM-b

Dans l'optique de faire une comparaison des deux types de bioréacteur et dans la dynamique d'améliorer les résultats de production en hydrogène, la configuration du BRM a été adaptée à un TSH global de 12 h, réalisée par l'augmentation du débit de la pompe d'alimentation en solution de substrat avec réduction de la concentration de celle-ci de 50 à 12 g_{hexose}/L, afin d'obtenir un DAS (1,1 g_{hexose}/L_{milieu}/h) équivalent à celui du BRM-a (Figure 74). La réduction du TSH doit permettre une amélioration du renouvellement du milieu réactionnel, en limitant l'accumulation des métabolites produits par la fermentation et leur impact potentiellement inhibiteur sur la production d'hydrogène. La mise en place d'un taux de recirculation de 1 est également réalisée, avec l'utilisation d'un débit de liquide identique pour l'alimentation en substrat et la recirculation du milieu réactionnel. Ce test, noté **BRM-b**, pourra directement être comparé au test RAC-b, réalisé dans les mêmes conditions de TSH et de DAS.

Contrairement au RAC, pour lequel la réduction du TSH provoque un lessivage du *consortium* microbien non fixé, la configuration verticale du BRM, sans agitation, permet aux matières en suspension de sédimenter en partie dans la partie inférieure de la calandre (volume mort équivalent à 50 mL), sous l'arrivée du liquide, sans être évacuées vers la sortie d'effluent, ni lavées par le renouvellement du milieu. De plus, le développement microbien sur la paroi des fibres membranaires permet potentiellement l'établissement d'un biofilm stable. Afin d'éviter la microaérobie due à l'apport d'oxygène dans le milieu réactionnel, créant des conditions favorables à l'émergence de voies métaboliques concurrentes, un dégazage continu est réalisé dans le réservoir d'alimentation. L'accumulation de la biomasse, et son vieillissement, peut cependant s'avérer favorable à l'activité des bactéries homoacétogènes [71,108], pouvant très fortement réduire la production d'hydrogène. La réduction du temps de séjour pourrait dans ce cas permettre une évacuation plus importante des matières en suspension dans le système, qui s'y accumuleraient moins. Les microorganismes se développant dans le milieu fermentaire seraient également évacués limitant le vieillissement du *consortium*.



V.B.2.1. Comparaison des modes de fonctionnements RAC et BRM

Une conduite de fermentation avec l'utilisation de différents TSH successif (11 h, 17 h et 20 h) est utilisée et comparée à la même conduite réalisée dans le test RAC-b (résultats non présentés précédemment). Le paragraphe présent consiste en une évaluation du procédé membranaire comparé au RAC pour une production efficiente d'hydrogène. La Figure 75 montre le profil de

production de H₂ et de CO₂ en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-b et RAC-b pour différents TSH. Une stabilité importante de la production de gaz peut être observée, avec un rapport H₂/CO₂ restant supérieur à 1, sans inversion des courbes de production, après plus de 250 h de fonctionnement. On remarque également un débit d'hydrogène produit par litre de milieu réactionnel au moins trois fois plus élevé pour le mode BRM que pour le mode RAC ; ceci est remarquable et met en évidence le bénéfice d'un tel réacteur.

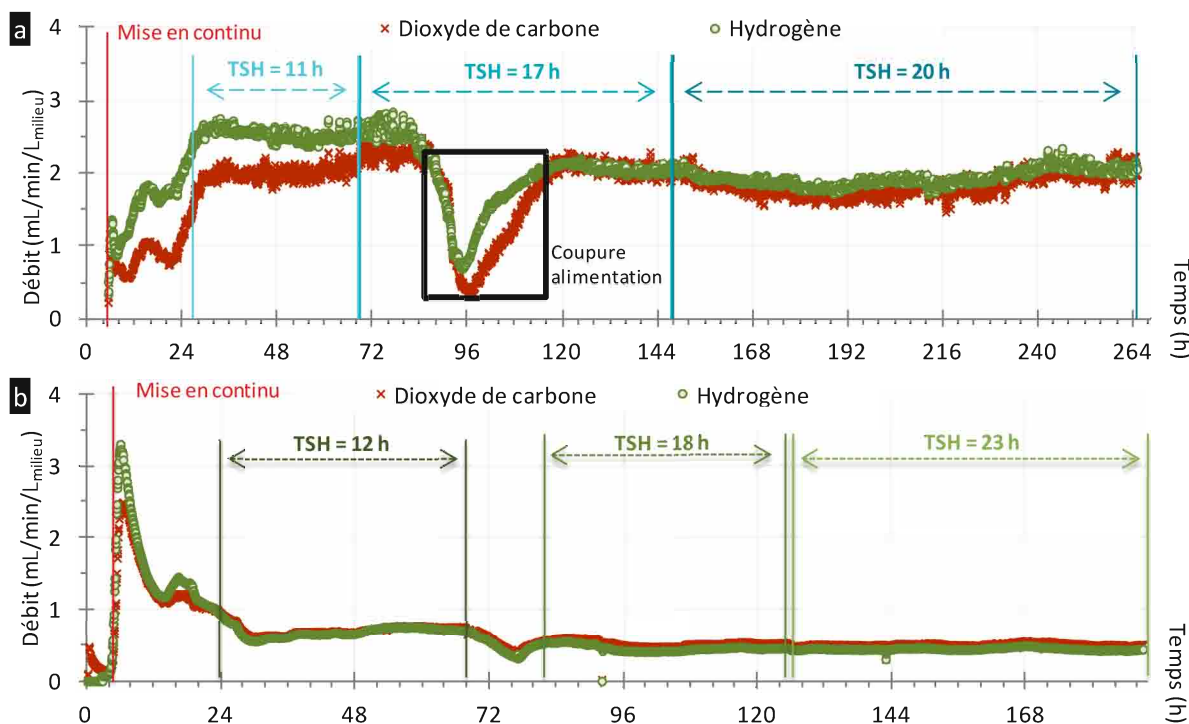


Figure 75. Débits de H₂ et CO₂ en fonction du temps pour les tests de fermentation BRM-b (a) et RAC-b (b)

BRM-b : Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 1,1 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 27 mL/L_{milieu}/min ; taux de recirculation de 0,8 ; TSH de 11 h, ensuite augmenté à 17 h puis 20 h

RAC-b : Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en RAC (1,5 L) ; volume d'inoculum de 0,9 L ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 1,0 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 12 mL/min/L_{milieu} ; taux de recirculation de 1,0 ; TSH de 12 h, ensuite augmenté à 18 h puis 23 h

NB : Une coupure de l'alimentation inopinée en substrat, pour le BRM, a eu lieu vers 82 h pendant environ 10 h. La reprise de l'alimentation a été accompagnée d'une reprise rapide de la production de gaz. Les résultats exprimés pour la zone de fermentation avec un TSH de 17 h correspondent à la moyenne des résultats obtenus avant et après la coupure (la partie dans le cadre noir sur la Figure 75 n'a pas été prise en compte dans les moyennes).

La comparaison plus fine des résultats de production obtenus avec les tests de fermentation RAC-b et BRM-b est réalisé dans le Tableau 42 pour des TSH d'environ 12 h et 18 h. Une amélioration importante de la production d'hydrogène peut être observée avec l'utilisation du BRM, avec une augmentation de 126% du rendement en hydrogène et une productivité en hydrogène multipliée par trois à un TSH équivalent de ≈ 12 h. De manière similaire, le passage à un TSH de ≈ 18 h met en évidence une forte augmentation du rendement (+ 118%) et une multiplication par quatre de la productivité en hydrogène par rapport au test RAC-b. On notera que le débit d'alimentation massique de substrat (DAS) par litre de milieu réactionnel est le même ($1 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) pour les deux configurations, rendant plus significatives les hausses importantes de production et de productivité en hydrogène pour la configuration BRM.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 42. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose en fonction du mode de fonctionnement RAC et BRM pour deux TSH (≈ 12 h et ≈ 18 h)

Test	TSH (h)	Rendement (mol_{H_2}/mol hexose ajouté)	Rendement (mol_{H_2}/mol hexose consommé)	Productivité ($mL_{H_2}/L_{milieu}/h$)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
RAC-b	12	0,29	0,80	41	0,96	1,39	0,82	38
BRM-b	11	1,09	1,81	153	1,27	1,03	1,03	60
RAC-b	18	0,20	0,66	27	0,88	1,00	1,01	32
BRM-b	17	0,97	1,43	135	1,04	0,79	0,96	72

Une amélioration significative (> 19%) du rapport H_2/CO_2 est également observée. Le substrat introduit dans le bioréacteur est plus consommé dans le cas du BRM, avec 60% contre 38% pour le RAC à un TSH de 12 h, phénomène amplifié avec l'augmentation du TSH. Cette augmentation est directement liée à l'augmentation de la productivité en hydrogène. Les bactéries s'étant probablement développées en partie sur la paroi externe des fibres creuses et le lessivage du milieu réactionnel étant réduit par la configuration du BRM. Une concentration en bactéries plus importante peut être supposée, permettant une métabolisation plus importante du substrat introduit dans le milieu réactionnel.

Le rapport molaire B/A est inférieur pour le test en BRM par rapport au test en RAC, ce qui indique que le mode de fonctionnement BRM est relativement plus favorable à la production d'acétate qu'à celle du butyrate. Dans les deux cas, une augmentation globale de la production de métabolites est attendue, la production d'hydrogène étant bien plus élevée. Le rapport $H_2/2(B+A)$ reste relativement bon (proche de 1), à un TSH de 11 h, pour le BRM par rapport au RAC (1,03 contre 0,82), tandis qu'il reste stable pour le TSH de 17 h autour de 1. Les valeurs obtenues pour ces rapports $H_2/2(B+A)$ étant toutes caractéristiques d'une production efficace d'hydrogène.

La Figure 76 présente la concentration en métabolites présents sur la voie de recirculation au cours des tests de fermentation RAC-b et BRM-b pour les deux premiers TSH testés. Une baisse de 44% et de 68% de la quantité d'hexose dans le milieu est observée lors de l'utilisation du BRM par rapport au RAC, respectivement pour les TSH de 12 et 18 h. Ceci met en évidence, pour un même DAS et TSH, une meilleure conversion du substrat introduit dans le milieu, permettant de la même façon une production de métabolites plus importante. Les concentrations en acétate et butyrate sont alors respectivement 3,3 et 2,5 fois plus élevées pour un TSH de 12 h dans le BRM par rapport au RAC et 4,5 et 3,5 fois plus élevées pour un TSH d'environ 18 h.

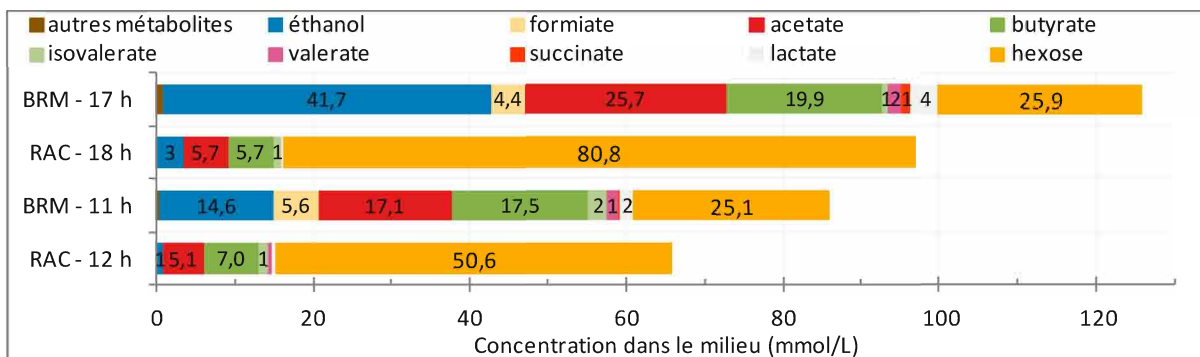


Figure 76. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, en fonction du TSH pour les tests RAC-b et le BRM-b

Une concentration en éthanol plus importante est relevée dans le BRM avec 14,6 mmol/L à un TSH de 11 h alors que dans le RAC, elle ne dépasse pas 1 mmol/L. On remarque également en proportion une quantité produite d'éthanol plus élevée dans le BRM lorsque l'on augmente le TSH à 17 h. Cette surproduction d'éthanol (18) peut expliquer en partie la baisse de rendement et de productivité dans le BRM à un TSH de 17 h par rapport au TSH de 11 h, avec un impact sur le rapport H₂/CO₂. La présence de formiate en quantité notable est également à noter, la voie de production de ce métabolite étant coproductrice d'hydrogène (25).



La Figure 77 permet d'observer clairement les flux de produits dans le système, de la consommation du substrat, à la production de gaz et de métabolites, les résultats moyens étant donnés pour chaque phase étudiée. L'importante production d'hydrogène est à nouveau confirmée, accompagnée de celle de dioxyde de carbone ; l'augmentation associée de la production d'acétate et de butyrate étant également observée. Lors de l'augmentation du TSH de 11 à 17 h dans le BRM, la production d'acétate reste stable, tandis que celle de butyrate diminue. Ceci confirme l'évolution du rapport B/A, et l'amélioration du rapport H₂/CO₂ avec l'utilisation du BRM. En revanche, une production importante d'éthanol est observée lors de l'utilisation du BRM favorisant la production de CO₂.

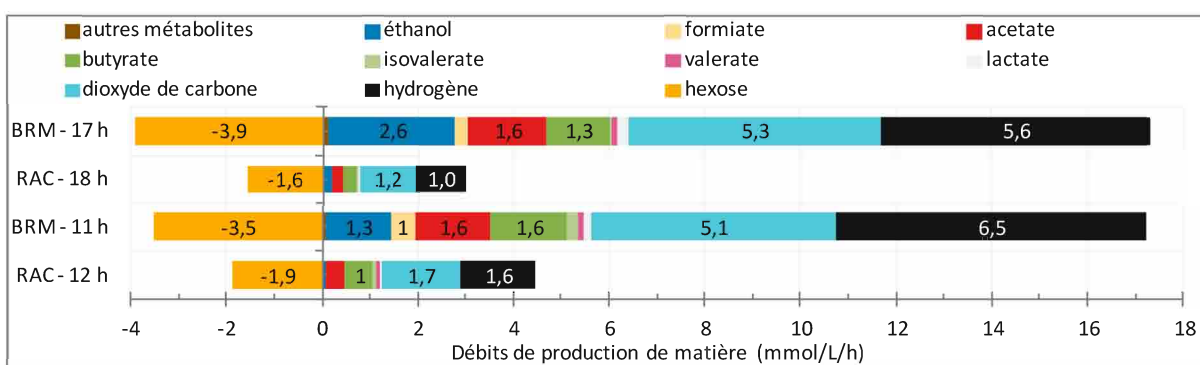


Figure 77. Valeurs de production des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, en fonction du TSH pour les tests RAC-b et le BRM-b

La consommation en substrat étant améliorée lors de l'utilisation du BRM par rapport au RAC, le bilan carbone s'en trouve impacté (Figure 78). La quantité de substrat résiduelle passe d'environ 68% du carbone total à environ 35%. Le recouvrement total du bilan carbone qui était d'environ 80% dans le RAC, est augmenté à 95%.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

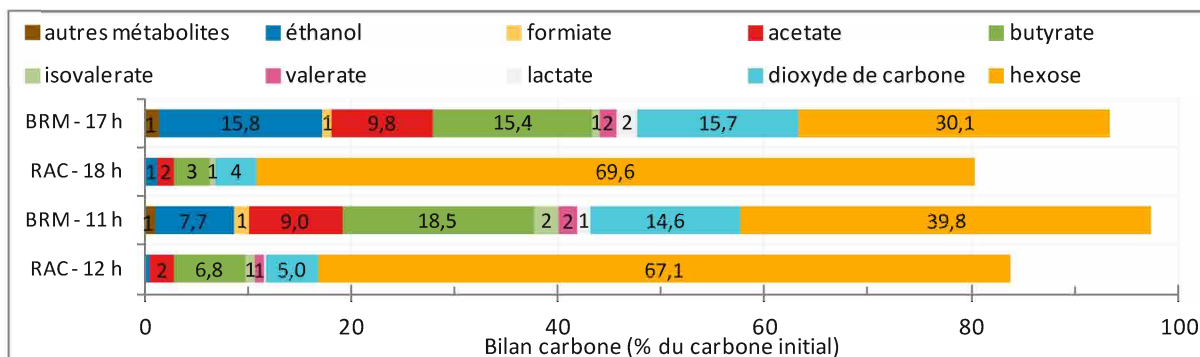


Figure 78. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne sur les échantillons réalisés dans le bioréacteur sur la phase considérée

Une première hypothèse expliquant le meilleur recouvrement du bilan carbone dans le BRM, est lié à une plus faible croissance microbienne puisqu'avec l'utilisation du BRM, le lessivage des matières en suspension présentes dans le milieu réactionnel est limité alors que pour le fonctionnement en RAC, la production en hydrogène est conditionnée par une croissance microbienne nécessaire pour limiter le phénomène de lessivage. La quantité de substrat nécessaire au renouvellement de la population microbienne est donc limitée dans le BRM. Enfin, une seconde hypothèse, est qu'un métabolisme différent ait lieu dans le RAC, conduisant à la production de métabolites non détectés et quantifiés, expliquant une partie du déficit dans le bilan carbone du RAC, ces métabolites n'étant pas produits dans le BRM.

Ces résultats de production sont très encourageants en ce qui concerne l'utilisation du BRM. Avec des paramètres de fonctionnement identiques (substrat, TSH, DAS, taux de recirculation) les résultats ont montré la supériorité du BRM par rapport au mode de fonctionnement RAC. Avec des TSH de 12 h ou de 18 h, de fortes améliorations du rendement (> 90%) et de la productivité (> 300%) en hydrogène ont été constatées. Une meilleure stabilité de la production d'hydrogène est observée dans le BRM par rapport au RAC. La production de métabolites et la consommation en substrat sont supérieures dans le cas du BRM, permettant un recouvrement de 95% du bilan carbone, suggérant un environnement adapté au métabolisme microbien. La suite de ce chapitre a pour sujet la confirmation de ces résultats et l'optimisation de ce nouveau mode de fonctionnement.

V.B.2.2. Reproductibilité des résultats en mode de fonctionnement BRM

Trois tests de fermentation en mode de fonctionnement BRM ont été réalisés afin d'évaluer la reproductibilité des résultats de production de gaz : **BRM-b**, **BRM-c** et **BRM-d**. Ces tests seront utilisés comme point de référence pour l'étude d'optimisation. Un TSH de 12 h et un DAS de 1 g/L/h sont utilisés (Figure 79).

Les profils de production d'hydrogène pour ces trois tests sont présentés sur la Figure 80. Sur les trois profils, une

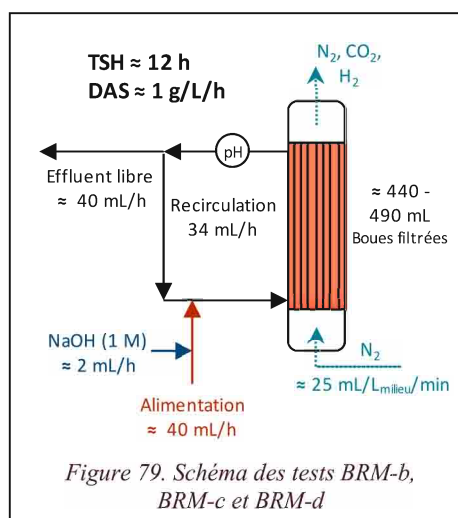


Figure 79. Schéma des tests BRM-b, BRM-c et BRM-d

V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

évolution similaire peut être observée, en particulier pour les tests BRM-b et BRM-d, le test BRM-c ayant un débit de production plus faible. Il est à souligner que l'*inoculum* externe, issu des boues activées de la zone anoxie correspond à un nouvel échantillon prélevé sur la station d'épuration pour chacune des trois expériences.

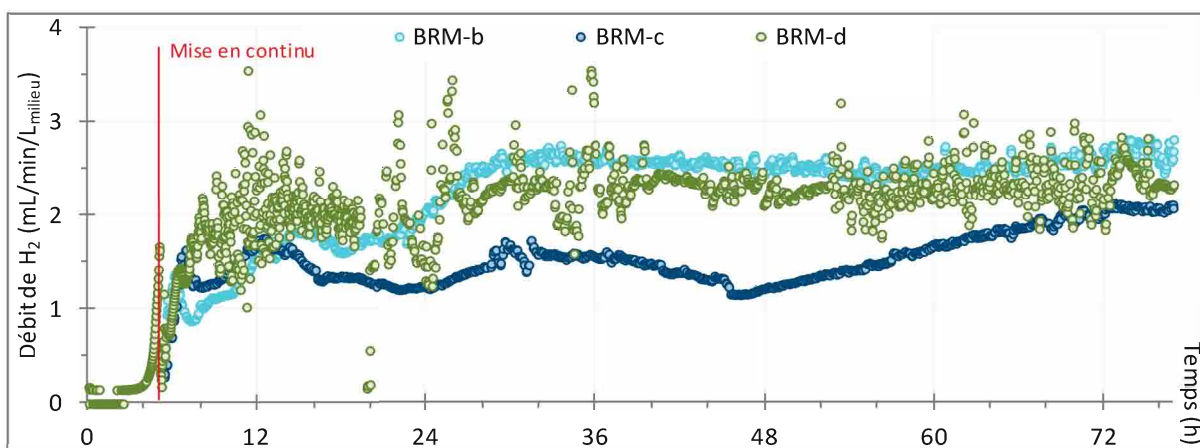


Figure 80. Débits de H₂ en fonction du temps pour les tests de fermentation BRM-b, BRM-c et BRM-d

Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose (DAS = $1,0 \pm 0,1$ g_{hexose}/L_{milieu}/h) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 25 ± 3 mL/L_{milieu}/min ; taux de recirculation de $0,9 \pm 0,1$; TSH de $11,6 \pm 0,9$ h

Les résultats de production obtenus pour ces trois tests sont regroupés dans le Tableau 43. Un rendement en hydrogène moyen de $1,0 \pm 0,2$ mol_{H₂}/mol_{hexose} ajouté est calculé, le test de fermentation BRM-c étant majoritairement responsable de l'erreur de 20% sur la valeur. La productivité en hydrogène moyenne est de 128 ± 31 mL_{H₂}/L_{milieu}/h, toujours très supérieure à la productivité du test de fermentation en réacteur agité continu, RAC-b (47 mL_{H₂}/L_{milieu}/h). Le rapport H₂/CO₂ est de $1,2 \pm 0,1$ et correspond à une valeur élevée et reproductible sur les différents tests réalisés.

Tableau 43. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose pour trois tests de référence en mode de fonctionnement BRM

	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H₂} / L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ / 2(B+A)	Hexose consommé (%)
BRM-b	1,1	1,8	153	1,3	1,0	1,03	60
BRM-c	0,7	1,1*	94	1,2	1,1*	1,03*	68*
BRM-d	1,1	1,8*	139	1,1	0,8*	0,96*	59*
Moyenne	$1,0 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,4^*$	128 ± 31	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2^*$	$1,01 \pm 0,04^*$	$63 \pm 5^*$

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

Les concentrations en hexose des deux tests de fonctionnement BRM-c et BRM-d sont approximatives, pour la même raison que pour le test BRM-a (localisation de l'échantillonnage en aval du point d'alimentation). Les résultats calculés pour les rendements en H₂ par mole d'hexose consommé et le taux de consommation du substrat sont donc impactés (valeurs identifiées par des astérisques, *). La consommation moyenne en hexose dans le BRM étant relativement élevée (63%), le rendement en hydrogène par mole d'hexose consommé moyen est 72% plus élevé que celui obtenu avec le RAC ($1,6 \pm 0,4$ mol_{H₂}/mol_{hexose} consommé) (paragraphe V.A).

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Une bonne reproductibilité des résultats est obtenue sur les rapports B/A et $H_2/2(B+A)$ avec moins de 20% d'erreur. La valeur moyenne du rapport B/A est autour de 1,0, ce qui est sensiblement équivalent à celle observée lors des tests de fermentation de référence RASB (paragraphe III.E). Un rapport moyen $H_2/2(B+A)$ de 1,0 est également observé, ce qui correspond donc, théoriquement, à l'utilisation quasi-exclusive des voies métaboliques (16) et (17) pour la production d'acétate et de butyrate, avec coproduction d'hydrogène.



Une concentration de métabolites assez importante dans le milieu est mesurée, avec une concentration d'acétate de 17,2 mmol/L_{milieu} et de butyrate de 16,3 mmol/L_{milieu}, ainsi que d'éthanol avec 15,1 mmol/L_{milieu}. Une bonne reproductibilité de la composition du milieu est observée entre les réplicats, l'erreur sur la concentration globale dans le milieu ne dépassant pas les 15%.

Les variations de concentrations observées dans le BRM sont assez stables d'un réplicat à l'autre (Figure 81). L'importance de la production d'acétate (1,4 mmol/L_{milieu}/h), de butyrate (1,4 mmol/L_{milieu}/h), et d'éthanol (1,3 mmol/L_{milieu}/h), peut être observée. A l'instar de la production d'hydrogène, une plus faible production de métabolites est observée pour le test BRM-c, bien que la consommation de substrat soit similaire. Une production non négligeable et reproductible de formiate et de lactate est observée, avec des débits de production de l'ordre de 0,3 mmol/L_{milieu}/h.

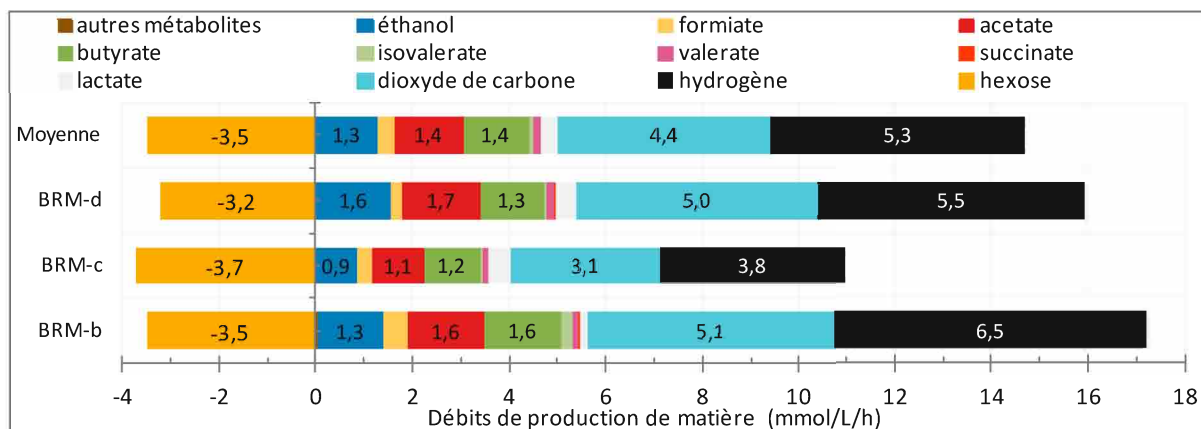


Figure 81. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, pour les tests BRM-b, BRM-c, BRM-d

Concernant le calcul du bilan carbone pour ces trois réplicats, un très bon recouvrement du carbone initial est observé (Figure 82), à l'exception du test BRM-c, dont une part assez importante de ce carbone n'est pas recouvert ; 25% des atomes de carbone introduit dans le milieu (par l'ajout de glucose) n'étant par retrouvé dans le liquide et le gaz extrait du bioréacteur. La part de substrat non consommé est importante, avec 37% de la quantité de matière du carbone initial pour la moyenne des tests. Le métabolite principal est le butyrate (16,3%), suivi de l'acétate (8,6%) et de l'éthanol (7,5%). Bien que cette molécule ne comporte qu'un seul atome de carbone, le dioxyde de carbone, produit en quantité importante, représente 13% du recouvrement moyen du carbone initial.

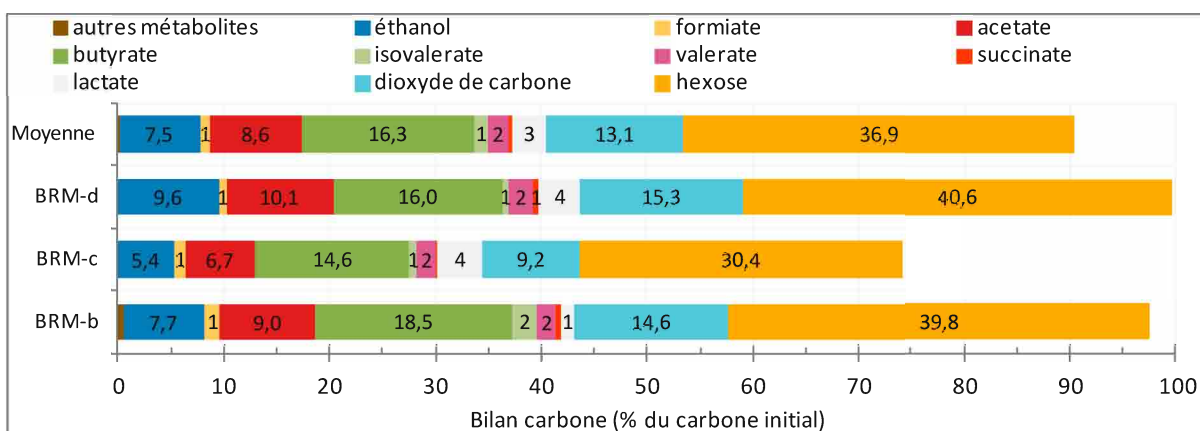


Figure 82. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée

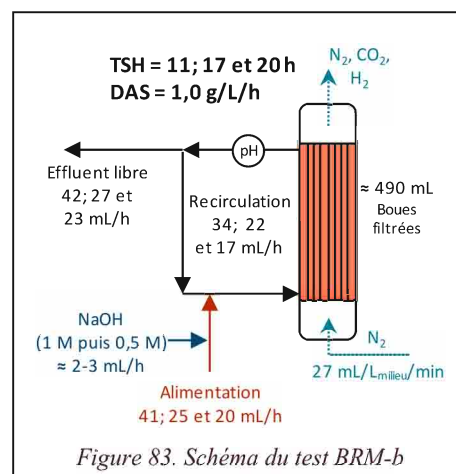
L'ensemble de ces résultats montre la reproductibilité relative des tests de fermentation réalisés, tant au niveau de la production totale que des débits de production d'hydrogène et des métabolites. Une certaine sensibilité est notée, sans doute liée à certains paramètres de fonctionnement comme le pH, dont la régulation n'est pas automatisée et directement liée à la performance de production en cours dans le bioréacteur. La moyenne obtenue pour ces trois répliquats est utilisée comme base de comparaison pour les tests réalisés par la suite sur le mode de fonctionnement du BRM.

V.B.2.3. Modification du temps de séjour hydraulique et récapitulatif

Le TSH est un paramètre majeur de la fermentation en mode de fonctionnement continu. La littérature montre une variabilité importante de résultats pour un temps de séjour hydraulique optimal, allant de 38 h [151] à 1 h, voire 0,5 h [152], en fonction du paramètre de performance considéré. Dans la plupart des études d'impact du TSH, la valeur du DAS augmente lorsque le TSH est réduit, car la concentration de la solution d'alimentation reste fixe. Ce point est différent des paramètres utilisés dans cette étude, pour laquelle il a été décidé de conserver un DAS fixe, afin de n'observer que l'impact du TSH, et non un impact conjugué de l'évolution ces deux paramètres.

En effet, lors de la réduction du TSH de moitié, la multiplication de la valeur du DAS par deux a un impact important sur le métabolisme, qui peut être inhibé par un surplus de substrat [154], ou au contraire permettre une amélioration importante de la productivité grâce à l'apport de substrat plus important, mais avec une réduction du rendement [11]. Horiuchi *et al.* [155] ont démontré que le pH du milieu réactionnel jouait un rôle important, en modifiant le TSH optimal du procédé, leur étude a de plus montré qu'une réduction trop importante du TSH lessivait le consortium microbien et donc limitait la production d'hydrogène, en mode de fonctionnement RAC.

Comme montré précédemment, une gamme assez large de TSH a été étudiée, allant de 11 h à 46 h, en conservant le DAS à une valeur proche de 1 $\text{g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$. Le test de fermentation BRM-b est étudié ici du point de vue de l'impact du TSH, modifié graduellement de 11 h à 17 h puis 20 h (Figure



V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

83). La durée d'observation du système est d'au moins trois fois le TSH appliqué, afin de pouvoir observer la stabilisation de la production de gaz. Une stabilité importante de la production de gaz peut être observée, avec un rapport H_2/CO_2 restant supérieur à 1 sur l'ensemble du test. Une légère baisse du débit de production de H_2 et de CO_2 est observée lors de l'augmentation du TSH global de 11 h à 17 h puis 20 h (Figure 84).

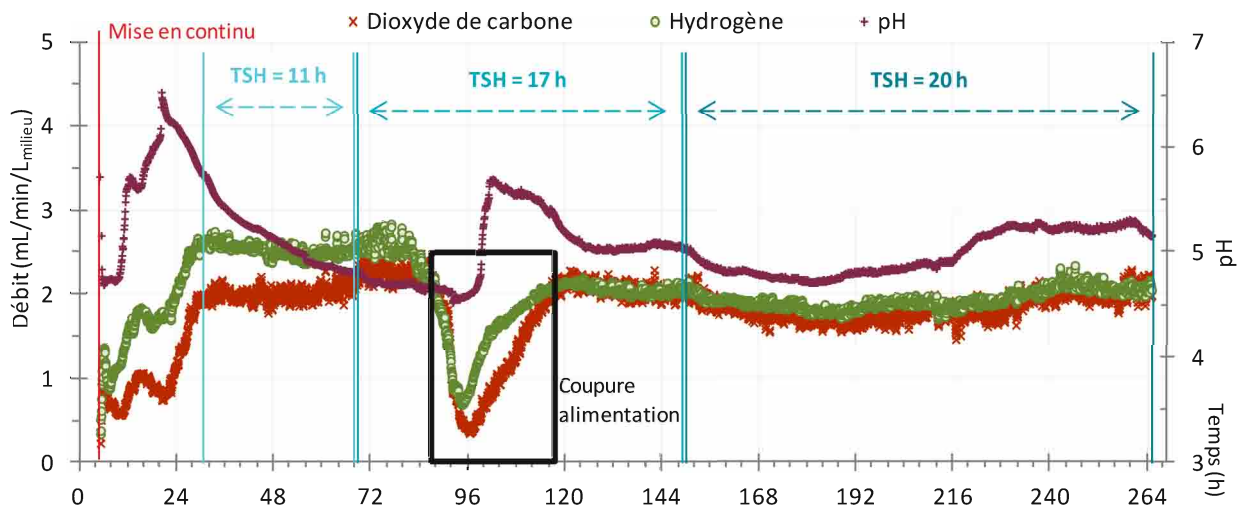


Figure 84. Débits de H_2 et CO_2 en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-b avec modification du TSH de 12 h à 17 h puis 20 h

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de $38^\circ C$; ajout de glucose ($DAS = 1,04 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $27 \text{ mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$; taux de recirculation de 0,8 ; TSH de 11 h, ensuite augmenté à 17 h puis 20 h

Les résultats obtenus avec le test de fermentation BRM-a (paragraphe V.B.1), utilisant un TSH de 46 h sont également utilisés pour étudier l'impact de ce paramètre sur les performances du BRM, les résultats stabilisés obtenus sur la phase finale sont utilisés pour cette comparaison, donc après renouvellement total du milieu réactionnel. Le Tableau 44 récapitule l'ensemble des résultats obtenus avec différents TSH pour les différents tests de fermentation réalisés. La moyenne des résultats obtenus pour l'étude de reproductibilité du fonctionnement du BRM (paragraphe V.B.2.2) est utilisée pour le TSH d'environ 12 h. Un optimum de TSH semble ressortir de ces résultats, avec un rendement maximal de $1,81 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$ et une productivité pouvant atteindre jusqu'à $153 \text{ mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$ (test BRM-b avec un TSH de 12 h). Le rapport H_2/CO_2 est optimal, supérieur à 1, et une consommation d'hexose de $\approx 65\%$ est observée. Seul le test avec un TSH de 46 h (BRM-a) donne des résultats de production d'hydrogène moins performant. Les autres tests donnant des résultats dans la gamme d'erreur de la moyenne de référence.

V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 44. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour les tests de fermentation BRM avec différents TSH

TSH (h)	Tests	Rendement (mol _{H2} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H2} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H2} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
≈ 12	BRM-b BRM-c BRM-d	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,4*	128 ± 31	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2*	1,01 ± 0,04*	63 ± 5*
17	BRM-b	0,97	1,43	135	1,04	0,79	0,96	72
20	BRM-b	0,84	1,36	117	1,05	0,71	0,85	62
46	BRM-a	0,64	1,41*	81	0,67	0,56*	0,79*	45*

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

En mode de fonctionnement RAC, avec un substrat modèle (sucrose + nutriment), à un DAS fixé à 0,83 g_{hexose}/L_{milieu}/h, Mariakakis *et al.* [151] ont observé un TSH optimal à 38 h sur une gamme allant de 12 h à 38 h, avec un rendement optimal de 1,72 mol_{H2}/mol_{hexose consommé}, et une productivité de 170 mL_{H2}/L_{milieu}/h, la consommation en substrat étant de 83%, supérieure à celle observée lors des tests de fermentation réalisés dans cette étude. Egalement avec un DAS fixe, à 0,94 g_{hexose}/L_{milieu}/h, Van Ginkel et Logan [125] ont observé les meilleures performances de production, tant en rendement (2,3 mol_{H2}/mol_{hexose consommé}) qu'en productivité (270 mL_{H2}/L_{milieu}/h) pour un TSH réduit situé entre 2,5 et 5,0 h. Les deux études montrent clairement la variabilité des résultats pouvant être obtenus, indiquant bien que le TSH optimal dépend fortement des conditions opératoires du système mises en place. L'utilisation du système particulier mis en place dans cette étude rend donc impossible toute comparaison directe des résultats issus de la littérature.

Dans la majorité des études portant sur l'impact du TSH, les meilleures performances de production d'hydrogène (rendement par mole d'hexose ajoutée et/ou productivité) sont observées lorsque le rapport molaire B/A est maximal. Cet effet est également observé dans notre étude, avec le rapport B/A entre 0,7 et 1,2 pour les TSH de 12 h et 20 h. L'étude de Chen *et al.* [156] montre bien l'effet des variations de production des deux métabolites : augmentation de la production de l'acide butyrique lorsque le rendement est maximal et diminution de la production d'acide acétique lorsque la productivité est maximale, ces deux évolutions permettant indépendamment l'augmentation du rapport B/A. En revanche, on notera la valeur du rapport est très variable, en particulier en fonction de l'*inoculum* et du substrat utilisé [154].

Avec l'augmentation du TSH de 17 h à 20 h, une diminution du rendement et de la productivité en H₂ est observée, ce phénomène peut être lié à l'augmentation de la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel, lié au renouvellement plus lent de celui-ci. En effet, le TSH, directement lié à la vitesse de renouvellement du milieu réactionnel, a donc un impact sur l'accumulation de métabolites dans le milieu réactionnel, dans la mesure où les débits de production de métabolites et de consommation du substrat restent relativement stables. Cet impact est clairement observé sur la Figure 85, avec une augmentation linéaire de la concentration des métabolites dans le milieu réactionnel en fonction du TSH, hormis pour l'éthanol, dont la concentration est plus faible à un temps de séjour élevé, généralement liée à un déséquilibre du métabolisme acidogène vers la solvantogénèse. On notera cependant que la production d'éthanol à un TSH de 46 h est plus faible que celle au TSH de 20 h ; ceci

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

étant probablement lié aux conditions de microaérobie pour le test BRM-a (TSH = 46 h), influant le métabolisme microbien.

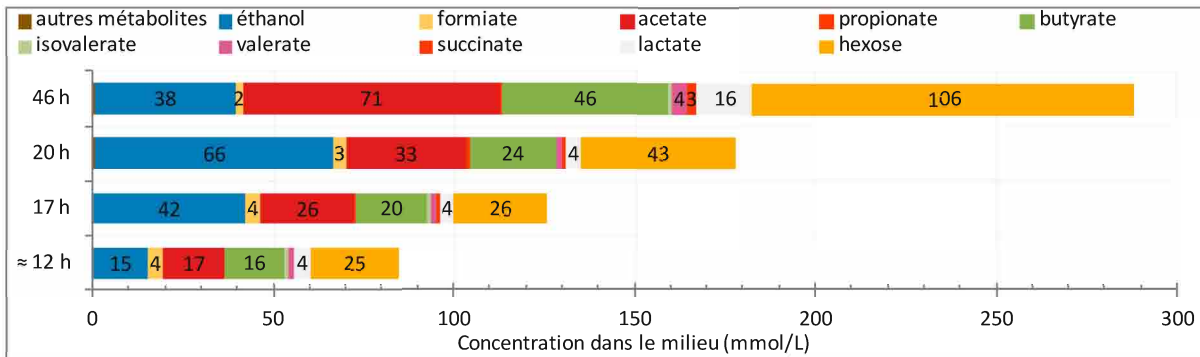


Figure 85. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, calculées sur une durée minimale de deux fois le TSH, en fonction du TSH pour les tests en mode BRM

De la même façon, la concentration d'hexose dans le milieu réactionnel augmente progressivement avec le TSH, ce qui semble indiquer un effet de saturation du milieu et un effet limitant sur le consortium microbien pour le consommer, bien que le DAS reste stable pour tous les TSH (environ $1 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$). On note en effet un impact négatif d'un TSH élevé sur la productivité en hydrogène. Or la Figure 86, montre que la consommation en substrat est relativement stable entre 12 h et 20 h de TSH, l'augmentation de la concentration en sucre dans le BRM sur cette gamme de TSH est donc essentiellement liée au temps plus élevé, nécessaire pour évacuer la même quantité de substrat non consommé. Cette augmentation linéaire est probablement liée à une activité microbienne utilisant des voies métaboliques équivalentes quelque soit le TSH et ayant pour résultante un rendement en H_2 équivalent. En revanche, pour le test réalisé avec un TSH de 46 h, une réduction importante de la consommation en hexose est observée, ce qui indique que l'hypothèse d'un effet inhibiteur du substrat est valide, pour des concentrations supérieures à 100 mmol/L.

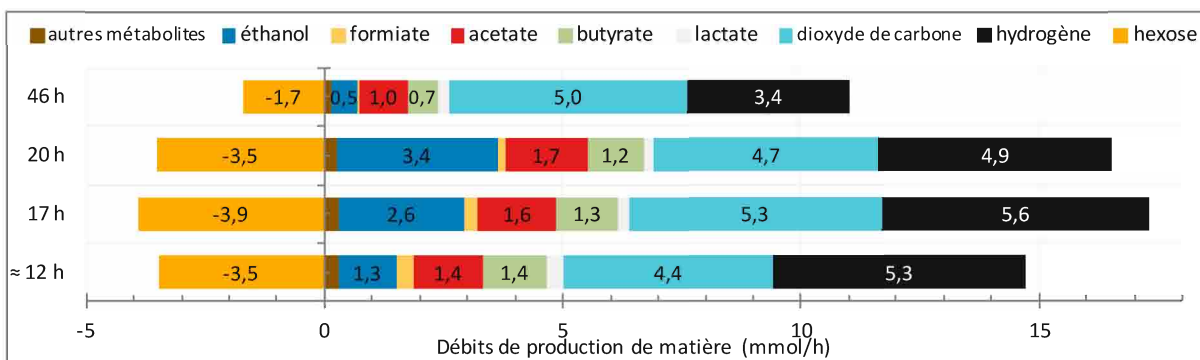


Figure 86. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, en fonction du TSH pour les tests en mode BRM

L'évaluation des bilans carbone, présentée sur la Figure 87, est cohérente avec l'observation des concentrations en métabolites et montre l'impact relativement limité du TSH sur la conversion du carbone apporté par le substrat. Le recouvrement global du bilan est relativement bon et est moins élevé pour les TSH faibles pour lesquels le renouvellement du milieu réactionnel nécessite une croissance microbienne plus importante consommant du carbone et visiblement un consortium plus actif (productivité élevée). La proportion de carbone utilisé pour les productions d'acétate et de butyrate sont stables (respectivement 10% et 15%), tandis que celles de dioxyde de carbone et d'éthanol augmentent progressivement ou sont variables avec l'augmentation du TSH.

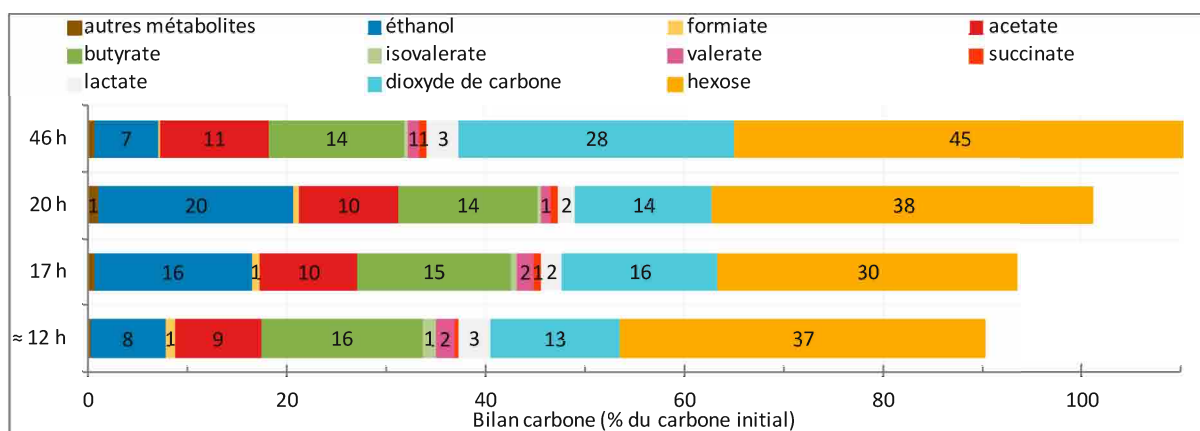


Figure 87. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel – moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée

L'augmentation du TSH, à partir d'environ 20 h, limite l'activité de certains microorganismes et semble favoriser l'émergence d'autres microorganismes homoacétogènes ou producteur d'éthanol. L'augmentation du TSH au-delà de 20 h est ainsi à l'origine d'une réduction de la productivité en H₂. Les résultats intéressants obtenus pour le TSH de 12 h permettent d'envisager, dans le futur, la réduction du TSH. En effet, plus le TSH est court, plus le renouvellement du milieu réactionnel est rapide, limitant la concentration en métabolites. De plus, pour un même DAS, la concentration en substrat de la solution d'alimentation est moins importante, ce qui permet l'utilisation de déchets plus pauvres en matières métabolisables, conditions favorables dans une optique d'industrialisation permettant d'envisager une plus large gamme de substrats biodégradables. Plusieurs études dans la littérature ont d'ailleurs montrées une valeur optimale de TSH, comprise entre 8 h et 10 h [11,154–156], en fonction d'un rendement ou d'une productivité maximale en hydrogène. Un nouveau test de fermentation sera à envisager avec réduction progressive du TSH de 12 h à 10 h et 8 h afin de confirmer cette hypothèse. Un test avec réduction du TSH de 12 h à 6 h dans des conditions d'alimentation différentes (glucose + nutriments) a montré une chute drastique du rendement en H₂ (– 65%) et de la productivité montrant que l'optimum en TSH est très probablement supérieur à 6 h.

A la différence du RAC, pour lequel la réduction du TSH provoque un lessivage plus important du consortium microbien, très défavorable à la production d'hydrogène, l'utilisation du bioréacteur membranaire, sans agitation, permet de conserver les matières en suspension dans le système. En effet, le BRM permet, d'une part, avec sa configuration verticale, aux matières en suspension de sédimenter en partie, dans la zone inférieure de la calandre, sans être évacuées. Et d'autre part, la configuration du BRM permet à un biofilm de se développer sur la paroi externe des fibres creuses, ces microorganismes fixés ne pouvant être perturbés par la réduction du TSH. C'est la raison pour laquelle un TSH réduit à 12 h affecte positivement la production de H₂.

NB : Un TSH de 12 h est conservé pour la suite de l'étude car ce TSH a été utilisé précédemment avec plusieurs conditions opératoires.

V.B.2.4. Impact de la concentration en métabolites sur la fermentation

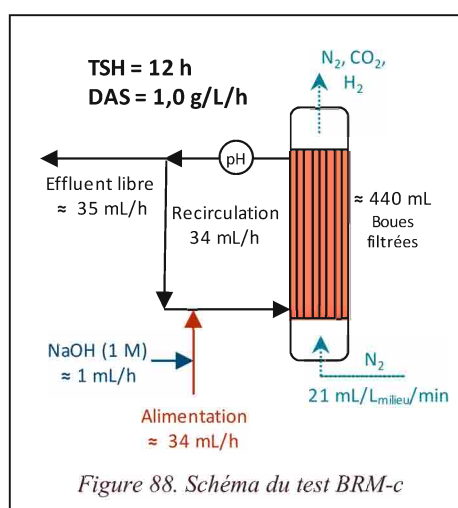
L'accumulation de métabolites dans le milieu réactionnel est suspectée d'être responsable de la baisse de productivité observée dans le BRM avec l'augmentation du TSH, étudié au paragraphe précédent. Logan et van Ginkel [125] ont observé l'impact négatif de certains métabolites comme les

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

acides acétique et butyrique sur la production de H₂, avec un effet négatif accru à une valeur de pH inférieure à 5,5. Cette observation est confirmée par Zhang *et al.* [231] sur un *inoculum* modèle composé de l'espèce *Peptoclostridium bifermentans* en mode de fonctionnement RASB, sur la production d'hydrogène, dès l'ajout de 20 mmol/L_{milieu} d'acétate ou de butyrate. De plus, une baisse de la croissance microbienne a été observée à partir de 100 mmol/L_{milieu} d'acétate ou 50 mmol/L_{milieu} de butyrate.

L'impact négatif de certains métabolites sur la productivité en hydrogène semble donc être significatif. Ceci confirmerait le rôle des métabolites dans la baisse de productivité en hydrogène observée avec l'augmentation du TSH. Dans notre cas, le pH dans la calandre du BRM n'est pas connu, celui-ci étant nécessairement hétérogène, mais toujours supérieur au pH de l'effluent sortant. Ce pH en sortie est mesuré et réglé de façon non automatisée à une valeur proche de 5,0 par l'ajout de soude en continu en entrée de calandre.

Les métabolites principaux produits dans le BRM étant l'acétate, le butyrate et l'éthanol, l'ajout ponctuel de ces métabolites dans le milieu réactionnel a été étudié à la suite du test de fermentation BRM-c, réalisé avec un TSH de 12 h et un DAS de 1,0 g_{hexose}/L_{milieu}/h (Figure 88). Ces tests permettant de définir l'impact de leur présence dans le milieu réactionnel : baisse de production en hydrogène, inversion du rapport H₂/CO₂, augmentation de la solvantogénèse, *etc.* Les quantités de métabolites introduites ponctuellement dans le flux d'alimentation du BRM ont été choisies dans le but d'observer un effet sur la production en hydrogène comparé à des tests en BRM pour des TSH élevés. Une quantité



d'éthanol de 65 mmol a été ajoutée afin d'obtenir une concentration théorique de 148 mmol/L dans le BRM, soit une concentration environ 2 fois plus importante que celle observée lors du test de fermentation BRM-b, au TSH le plus élevé (20 h). Les quantités d'acides acétique et butyrique ont été ajoutées (respectivement 66 et 45 mmol) afin d'obtenir des concentrations environ deux fois plus importantes que celles mesurées en sortie du BRM lors du test de fermentation BRM-a (TSH de 46 h).

L'impact négatif du propionate sur le métabolisme producteur d'hydrogène est connu [235] et évident puisque sa voie de production est consommatrice de H₂ (20). De plus, ce métabolite est relativement peu produit dans les tests de fermentation de cette étude, à l'exception de certaines conditions opératoires défavorables à la production de H₂. Il donc a été décidé de ne pas tester l'impact de l'ajout de ce métabolite.



L'ajout ponctuel de chaque métabolite est réalisé séparément avec un minimum de 12 h entre chaque ajout (une fois le TSH), ainsi l'impact de chaque métabolite pourra être observé indépendamment sur la courbe de production de gaz (Figure 89). Les courbes de production de H₂ et CO₂ sont en augmentation constante, avant l'ajout de l'éthanol dans le milieu à 221 h. Cet ajout donne lieu à des fluctuations importantes de la production des deux gaz (0,5 mL/L_{milieu}/min

d'amplitude) sans impact négatif net sur le volume moyen d'hydrogène ou de dioxyde de carbone produits, les paramètres de production restant relativement stables (Tableau 45).

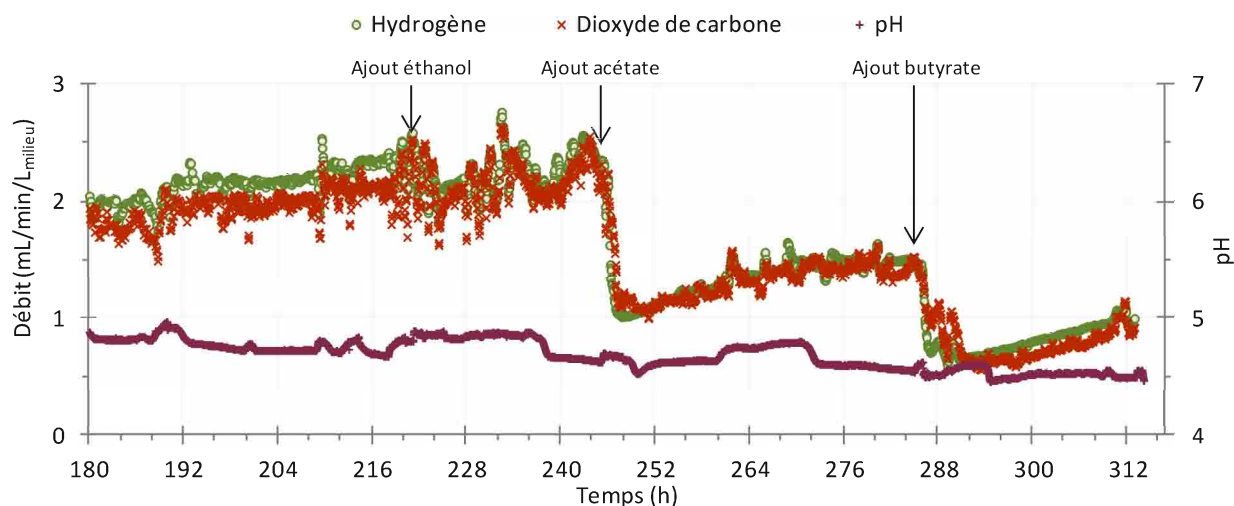


Figure 89. Débits de H_2 et CO_2 et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avec ajouts ponctuels successifs de métabolites dans le milieu réactionnel

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de $38^\circ C$; ajout de glucose ($DAS = 1,0 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $21 \text{ mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$; taux de recirculation de 0,9 ; TSH de 12 h ; trois ajouts ponctuels de métabolites réalisés : éthanol ($6,8 \text{ g}/L_{\text{milieu}}$) à 221 h ; acétate ($9,0 \text{ g}/L_{\text{milieu}}$) à 247 h ; butyrate ($9,0 \text{ g}/L_{\text{milieu}}$) à 286 h

Tableau 45. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-c avec ajouts ponctuels successifs de métabolites dans le milieu réactionnel – comparée aux résultats du test BRM-a (TSH long = 46 h) sur la phase stabilisée

	Période étudiée	Rendement ($\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ ajouté}$)	Rendement ($\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$)	Productivité ($\text{mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
phase initiale	de 195 à 221 h	1,05	1,47*	134	1,09	0,64*	0,94*	71*
post ajout d'éthanol	de 221 à 245 h	1,12	1,19*	143	1,04	0,65*	0,84*	94*
post ajout d'acétate	de 247 à 285 h	0,63	0,91*	81	1,02	n.s.	n.s.	70*
post ajout de butyrate	de 286 à 313 h	0,38	0,83*	49	1,06	n.s.	n.s.	46*
test BRM-a TSH = 46 h	Phase 2 de 72 à 169 h	0,64	1,41*	81	0,67	0,65*	1,69*	45*

n.s. : non significatif

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

De la même façon, à l'exception de l'éthanol, la production des autres métabolites ne semble pas être impactée significativement après l'ajout à 221 h (Figure 90). En ce qui concerne l'éthanol, une certaine inertie est observée, nécessitant deux à trois TSH pour retourner à une concentration en éthanol stabilisée dans le milieu réactionnel, inférieur de 2/3 à celle observée avant l'ajout à 221 h (Figure 91). Le faible impact de ce métabolite sur la production d'hydrogène s'explique par l'absence de coproduction d'hydrogène dans sa voie de production (18). La stabilité des rapports B/A et $H_2/2(B+A)$ confirme cette observation. En revanche, la limitation de la production d'éthanol, qui est observée, était attendue et confirmée par un rapport H_2/CO_2 stable.



V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

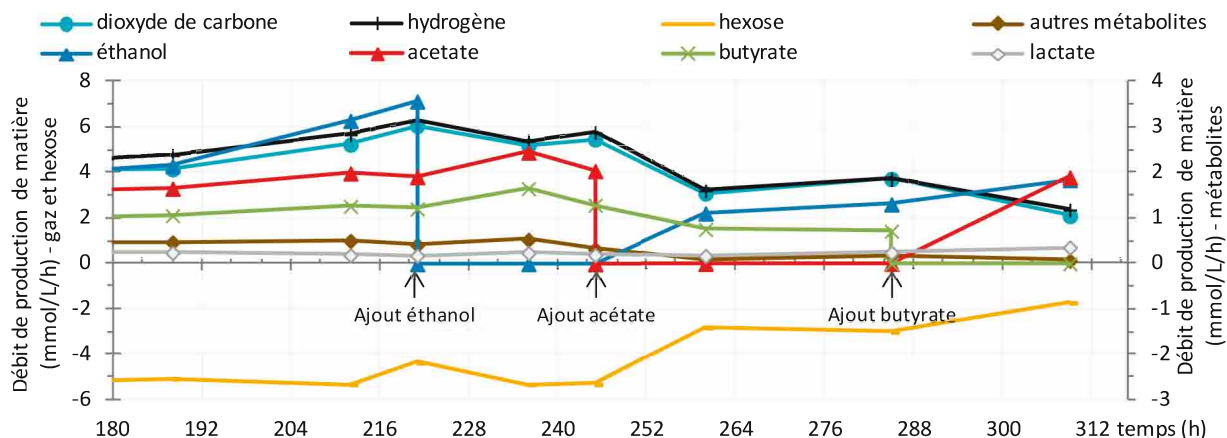


Figure 90. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avec ajouts ponctuels successifs de métabolites dans le milieu réactionnel

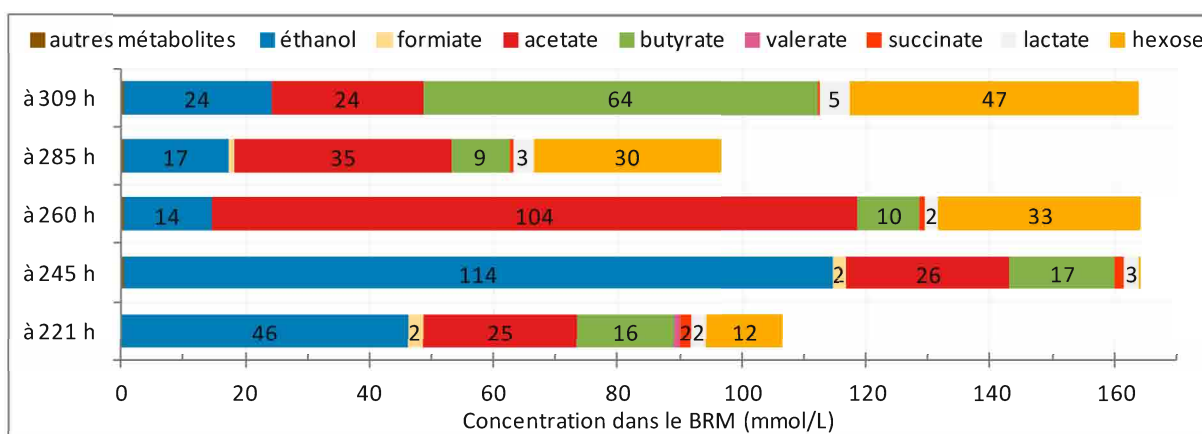


Figure 91. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminé sur la boucle de recirculation, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c

L'ajout ponctuel d'acétate dans le milieu réactionnel, réalisé à 245 h, a un impact bien plus net sur la production de gaz, dont les débits de production chutent de 2,1 à 1,0 mL/L_{milieu}/min en moins de 3 h alors que le pH mesuré en sortie au bout de six heures (temps de séjour dans la calandre du milieu réactionnel) ne décline que de 0,2 unité de pH. Une remontée de la production peut néanmoins être observée dans les 24 h suivantes (durée correspondante à deux fois le TSH), avec une stabilisation vers 1,5 mL/L_{milieu}/min. La productivité et le rendement en hydrogène baisse de 43% en moyenne à la suite de l'ajout d'acétate, tandis que le rapport H₂/CO₂ est stable (Tableau 45). En raison de l'introduction artificielle et massive d'acétate dans le milieu réactionnel, le calcul des rapports B/A et H₂/2(B+A) n'est pas fiable pour caractériser le métabolisme suivi par le consortium microbien.

De même que pour la production de gaz, l'ajout d'acétate impacte la production de butyrate, qui diminue globalement de moitié (Figure 90). La quantité d'acétate dans le milieu reste assez élevée durant une période entre deux et trois fois le TSH, temps nécessaire pour évacuer la majeure partie de la quantité d'acétate ajoutée, puis cette concentration se stabilise à une valeur environ 20% plus élevée que celle observée dans le milieu avant l'ajout d'acétate (Figure 91), l'évolution de cette concentration restant décroissante. Cette inertie pour évacuer l'acétate semble indiquer la présence d'une production d'acide acétique par acétogénèse, la production d'hydrogène étant très faible. Cette production commence probablement alors que la concentration en acétate est encore relativement élevée dans le milieu réactionnel, ce qui la rend impossible à détecter.

V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

NB : *On notera particulièrement que le rendement par mole d'hydrogène ajouté et la productivité en hydrogène sont quasi-identiques entre le fonctionnement à un TSH de 46 h et celui avec ajout d'acétate à un TSH de 12 h.*

Enfin, l'ajout à 285 h du troisième métabolite, le butyrate, au milieu réactionnel, a eu pour effet une nouvelle chute de production des deux gaz jusque 0,6 mL/L_{milieu}/min, suivie à nouveau d'une augmentation de la production en CO₂ et H₂. L'ajout de butyrate a engendré une chute supplémentaire de 40% de la productivité et du rendement en hydrogène, sans impacter significativement le rapport H₂/CO₂, qui reste stable, légèrement supérieur à 1,0 (Tableau 45). Comme pour l'ajout d'acétate, les rapports B/A et H₂/2(B+A) ne sont pas utilisables.

Un effet similaire à celui obtenu après l'ajout d'acétate est observé sur la production de métabolites, avec une limitation de la reprise de production d'acétate, celle de butyrate n'étant plus observable (Figure 91).

Les résultats de production de métabolites présentés dans ce paragraphe sont à prendre avec précaution car, à la différence du reste de l'étude, ces résultats sont obtenus avec une estimation du temps nécessaire à la durée à l'évacuation de la quantité de métabolite ajoutée dans le milieu. En effet l'ajout ponctuel d'une quantité de matière fixe dans un système en continu, avec recirculation, implique une inertie avant son évacuation totale. La production de chaque métabolite a été considérée comme nulle sur la période précédant l'évacuation de la quantité ajoutée ponctuellement. La durée entre chaque échantillon de biomasse étant relativement élevé, l'approximation réalisée est assez importante, ce qui ne permet pas d'être absolument juste sur les données présentées. De plus, bien que la production de métabolites puisse être raisonnablement considérée comme nulle lorsque la concentration de ce métabolite dans le milieu réactionnel est très élevée, cela n'est plus le cas à partir d'une certaine concentration, dont la valeur n'est pas connue. En revanche les concentrations en métabolites présentées sur la Figure 91 sont celles mesurées dans le milieu réactionnel, sans approximation.

En parallèle de ces observations, il faut noter que le pH du milieu réactionnel n'est pas impacté significativement par ces ajouts successifs d'acides faibles (Figure 89), l'écart entre le maximum et minimum de pH sur la période de chaque ajout restant inférieur à 0,3 unité de pH. L'origine des chutes de production de gaz ne peut donc pas être directement imputée à un effet d'acidification du milieu. Accentué par le pH globalement bas en sortie du BRM (entre 4,5 et 5,0), donc probablement également dans la partie supérieure de celui-ci. En effet, l'étude de Van Ginkel et Logan [125] ont montré l'impact négatif de l'augmentation très significative d'une concentration en métabolites élevée lors d'une réduction du pH de 5,5 à 5,0 sur la production d'hydrogène par fermentation obscure.

En mode de fonctionnement RAC (TSH = 12 h) avec un *inoculum* composé de boues digérées alimenté en saccharose (3,3 g_{hexose}/L_{milieu}/h), Kyazze *et al.* [138] ont observé une légère baisse temporaire de production après l'ajout de butyrate (23 mmol/L_{milieu}), un ajout plus important (45 mmol/L_{milieu}) étant responsable d'un arrêt complet de la production de gaz, ne reprenant qu'après environ deux TSH. On remarque que dans notre étude, l'ajout de 103 mmol/L_{milieu} n'a été responsable que d'une baisse de 40% de la production de d'hydrogène, ce qui pourrait s'expliquer par l'homogénéisation du milieu dans le RAC utilisé dans l'étude de Kyazze *et al.*, ce qui n'est pas le cas dans le module membranaire, dans lequel la diffusion hétérogène du butyrate permet à certains microorganismes de rester actif.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Ce test a montré qu'une concentration élevée en acides acétique ou butyrique, comme cela est observé lors des tests en mode de fonctionnement continu avec des TSH élevés (RAC-a et BRM-a), est au moins en partie responsable de la baisse de production observée après un TSH, soit le temps nécessaire pour atteindre une concentration relativement homogène dans le milieu fermentaire. Cependant, le rapport H₂/CO₂ n'étant pas impacté, l'origine de son inversion lors des tests précédents reste un point à élucider, probablement liée à la présence d'oxygène dissous dans l'alimentation en substrat. Cette étude montre que l'ajout ponctuel d'éthanol n'a pas d'impact négatif sur la production d'hydrogène.

V.B.3. Analyse microbiologique – tests BRM-b et RAC-b

Des échantillons de biomasse prélevés à 68 h (TSH = 12 h) pendant les tests de fermentation en RAC-b et en BRM-b ont été analysés par séquençage Illumina à haut débit. Une faible quantité d'OTU est observé lors du test RAC-b (172) par rapport au test en mode de fonctionnement BRM (880), le nombre d'OTU obtenu en mode semibatch étant le plus élevé (930) (Tableau 46). Cet effet semble directement lié au lessivage du milieu réactionnel, plus important dans le cas du RAC, dans lequel seules les bactéries capables de croître à un TSH de 12 h restent présentes. En revanche, dans le cas du BRM, le développement du biofilm sur les fibres creuses et la sédimentation partielle des matières en suspension dans la calandre permet de limiter le lessivage et d'augmenter le temps de séjours des matières en suspension ; une diversité plus importante de bactéries peut alors survivre dans le système. On remarque que l'indice de Simpson est plus élevé pour le test réalisé en mode de fonctionnement RAC (0,35) et que celui obtenu pour le mode de fonctionnement BRM est très faible, avec 0,03, par rapport à 0,22 en fin de test semibatch. On rappelle que l'indice de Simpson ne dépassait pas la valeur de 0,03 avant et après traitement thermique (paragraphe III.E). La forte diversité dans le BRM, beaucoup plus importante que dans le RASB, est certainement liée aux conditions de fermentation dans la calandre, favorable à de nombreuses espèces bactériennes.

Tableau 46. Paramètres correspondant aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation RAC-b et BRM-c à 68 h – TSH, nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Phase du test étudiée	TSH (h)	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
BRM-c à 68 h	Phase 1	12	880	0,03
RAC-b à 68 h	Phase 1	12	172	0,35
RASB à 20 h	fin de fermentation	/	930	0,22

Avec les deux modes de fonctionnement, une prédominance du phylum *Firmicutes* est à nouveau observée, mais avec une présence nettement moins importante dans le BRM (54,6%) que dans le RAC (96,3%) (Figure 92). On observe clairement une diversité bactérienne beaucoup plus importante dans le BRM par rapport au RAC, avec en particulier la présence des phyla *Bacteroidetes* (11,5%) et *Synergistetes* (7,1%). Cette diversité peut expliquer notamment la part importante dans le bilan le carbone de l'éthanol dans le cas du BRM, qui semble donc favoriser la solvantogène.

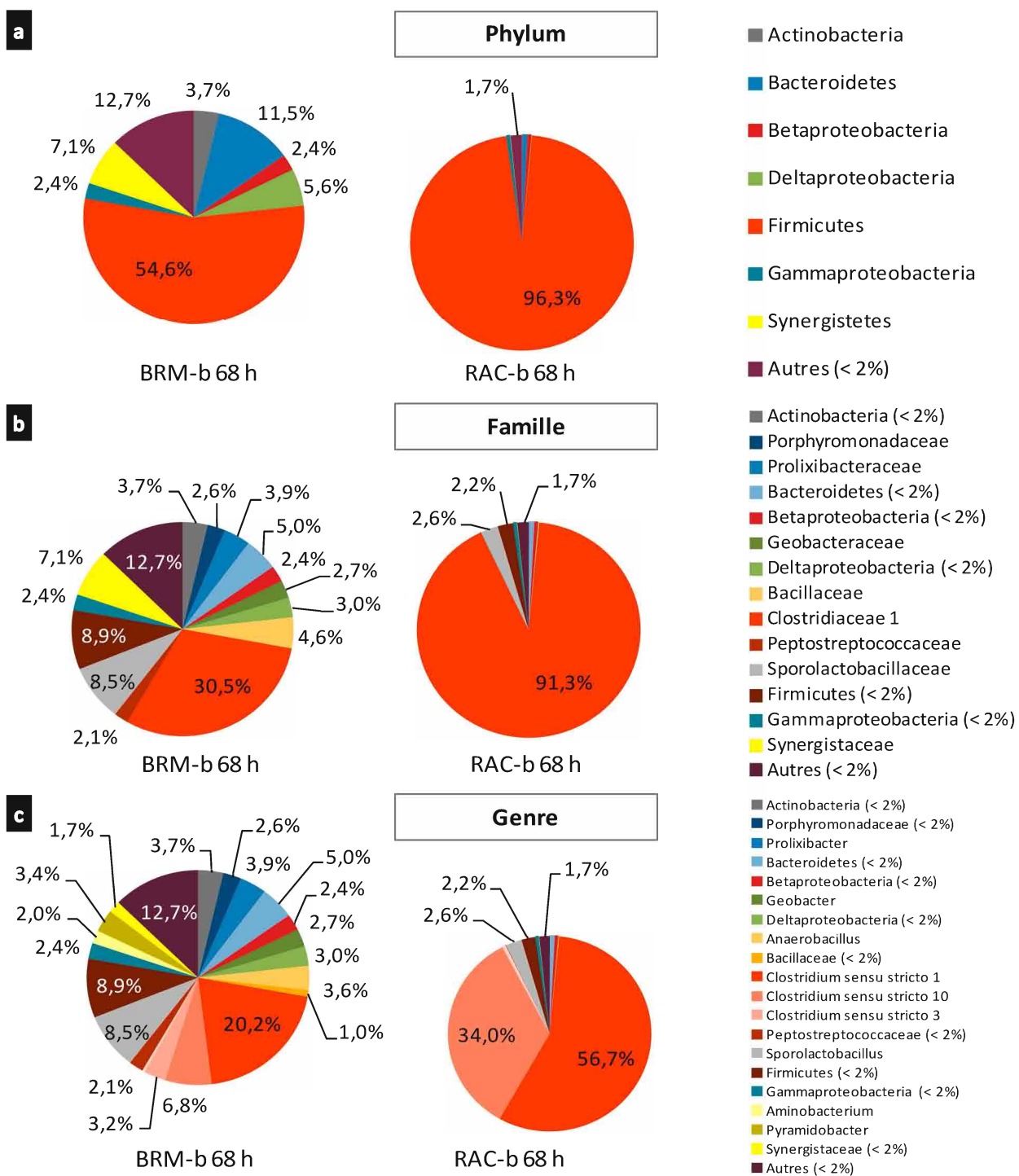


Figure 92. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation de test RAC et BRM, à 68 h, avec un TSH de 12 h - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 47. Résultats obtenus par séquençage des échantillons à 68 h de fermentation de test RAC et BRM avec un TSH de 12 h - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	BRM (%)	RAC (%)	
Actinobacteria	Coriobacteriaceae	<i>Olsenella</i> / <i>Atopobium</i>	<i>Olsenella</i> sp. / <i>Atopobium</i> sp.	100	/	1,7%	0,0%	
Bacteroidetes (100%)	Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i> (100%)	<i>Porphyromonas</i> (<i>somerae</i> / <i>levii</i>)	< 97	/	1,7%	0,0%	
	Prolixibacteraceae (< 97%)	<i>Prolixibacter</i> (< 97%)	<i>Prolixibacter bellariivorans</i>	< 97	NR_113041	3,9%	0,0%	
	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	<i>Geobacter</i> (<i>lovleyi</i> / <i>thiogenes</i>)	100	/	2,7%	0,0%	
Deltaproteobacteria	Syntrophaceae (100%)	<i>Smithella</i> (99%)	<i>Smithella propionica</i>	97	NR_024989	1,1%	0,0%	
	Bacillaceae	<i>Anaerobacillus</i>	<i>Anaerobacillus</i> (<i>alkalidiazotrophicus</i> / <i>alkalilacustris</i>)	100	/	3,6%	0,0%	
Firmicutes	Clostridiaceae 1	<i>Clostridium sensu stricto 1</i> (100%)	<i>Clostridium</i> (<i>carnis</i> / <i>quini</i>)	99	/	2,3%	0,0%	
			<i>Clostridium baratii</i>	98	NR_029229	4,1%	3,2%	
			<i>Clostridium butyricum</i>	99	LN828941	10,7%	52,8%	
	Clostridiaceae 1	<i>Clostridium sensu stricto 10</i> (100%)	<i>Clostridium</i> sp.	100	LC020510	3,1%	0,7%	
			<i>Clostridium</i> (<i>subterminale</i> / <i>thiosulfatireducens</i> / <i>sulfidigenes</i>)	97	/	5,4%	25,0%	
			<i>Clostridium subterminale</i>	97	K1950289	1,1%	9,0%	
	Family_XII	Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium sensu stricto 3</i>	<i>Clostridium intestinale</i>	100	LC037210	2,7%	0,0%
				<i>Exiguobacterium</i>	100	/	1,0%	0,0%
		Ruminococcaceae	<i>Peptoclostridium</i>	<i>Exiguobacterium</i> (<i>himgriensis</i> / <i>aurantiacum</i> / <i>aquaticum</i> / <i>alkaliphilum</i> / <i>mexicanum</i> / <i>aestuarii</i> / <i>marinum</i>)	100	/	1,5%	0,0%
				<i>Peptoclostridium</i> (<i>bifermentans</i> / <i>difficile</i> / <i>hungatei</i>)	100	/	0,7%	1,7%
<i>Ethanoligenens</i> (<i>harbinense</i> / <i>Clostridium</i> sp. <i>Rennanqifly3</i> / <i>Limningia china</i> (<i>même genre</i>))				99	/	8,5%	2,6%	
Synergistetes	Sporolactobacillaceae	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100	NR_112769	2,0%	0,0%	
	Synergistaceae	<i>Aminobacterium</i>	<i>Aminobacterium colombiense</i>	100	NR_074624	3,4%	0,0%	
		<i>Pyramidobacter</i> (100%)	<i>Pyramidobacter piscolens</i>	< 97	NR_113185			

V.B. Mise en œuvre du bioréacteur membranaire (BRM)

Les bactéries de type *Clostridium sensu stricto* restent présentes en proportion importante, avec 30% dans le BRM, bien que cette proportion soit de 91% dans le RAC. Cette observation met le point sur l'importance de la diversité bactérienne dans le milieu réactionnel pour obtenir une production d'hydrogène efficace. L'espèce *Clostridium butyricum* est l'espèce majoritaire dans les deux configurations du bioréacteur (Tableau 47), ce qui confirme son rôle important pour la production d'hydrogène. Cependant, elle ne représente que 10,7% des séquences analysées dans l'échantillon du BRM, contre 52,8% pour le RAC. L'espèce *Clostridium baratii*, majoritaire en mode de fonctionnement RASB (44,2%) n'est ici présente qu'à environ 3,5% dans les deux configurations. Cette espèce semble donc moins adaptée au mode de fonctionnement continu.

Parmi les principaux genres bactériens observés dans le BRM et n'apparaissant pas dans les résultats obtenus pour le RAC, différentes fonctions sont observées. L'espèce bactérienne *Prolixibacter bellariivorans*, absente du RAC, représente 3,9% des séquences analysées dans l'échantillon du BRM. C'est une bactérie anaérobie facultative, fermentant les sucres pour la production d'acides organiques (acétate, succinate et propionate) [239].

L'OTU dont la correspondance est indéterminée entre deux espèces du genre *Geobacter*, (*G. lovleyi* et *G. thiogenes*) est le principal représentant du phylum *Deltaproteobacteria* dans le consortium, avec 2,7% du total des séquences analysées. Ces deux espèces sont reconnues pour leur capacité de chlororespiration, permettant la dégradation de molécules organochlorées, comme tétrachloroéthène (*G. lovleyi*) ou l'acide trichloroacétique (*G. thiogenes*) en utilisant l'acétate ou l'hydrogène comme accepteur d'électron, mais pas le glucose [240,241].

Aminobacterium colombiense a été trouvé dans plusieurs environnements anaérobiques, en particulier des digesteurs anaérobiques et des stations d'épuration. C'est une bactérie anaérobie stricte, asaccharolytique (qui ne consomme pas de glucides), mais peut consommer des acides aminés pour la production d'acétate et d'hydrogène, majoritairement [242]. De même, l'espèce *Pyramidobacter piscolens* est également anaérobie stricte, asaccharolytique, mais pouvant consommer des protéines ou des peptones pour la production d'acétate et d'isovalérate, majoritairement [243]. L'absence de consommation de glucides par ces bactéries tend à confirmer l'hypothèse d'un développement bactérien sur les résidus des bactéries non évacués par le flux de liquide. Les bactéries fermentant les protéines issues des bactéries mortes comme *Aminobacterium colombiense* permettent d'apporter un complément de production au système global ; ce qui n'est pas le cas dans le RAC puisque les bactéries sont évacuées au fur et à mesure du renouvellement du milieu fermentaire.

L'accumulation de biomasse par sédimentation dans la partie basse de la calandre du BRM semble permettre le développement de microorganismes différents, dont la croissance est limitée en mode de fonctionnement RAC, à cause du lavage plus rapide du milieu. Les fibres creuses présentes sur toute la longueur du réacteur permettent de fournir un support pour le développement microbien, à l'interface gaz/liquide, permettant ainsi l'extraction rapide du biohydrogène, et donc limitant la pression partielle en hydrogène efficacement dans le milieu fermentaire. Une analyse par séquençage de ce biofilm serait à envisager afin de compléter les informations obtenues sur la composition bactérienne du milieu fermentaire.

Une majorité de bactéries du phylum Firmicutes a été détectée avec les deux modes de fonctionnement RAC et BRM, avec cependant une diversité microbienne beaucoup plus

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

importante dans le BRM, liée à la géométrie de la calandre, qui permet de limiter le lessivage des bactéries à développement lent. Les bactéries majoritaires sont *Clostridium butyricum* et *C. (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)* dans les deux configurations, la population de *Clostridium butyricum* atteignant 52,8% dans le RAC, contre 10,7% dans le BRM. Parmi les bactéries présentes dans le BRM, absentes du RAC, certaines sont liées à des métabolismes parasites, mais d'autres, comme *Aminobacterium colombiense* sont productrices d'H₂ à partir de protéines et réalisent un complément de production.

V.B.4. Bilan de la mise en œuvre du BRM

La possibilité de produire de l'hydrogène par fermentation obscure dans le bioréacteur membranaire a été démontrée. Les résultats de production obtenus sont plus que prometteurs quant à l'intérêt de l'utilisation du BRM par rapport à celle du RAC pour une production efficace d'hydrogène, tant en rendement (> + 90%) qu'en productivité (> + 300%), pour un TSH de 12 h ou 18 h. A la différence du RAC, pour lequel la réduction du TSH provoque un lessivage plus important du consortium microbien, très défavorable à la production d'hydrogène, l'utilisation du bioréacteur membranaire, sans agitation, permet de conserver les matières en suspension dans le système. En effet, le BRM permet, d'une part, avec sa configuration verticale, aux matières en suspension de sédimenter en partie, dans la zone inférieure de la calandre, sans être évacuées. Et d'autre part, la configuration du BRM permet à un biofilm de se développer sur la paroi externe des fibres creuses, les microorganismes se développant dans ce biofilm ne pouvant être perturbés par la réduction du TSH.

Il a été montré qu'un TSH réduit à 12 h affecte positivement la production de H₂, alors qu'un TSH élevé (> 46 h) induit une baisse de production d'H₂ liée à des concentrations élevées en acétate et butyrate. Une meilleure stabilité sur la durée de la production d'hydrogène est ainsi observée dans le BRM par rapport au test avec le RAC, avec une très bonne reproductibilité des tests de fermentation, tant au niveau de la production totale que des débits de production de l'hydrogène et des métabolites.

A l'instar du mode de fonctionnement RAC, une majorité de bactéries du *phylum Firmicutes* a été détectée dans le BRM, avec cependant une diversité microbienne beaucoup plus importante. Ce qui est lié à la réduction du lessivage des bactéries à développement lent. Les bactéries majoritaires dans le BRM sont *Clostridium butyricum* (10,7%) et *Sporolactobacillus laevolacticus* (8,5%) ainsi que *C. (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)* (4,7%), trois bactéries étant déjà présentes dans le RAC.

Ces résultats de production sont très encourageants pour l'utilisation du BRM en fermentation obscure. L'optimisation d'autres aspects de ce procédé de production est l'objet du paragraphe suivant.

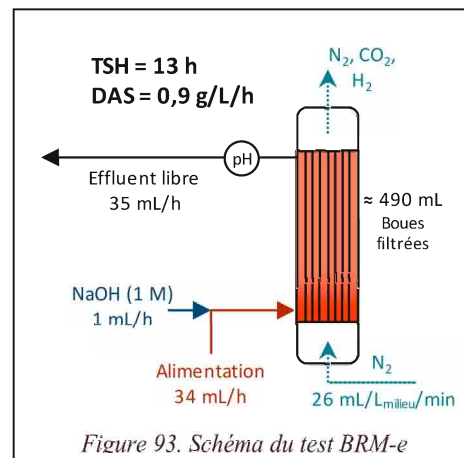
V.C. Autres optimisations du bioréacteur membranaire (BRM)

L'intérêt du mode de fonctionnement BRM étant établi, la configuration utilisée pour le test de fonctionnement BRM-b, est conservée pour la majorité des études, avec un TSH de 12 h. L'impact de différents points de fonctionnement (recirculation du milieu, mode d'extraction des gaz produits) sont

testés. L'impact de dysfonctionnements du procédé a été observé : panne momentanée du régulateur de température, accumulation de métabolites produits dans le milieu fermentaire.

V.C.1. Fonctionnement avec/sans boucle de recirculation

Les tests de fermentation de référence présentés précédemment (BRM-b, BRM-c et BRM-d) ont été réalisés avec une boucle de recirculation permettant d'avoir un TSH local au niveau du BRM de 6 h, le TSH global du système étant de 12 h environ. Le test **BRM-e** est réalisé sans cette boucle de recirculation, c'est-à-dire que la totalité du milieu réactionnel sortant du BRM est évacuée du système (Figure 93). Le TSH est ici de 13 h.



La Figure 94 présente les profils de production de gaz pour ce test de fermentation. Un débit de production d'hydrogène globalement dans la gamme basse de celle des tests de fermentation avec boucle de recirculation est obtenu. Dans la configuration avec boucle de recirculation, le substrat, injecté dans le système traverse en théorie deux fois la calandre et la boucle de recirculation avant d'être évacué, ce qui améliore la mise en contact du substrat avec les bactéries. Le débit de CO₂ reste bien inférieur à celui de H₂ sur plus de 84 h de fermentation.

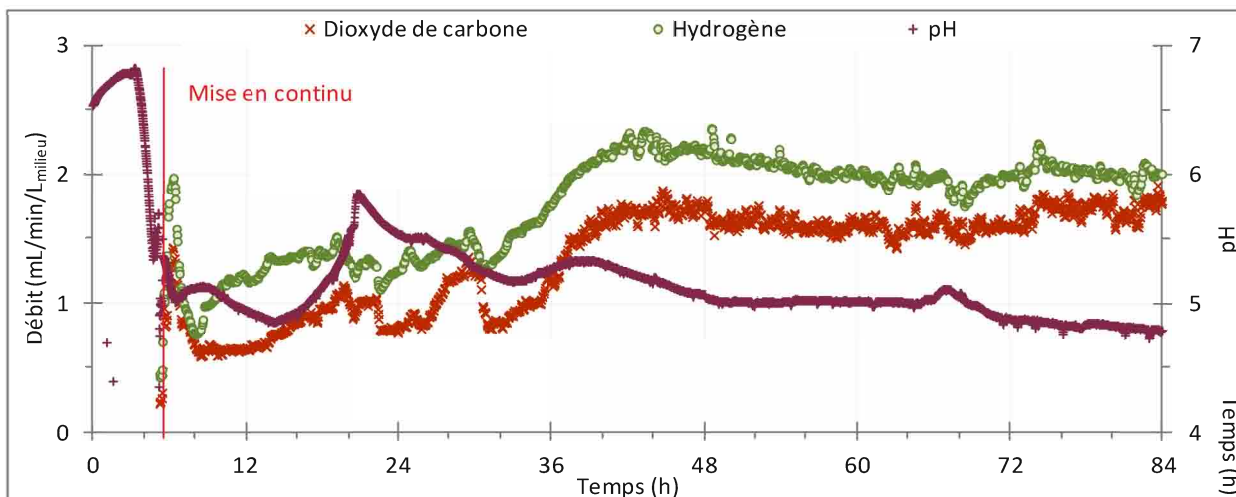


Figure 94. Débits de H₂ et CO₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-e sans boucle de recirculation
Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose (DAS = 0,9 g_{hexose}/L_{milieu}/h) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 26 mL/L_{milieu}/min ; TSH de 13 h ; sans recirculation du milieu réactionnel

Le Tableau 48 donne les résultats de production obtenus avec cette configuration, comparés aux résultats moyens obtenus avec la boucle de recirculation. Le rendement et la productivité en H₂ ainsi que le rapport H₂/CO₂, sont dans la même gamme que les tests réalisés avec la boucle de recirculation. Sans recirculation, la consommation en hexose est de 55% seulement contre 63% avec la boucle. Ceci semble corroborer l'hypothèse d'une moins bonne mise en contact du substrat avec les microorganismes, conduisant à une réduction de la consommation, et donc également de la productivité en hydrogène, bien que cet impact reste très limité.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 48. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour la moyenne des tests réalisés avec recirculation (BRM-b, BRM-c, BRM-d) et le test réalisé sans recirculation (BRM-e)

	Mode de fonctionnement	Rendement (mol _{H2} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H2} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H2} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
BRM-e	sans recirculation	0,98	1,79	110	1,29	0,94	1,03	55
BRM-b BRM-c BRM-d	avec recirculation	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,4*	128 ± 31	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2*	1,01 ± 0,04*	63 ± 5*

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

En ce qui concerne les rapports molaires B/A et $H_2/2(B+A)$, les valeurs obtenues sans recirculation sont situées dans l'écart-type des résultats moyens obtenus avec recirculation. Ceci semble indiquer assez peu de variations sur le métabolisme microbien et la production de métabolites. En effet, la production de métabolites observée lors de ce test de fermentation est globalement similaire, avec une distribution des métabolites produits très proche (Figure 95). Une baisse de la consommation en hexose et de la production de gaz et de métabolites est cependant systématiquement observée par rapport à la valeur moyenne, se plaçant à la limite basse de la gamme. La consommation d'hexose diminue de 27% et les productions d'acétate et de butyrate diminuent de 20%. Cette observation concorde avec l'hypothèse d'une moindre mise en contact du substrat avec les bactéries dans la calandre, celui-ci ne circulant statistiquement, qu'une seule fois, contre deux avec la recirculation, avant d'être évacué.

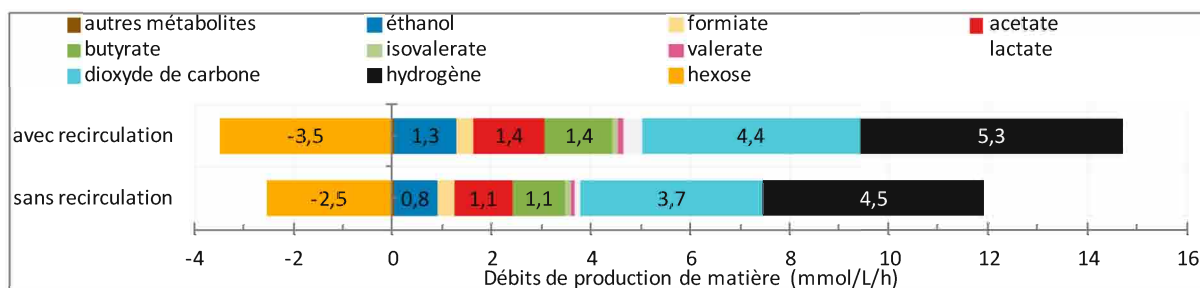


Figure 95. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, pour la moyenne des tests réalisés avec recirculation (BRM-b, BRM-c, BRM-d) et le test réalisé sans recirculation (BRM-e)

La Figure 96 présente les résultats obtenus pour le calcul du bilan carbone avec ces deux configurations. Le bilan carbone obtenu sans recirculation est très similaire à celui obtenu avec recirculation. Une plus grande quantité de substrat résiduel est observée, compensant une production de métabolites légèrement plus faible. Pour ce test de fonctionnement sans recirculation, le bilan carbone présente un bon recouvrement avec 94,5% du carbone initial, dans la gamme de résultats obtenus avec recirculation.

V.C. Autres optimisations du bioréacteur membranaire (BRM)

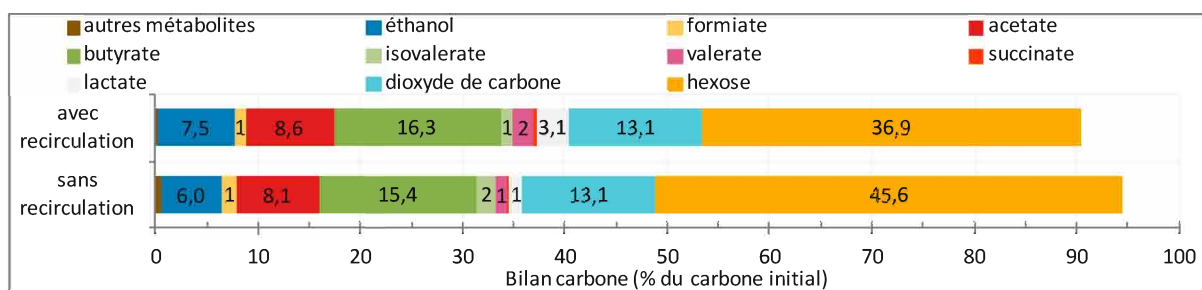


Figure 96. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée

Une analyse par séquençage haut débit a été réalisée sur deux échantillons de biomasse prélevés dans l'effluent du BRM à 68 h de fermentation pour les tests avec et sans boucle de recirculation (BRM-c et BRM-e, respectivement). Le nombre d'OTU obtenu après traitement des données est de 880 pour le test BRM-c et de 403 pour le test BRM-e (Tableau 49). La quantité réduite d'OTU dans le cas du test sans boucle de recirculation semble indiquer un lessivage plus important dans cette configuration, ceci pouvant s'expliquer par l'extraction systématique des bactéries sortant de la calandre, alors qu'en présence d'une boucle de recirculation, la moitié du flux est redirigé vers l'entrée de la calandre. Les indices de Simpson obtenus pour ces deux tests sont faibles par rapport aux valeurs observées lors des tests en mode de fonctionnement semibatch ou RAC (systématiquement supérieur à 0,2). On remarque cependant une valeur plus importante de l'indice de Simpson dans le cas du test sans boucle de recirculation (0,09), indiquant une diversité bactérienne moins importante que dans la configuration avec boucle de recirculation (0,03) ; ce qui tend à confirmer l'hypothèse d'un lessivage plus important pour le test BRM-e.

Tableau 49. Paramètres correspondant aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation BRM-c et BRM-e à 68 h – TSH, nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon

Echantillon	Mode de fonctionnement	TSH (h)	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
BRM-c	avec recirculation	12	880	0,03
BRM-e	sans recirculation	12	403	0,09

Les principaux résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 50. Une part plus importante du phylum *Firmicutes* est observée dans le cas du test sans boucle de recirculation, 72% contre 55%, dont l'écart est principalement dû à la famille *Clostridiaceae 1*, contenant les bactéries du genre *Clostridium sensu stricto*, dont le pourcentage est de 54% sans boucle de recirculation, contre 31% avec. L'espèce *Clostridium subterminale* est principalement responsable de cette augmentation, représentant 24,7% des séquences identifiées dans le consortium microbien du test sans boucle de recirculation, alors que celle-ci n'était que de 1,1% avec recirculation. Cette espèce semble donc être particulièrement adaptée à ce mode de fonctionnement. On note une abondance relative équivalente pour l'espèce *C. butyricum* dans les deux configurations, avec une valeur proche de 10% de l'ensemble des séquences analysées. Cette évolution montre que les conditions de fermentation sans boucle de recirculation semblent plus favorables à cette bactérie productrice d'hydrogène [244], bien qu'aucune modification significative n'ait été observée au niveau du métabolisme et des quantités de gaz produits.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 50. Résultats obtenus par séquençage des échantillons à 68 h de fermentation de test BRM-c et BRM-e - groupes ayant une abondance > 2% pour au moins un des échantillons

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° accession	BRM-c (%)	BRM-e (%)
Bacteroidetes (100%)	Prolixibacteraceae (< 97%)	Prolixibacter (< 97%)	Prolixibacter bellariivorans	< 97	NR_113041	3,9	0,0
			Geobacter (lovleyi / thiogenes)	100	/	2,7	0,0
Deltaproteobacteria	Geobacteraceae	Geobacter	Anaerobacillus (alkalidiazotrophicus / alkalilacustris)	100	/	3,6	5,7
			Clostridium (carnis / quinii) (100%)	99	/	2,3	1,0
			Clostridium sensu stricto 1 (100%)	98	NR_029229	4,1	5,4
			Clostridium butyricum (100%)	99	LN828941	10,7	9,3
			Clostridium sp.	100	LC020510	3,1	1,5
Firmicutes	Clostridiaceae 1	Clostridium sensu stricto 10 (100%)	Clostridium (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)	97	/	5,4	4,9
			Clostridium subterminale	97	KI950289	1,1	24,7
			Clostridium intestinale	100	LC037210	2,7	5,9
			Ethanoligenens harbinense / Clostridium sp. Rennanqifly3 / Limingia china	99	/	0,7	2,5
			Ruminiclostridium - [Clostridium] (même genre) (100%)	< 97	NR_026104	0,2	5,0
Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillus	Sporolactobacillus	Sporolactobacillus laevolacticus	100	NR_112769	8,5	0,4
			Pseudomonas (protegens / corrugata / fluorescens / moraviensis / putida / tremae / syringae / saponiphila / ficuserectae)	100	/	0,2	3,8
			Aeromonas (salmonicida / veronii / hydrophila / australiensis / caviae / tecta / encheleia / jandaei / media / bestiarum / allosaccharophila / taiwanensis / sanarellii / piscicola / rivuli / molluscorum / bivalvium / dhakensis / popoffii / jandaei) // [Haemophilus] piscium	100	/	0,8	5,6
Synergistetes	Synergistaceae	Pyramidobacter (100%)	Pyramidobacter piscolens	< 97	NR_113185	3,4	0,0

V.C. Autres optimisations du bioréacteur membranaire (BRM)

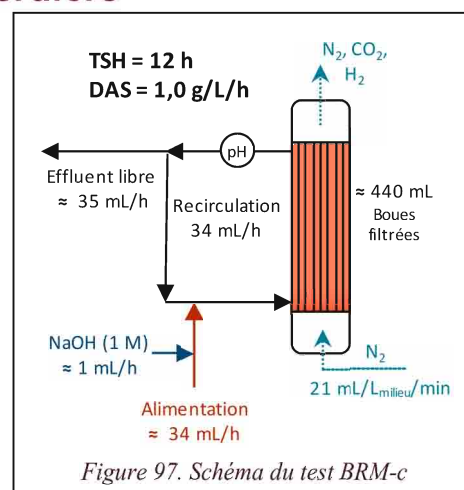
La population de *Sporolactobacillus* chute de 8,5% à 0,4% lorsque la boucle de recirculation n'est pas utilisée, ces bactéries sont généralement productrices d'acide lactique, voie non coproductrice de gaz. Une tendance à la baisse de la production de ce métabolite est en effet observée, mais d'autres tests de fermentation seraient nécessaires pour confirmer cette tendance. On notera que les bactéries du genre *Sporolactobacillus* sont capables de sécréter des bactériocines pour limiter l'activité des autres bactéries, et donc la production d'hydrogène [82]. La diminution de leur population semble donc être un effet bénéfique du fonctionnement sans boucle de recirculation, bien que cela ne semble pas avoir d'impact significatif sur la production d'hydrogène, à ce niveau.

Lors du test de fermentation BRM-e, sans recirculation, la présence de bactéries du phylum *Gammaproteobacteria* est observée, avec les genres *Pseudomonas* et potentiellement *Aeromonas*, espèces dont la quantité relative dans le milieu avant et après traitement thermique, et dans l'échantillon final en mode de fonctionnement RASB, était très faible (< 0,5%). Le genre *Pseudomonas* a pu participer à l'hydrolyse de glucides non métabolisables, en particulier grâce à la production d'enzyme cellulase [245] ; la présence de ce genre dans le *consortium* bactérien peut donc s'avérer être un avantage lors de l'utilisation de biomasse complexe comme substrat, en permettant l'utilisation de glucides non métabolisables directement par les espèces productrices d'hydrogène.

Ces résultats montrent que la configuration du BRM sans boucle de recirculation est, au moins, aussi favorable à une productivité en hydrogène élevée, que la configuration avec boucle de recirculation. Dans une optique d'optimisation paramétrique, en particulier pour la régulation du pH du milieu, la boucle de recirculation a été préférée, celle-ci permettant le suivi plus rapproché des conditions de fermentation dans le temps (6 h au lieu de 12 h). De même, le dispositif de recirculation présente l'avantage de générer un gradient en pH moins important dans le bioréacteur membranaire. Pour la suite de l'étude, la configuration avec boucle de recirculation a donc été utilisée. Dans une optique économique de production d'hydrogène, l'utilisation d'un système sans boucle de recirculation pourra cependant être envisagée.

V.C.2. Panne de régulation de température

L'étude réalisée en RASB sur la température de fermentation (paragraphe III.D) a montré que celle-ci avait un impact très important sur les performances du bioréacteur. En mode de fonctionnement continu, la probabilité d'une panne de la régulation de la température de fermentation est assez importante (dysfonctionnement du matériel, coupure de courant, erreur de manipulation, etc.). Afin d'étudier l'impact d'une panne de la régulation de la température de fermentation sur le BRM, une phase d'arrêt du bain thermostaté a été provoquée au cours du test de fermentation BRM-c (entre 79 h et 90 h) (Figure 97).



La température du milieu réactionnel décroît de 38°C (à 79 h) pour atteindre un palier à $\approx 21^\circ\text{C}$ à partir de 88 h. La production d'hydrogène, ainsi que celle de dioxyde de carbone, est immédiatement

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

impactée par la baisse de la température dans le milieu réactionnel (Figure 98), le débit de production passe en moins de 8 h de 2,1 à 0,8 mL_{H₂}/h/L_{milieu}, soit une baisse de 62% avec un profil proche de celui de la température.

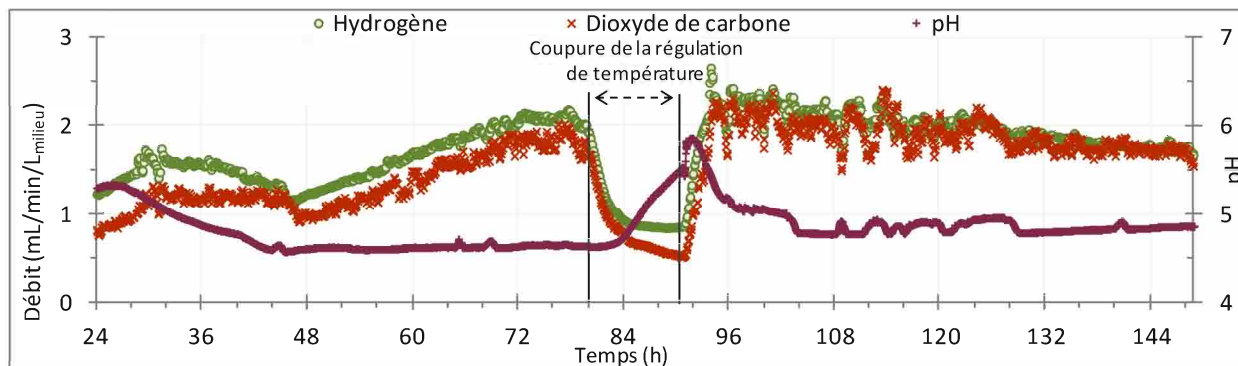


Figure 98. Débits de H₂ et CO₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avec coupure de la régulation de température du bioréacteur

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C avec arrêt de régulation entre 80 h à 90 h ; ajout de glucose (DAS = 1,0 g_{hexose}/L_{milieu}/h) ; débit de gaz de balayage (N₂) de 21 mL/L_{milieu}/min ; taux de recirculation de 0,9 ; TSH de 12 h

Une fois la régulation de la température de fermentation à 38°C remise en fonctionnement à partir de 90 h, le réchauffement rapide du milieu, conduit à la remontée de la production de gaz. La production d'hydrogène est de 2,3 mL_{H₂}/h/L_{milieu}, soit 10% de plus qu'avant l'arrêt de la régulation de température. De même, le rendement en hydrogène augmente de 0,73 à 0,92 mol_{H₂}/mol_{hexose} ajouté ; la consommation en hexose restant stable à 68% (Tableau 51). L'arrêt de la régulation de la température ne semble pas être directement responsable de l'augmentation de la production d'hydrogène, qui était déjà croissante avant l'arrêt. La déstabilisation du consortium microbien suivant cette baisse de température semble en revanche être à l'origine de l'inversion de la tendance de production, stable puis décroissante à partir de 120 h.

Tableau 51. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-c avant et après la coupure de la régulation de température du bioréacteur

	Période étudiée	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
Phase initiale	de 17 à 77 h	0,73	1,08*	94	1,24	1,07*	1,03*	68*
Phase de reprise	de 101 à 149 h	0,92	1,33*	118	1,05	0,63*	0,97*	69*

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

Le rapport H₂/CO₂ diminue de 1,24 à 1,05 après la reprise de la régulation de température, ce qui reste élevé. Un impact important de cet événement apparaît sur l'évolution le rapport B/A qui baisse de 0,44, avec l'augmentation de la production d'acétate, celle de butyrate restant à peu près stable entre ces deux phases (Figure 99). La baisse de température semble donc avoir permis d'orienter les voies de production d'hydrogène vers la voie acétate (16), bien que ceci devrait résulter également d'une augmentation du rapport H₂/CO₂, pourtant en baisse. Concernant le rapport H₂/2(B+A), celui-ci reste élevé et stable autour de 1, indiquant qu'une déviation de la production d'acétate par acétogénèse est peu probable.



A l'exception de l'augmentation de la production d'acétate (+ 52%), la coupure de régulation de la température a peu d'impact sur le métabolisme microbien, la production d'éthanol restant relativement instable entre 1 et 3 mmol/Lmilieu/h et celle des autres métabolites secondaires restant très faible (< 1 mmol/Lmilieu/h).

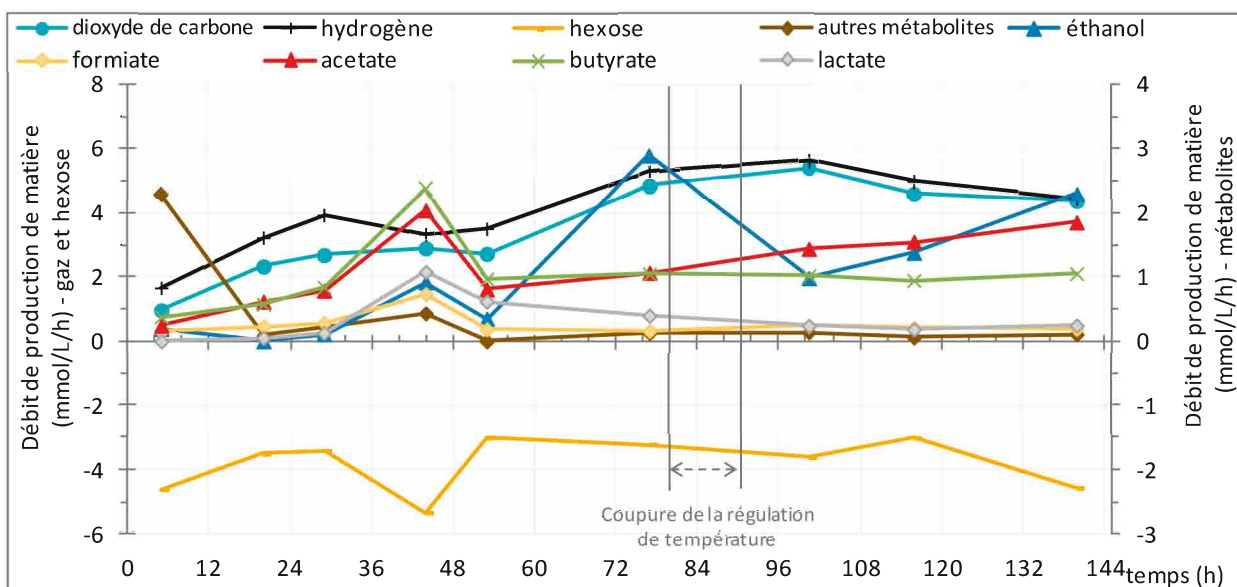


Figure 99. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c, avant et après la coupure de la régulation de température du bioréacteur

A l'instar de l'arrêt d'autres dispositifs comme les pompes de mise en recirculation (paragraphe V.C.1) ou d'alimentation (paragraphe V.B.2), ces résultats montrent une certaine robustesse du consortium microbien utilisé dans notre système, avec une capacité à reprendre rapidement la production à la suite d'un arrêt technique comme le chauffage du milieu. La résistance globale du consortium de production d'hydrogène semble importante ce qui peut être lié à sa stabilisation dans la calandre du BRM.

V.C.3. Mise en place d'une extraction libre des gaz produits du BRM

L'utilisation du module membranaire pendant la fermentation permet d'extraire efficacement les gaz produits dans la calandre hors du milieu réactionnel, cette production ayant essentiellement lieu à l'interface des fibres. Dans les tests de fermentation continus précédents, un gaz de balayage est utilisé pour permettre l'entraînement des gaz produits et éviter leurs stagnations dans le BRM et leur accumulation dans le milieu. Afin d'améliorer le rendement énergétique et économique du procédé, l'utilisation d'un système sans gaz de balayage est à envisager. Le mode de fonctionnement sans gaz de balayage par extraction libre a donc été testé sur le BRM.

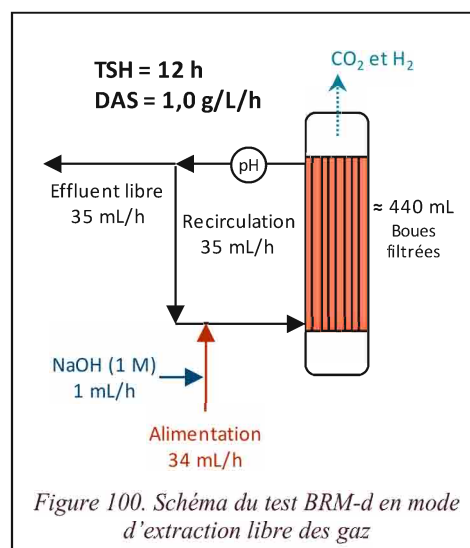


Figure 100. Schéma du test BRM-d en mode d'extraction libre des gaz

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

Le test de fermentation (BRM-d), utilisant un gaz de balayage pour l'extraction des gaz produits, dans sa phase de fermentation initiale, a été poursuivi avec l'arrêt du gaz de balayage afin de tester le mode d'extraction libre (Figure 100). Lors de ce test, un arrêt du gaz de balayage est réalisé pendant 71 h soit 5,9 fois le TSH global du système.

Le profil de production (Figure 101) montre que l'arrêt du gaz de balayage, à 93 h, est suivi d'une chute nette de la production de gaz, suivie d'une remontée après 3 h, ce qui correspond au temps nécessaire pour atteindre l'équilibre du fonctionnement dans ces nouvelles conditions. L'augmentation du temps de latence, entre le moment où le gaz est produit et sa détection par l'analyseur, explique la baisse de production observée. Une fois l'équilibre atteint, le retour à un débit stable est observé, présentant cependant une tendance à la baisse, avec en moyenne une réduction d'un tiers du rendement et de la productivité par rapport au fonctionnement initial avec gaz de balayage, le rapport H_2/CO_2 étant peu impacté (Tableau 52).

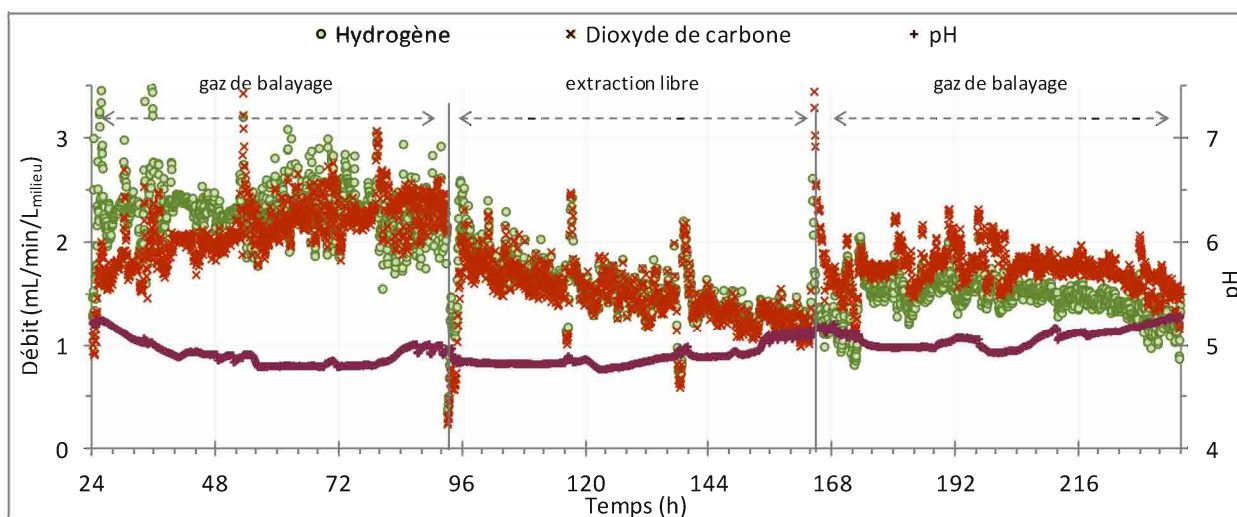


Figure 101. Débits de H_2 et CO_2 et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-d avec l'utilisation des modes avec et sans gaz de balayage pour l'extraction des gaz produits par la fermentation

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de $38^\circ C$; ajout de glucose ($DAS = 1,0 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $26 \text{ mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$ utilisé de t_0 à 93 h, puis extraction libre des gaz entre 93 h et 164 h, puis débit de gaz de balayage remis en place ; taux de recirculation de 1,0 ; TSH de 12 h

A partir de 164 h, le retour au mode d'extraction par gaz de balayage est caractérisé par un pic de dégazage des gaz accumulés dans le milieu fermentaire et les voies d'extraction des gaz, suivi d'un retour à la normale avec une légère remontée du débit de gaz produit (H_2 et CO_2) par rapport à la fin de la phase sans gaz de balayage : 1,6 contre 1,2 $\text{mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$. Ces résultats concordent avec ceux obtenus en mode de fonctionnement RASB (paragraphe IV.A), pour lesquels il avait été observé une baisse du rendement par mole d'hexose consommé de -47% et de la productivité de -61% , sur la phase de production (avant dégazage du milieu) lorsque le gaz de balayage n'était pas présent. L'impact sur le fonctionnement est plus limité sur l'ensemble du test RASB (dégazage compris) avec seulement 6% de baisse du rendement. Or, dans le cas du test continu en BRM, aucun dégazage n'est réalisé, le gaz dissout dans le milieu, principalement du dioxyde de carbone, restant dissout dans l'effluent, ce qui explique l'impact significatif du mode d'extraction des gaz. Cet effet peut être exploité avantageusement pour réaliser une pré-séparation de l' H_2 et du CO_2 produit, le gaz dissout étant très majoritairement composé de CO_2 : $314 \text{ mL}_{CO_2}/L$ contre $9 \text{ mL}_{H_2}/L$, dans l'eau pure à $38^\circ C$ avec une atmosphère $H_2 : CO_2$ (50 : 50) (par application de la loi de Henry).

V.C. Autres optimisations du bioréacteur membranaire (BRM)

Tableau 52. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-d

	Mode d'extraction des gaz	Période étudiée	Rendement ($mol_{H_2}/mol_{hexose\ ajouté}$)	Rendement ($mol_{H_2}/mol_{hexose\ consommé}$)	Productivité ($mL_{H_2}/L_{milieu}/h$)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
BRM-d	gaz de balayage	de 26 à 93 h	1,06	1,79*	139	1,08	0,79*	0,96*	59*
	extraction libre	de 96 à 164 h	0,70	1,23*	92	1,03	0,51*	1,16*	57*
	gaz de balayage	de 166 à 236 h	0,67	1,48*	87	0,84	0,41*	0,90*	45*
RASB	gaz de balayage	global	2,11	2,11	268	0,84	0,5	0,8	98,0
	extraction libre	avant dégazage	1,13	1,12	104	1,66	0,8	0,6	98,4
		après dégazage	2,01	1,99		0,77			

* Résultats calculés avec approximation de la concentration en hexose et métabolites

Le rapport H_2/CO_2 semble avoir été impacté pendant ces manipulations successives, passant de 1,03 à 0,84, potentiellement lié à une modification des voies métaboliques empruntées, induite par l'augmentation de la pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel pendant la phase d'extraction libre. Une baisse similaire, de 8%, du rapport H_2/CO_2 a pu être observée lors des tests en mode de fonctionnement RASB, après dégazage du milieu réactionnel.

Après passage au mode d'extraction libre des gaz produits, une baisse significative (-36%) du rapport molaire B/A est observée, s'amplifiant ensuite avec le retour au mode d'extraction par gaz de balayage, ce qui semble bien indiquer un dérèglement assez important du métabolisme microbien. Concernant le rapport $H_2/2(B+A)$, une augmentation significative (environ 20%) est observée lors de l'utilisation de l'extraction libre par rapport à l'extraction par gaz de balayage, liée à une baisse de la production de métabolites, en particulier du butyrate.

La Figure 102 montre les évolutions de production des différents produits de la fermentation et de consommation du substrat. Le changement de mode d'extraction à 93 h est suivi d'une baisse progressive de la production d'acétate et de butyrate, qui accompagne la baisse de production de gaz. Une tendance à l'augmentation de la consommation de substrat est cependant observée, qui peut s'expliquer par l'augmentation de la production d'éthanol sur cette période, passant d'environ 1,6 à environ 3,0 mmol/ L_{milieu}/h .

Après retour au mode d'extraction par gaz de balayage, à 164 h, la production d'acétate se stabilise au niveau atteint pendant la phase précédente (1,4 mmol/ L_{milieu}/h) et celle de butyrate continu doucement de décliner, tandis que la production d'éthanol semble diminuer, sans pour autant revenir à la valeur de la phase initiale. Une diminution significative de la consommation de substrat est également observée, ce qui coïncide avec les baisses de production de métabolites et de gaz.

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

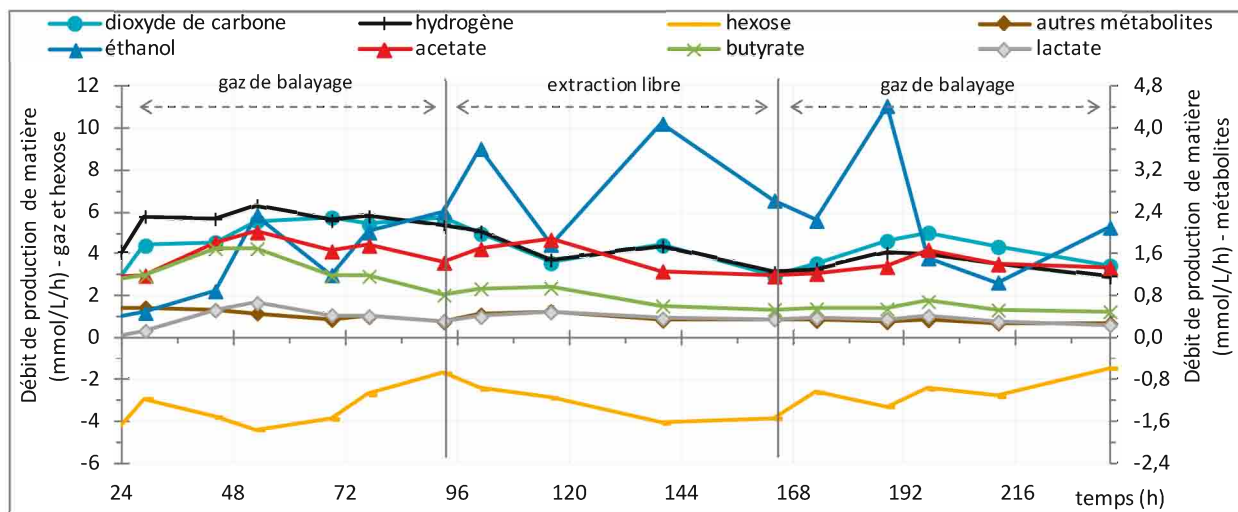


Figure 102. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du système, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-d

Le calcul du bilan carbone sur ces trois phases de fonctionnement montre un bon recouvrement du carbone initial (Figure 103). La baisse de la part du recouvrement liée au butyrate est clairement observée, passant de 16,0% à 9,5% du total entre la phase initiale avec gaz de balayage et la phase d'extraction libre. De même, la part relative à l'éthanol est multipliée par deux entre ces deux phases. Cette augmentation n'est pas cohérente avec la baisse de la production de dioxyde de carbone observée lors du passage au mode d'extraction libre, cependant ceci peut facilement être expliqué par la solubilisation du CO₂ produit et son évacuation via l'effluent et non par les voies gaz, une quantité maximale de 1,0 mmolCO₂/Lmilieu/h étant possible, soit environ 25% de la production de CO₂ mesurée.

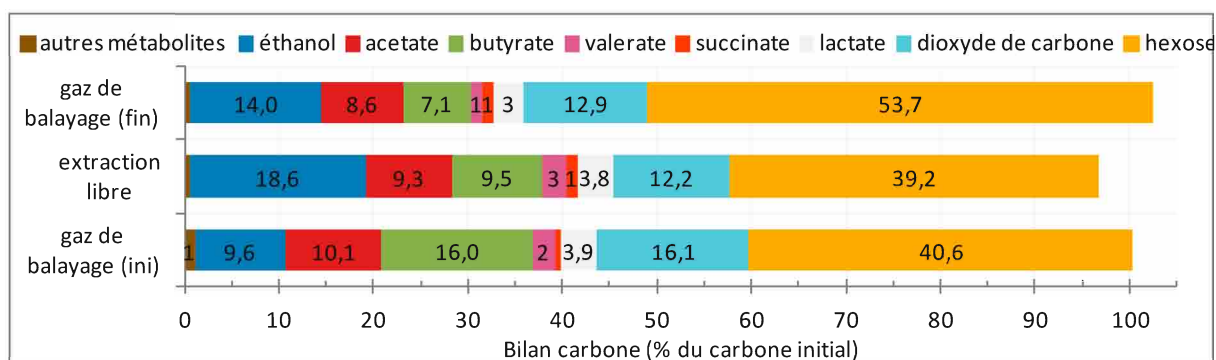


Figure 103. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée

Alors que l'évolution de la production d'hydrogène est relativement similaire lors du changement de mode d'extraction des gaz produits l'impact sur la production de métabolites est très différent par rapport aux tests réalisés en mode de fonctionnement RASB (paragraphe IV.A). L'augmentation significative de la production de butyrate (+ 43%) observée entre les tests de fermentation RASB avec extraction libre par rapport à celle avec gaz de balayage, n'est pas observée lors du test en continu, pour lequel la production de butyrate diminue (- 41% en moyenne entre la première phase avec gaz de balayage et la phase avec extraction libre). De même, l'augmentation importante de la production d'éthanol qui est observée dans le BRM, ne l'était pas lors des tests en mode RASB, pour lequel cette production était stable, avec 6% du bilan carbone des tests. Ces différences significatives montrent l'impact majeur des conditions de fonctionnement mises en œuvre dans le BRM, où la présence d'une

V.D. Conclusion du chapitre

extraction active des gaz produits semble également être primordiale. En effet, on peut poser l'hypothèse d'un développement spécifique de bactéries productrices d'hydrogène à la surface des fibres creuses, celui-ci étant amélioré par l'extraction rapide de l' H_2 produit, en réduisant la pression partielle locale. Ce phénomène est supprimé lors du fonctionnement sans gaz de balayage dans les fibres creuses, l'hydrogène s'y accumulant.

L'utilisation du dispositif de fermentation pour la production d'hydrogène sans l'utilisation du gaz de balayage limite la production d'hydrogène, probablement à cause de l'accumulation du biogaz produit dans le milieu non agité. L'utilisation d'un gaz de balayage semble donc nécessaire, avec cependant la possibilité d'utiliser des débits relativement réduits, ici d'environ 23 mL/L_{milieu}/min, ce qui pourra être optimisé.

V.D. Conclusion du chapitre

A partir des conditions optimisées aux chapitres précédents en réacteur semibatch (RASB), la mise en œuvre en continu du procédé de fermentation obscure a été réalisée avec succès en réacteur agité continu (RAC). Une première configuration avec un long temps de séjour hydraulique (TSH) à permis d'acclimater efficacement le *consortium* microbien dans le bioréacteur, sur plus de 240 h, avec un rendement et une productivité en hydrogène réduite de moitié par rapport au RASB. Un métabolisme proche du RASB a été observé, avec comme métabolites majoritaires l'acétate et le butyrate avec une consommation quasi-totale du substrat. Afin de limiter le développement de microorganismes hydrogénotrophes et l'accumulation de métabolites, une réduction du TSH est nécessaire. Une valeur de 12 h a été choisie, proche de celles utilisées dans la littérature. Une production stable de gaz, sans inversion des courbes de production de H_2 de CO_2 , a été établie avec diminution de la concentration des métabolites dans le milieu réactionnel. Cependant, la diminution du TSH conduit à une accélération du lessivage du milieu, avec une forte pression sélective sur les microorganismes, influant particulièrement sur la richesse bactérienne en diminution. A l'instar du mode RASB, le phylum *Firmicutes* est majoritaire dans le *consortium* bactérien du RAC avec au minimum 75% du total des séquences, l'espèce *Clostridium butyricum* étant majoritaire (53%) pour le test réalisé avec un TSH de 12 h.

A partir de la configuration opérationnelle du RAC, la mise en fonctionnement du bioréacteur membranaire (BRM) a été réalisée avec succès et a permis de valider les performances de ce dispositif innovant pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. L'utilisation du bioréacteur membranaire (BRM) offre d'excellents résultats puisque celui-ci montre une meilleure stabilité de la production d'hydrogène que les tests en RAC. Dans les conditions opératoires testées, l'utilisation d'un TSH de 12 h et le dégazage de la solution d'alimentation en substrat a permis d'améliorer les performances en permettant une production efficace de H_2 pendant plus de 400 h. Par rapport au fonctionnement RAC, le BRM a permis une amélioration nette du rendement (> + 90%) et de la productivité (> + 300%) pour des TSH de 12 h et 18 h. L'absence d'agitation au sein du BRM, permet de conserver les matières en suspension dans le système et d'éviter le lessivage préjudiciable en fonctionnement RAC. Il a été montré qu'un TSH élevés (46 h) conduit à une baisse de production d' H_2 à cause d'une concentration élevée en acides acétique et/ou butyrique. Durant la production d' H_2 , une majorité de bactéries du phylum *Firmicutes* a également été détectée dans le BRM, avec

V. Mise en fonctionnement du réacteur agité en continu (RAC) et du bioréacteur membranaire (BRM)

une diversité microbienne beaucoup plus importante que dans le RAC, ceci étant lié à la réduction du lessivage des bactéries à développement lent. Les bactéries majoritaires dans le BRM sont *Clostridium butyricum* (10,7%) et *Sporolactobacillus laevolacticus* (8,5%) ainsi que *Clostridium (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)* (4,7%), bactéries également observées dans le RAC.

L'utilisation de ce dispositif sans boucle de recirculation a été testée, sans diminution des critères de performances de production d'H₂. L'utilisation de la boucle de recirculation a été conservée, dans cette étude dans une optique d'optimisation paramétrique, elle pourra être supprimée dans le cadre d'une utilisation industrielle. La robustesse du *consortium* microbien utilisé dans notre système a été prouvée à plusieurs reprises, avec une reprise efficace de la production à la suite de différents aléas technique comme l'arrêt du chauffage du milieu, ceci étant probablement lié à la stabilisation du *consortium* dans la calandre du BRM. Les modes de fonctionnement avec et sans gaz de balayage dans les fibres creuses du module membranaire ont été testés, démontrant l'utilisation possible de ces deux modes, avec un avantage pour la configuration avec gaz de balayage, grâce à l'évacuation rapide des gaz produits dans le milieu non agité. Le gaz de balayage est cependant utilisé à un débit réduit ($\approx 20 \text{ mL/L}_{\text{milieu}}/\text{min}$) ce qui pourra être optimisé.

Le chapitre suivant de cette étude porte sur l'intensification du fonctionnement du BRM, avec dans un premier temps le renouvellement en nutriments du milieu fermentaire pour limiter l'appauvrissement de celui-ci, puis l'utilisation d'un substrat réel issu de biomasse agricole comme solution d'alimentation continue, permettant de prouver la faisabilité de ce dispositif pour une production d'H₂ en conditions réelles. Enfin, la possibilité de faire fonctionner le bioréacteur sans réaliser d'apport d'*inoculum* frais sera envisagée.

VI. Etudes complémentaires sur le bioréacteur membranaire (BRM)

L'objectif de ce dernier chapitre exploratoire est de mettre en œuvre le bioréacteur membranaire (BRM) avec différentes solutions d'alimentation afin d'en améliorer les performances puis de prouver la faisabilité du procédé en conditions réelles.

L'apport ponctuel de composés nutritifs est réalisé dans un premier temps, afin de contrer la baisse de production observée suite au lessivage du milieu. Puis, dans un second temps, un ajout en continu d'un mélange modèle de nutriments, permettra le renouvellement nutritionnel complet du milieu réactionnel. En plus de l'apport de glucides (contenant le carbone), réalisé par l'ajout de glucose, le métabolisme microbien nécessite en effet l'apport de différents nutriments pour la croissance et la production de gaz [73,102]. Le principal nutriment est l'azote, suivi du phosphate et de certains métaux en plus faible quantité, en particulier le fer, le magnésium et le nickel. Le manque de nutriments, lié au lessivage du milieu réactionnel pendant la fermentation, limite et modifie l'activité microbienne, dont les voies de production peuvent se modifier avec la sélection de microorganismes non producteurs d'hydrogène.

Le fonctionnement du BRM a ensuite été testé avec pour alimentation, un substrat organique complexe réel issu de l'agriculture, permettant d'envisager l'application du procédé en conditions réelles. Le substrat sélectionné pour cette étude est composé de bourbes, issues de la filière viticole, dont les performances de production d'hydrogène ont été prouvées en mode de fonctionnement semibatch [116,246]. Cette expérience possède cependant un fort caractère exploratoire, ce substrat n'ayant jamais été utilisé en fonctionnement continu.

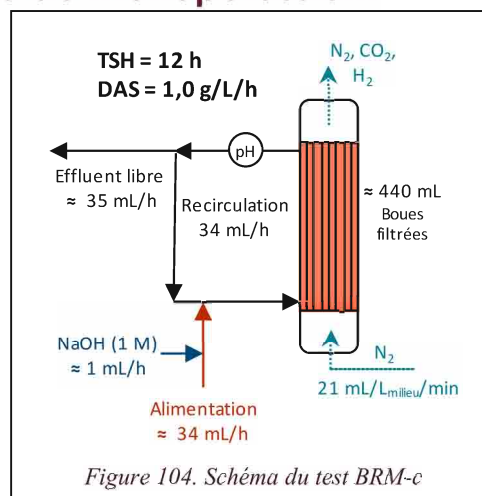
Enfin, la présence d'un biofilm à la surface des fibres creuses du module membranaire a été expérimentée dans le but d'utiliser celui-ci comme *consortium* microbien pour produire de l'hydrogène sans apport d'*inoculum* externe. On notera l'aspect exploratoire de ce test de fermentation dont le succès permettrait d'envisager une utilisation simplifiée du BRM, qui peut être un atout important dans la perspective d'une utilisation industrielle de ce procédé de production d'hydrogène.

VI.A. Ajout de nutriments

Au cours des tests de fermentation, un renouvellement du milieu réactionnel s'opère jusqu'à cinq fois en 68 h de fermentation avec un TSH de 12 h, avec l'ajout d'une solution de substrat ne contenant que du glucose. Les nutriments initialement présents dans les boues acclimatées sont donc rapidement évacués vers l'effluent. Dans le but de tester l'impact de l'ajout de nutriments sur l'activité microbienne, l'ajout de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) permet le renouvellement du milieu en phosphate, essentiel pour le métabolisme [100,101], en particulier pour l'activité de transfert énergétique des adénosines diphosphate et triphosphate [66]. Hawkes *et al.* [159] indiquent que l'absence de phosphate dans le milieu réactionnel peut être à l'origine d'une déviation de la production d'hydrogène vers la solvantogénèse. L'ajout ponctuel de ce nutriment dans le milieu réactionnel a donc été réalisé, après 149 h de fermentation, après un lessivage important du milieu réactionnel. Dans un second temps, le renouvellement en continu du milieu réactionnel avec un mélange modèle de nutriments a été réalisé via la solution d'alimentation.

VI.A.1. Ajout ponctuel de phosphate de monopotassium

Le test de fermentation **BRM-c** (Figure 104), en fonctionnement sur une période de fermentation de plus de 100 h présente une baisse progressive de la production de gaz au cours du temps, après la phase initiale de fermentation (Figure 105). Ce phénomène est potentiellement dû au lessivage du milieu réactionnel initial composé exclusivement des boues activées de station d'épuration et à son épuisement en éléments nutritifs nécessaires à la fermentation, le renouvellement du milieu n'apportant que du glucose et du NaOH (pour la régulation du pH) au consortium microbien présent dans la calandre.



L'ajout de KH_2PO_4 dans le milieu réactionnel (0,85 g soit environ 1,9 g/Lmilieu ou 14,1 mmol/Lmilieu) a été réalisé ponctuellement via la vanne de prélèvement situé sur la voie de recirculation du milieu réactionnel. L'impact de cet ajout est clairement visible sur le profil de production de gaz (Figure 105), avec une augmentation de la production de H_2 et de CO_2 , avec un temps de latence d'environ 6 h, ce qui correspond au temps nécessaire au milieu réactionnel pour parcourir l'ensemble de la calandre.

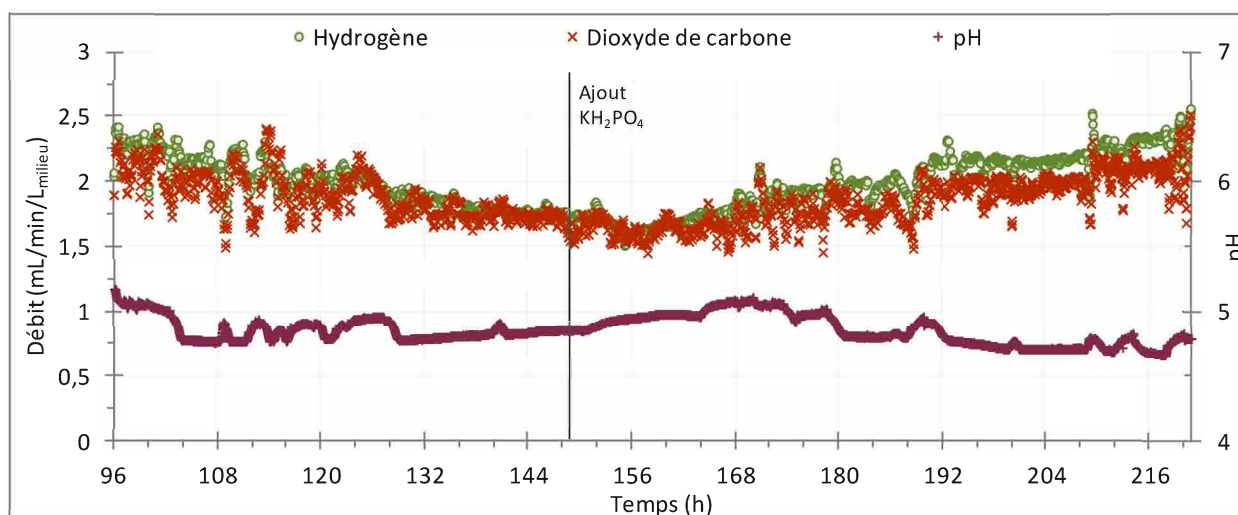


Figure 105. Débits de H_2 et CO_2 et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avant et après ajout ponctuel de KH_2PO_4 en cours de fermentation

Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($\text{DAS} = 1,0 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $21 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$; taux de recirculation de 0,9 ; TSH de 12 h ; ajout ponctuel de KH_2PO_4 ($1,9 \text{ g}/\text{L}_{\text{milieu}}$) à 149 h

L'augmentation du débit de production d'hydrogène se poursuit sur plusieurs dizaines d'heures, correspondant à environ trois fois le TSH du système, jusqu'à atteindre $2,5 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$. Entre 149 h et 221 h, le débit d'hydrogène a une progression de 48%. Une amélioration moyenne de 7% du rendement et de la productivité en hydrogène est mesurée entre avant la période (101 h - 149 h) et celle après l'ajout de KH_2PO_4 (170 h - 221 h), tandis que le rapport H_2/CO_2 ne semble pas significativement impacté, bien que légèrement amélioré (Tableau 53). Les rapports molaires B/A et $\text{H}_2/2(\text{B}+\text{A})$ restent également relativement stables, respectivement autour de 0,6 et 0,95. Ceci semble indiquer que l'ajout de KH_2PO_4 ne modifie pas significativement le métabolisme microbien, qui reste efficace pour la production d'hydrogène ; le rapport $\text{H}_2/2(\text{B}+\text{A})$ étant proche de 1.

VI.A. Ajout de nutriments

Tableau 53. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose, avant et après ajout ponctuel de KH_2PO_4 en cours de fermentation pour le test de fermentation BRM-c

	Période étudiée	Rendement (mol_{H_2}/mol hexose ajouté)	Rendement (mol_{H_2}/mol_{hexose} consommé)	Productivité ($mL_{H_2}/L_{milieu}/h$)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/2(B+A)$	Hexose consommé (%)
Phase initiale	de 101 à 149 h	0,92	1,33*	118	1,05	0,63*	0,97*	69*
Phase post ajout KH_2PO_4	de 170 à 221 h	0,99	1,27*	127	1,09	0,64*	0,92*	78*

* Résultats calculés avec une estimation de la concentration en hexose et métabolites

L'observation des métabolites produits au cours de cette période (Figure 106) permet de confirmer l'absence d'impact majeur sur l'équilibre de la production d'acides organiques. Les débits de production d'acétate et de butyrate augmentent semblablement d'environ 20%. Une augmentation de la production d'éthanol peut cependant être observée après 188 h, celle-ci s'accompagnant de l'augmentation de la production de dioxyde de carbone. Durant cette période, on notera une augmentation moyenne de 30% du débit consommation de substrat par rapport à la phase précédente.

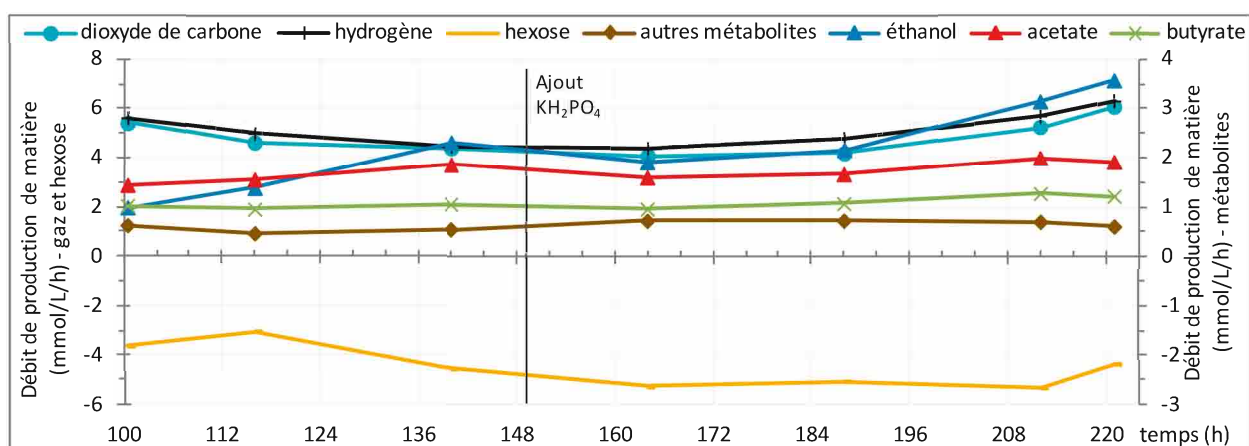


Figure 106. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, avant et après ajout ponctuel de KH_2PO_4 en cours de fermentation pour le test de fermentation BRM-c

Les bilans carbone réalisés sur les périodes avant et après cet ajout ponctuel de KH_2PO_4 sont présentés sur la Figure 107. Un recouvrement assez faible, entre 75 et 80% est observé pour ces deux phases, impliquant qu'une partie assez importante du carbone apporté par le substrat est conservé dans le milieu pour la croissance microbienne ou est utilisé pour la production de métabolites non quantifiables par les méthodes utilisées dans cette étude. Une amélioration de la consommation du substrat peut être observée, avec la part de substrat résiduelle initialement de 30%, réduite à 9% du carbone initial. Ce substrat est cependant utilisé principalement pour la production d'éthanol, qui est doublée ; celle de l'acétate et du butyrate augmentant d'environ 20%.

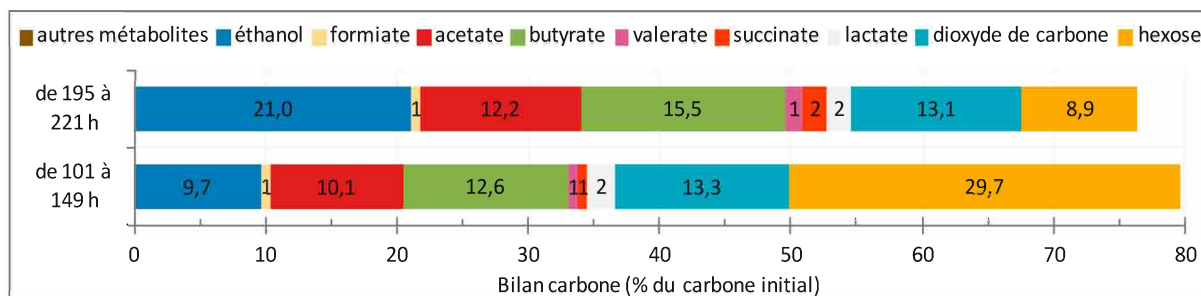


Figure 107. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée

L'étude de Suzuki *et al.* [247] a montré l'effet positif de l'ajout de phosphate (K_2HPO_4 ou Na_2HPO_4 , indépendamment à 25 mmol/L_{milieu}) dans un bioréacteur de digestion anaérobie en mode de fonctionnement clos (batch) avec une amélioration de la productivité en biogaz par rapport au test de référence, confirmant l'effet positif de ce nutriment pour l'activité microbienne par une accélération du métabolisme.

L'ajout ponctuel de KH_2PO_4 dans le milieu fermentaire, épuisé en matières métabolisables par un lessivage important (> 10 fois le TSH), a permis d'inverser l'évolution de la courbe de production d'hydrogène, avec une amélioration moyenne du rendement et de la productivité de 7%. Ces résultats montrent l'intérêt de l'ajout ponctuel de nutriments pour entretenir les performances de production d'hydrogène sur le long terme tout en conservant le métabolisme microbien, et ainsi éviter la baisse de régime liée à l'épuisement en nutriments du milieu réactionnel. Afin de confirmer l'impact positif de l'apport de nutriments au système, l'ajout d'un mélange de nutriments, en continu, a été effectué pendant la fermentation, via la solution d'alimentation en substrat.

VI.A.2. Ajout en continu d'un mélange complet de nutriments

Dans une optique de fonctionnement prolongé, un ajout de nutriments à la solution de substrat doit être réalisé pour un apport complet et constant. Fondée sur les concentrations utilisées et recommandées dans la littérature [62,73,102], une solution type de substrat a été préparée pour alimenter le bioréacteur membranaire. Cette solution permet de renouveler le milieu en nutriments nécessaires au métabolisme microbien. Celle-ci contient du phosphate de monopotassium, du sulfate d'ammonium, du sulfate de fer, du sulfate de magnésium et du chlorure de nickel (concentrations précisées dans le paragraphe II.A.2). Deux tests de fermentation, **BRM-f** et **BRM-g**, ont été réalisés en utilisant des conditions identiques à celles des tests de fermentation de référence présentés au paragraphe V.B.2.2, complété par l'apport continu de nutriments dans la solution d'alimentation en glucose (Figure 108).

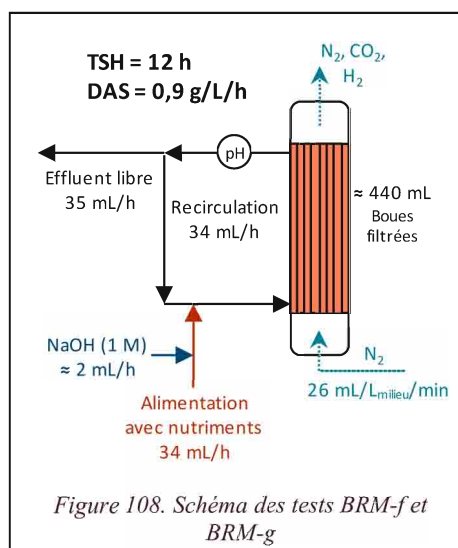


Figure 108. Schéma des tests BRM-f et BRM-g

VI.A. Ajout de nutriments

Les profils de production obtenus avec ajout de nutriments sont présentés sur la Figure 109 - a. On remarque que les profils de ces deux tests sont assez similaires et présentent un débit de production de H₂ supérieur à ceux obtenus sans utilisation de nutriments durant les 40 premières heures de fonctionnement (Figure 109 - b). Cependant, une baisse de régime apparaît par la suite avec une stabilisation de la production à 1,7 mL_{H2}/L_{milieu}/min vers 50 h. De plus, à cette période, une augmentation de la production de CO₂ est observée, dépassant alors la production de H₂. Comme pour tous les tests pour lesquels une inversion des courbes de production d'H₂ et de CO₂ est observée, une modification dans le métabolisme est sûrement à l'origine de ce phénomène.

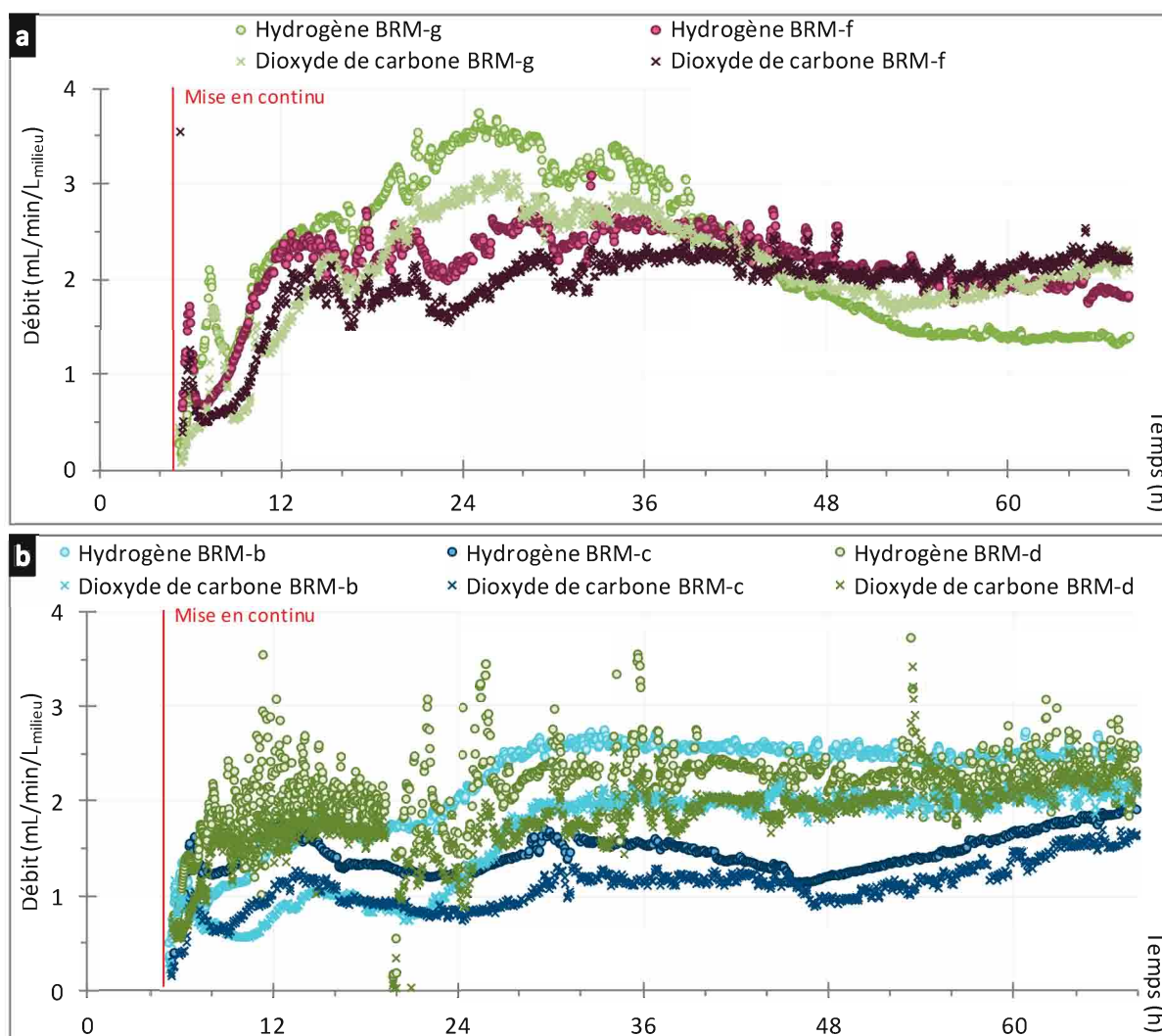


Figure 109. Débit de production de gaz en fonction du temps pour les tests de fermentation BRM-f et BRM-g avec alimentation avec nutriments (a) et des tests de fermentation BRM-b, BRM-c et BRM-d avec alimentation sans nutriments (b)

(a) BRM-f et BRM-g : Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 0,9 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) + nutriments ; débit de gaz de balayage (N_2) de $26 \pm 1 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$; taux de recirculation ≈ 1 ; TSH de 12,0 h

(b) BRM-b, BRM-c et BRM-d : Tests de fermentation réalisés à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 1,0 \pm 0,1 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $25 \pm 3 \text{ mL}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{min}$; taux de recirculation $0,9 \pm 0,1$; TSH de $11,6 \pm 0,9 \text{ h}$

Le Tableau 54 donne les résultats moyens obtenus pour les deux tests de fermentation avec nutriments (tests BRM-f et BRM-g) comparés à ceux obtenus sans l'utilisation de nutriments (tests BRM-b, BRM-c et BRM-d) sur la phase initiale de fermentation. Les résultats obtenus lors des deux tests de fermentation avec nutriments sont très proches, avec moins de variations que pour ceux obtenus avec les tests sans nutriments, cependant ces propos sont à moduler étant donné le nombre limité de tests

VI. Etudes complémentaires sur le bioréacteur membranaire (BRM)

de fermentation réalisés. Le rendement en fonction de la quantité d'hexose ajouté et la productivité en hydrogène moyenne sur la phase de fermentation étudiée sont compris dans l'écart-type calculé sur les valeurs obtenues sans utilisation de nutriments, bien qu'étant situés dans la gamme supérieure. La différence majeure est la consommation quasi-totale du substrat ajouté dans le milieu avec utilisation de nutriments, 97% contre 60%. L'ajout de nutriments permet donc une meilleure consommation du substrat, mais le substrat n'est pas plus utilisé pour la production d'hydrogène, comme l'indique le rendement en H₂ par mole d'hexose ajouté : 1,1 contre 1,0 sans l'utilisation de nutriment.

Tableau 54. Valeurs moyennes du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose pour les tests de fermentation avec et sans ajout de nutriments

Test de fermentation	avec/sans nutriments	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
BRM-f BRM-g	avec nutriments	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	138 ± 5	1,05 ± 0,01	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,1	97 ± 4
BRM-b BRM-c BRM-d	sans nutriment	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,4	128 ± 31	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,01 ± 0,04	63 ± 5

La présence des nutriments dans le milieu réactionnel semble donc permettre le développement de microorganismes non producteurs d'hydrogène et consommateurs du substrat ou l'activation de voies métaboliques concurrentes, ces deux hypothèses étant liées. Un rapport H₂/CO₂ de 1,05 est obtenu avec la présence de nutriments dans la solution de substrat. Ce rapport est légèrement plus faible que celui obtenu pour les tests sans nutriments, ce qui implique une production de CO₂ plus importante, coproduit par des voies métaboliques secondaires comme la solvantogénèse.

Un rapport molaire B/A augmenté de 60% est observé lorsque des nutriments sont ajoutés à la solution d'alimentation. Cette évolution s'explique par l'effet conjoint d'une production augmentée de butyrate et diminué d'acétate sur la période étudiée (Figure 110). Ces deux variations s'équilibrent et permettant de maintenir un rapport H₂/2(B+A) élevé à 0,9. L'utilisation préférentielle de la voie butyrate (17) pour la production d'hydrogène peut expliquer la diminution du rapport H₂/CO₂, mais en aucun cas l'augmentation de la consommation d'hexose. Le débit de production d'éthanol n'est pas sensiblement augmenté avec l'utilisation de nutriments ; la solvantogénèse ne peut donc pas expliquer l'augmentation du débit de production de CO₂. La production de lactate, relativement faible (< 1 mmol/L_{milieu}/h), est doublée. Ce dernier point a relativement peu d'impact sur la production de gaz, mais atteste d'une évolution du métabolisme. L'augmentation de la consommation de substrat est nettement observée, avec 5,0 contre 3,5 mmol/L_{milieu}/h, respectivement avec et sans l'ajout en continu du mélange de nutriments.



VI.A. Ajout de nutriments

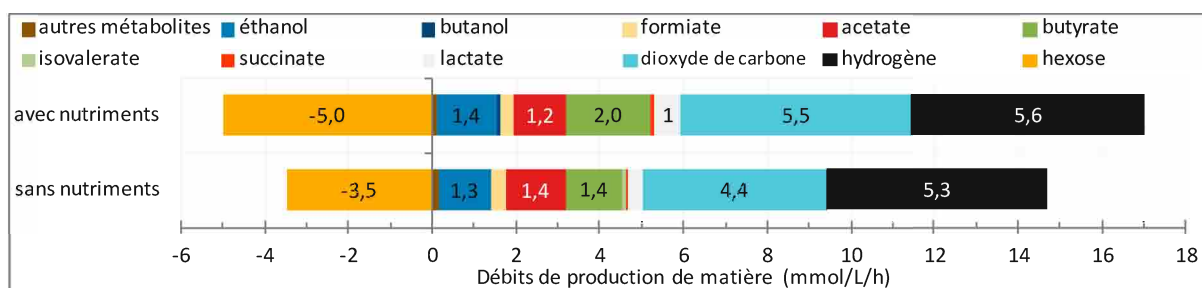


Figure 110. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, pour les tests de fermentation avec et sans ajout de nutriments

L'établissement du bilan carbone sur ces tests de fermentation permet d'identifier les voies du métabolisme favorisées par l'utilisation de nutriments dans l'alimentation (Figure 111). Les résultats montrent clairement une augmentation importante de la part de carbone initial utilisé pour la production de butyrate pendant la fermentation, augmentant de 16,3 à 25,6%. La réduction de la production d'acétate a un impact plus limité, ce qui s'explique par la quantité de carbone inférieure présente dans cette molécule, 2, par rapport à celle de butyrate, 4. Malgré un débit de production très faible, la part de carbone utilisé pour la production d'acide lactique représente 6,2% du bilan total lorsque les nutriments sont ajoutés, ce qui est supérieur à la quantité résiduelle d'hexose dans le milieu (3%). En effet, l'augmentation de la consommation du substrat est remarquable avec une baisse de 91% de la part du bilan carbone avec l'utilisation de nutriments.

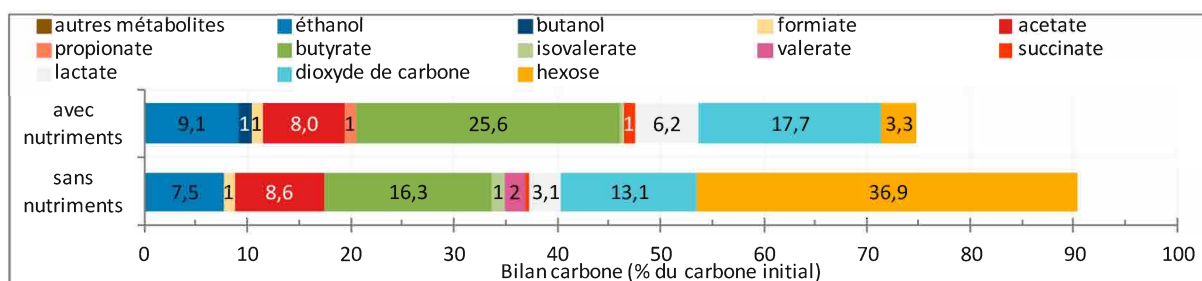


Figure 111. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présent dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée

Le recouvrement du bilan carbone est plus faible lors des tests réalisés avec apport de nutriments, le carbone du substrat consommé n'étant pas retrouvé dans les métabolites analysés. La présence d'autres voies métaboliques, activées par l'ajout de nutriments dans le milieu réactionnel est une possible explication à ce phénomène, ces métabolites n'étant pas quantifiés, donc pris en compte dans le bilan carbone. La production d'hydrogène restant importante et le substrat étant totalement consommé, l'identification des métabolites produits non identifiés est une première hypothèse.

Une seconde hypothèse est l'amélioration des conditions de croissance microbienne par l'ajout de nutriments dans le milieu, conduisant à une consommation importante de substrat dans cet objectif. La mise en place d'une méthode de quantification de la croissance microbienne permettrait d'évaluer son impact sur le bilan carbone. Le suivi de la demande chimique en oxygène (DCO), des matières en suspension totales et volatiles (MES et MESV) ou de la densité optique du milieu, en entrée et sortie du système, pourrait apporter une bonne estimation de l'évolution de cette croissance dans le temps.

L'ajout de nutriments en continu réalisé dans cette étude a eu un impact significatif sur le métabolisme microbien par rapport au fonctionnement avec le glucose seul. Les performances de production d'hydrogène sont similaires à celles obtenus sans apport de substrat, tandis qu'une

augmentation importante de la consommation en substrat a été observé, liée à une production supplémentaire de métabolites (butyrate, lactate,...) et, très probablement, à une croissance microbienne améliorée par la présence de nutriments.

VI.A.3. Bilan de l'ajout de nutriments

Ces résultats ont montré l'impact positif de l'ajout ponctuel de phosphates (sous la forme de KH_2PO_4) dans le milieu fermentaire, permettant d'inverser l'évolution de la courbe de production d'hydrogène, avec une remontée du rendement et de la productivité. L'ajout ponctuel de nutriments peut donc être envisagé comme réponse à une baisse de performance de production, afin d'entretenir les performances de production d'hydrogène sur le long terme tout en conservant le métabolisme microbien.

Pour éviter la baisse de régime liée à l'épuisement en nutriments du milieu réactionnel, un apport continu de nutriments semblerait cependant une méthode plus appropriée. L'ajout d'un mélange varié de nutriments, en continu, a ainsi été réalisé dès le début de la fermentation, via la solution d'alimentation en substrat avec un impact important sur le métabolisme microbien, conduisant à une consommation quasi-totale du substrat, mais sans amélioration significative des performances de production d'hydrogène par rapport au fonctionnement avec le glucose seul. Cette consommation supplémentaire étant attribuée à la production de métabolites supplémentaires et/ou à une croissance microbienne améliorée. L'apport de nutriments, uniquement lorsque le régime permanent est atteint, peut être une solution.

La composition idéale du mélange de nutriments n'est pas standard, elle dépend des conditions de fonctionnement et de l'*inoculum* microbien utilisé. De plus, l'utilisation d'une biomasse comme substrat réel peut, en soi, constituer un renouvellement du milieu en nutriments si les éléments essentiels sont présents dans celle-ci. Un autre moyen de renouvellement des nutriments serait d'alimenter en continu le bioréacteur avec les boues de station d'épuration « fraîches » traitées thermiquement, acclimatées ou non ; le milieu réactionnel initial, formé exclusivement de ces boues, étant productif.

VI.B. Production d'hydrogène avec substrat réel : les bourbes viticoles

Pour cette étape, le potentiel de production d'hydrogène à partir de déchets agricoles fermentescibles réels a été étudié. Nous avons fait le choix de nous focaliser sur les résidus d'exploitations viticoles (lies, bourbes et marcs) dont le potentiel de production d'hydrogène a été prouvé en mode de fonctionnement RASB [246] en tant que substrat et *consortium* microbien. Ce substrat présente, en outre, une teneur élevée en sucres simples, glucose et fructose, permettant une production efficace d'hydrogène.

Cette biomasse fermentescible est considérée comme un déchet organique dont la gestion représente l'un des problèmes les plus importants auxquels doit faire face l'industrie mondiale du vin [248]. Les lies, bourbes et marcs constituent actuellement ce que l'on appelle les prestations viniques. Compte tenu des quantités élevées produites chaque année par l'industrie du vin (850 000 tonnes de marcs de raisin et 1,5 million d'hectolitres de lies et de bourbes envoyées chaque année aux distilleries françaises [249]), la valorisation de ces déchets représente un fort intérêt, tant pour les producteurs de

VI.B. Production d'hydrogène avec substrat réel : les bourbes viticoles

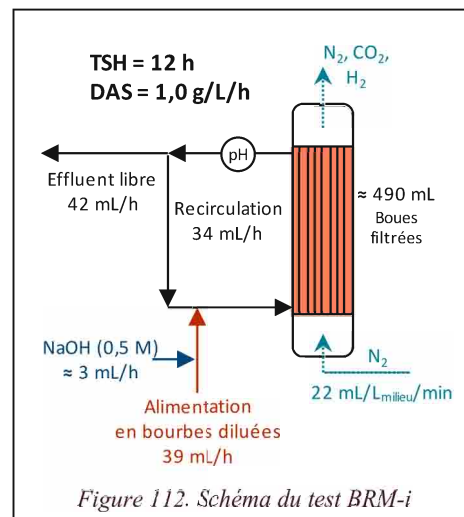
vin (complément de revenus) que pour l'industrie de l'énergie (nouvelle ressource pour la production d'énergie renouvelable).

Dans cette étude, notre choix s'est porté sur l'utilisation de la biomasse « bourbes » comme substrat pour alimenter le *consortium* microbien de la station d'épuration de Strasbourg utilisé précédemment avec un substrat modèle. Les bourbes correspondent au déchet obtenu pendant le débouillage du moût, obtenu par pressurage du raisin, avant fermentation. Elles contiennent donc une quantité importante de matières métabolisables ($DCO_{totale} \approx 250$ g/L), avec beaucoup de matières en suspension ($MES \approx 100$ g/L). Ce substrat présente l'intérêt d'être liquide, les matières métabolisables étant majoritairement solubilisées. Cette concentration en matières métabolisables étant trop élevée par rapport aux conditions utilisés précédemment dans cette étude, une dilution a donc été réalisée dans l'eau du réseau de Strasbourg afin d'obtenir une concentration d'environ 12 g/L, permettant d'appliquer au BRM un DAS de 1 g/L_{milieu}/h avec un TSH de 12 h.

Ces conditions de fermentation sont identiques à celles utilisées avec substrat modèle (tests BRM-b, BRM-c et BRM-d – paragraphe V.B.2.2), permettant de comparer directement le potentiel de production d'hydrogène de cette biomasse en mode de fonctionnement continu avec le BRM.

Le test de fermentation **BRM-i** a été réalisé dans des conditions identiques aux conditions initiales mises en place pour le test de fermentation BRM-b (Figure 112). Des bourbes issues des moûts de raisins du cépage Riesling du domaine Pfister (vendanges 2014) ont été utilisées. Ces bourbes sont donc diluées dans l'eau du réseau de Strasbourg afin d'obtenir une concentration équivalente à celle utilisée pour le substrat modèle ($12,1 \pm 0,9$ g_{hexose}/L), et ajustées à pH 7,0 avant d'être stockées à 4°C, dans le réservoir d'alimentation, afin de limiter le développement microbien.

Le profil de production de gaz obtenu avec l'utilisation de ces bourbes comme substrat est présenté sur la Figure 113. Trois phases de fermentation sont observées, avec une première phase d'acclimatation qui dure le temps nécessaire à deux renouvellements du milieu réactionnel, permettant une bonne acclimatation du *consortium* à cette solution d'alimentation complexe. Une production modérée de H₂, avec environ 1,5 mL/L_{milieu}/min est observée sur cette phase, augmentant ensuite à environ 2,5 mL/L_{milieu}/min sur la phase 2 de production stable. Une déviation de la production avec diminution de la production de H₂, accompagnée d'une légère augmentation de celle de CO₂ est cependant observée à partir de 96 h, s'intensifiant sur la phase 3.



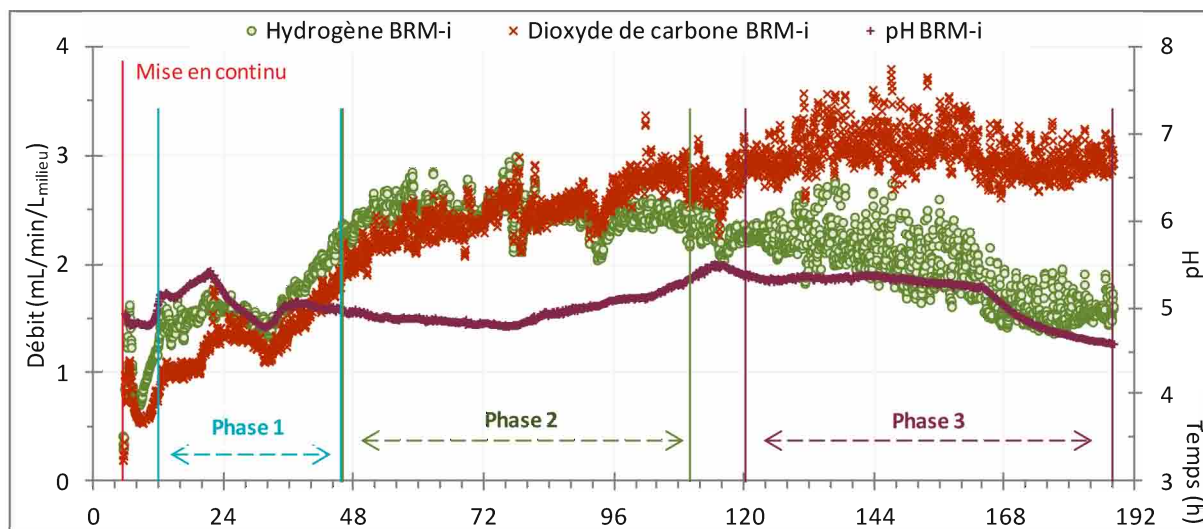


Figure 113. Débits de H_2 et CO_2 en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-i avec l'utilisation de bourbes comme substrat

BRM-i : Test de fermentation réalisé à partir de boues activées de la zone anoxie en BRM (0,44 L) ; température de fermentation de $38^\circ C$; bourbes (Riesling) diluée dans l'eau ajoutées comme substrat ($DAS = 1,0 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) ; débit de gaz de balayage (N_2) de $22 \text{ mL}/L_{\text{milieu}}/\text{min}$; taux de recirculation de 0,8 ; TSH de 11,5 h

Le Tableau 55 donne les résultats de production obtenus sur ces trois phases de fonctionnement, comparés aux résultats moyens obtenus pour les tests de fermentation avec substrat modèle. Un rendement maximal de $1,66 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$ est observé sur la première phase, lié à une productivité modérée de $98 \text{ mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$. La consommation d'hexose augmente fortement sur la seconde phase de production de H_2 passant de 51 à 83% d'hexose consommé, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la productivité à $148 \text{ mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$, située dans la gamme haute des résultats obtenus avec un substrat modèle (en moyenne $128 \pm 31 \text{ mL}_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$). Entre la phase initiale et la deuxième phase de production, le rendement en H_2 par mole d'hexose ajouté augmente de 50% tandis que le rendement en H_2 par mole d'hexose consommé est réduit de 20%. Ceci implique la consommation d'une part importante du substrat pour la production de métabolites secondaires.

Tableau 55. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-i avec l'utilisation de bourbes comme substrat et des tests de fermentation BRM-b, BRM-c et BRM-d avec alimentation en substrat modèle

Etape	phase étudiée	Rendement ($\text{mol}_{H_2}/\text{mol}$ hexose ajouté)	Rendement ($\text{mol}_{H_2}/\text{mol}$ hexose consommé)	Productivité ($\text{mL}_{H_2}/$ L_{milieu}/h)	H_2/CO_2	B/A	$H_2/$ $2(B+A)$	Hexose consommé (%)
Phase 1	de 12 à 45 h	0,76	1,66	98	1,22	0,87	0,96	51
Phase 2	de 45 à 110 h	1,15	1,32	148	0,99	0,78	0,84	83
Phase 3	de 120 à 188 h	0,91	0,90	117	0,64	0,85	0,43	97
BRM-b	de 26 à 68 h	$1,0 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,4$	128 ± 31	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$1,01 \pm 0,04$	63 ± 5
BRM-c	de 17 à 77 h							
BRM-d	de 26 à 93 h							

Sur la troisième phase, représentant la déviation de la production, un rendement diminué d'environ 20% est observé par rapport à la phase 2. Le rapport H_2/CO_2 moyen final est de 0,64, soit 35% plus faible que celui de la phase de production 2. Une consommation importante du substrat est toujours observée (97%). Des voies métaboliques non coproductrices de H_2 semblent être activées par l'alimentation en bourbes. Le développement de voies métaboliques secondaires peut-être dû à

VI.B. Production d'hydrogène avec substrat réel : les bourbes viticoles

l'introduction de bactéries non coproductrices d'hydrogène, s'adaptant aux conditions continues et consommant le substrat au détriment des bactéries productrices d'hydrogène.

Au cours du test de fermentation, le rapport molaire B/A reste relativement stable, autour de 0,83, soit avec une production d'acétate légèrement plus élevée que celle de butyrate, et une quantité d'acétate en moyenne plus élevée que pour les tests réalisés avec apport de substrat modèle pour lesquels le rapport B/A moyen était de 1,0. La production de ces deux métabolites (Figure 114) n'est cependant pas stable, avec une augmentation progressive des débits au cours du test. Cette augmentation de débit n'étant pas accompagnée proportionnellement de celle de la production d'hydrogène, le rapport molaire $H_2/2(B+A)$ diminue à chaque étape du test de fermentation. Ce rapport dans la première phase est de 0,96, équivalent au résultat moyen avec glucose seul (1,01). Ce rapport $H_2/2(B+A)$ initial est maintenu sur la seconde phase avec 0,84, mais est ensuite réduit à 0,43 après la déviation de la production, indiquant une modification du métabolisme microbien, sans doute liée à la consommation d'hydrogène, par homoacétogénèse (26) ; l'augmentation de la production de butyrate (17) ne permettant pas de maintenir la production d'hydrogène.

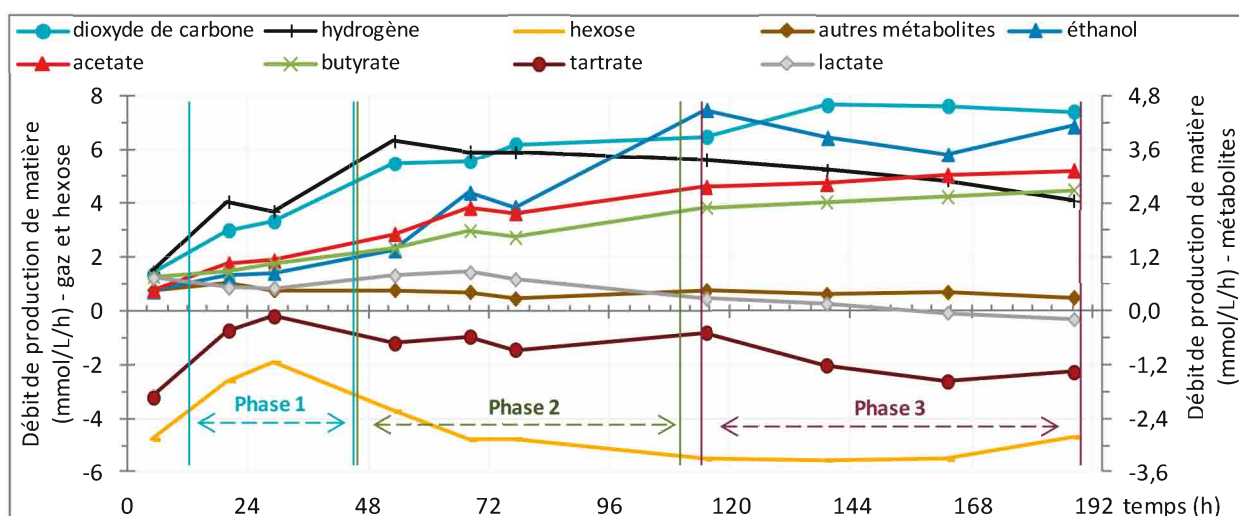


Figure 114. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-i

L'évolution de la production de métabolites montre bien le lien entre l'augmentation de la production de dioxyde de carbone à partir de 96 h, et de celle d'éthanol, ces deux molécules étant les coproduits de la solvantogénèse. La troisième phase de fonctionnement est également concomitante avec la baisse de la production de lactate, dont la production n'a pourtant pas de lien direct avec la production de CO_2 . Ces changements indiquent une modification importante du métabolisme et potentiellement des bactéries actives, celles apportées par les bourbes entrant en compétition avec celles initialement présentes dans l'*inoculum* microbien de la station d'épuration.

La solution d'alimentation en substrat, composée de bourbes diluées, contient majoritairement des sucres (glucose et fructose) et du tartrate, molécule issue du raisin, avec respectivement 66,5 et 24,5 mmol/L_{milieu} (Figure 115). La présence de tartrate dans le milieu réactionnel est notable ; sa concentration atteignant environ 15 mmol/L_{milieu}, soit du même ordre de grandeur que les concentrations des métabolites principaux produits. Plusieurs voies métaboliques peuvent être à l'origine de la consommation du tartrate pour la production d'acétate, de CO_2 , de succinate et de

VI. Etudes complémentaires sur le bioréacteur membranaire (BRM)

lactate par des bactéries lactiques [250] ou via le pyruvate, l'acétate, l'H₂, et le CO₂ par certaines clostridies avec coproduction de butyrate [251]. Le tartrate est consommé avec un débit qui s'accroît avec l'avancement du test de fermentation, jusqu'à 1,2 mmol/L_{milieu}/h, ce qui peut s'expliquer par l'arrivée dans le milieu d'une population de microorganismes issue des bourbes, par exemple des bactéries lactiques, adaptées à ce substrat [250]. La valeur du DAS étant calculée par rapport à la quantité seule d'hexose présente dans le milieu, la présence de tartrate augmente l'apport réel en matières métabolisables.

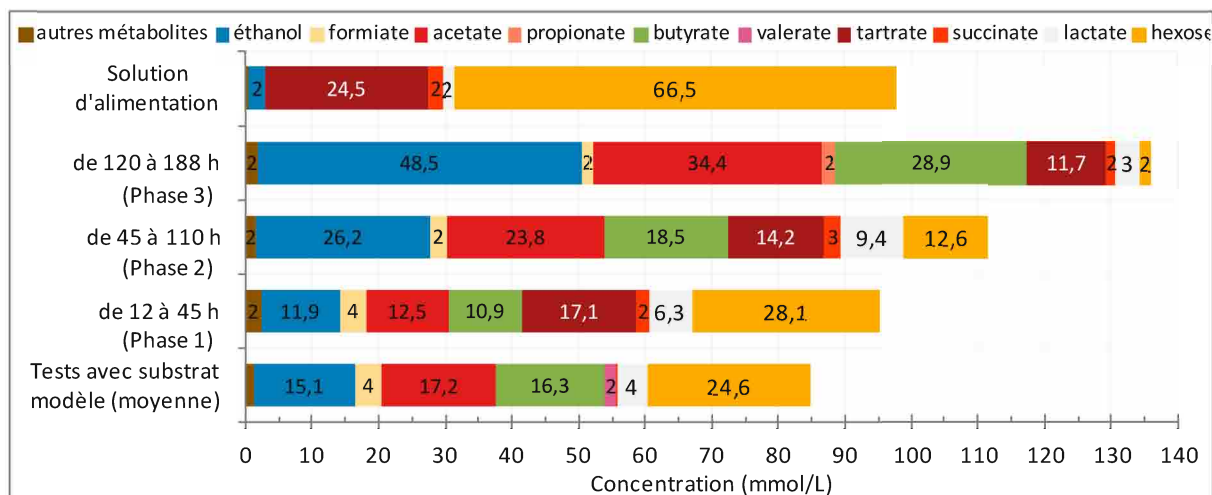


Figure 115. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, en fonction du temps pour le test BRM-i et concentration moyenne des échantillons prélevés dans le réservoir d'alimentation au cours du test BRM-i – comparaison avec la moyenne des résultats obtenus pour les trois tests de fermentation réalisés avec l'utilisation de substrat modèle (BRM-b, BRM-c et BRM-d)

Cet apport supplémentaire de substrat devrait être considéré pour la comparaison des performances de diverses biomasses métabolisables, le sucre n'étant pas le seul substrat potentiellement utilisable par le consortium microbien. Une demande chimique en oxygène (DCO) de 267 g/L a été déterminée pour ces bourbes, principalement liée au sucre au tartrate. L'utilisation de la DCO permet d'apporter plus d'information sur le potentiel d'une biomasse réelle pour la production d'hydrogène. L'augmentation de la consommation en hexose est observée avec l'avancement du test de fermentation, atteignant la quasi-totalité du substrat ajouté. Cependant, ce substrat n'est pas utilisé pour une production efficace d'hydrogène, qui est consommé pour la production d'acétate. De plus, une forte production d'éthanol est également observée.

La composition du milieu réactionnel dans la seconde phase de fermentation (de 45 h à 110 h) peut être comparée aux résultats moyens obtenus pour les tests de fermentation avec substrat modèle. Une concentration globale supérieure en métabolites est observée, pour l'éthanol (+ 74%), l'acétate (+ 38%), le butyrate (+ 14%) et le lactate (+ 121%), ce qui explique que la quantité de glucides soit réduite de 49%.

La Figure 116 présente les bilans carbone obtenus pour les trois phases de fonctionnement de ce test de fermentation. Une évolution importante de la composition du bilan peut être observée, le recouvrement global restant cependant stable, autour de 90%, équivalent au résultat avec substrat modèle. Sur la première phase de fonctionnement, une part importante de substrat résiduel est observée, avec des parts de carbone de 40% pour l'hexose et de 16% pour le tartrate. Cette proportion est ensuite fortement réduite jusqu'à la troisième phase de fermentation, avec respectivement, pour l'hexose et le tartrate, une réduction 94% et 54% de la part de carbone initial résiduelle correspondante,

VI.B. Production d'hydrogène avec substrat réel : les bourbes viticoles

par rapport à la phase initiale. La part de substrat résiduel moyenne lors des tests réalisés avec substrat modèle est bien supérieure avec 36.9% de carbone issu du glucose, et non utilisé pour la production de métabolites ou de dioxyde de carbone.

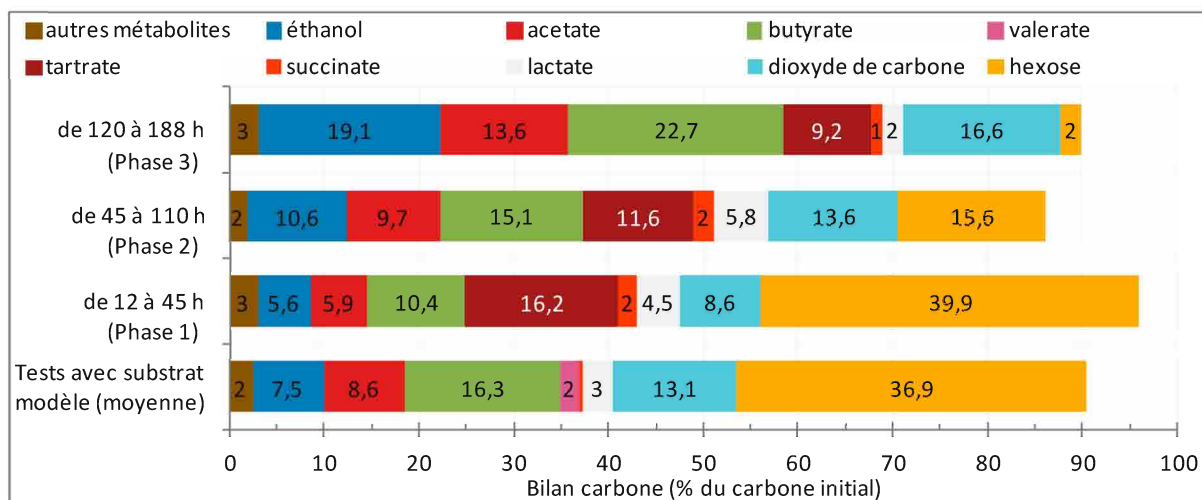


Figure 116. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée pour le test BRM-i – comparaison avec la moyenne des résultats obtenus pour les trois tests de fermentation réalisés avec l'utilisation de substrat modèle (BRM-b, BRM-c et BRM-d)

Une augmentation graduelle de la part des trois métabolites principaux produits (butyrate, acétate et éthanol) et du dioxyde de carbone est observée, avec au minimum une multiplication par deux entre la phase 1 et la phase 3.

Cette étude exploratoire sur l'utilisation d'un substrat réel, riche en glucides, pour l'alimentation en matières métabolisables du consortium microbien du BRM a été conduite avec succès. L'apport de bourbes diluées comme substrat a permis de mettre en évidence la faisabilité de ce procédé de production d'hydrogène avec un substrat réel d'origine agricole. Les performances obtenues avec l'utilisation de bourbes sont équivalentes à celles obtenus avec le substrat modèle, dans des conditions de fonctionnement identiques. Une consommation supérieure en substrat (+ 33%) a été observée, avec une production de métabolites plus importante, en particulier d'éthanol (+ 74%), qui peut être liée à un apport de bactéries endogènes aux bourbes.

L'utilisation d'une biomasse viticole riche en glucides et autres nutriments, tel que les bourbes, est attractif pour la production de biohydrogène. Cette biomasse s'est montrée relativement efficace, bien que l'apport de nouveaux microorganismes endogènes à la biomasse agricole, semble avoir modifié le consortium microbien actif et le métabolisme général dans le BRM. Le renouvellement du consortium microbien en continu, accompagné d'un apport complet en nutriments permet cependant d'envisager une stabilité importante du procédé de production sur le long terme. La filtration des bourbes pourrait limiter en partie les perturbations liées à l'apport de microorganismes exogènes au consortium initial de production d'hydrogène. D'autres méthodes de désactivation, plus efficace, de l'activité microbienne sont envisageables (pasteurisation, irradiation microondes, ultrasons, autoclave, etc.) afin de conserver les matières organiques métabolisables présentes initialement. Le potentiel des bourbes viticoles pour la production d'hydrogène est prouvé en mode de fonctionnement RASB [116,246], sans apport du

VI.C. Mise en évidence d'un biofilm dans le BRM

De façon surprenante, une production importante d'hydrogène a été observée dans le bioréacteur (Figure 118), avec un débit de production en hydrogène élevé, de 3,5 mL/L_{milieu}/min, équivalent à celui obtenu avec apport microbien externe. Cette production de H₂ débute progressivement avec un temps de latence de 13,8 h puis se stabilise 23 h après le début de l'alimentation du BRM. Une inversion des profils de production de H₂ et CO₂ a lieu entre 39 h et 60 h (heure exacte inconnue liée à d'un problème d'acquisition de données de µGC-TCD). La production de gaz se stabilise vers 80 h avec un débit de production de H₂ à 2 mL/L_{milieu}/min et de CO₂ à 2,5 mL/L_{milieu}/min.

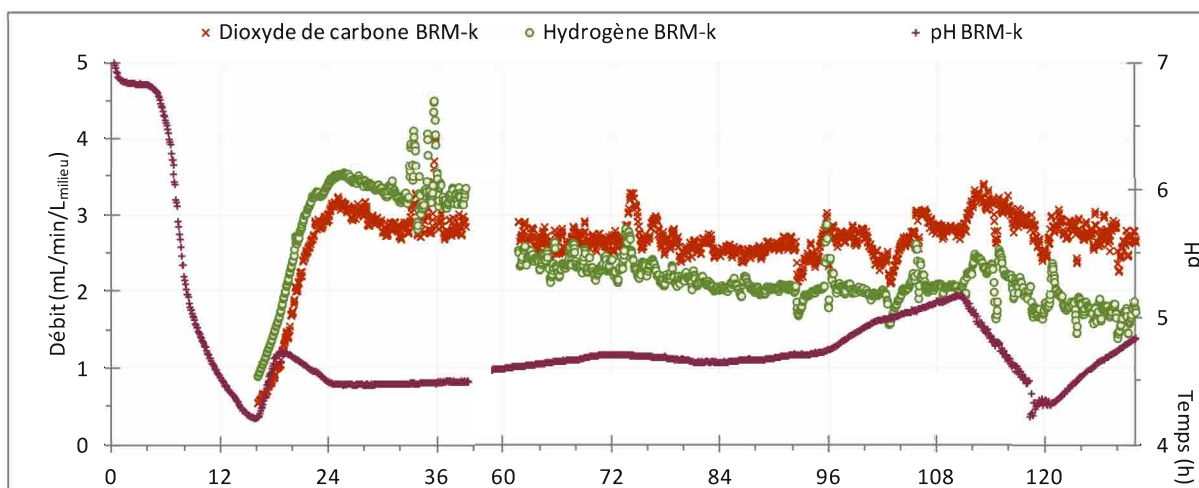


Figure 118. Débits de H₂ et CO₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-k sans apport d'inoculum microbien extérieur(a) et pour les tests de fermentation BRM-f et BRM-g avec apport de boues activées comme inoculum microbien (b)

(a) BRM-k : Tests de fermentation réalisés sans apport externe d'inoculum en BRM (0,44 L) ; température de fermentation régulée à 38°C ; glucose ajouté comme substrat ($DAS = 1,0 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) + nutriments ; débit de gaz de balayage (N₂) de 23 mL/L_{milieu}/min ; taux de recirculation de 0,8 ; TSH de 11,6 h

Un très bon rendement en H₂ par mole d'hexose ajouté est observé sur la première phase de fonctionnement de 23 à 39 h, avec 2,24 mol_{H₂}/mol_{hexose} consommé, avec un taux de consommation en substrat important, et une productivité de 204 mL_{H₂}/L_{milieu}/h, valeur maximale sur l'ensemble de cette étude (Tableau 56). Sur la seconde phase de production, une légère baisse de ces résultats est observée (globalement 15%), mais restant tout de même importants, en particulier concernant la productivité avec 179 mL_{H₂}/L_{milieu}/h. La baisse du rapport H₂/CO₂ est de 27% entre les deux phases.

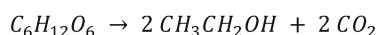
Tableau 56. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H₂/CO₂, B/A et H₂/2(B+A) et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-k (sans apport d'inoculum externe) comparé à la moyenne des tests de fermentation BRM-f et BRM-g réalisé avec apport de boues activées comme inoculum microbien

Test de fermentation	phase étudiée	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose ajouté)	Rendement (mol _{H₂} /mol hexose consommé)	Productivité (mL _{H₂} /L _{milieu} /h)	H ₂ /CO ₂	B/A	H ₂ /2(B+A)	Hexose consommé (%)
BRM-k	de 23 à 39 h	1,60	2,24	204	1,14	1,08	0,85	71
	de 60 à 134 h	1,41	1,44	179	0,83	2,35	0,68	99
BRM-f BRM-g	de 28 à 68 h	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	138 ± 5	1,05 ± 0,01	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,1	97 ± 4

La consommation en hexose augmente entre la phase initiale et la phase stabilisée, culminant à 99%, ce qui correspond aux résultats obtenus lors des tests de fermentation précédents avec l'utilisation de nutriments dans la solution d'alimentation.

VI. Etudes complémentaires sur le bioréacteur membranaire (BRM)

Les résultats de production de métabolites en fonction du temps sont présentés sur la Figure 119. Lors de la phase d'acclimatation, les productions d'acétate et butyrate augmente progressivement, les deux étant relativement proches, autour de 2,0 mmol/L_{milieu}/h à 46 h. Le rapport molaire H₂/2(B+A) calculé à 46 h de fonctionnement est proche de 1 (0,85) et correspond bien aux résultats obtenus pour les tests de fermentation en continu avec l'utilisation de la même solution d'alimentation avec nutriments. Sur la phase de fonctionnement principale (jusqu'à 68 h de fermentation), par rapport aux tests de fermentation réalisés avec apport d'un *inoculum* externe, la production d'acétate est plus élevée (+ 68%) tandis que celle de butyrate est équivalente. On notera la quantité importante d'éthanol produite lors du test de fermentation BRM-k par rapport aux tests BRM-e et BRM-f (+ 273%). Cette production d'éthanol, bien que consommatrice de substrat, sans coproduction d'hydrogène (24), n'est pas responsable d'une diminution du rendement en hydrogène, qui reste élevé par rapport aux tests avec apport d'*inoculum* externe.



$$\Delta G^0 = -164,8 \text{ kJ/mol} \quad (24)$$

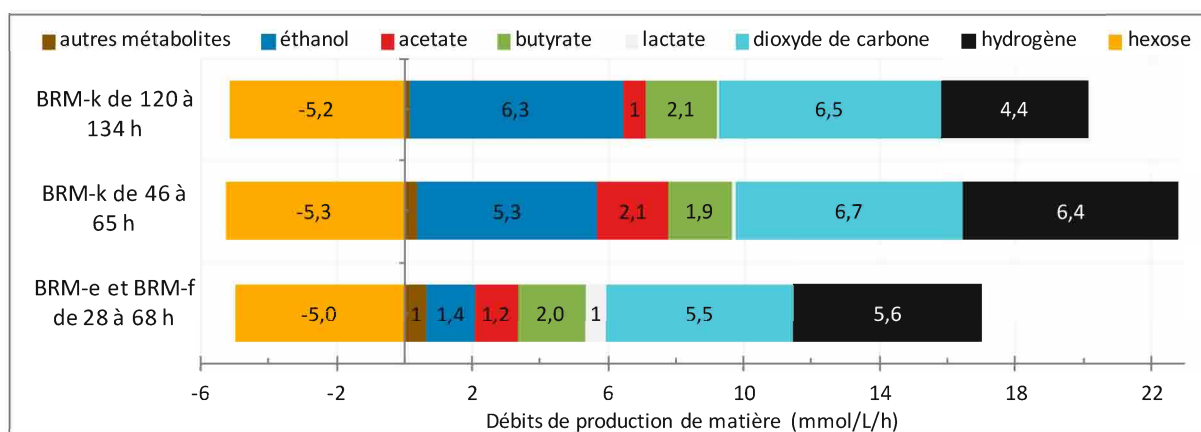


Figure 119. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-k comparée à la moyenne obtenue sur la phase de production pour les tests BRM-e et BRM-f avec apport d'*inoculum* microbien

La production d'acétate diminue fortement après 65 h (- 67%), tandis que celle de butyrate reste stable. Ceci permet de comprendre la variation importante du rapport molaire B/A observée entre la phase d'acclimatation et la phase de production prolongée. Cette modification du métabolisme est inhabituelle lorsque la production d'hydrogène diminue, comme l'indique la baisse du rapport H₂/2(B+A) à 0,68, qui est généralement liée à l'augmentation de la production d'acétate par homoacétogénèse (26). La quantité d'acétate produite peut cependant être obtenue par cette voie de production, la part d'acétate produit par la voie coproductrice d'H₂ (16) étant réduite avec la baisse de production.



La très forte production d'éthanol, également observée, avec jusqu'à 6,3 mmol/L_{milieu}/h, ne peut être liée à l'utilisation de nutriments dans la solution d'alimentation, mais semble plutôt être due au *consortium* microbien actif ; le test de fermentation précédent celui-ci ayant été réalisé avec apport de bourbes (test BRM-i). La fermentation lors de ce test ayant montré un fort potentiel de production d'éthanol.

Les recouvrements obtenus pour les bilans carbone de ce test de fermentation sont proches de 100% (Figure 120). L'échantillon prélevé à 14 h de fermentation ne contient encore que très peu de

VI.C. Mise en évidence d'un biofilm dans le BRM

métabolites, 95% du carbone étant issu du substrat résiduel, ce qui est logique puisque la fermentation est encore très faible sur cette période. Dans l'échantillon prélevé à 22 h, les productions de gaz et de métabolites sont encore en augmentation, et ne sont pas stabilisées, une proportion assez importante d'éthanol est déjà observée ici, avec 10% du total du carbone initial. A 46 h, à la fin de la période d'acclimatation, le milieu de fermentation est relativement stabilisé, avec une production relativement importante d'acétate, de butyrate et d'éthanol. Sur la suite du test, une augmentation de la part de carbone initial utilisé pour la production d'éthanol peut être observée, jusqu'à 40%, la part de l'acétate étant fortement réduite.

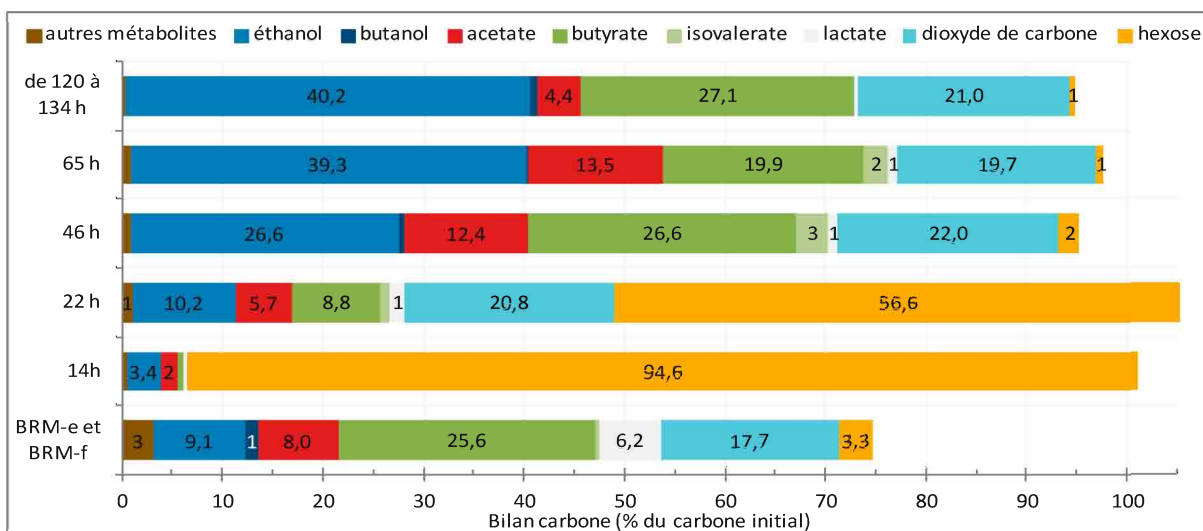


Figure 120. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-k comparée à la moyenne obtenue sur la phase de production pour les tests BRM-e et BRM-f avec apport d'inoculum microbien

Les bilans carbone obtenus à 46 et 65 h peuvent être comparés aux résultats obtenus sur la même période pour les tests BRM-e et BRM-f, avec apport d'un *inoculum* initial externe. On note la part importante de l'éthanol dans le bilan obtenu pour le test BRM-k, entre 3 et 4 fois plus importante que pour les tests BRM-e et BRM-f. Les parts relatives de l'acétate, du butyrate et du dioxyde de carbone sont en revanche relativement proches. On notera également l'absence de production significative de lactate dans le cas du test réalisé sans apport d'*inoculum*.

La production de dioxyde de carbone étant plus faible que celle attendue compte tenu de la production d'éthanol et de butyrate observée, la production d'acétate par homoacétogénèse peut être confirmée. Cependant, cette faible quantité d'acétate produite par rapport à celle de butyrate montre que la reprise du fonctionnement sur le biofilm du BRM ne pousse pas spécifiquement la fermentation vers la production d'acétate par homoacétogénèse, comme lors de l'utilisation d'une biomasse vieillissante [108], cela malgré l'âge important du biofilm.

Un rendement et une productivité en H₂ importants ont pu être obtenus, lors de ce test de fermentation, très compétitifs avec les tests utilisant un inoculum microbien fraîchement prélevé à la station d'épuration. Ceci prouve la présence d'un consortium microbien actif potentiellement présent dans un biofilm sur les parois du module et démontre l'intérêt majeur du BRM pour la stabilisation du consortium microbien producteur de H₂ sur les fibres creuses. De plus, ces résultats laissent envisager une simplification du procédé sur le long terme, en limitant les besoins de réensemencement du milieu réactionnel. La sélection et la culture de souches robustes et

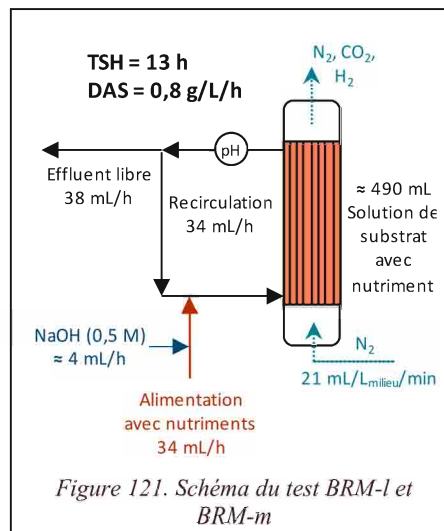
résistantes aux conditions de fermentation pourront être réalisées au fur et à mesure d'une fermentation en continu au niveau industriel, permettant une bonne adaptation du système avec les conditions opératoires et le substrat utilisé. Lors des phases de maintenance, ce consortium pourra être conservé efficacement, puis reprendre son activité rapidement à la remise en route de la production.

VI.D. Utilisation du biofilm comme *inoculum* microbien

La présence d'un biofilm microbien sur la surface du module membranaire et son potentiel de production d'hydrogène, prouvé, son utilisation comme *inoculum*

microbien exclusif a été envisagé. La possibilité de faire fonctionner le bioréacteur sans réensemencement systématique est un atout particulièrement important pour une adaptation industrielle du procédé de production d'hydrogène. Un second point important à démontrer, pour l'utilisation du procédé est la possibilité d'un stockage long du biofilm, sans perte de productivité, par exemple, entre deux phases de production d'hydrogène dans le cas d'un fonctionnement saisonnier, comme cela peut être le cas des substrats d'origine vitivinicole. Afin de vérifier la stabilité de ce consortium sur le long terme, un second test de fermentation, **BRM-I**, toujours sans apport d'*inoculum* extérieur, a été réalisé après une période d'arrêt de 256 jours, sans utilisation du module membranaire (Figure 121).

Pour ce test de fermentation, un temps de latence de 26,5 h a été observé, considéré comme très court compte tenu de la longue durée d'inactivité du biofilm (Tableau 57). Ce temps de latence est deux fois plus important que celui obtenu pour le test de fermentation BRM-k, dont la durée de stockage depuis le dernier test de fermentation n'avait été que de 6 jours. Lors de ce test de fermentation BRM-I, une phase de production stabilisée différée par rapport aux autres tests de fermentation est donc observée, débutant avec un retard et avec un débit de production en hydrogène plus faible mais extrêmement stable, avec un débit de production de H₂ supérieur à celui de CO₂ après 70 h (Figure 122). Un rendement et une productivité en hydrogène relativement importants ont été observés avec respectivement 1,01 mol_{H₂}/mol_{hexose} ajouté et 113 mL_{H₂}/L_{milieu}/h, bien qu'inférieurs aux résultats obtenus pour le test BRM-k. Cette baisse de production est probablement liée à la durée de stockage du BRM sans mise en fonctionnement ; la remise en fonctionnement du biofilm et le renouvellement de la flore microbienne ne permettant pas d'atteindre les niveaux de performance observés précédemment.



VI.D. Utilisation du biofilm comme inoculum microbien

Tableau 57. Valeurs de durée de la période de repos avant remise en fonctionnement du BRM, du temps de latence, du rendement et de la productivité en hydrogène et du rapport molaire H_2/CO_2 , pour les tests de fermentation BRM-k, BRM-l et BRM-m

BRM-k Test de fermentation réalisé sans apport externe d'inoculum en BRM (0,49 L) ; température de fermentation régulée à 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 0,95 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) + nutriments ; débit de gaz de balayage (N_2) de 23 mL/ L_{milieu}/min ; taux de recirculation de 0,8 ; TSH de 11,6 h

BRM-l : Test de fermentation réalisé sans apport externe d'inoculum en BRM (0,49 L) ; température de fermentation régulée à 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 0,84 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) + nutriments ; débit de gaz de balayage (N_2) de 21 mL/ L_{milieu}/min ; taux de recirculation de 0,9 ; TSH de 12,7 h

BRM-m : Test de fermentation réalisé sans apport externe d'inoculum en BRM (0,49 L) ; température de fermentation régulée à 38°C ; ajout de glucose ($DAS = 0,83 \text{ g}_{\text{hexose}}/L_{\text{milieu}}/h$) + nutriments ; débit de gaz de balayage (N_2) de 23 mL/ L_{milieu}/min ; taux de recirculation de 0,9 ; TSH de 13,3 h

Test de fermentation	Durée de repos avant reprise (jours)	Temps de latence (h)	phase étudiée	Rendement ($mol_{H_2}/mol_{\text{hexose ajouté}}$)	Productivité ($mL_{H_2}/L_{\text{milieu}}/h$)	H_2/CO_2
BRM-k	6	13,8	de 23 à 39 h	1,60	204	1,14
			de 60 à 134 h	1,41	179	0,83
BRM-l	256	26,5	de 45 à 69 h	1,01	113	1,04
BRM-m	3	10,3	de 24 à 77 h	1,49	165	1,04

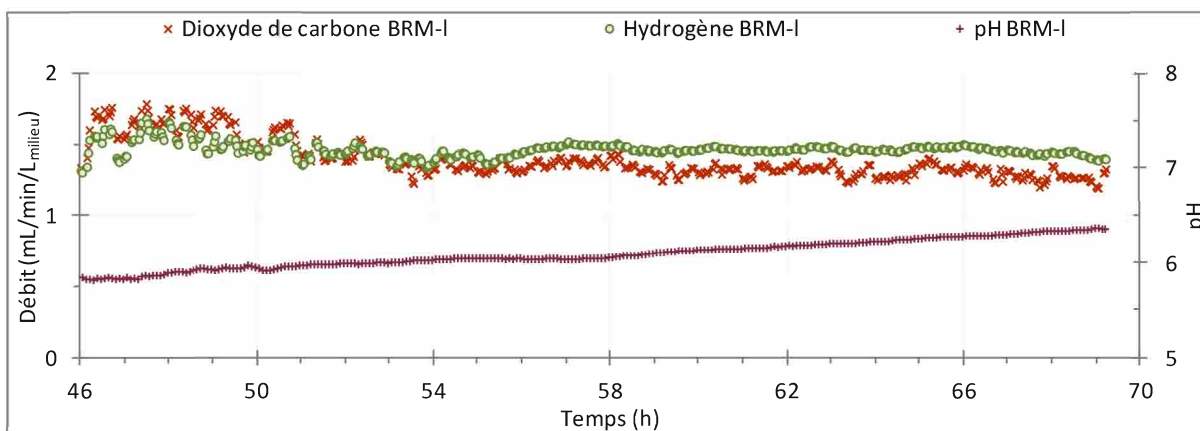


Figure 122. Débits de H_2 et CO_2 et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-l sans apport d'inoculum microbien externe

Afin de vérifier l'impact de la durée de l'arrêt sur l'efficacité du consortium microbien pour la production d'hydrogène, ce test de fermentation a été stoppé, afin de remettre le biofilm en fonctionnement après une période d'arrêt courte (3 jours). Ce test de fermentation, **BRM-m**, a montré une reprise de fermentation rapide et importante (Figure 123) avec un temps de latence de seulement 10,3 h. Une production d'hydrogène importante est observée, sans inversion des courbes de production d'hydrogène et de dioxyde de carbone avant au moins 77 h de fermentation.

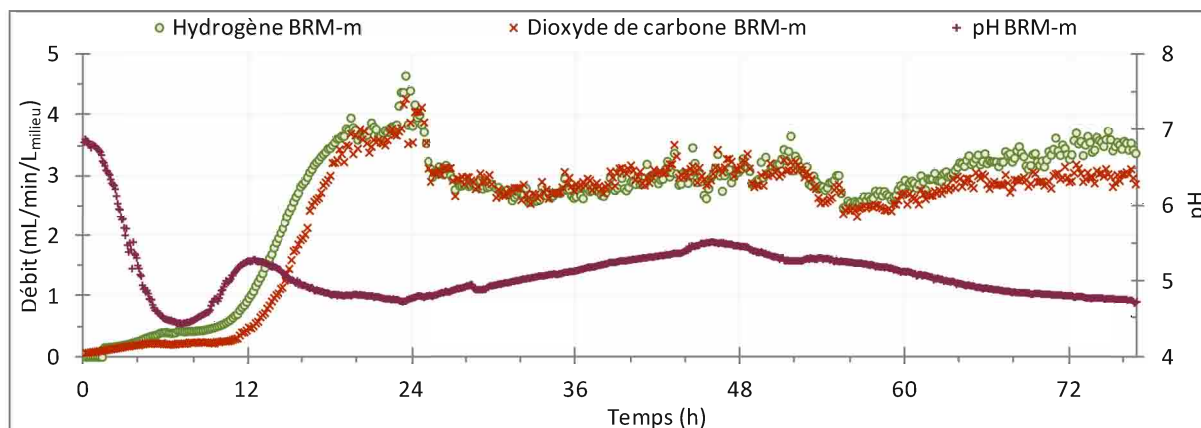


Figure 123. Débits de H_2 et CO_2 et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-m sans apport d'inoculum microbien externe

Un rendement de $1,49 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ ajouté}$ a ainsi été obtenu, très proche des résultats obtenus sur une période équivalente lors du test de fermentation BRM-k. De même une bonne productivité de $165 \text{ mL}_{H_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$ a été déterminée sur cette période de fonctionnement, de 24 à 77 h de fermentation.

On notera également que pour ces deux tests de fermentation, BRM-l et BRM-m, le rapport H_2/CO_2 reste supérieur à 1, au moins jusqu'à 60 h, ce qui démontre la stabilité du consortium microbien de production d'hydrogène.

La survie des microorganismes dans le biofilm sur de longues périodes semble être associée au phénomène des bactéries viables mais non cultivables (VBNC bacteria) [252] permettant la survie de microorganismes pendant de longues périodes, lorsque l'environnement n'est pas favorable, ici l'absence de substrat et d'eau. Au retour des conditions plus clémentes, les microorganismes sortent de cet état de dormance et reprennent leurs activités, avec des variations en fonction des espèces, ce qui peut expliquer les performances de production d'hydrogène plus limitées lors du test de fermentation BRM-l, après 8 mois de dormance.

Ces tests de fermentation sans apport d'inoculum externe et réalisés après un temps de non fonctionnement allant jusqu'à 8 mois, ont permis de monter l'exceptionnelle stabilité et résistance du consortium microbien producteur d'hydrogène. La conservation des rendements et les productivités, après une coupure de production relativement courte (3 jours) permet d'envisager la mise en place d'un rythme de fonctionnement alternant phase longue de fonctionnement et phase courte de repos. Dans l'optique d'une production d'hydrogène industrielle et afin de conserver un rendement et une productivité élevée en hydrogène, la gestion d'un roulement de fonctionnement des modules placés en parallèle dans le cadre d'une unité de production permettrait de limiter l'impact de cette procédure sur la production globale d'hydrogène.

VI.E. Conclusion du chapitre

Les résultats de ce chapitre exploratoire ont permis de confirmer la faisabilité de notre procédé de production d'hydrogène en bioréacteur membranaire. L'apport au milieu réactionnel de nutriments a permis ponctuellement de relancer une production en continu en décroissance, tandis qu'un ajout continu d'un mélange complet de nutriments a permis une amélioration relative du rendement et de la

VI.E. Conclusion du chapitre

productivité en hydrogène, ainsi qu'une augmentation significative de la consommation du substrat, non dirigée vers la production d'hydrogène.

L'utilisation d'une biomasse viticole riche en glucides et autres nutriments, tel que les bourbes vitivinicoles, est attractif pour la production de biohydrogène. Cette biomasse a été testée et s'est révélée très efficace, bien que l'apport de nouveaux microorganismes endogènes à la biomasse agricole, semble avoir modifié le *consortium* microbien actif et le métabolisme général dans le BRM. Les performances obtenues avec l'utilisation de bourbes comme source de matières métabolisables sont équivalentes à celles obtenues avec le substrat modèle, dans des conditions de fonctionnement identique. C'est une preuve du fonctionnement du bioréacteur avec un substrat réel.

Enfin, la présence d'un biofilm et son efficacité pour la génération d'un *consortium* stabilisé dans le bioréacteur membranaire a été démontrée. La preuve de faisabilité de l'utilisation de ce biofilm pour démarrer une fermentation a été apportée, avec en outre un avantage très significatif sur les performances de production d'hydrogène, augmentation de 26% du rendement, amélioration de productivité de 30% par rapport aux résultats obtenus dans les mêmes conditions hormis l'apport d'*inoculum* externe. Une excellente stabilisation de ce *consortium* a été observée après plusieurs jours, voire plusieurs mois, d'inactivité. La réussite dans la sélection d'un *consortium* microbien particulièrement efficace pour la production d'H₂ est ainsi un atout pour ce procédé.

Avec un taux de remplissage de 8,5% et une compacité de 391 m²/m³ ; le module membranaire à fibres creuses utilisé dans cette étude est relativement peu dense en surface membranaire par rapport au module à compacité élevée. Ceci laisse envisager l'augmentation de ce paramètre pour améliorer la productivité en hydrogène. En effet, l'augmentation de la surface de contact permettrait de conjuguer une extraction plus efficace de l'hydrogène avec la stabilisation du *consortium* microbien sur les fibres creuses du module membranaire.

Conclusions générales et perspectives

Le principal objectif de cette thèse était la mise en œuvre du couplage de la production d'hydrogène par fermentation obscure à un procédé membranaire, pour une extraction optimisée des gaz produits du milieu fermentaire. En effet, l'extraction des gaz produits est un des paramètres clés du processus de fermentation obscure, l'accumulation des gaz produits limitant l'activité des bactéries hydrogénogènes et favorisant celle des bactéries acétogènes et des archées présentes dans l'*inoculum* convertissant l'hydrogène respectivement en acétate et en méthane.

Les étapes clés du déroulement de cette thèse ont été :

- le choix du *consortium* microbien et la sélection des paramètres de fermentation obscure optimaux pour celui-ci, en réacteur agité semibatch (RASB),
- l'intensification du procédé de fermentation par différents modes d'extraction des gaz produits, en particulier par l'utilisation d'un gaz de balayage,
- la mise en œuvre du processus de fermentation optimisée en fonctionnement continu en réacteur agité (RAC) et en bioréacteur membranaire gaz/liquide (BRM) pour comparaison directe. Cette dernière configuration, avec extraction efficace des gaz produits au travers des fibres creuses, directement au sein du milieu fermentaire en cours de fermentation, correspond aux premiers travaux réalisés sur ce type de BRM et surtout a permis une amélioration importante de la production et de la productivité en hydrogène,
- la mise en évidence de la stabilisation du *consortium* bactérien actif dans le BRM et le test de performance avec une biomasse complexe ont été des jalons importants de cette étude.

Pour cela, une approche analytique rigoureuse a été mise en place pour permettre le suivi de production de gaz, H₂ et CO₂, grâce à la maîtrise de l'extraction des gaz produits, ainsi qu'une analyse fine des métabolites produits lors de la fermentation. De plus, un suivi en continu du pH du milieu de fermentation a été réalisé pour la majorité des tests de fermentation et une analyse microbiologique permettant d'observer les variations de la structure du *consortium* microbien a été réalisée pour les échantillons de biomasse les plus pertinents.

Choix du consortium microbien et optimisation des conditions opératoires du RASB : Le *consortium* microbien utilisé dans cette étude pour l'*inoculation* du milieu fermentaire a été sélectionné parmi les différentes boues de la station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg. **Après un traitement thermique à 70°C permettant d'activer efficacement les bactéries productrices d'H₂, tous les inocula testés ont permis la production d'hydrogène avec coproduction de dioxyde de carbone et une absence totale de méthane.** Les boues activées de la zone anoxie des lignes de traitement biologique de la station d'épuration ont été sélectionnées, avec un apport ponctuel de substrat modèle (11 mmol_{hexose}/L_{milieu}), permettant une fermentation complète en réacteur agité semibatch (RASB), sur une durée inférieure à 24 h. Sur une gamme de 35 à 60°C, la température optimale de production d'H₂ pour cet *inoculum* microbien a été déterminée à 38°C, proche des températures mésophiles typiquement observées dans la littérature.

Voies métaboliques et identification du consortium bactérien actif : Dans ces conditions de fermentations optimisées, un suivi précis de l'évolution du milieu fermentaire a été réalisé, pour les métabolites et le consortium bactérien. La production de gaz, H₂ et CO₂ a été observé après un temps de latence d'environ 4 h, avec un maximum de production à 5 h. Cette production de gaz est accompagnée d'une **coproduction d'acétate et de butyrate comme métabolites principaux** et d'autres **métabolites secondaires, produits puis reconsumés comme le propionate ou le formiate, ou conservés en fin de fermentation comme l'éthanol**. Depuis l'*inoculum* fraîchement prélevé à la station d'épuration, avant traitement thermique, jusqu'à l'échantillon de milieu fermentaire après arrêt de toute production de gaz, l'évolution du consortium bactérien durant la fermentation a été étudiée par T-RFLP et séquençage à haut débit. Une forte diversité bactérienne est observée avant le début de la fermentation, avec des bactéries des *phyla* *Deltaproteobacteria* (*Haliangium* sp.) et *Betaproteobacteria* (*Zoogloea caeni*, *Rhodoferrax* sp.). Dès 3,5 h de fermentation, le consortium bactérien identifié est spécifique à la production d'hydrogène par fermentation obscure, cette population restant quasi-stable jusqu'à la fin du test de fermentation. **Au maximum de production d'H₂, une majorité de bactéries de genre *Clostridium sensu stricto* (> 50%) est observée, avec en particulier de *C. spp. (baratii/perfringens)* (26,7%) et *C. butyricum* (13,7%),** des bactéries dont le métabolisme correspond typiquement à la production d'hydrogène par les voies acétate et butyrate, confirmant les résultats obtenus.

Impact positif de l'extraction des gaz produits par gaz de balayage : L'extraction des gaz produits hors du milieu fermentaire et du bioréacteur permet de réduire efficacement la pression partielle en hydrogène, limitant l'activité des bactéries hydrogénogènes. Les différents modes d'extraction (extraction libre, extraction forcée par une faible dépression et extraction avec gaz de balayage (N₂)) ont été testés et comparés au mode batch avec un net avantage pour celui utilisant un gaz de balayage ; **les rendements observés sur la phase de production étant de 0,9, 1,1 et 1,3 mol_{H2}/mol_{hexose} respectivement pour les modes batch, par extraction libre et en dépression, contre 2,1 mol_{H2}/mol_{hexose} avec gaz de balayage**. De plus, lors de l'utilisation du gaz de balayage pour l'extraction des gaz produit, un bénéfice sur les voies métaboliques peut être observé, celles-ci étant redirigées plus spécifiquement vers la production d'H₂.

Ce mode d'extraction a ensuite été optimisé en faisant varier le débit d'azote utilisé. **L'augmentation du débit de gaz de balayage** de 13 à 259 mL/L_{milieu}/min a conduit à un **bénéfice important de la production d'H₂, tant sur le rendement que sur la productivité, avec respectivement + 35% et + 69% ; cette augmentation ayant une évolution asymptotique**. Cet effet est clairement une preuve de l'effet inhibiteur des gaz produits sur la production d'H₂. Cependant, l'apport d'un gaz externe au procédé constitue l'inconvénient notable d'apporter un troisième gaz au biogaz produit, créant un mélange ternaire (N₂, H₂ et CO₂) plus difficile et coûteux à traiter par séparation gazeuse. Ainsi, l'utilisation de CO₂ comme gaz de balayage, en mélange avec N₂ ou seul a été réalisé et a permis d'atteindre des performances de production d'H₂ améliorées, jusqu'à 13% sur le rendement en hydrogène avec l'utilisation du mélange CO₂ : N₂ (75 : 25) ; cette amélioration étant liée à l'inhibition de bactéries du genre *Peptoclostridium*, permettant le développement plus important de l'espèce *Clostridium baratii*, principale productrice d'H₂. Une augmentation des productions de CO₂ et de butyrate avec en parallèle une légère baisse des quantités produites d'éthanol et d'acétate sont observées lorsque la proportion de CO₂ augmente dans le gaz de balayage. Ainsi, **les travaux montrent**

qu'une partie du CO₂ produit par la fermentation peut être recyclé dans le procédé en tant que gaz de balayage ; la séparation des gaz (CO₂ : H₂) étant nécessaire à la valorisation de l'hydrogène.

Mise en œuvre du bioréacteur en mode continu (RAC) : Cette étude vise à permettre, à terme, l'utilisation du procédé dans un contexte de production d'H₂ par fermentation obscure à l'échelle industrielle. La mise en continu du procédé, globalement plus efficace énergétiquement, permet de simplifier les opérations de fonctionnement et d'automatisation du procédé. Les conditions opératoires optimisées en fonctionnement RASB ont permis, avec succès, une mise en fonctionnement rapide du réacteur agité en fonctionnement continu (RAC). Une production continue d'hydrogène sur une durée supérieure à 240 h a pu être obtenue, sans interruption, à un temps de séjour hydraulique (TSH) élevé (73 h) choisi pour acclimater efficacement le *consortium* microbien au fonctionnement continu, sans risque de lessivage des microorganismes dans l'effluent liquide. Après une phase d'acclimatation présentant une forte production d'H₂ (158 mL_{H2}/L_{milieu}/h), durant environ un TSH, la productivité d'H₂ reste limitée (72 mL_{H2}/L_{milieu}/h) avec un rapport H₂/CO₂ faible (0,65). Un métabolisme proche de celui observé en RASB a été observé, l'acétate et le butyrate restant majoritairement produits avec consommation quasi-totale du substrat, avec des concentrations dans le milieu réactionnel très importantes, de l'ordre de dix fois celle observée en mode RASB. Une réduction du TSH est cependant nécessaire pour limiter le développement de certains microorganismes hydrogénotrophes, de plus l'accumulation de métabolites dans le milieu peut être défavorable à l'activité des bactéries productrices d'H₂. A un TSH réduit (12 h), une production plus stable de gaz a été observée avec, comme attendue, la diminution de la concentration des métabolites mais avec une réduction importante de la productivité (41 mL_{H2}/L_{milieu}/h), liée à l'augmentation du lessivage du milieu fermentaire, évacuant une partie importante des microorganismes, dont ceux producteurs d'H₂. Cette pression sélective sur les microorganismes est à l'origine d'une diminution de la richesse bactérienne, le phylum *Firmicutes* restant majoritaire dans le *consortium* bactérien du RAC avec au minimum 75% du total des séquences ; l'espèce *Clostridium butyricum* étant majoritaire (53%) pour le test réalisé au TSH de 12 h.

Bénéfices du BRM sur les performances de production d'hydrogène : La mise en place d'un module membranaire à fibres creuses afin d'y réaliser directement la fermentation avec extraction des gaz du milieu réactionnel constitue l'une des finalités de la thèse. Dans cette configuration de BRM inédite, le gaz de balayage circule dans le jour des fibres creuses, entraînant en continu les gaz produits par la fermentation. L'utilisation de fibres creuses permet d'augmenter la surface d'échange gaz/liquide pour une évacuation efficace de ces gaz. Les résultats ont permis de valider les performances de ce dispositif innovant pour la production d'hydrogène. Les études ont ainsi mis en évidence une meilleure stabilité de la production d'hydrogène par rapport à celle observée dans le RAC avec une production réalisée sur plus de 400 h. Les premiers tests de fermentation ont montré qu'un TSH de l'ordre de 12 h à 18 h semble optimal pour la production d'H₂ dans le BRM. **A des TSH équivalents, l'utilisation du BRM a permis une amélioration nette en rendement (> + 90%) et en productivité d'hydrogène (> + 300%) par rapport au mode de fonctionnement RAC.** En plus de l'amélioration au niveau de l'extraction des gaz produits, ces résultats peuvent s'expliquer par l'absence d'agitation dans la calandre du BRM, permettant de conserver les matières en suspension dans le système, évitant le lessivage préjudiciable en RAC. Les bactéries du phylum *Firmicutes* restent majoritaires dans cette configuration, avec cependant une diversité microbienne beaucoup plus importante que dans le RAC, liée à la réduction du lessivage permettant à des bactéries au

Conclusions générales et perspectives

développement lent de se maintenir dans le milieu fermentaire. Les espèces majoritaires détectées sont *Clostridium butyricum* (10,7%) et *Sporolactobacillus laevolacticus* (8,5%) ainsi que *C. (subterminale / thiosulfatireducens / sulfidigenes)* (4,7%), bactéries qui avaient également été observées dans le RAC. Ces résultats prometteurs permettent de valider, sans hésitation, les performances de ce dispositif innovant.

Plusieurs tests ont été réalisés pour améliorer la configuration du bioréacteur membranaire et pour en trouver les limites opérationnelles afin de caractériser le fonctionnement de ce système et de sélectionner les paramètres optimaux pour son intensification. La robustesse de l'activité du *consortium* microbien dans le BRM a été prouvée à plusieurs reprises, à la suite de différents aléas techniques (coupure du chauffage du milieu fermentaire, coupure des pompes de recirculation), ceci étant permis par la stabilisation du *consortium* dans la calandre du BRM. On notera en particulier, que l'absence d'une boucle de recirculation pour la phase liquide n'impacte en aucun cas les critères de performances, la suppression de ce dispositif pouvant s'avérer intéressante pour l'utilisation future du procédé. Toujours dans l'optique de limiter la dilution des gaz produits, l'utilisation du BRM sans gaz de balayage a été testé, montrant l'utilisation possible des deux modes, avec un avantage pour le gaz de balayage expliqué par l'évacuation plus rapide des gaz du milieu réactionnel. Le débit de gaz de balayage utilisé pour le BRM est cependant bien inférieur à celui utilisé en mode RASB $\approx 20 \text{ mL/L}_{\text{milieu}}/\text{min}$ contre plus de $65 \text{ mL/L}_{\text{milieu}}/\text{min}$; cette valeur pouvant probablement encore être réduite, en particulier à plus grande échelle. Un autre mode d'extraction actif des gaz est cependant envisageable, par dépression transmembranaire, permettant d'extraire activement le biogaz produit tout en évitant sa dilution.

Test du BRM sur une biomasse complexe : La production d' H_2 par fermentation obscure à l'échelle industrielle n'est envisageable qu'à partir de déchets organiques métabolisables, peu coûteux. L'utilisation d'un substrat réel issu de la filière viticole comme solution d'alimentation du BRM a ainsi été réalisée, afin de prouver la faisabilité de ce dispositif pour une production d' H_2 proche des conditions réelles. Les bourbes vitivinicoles, ont été sélectionnées car liquides et riches en glucides ($\approx 200 \text{ g}_{\text{hexose}}/\text{L}$) ; elles sont, de plus, produites en quantité relativement importante (13 kt annuel en France), et ont prouvé leur efficacité pour la production d'hydrogène par fermentation obscure en RASB. Des résultats très prometteurs ont ainsi été obtenus, avec des performances équivalentes à celles obtenues avec le substrat modèle : rendement de $1,32 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose consommé}}$ et une productivité de $148 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$. Ce substrat réel a permis l'apport de nouveaux microorganismes endogènes à la biomasse agricole, ce qui semble avoir modifié le *consortium* microbien actif et le métabolisme général dans le BRM avec une production accrue d'éthanol et d'acétate. L'utilisation de cette biomasse, attractive pour la production de biohydrogène, a fait la preuve, avec succès, du fonctionnement du bioréacteur avec un substrat réel, étape indispensable pour envisager la transposition de ce procédé à plus grande échelle. L'utilisation d'autres substrats réels devra donc être envisagée pour élargir le potentiel effectif de production d' H_2 du BRM.

Stabilisation du consortium microbien dans le BRM : La dernière étape majeure de cette étude a consisté à mettre en évidence, de façon indirecte, un biofilm microbien sur les fibres creuses, celui-ci ayant été généré au cours des tests de fermentation précédents par l'activité microbienne. Ce biofilm durablement installé dans le bioréacteur, rend possible la fermentation sans réaliser d'apport d'*inoculum* frais, ce qui constitue un atout pour ce procédé, dans le cas de l'utilisation de biomasses fermentescibles ne contenant pas les microorganismes nécessaires à la production d' H_2 . **La présence**

de ce biofilm a été prouvée par la mise en fonctionnement du BRM sans aucun apport microbien externe, faisant la preuve de faisabilité de l'utilisation de ce biofilm pour ensemençer une fermentation et la génération d'un consortium endogène au BRM. En outre, une efficacité sans précédent dans le BRM a été observée avec une amélioration de 26% du rendement ($1,44 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$), et de 30% de la productivité ($179 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu}}/\text{h}$) en hydrogène par rapport aux tests réalisés précédemment avec l'apport d'*inoculum* externe prétraité de la station d'épuration. Ce point constitue un avantage significatif sur les performances de production d'hydrogène, en plus de l'excellente stabilisation du biofilm, après plusieurs jours, comme après plusieurs mois d'inactivité du BRM. Cette étude a ainsi réussi la sélection d'un *consortium* microbien particulièrement efficace pour la production d' H_2 et son installation durable dans le bioréacteur de fermentation.

Les **perspectives** du bioréacteur membranaire développé dans cette étude pour la production d'hydrogène par fermentation obscure sont importantes et plusieurs voies d'amélioration de ce procédé restent à explorer pour optimiser le fonctionnement du système et son utilisation à plus grande échelle.

Améliorations techniques : Afin de limiter l'accumulation et le vieillissement de la biomasse dans la calandre du bioréacteur, et les risques associés d'homoacétogénèse, une configuration du BRM, avec extraction simultanée dans la partie haute de la calandre (identique au système actuel) et dans la partie basse est à mettre en place. Cette sortie liquide supplémentaire permettrait l'évacuation des matières en suspension du système, évitant ainsi leur vieillissement. La configuration verticale de la calandre permettrait une séparation relative des phases solide et liquide, dont les débits d'extraction pourront être dissociés afin de réguler le TSH et le temps de séjour des solides indépendamment. Ainsi une parfaite optimisation du système sera possible, permettant probablement de réduire les temps de séjour et d'augmenter le débit d'alimentation en substrat dans le but d'améliorer la productivité du procédé de production d'hydrogène. Par ailleurs, l'utilisation d'un débit de recirculation important du milieu fermentaire semble intéressante à envisager pour réaliser la mise en suspension des MES dans la calandre, à l'instar des bioréacteurs à lit fluidisé, tout en accélérant et améliorant l'équilibrage du milieu avec une meilleure mise en contact de la biomasse et du substrat entrant.

Augmentation de la surface de contact gaz/liquide du BRM : Le module membranaire utilisé dans cette étude a été conçu avec un taux de remplissage (8,5%) et une compacité ($391 \text{ m}^2/\text{m}^3$) relativement faibles pour limiter les risques d'accumulation de matières dans celui-ci. Une augmentation du taux de remplissage peut être une piste pour améliorer les performances en productivité d'hydrogène, en augmentant la surface d'échange gaz/liquide pour le développement du biofilm microbien et l'extraction améliorée des gaz. De plus, une distribution plus homogène des fibres dans le milieu fermentaire permettrait d'améliorer la quantité de substrat atteignant les bactéries présentes dans le biofilm sélectionné pour la production d'hydrogène.

BRM permselectif à l'hydrogène : L'utilisation d'un matériau membranaire permselectif à l'hydrogène peut constituer un atout supplémentaire pour préconcentrer l'hydrogène produit ; le dioxyde de carbone, dont la présence dans le milieu s'est révélée bénéfique en RASB, resterait dans la calandre pour s'évacuer avec l'effluent liquide.

Optimisation des paramètres de fonctionnement du BRM par modélisation : Cette étape semble incontournable pour optimiser les TSH, DAS, pH et température et maximiser les rendements de production d'hydrogène permettant pour un gain de temps expérimental précieux.

Le développement de ce dispositif novateur et performant a abouti à un dépôt de brevet en septembre 2015 « Dispositif de production d'hydrogène à l'aide d'un réacteur membranaire à fibres creuses ». L'exploitation de ce brevet pour la production d'hydrogène à l'échelle industrielle fait partie des objectifs du projet BHFO (Biohydrogène par fermentation obscure) financé par la SATT Conectus d'Alsace et conduit au laboratoire RePSeM de l'IPHC, en partenariat avec des équipes de l'UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques) de l'Université de Bourgogne et un industriel gazier. Ce projet a pour objectif de prouver la faisabilité économique de la production d'hydrogène par fermentation obscure à l'échelle industrielle, en particulier via le développement et l'utilisation d'un bioréacteur membranaire à l'échelle pilote.

Pour conclure, cette thèse a permis de démontrer la faisabilité du couplage des technologies membranaires avec le procédé de fermentation obscure, avec une nouvelle configuration, permettant de conjuguer une extraction plus efficace des gaz produits et la stabilisation d'un *consortium* microbien, sélectionné pour la production d'hydrogène. Afin d'améliorer les performances de conversion de la biomasse, le couplage de la fermentation obscure peut être envisagé avec d'autres procédés permettant la conversion énergétique des acides gras volatils produits. Le procédé de photo-fermentation peut typiquement être envisagé, celui-ci permettant de compléter la production d'H₂ et d'atteindre en couplage jusqu'à 7,1 mol_{H₂}/mol_{hexose} [253]. L'autre alternative importante de valorisation des acides gras volatils est le couplage de la fermentation obscure avec la digestion anaérobie, pour la production de méthane, ce procédé présentant l'intérêt d'être mature et déjà implanté au niveau industriel. L'insertion du procédé de fermentation obscure, en amont d'un biodigesteur en place, permettrait de réaliser un prétraitement de la biomasse pour celui-ci, ce qui constituerait une voie de valorisation importante de ce procédé.

Bibliographie

- [1] U.S. Energy Information Administration. International Energy Outlook 2016 (IEO2016). U.S. Department of Energy; **2016**.
- [2] L. Kalinowski, J.-M. Pastor. L'HYDROGÈNE: VECTEUR DE LA TRANSITION ÉNERGETIQUE ? France: Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques; **2013**.
- [3] Hydrogen Mobility Europe s. d. <http://h2me.eu/> (consulté le 20 juillet 2016).
- [4] T. Schaaf, J. Grünig, M.R. Schuster, T. Rothenfluh, A. Orth. Methanation of CO₂ - storage of renewable energy in a gas distribution system. *Energ Sustain Soc*, 4(1) **2014** 1-14.
- [5] D. Haeseldonckx, W. D'haeseleer. The use of the natural-gas pipeline infrastructure for hydrogen transport in a changing market structure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(10-11) **2007** 1381-6.
- [6] R. Batisse, H. Pierre. GRHYD - Gestion des Réseaux par l'injection d'Hydrogène (H₂) pour Décarboner les énergies **2014**.
- [7] F. della Faille. Integrated fluidic devices for hydrogen applications - Interview de Ad-Venta au congrès « Europe's largest hydrogen, fuel cells and battery exhibition » **2014**.
- [8] A. Le Duigou, M. Miguët, Y. Amalric. French hydrogen markets in 2008 – Overview and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(15) **2011** 8822-30.
- [9] S.-E. Oh, P. Iyer, M.A. Bruns, B.E. Logan. Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(1) **2004** 119-127.
- [10] J.R. Paterek. Method for hydrogen production from organic wastes using a two-phase bioreactor system. US7083956, **2006**.
- [11] K.-S. Lee, P.-J. Lin, K. Fangchiang, J.-S. Chang. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(8) **2007** 950-7.
- [12] D.-Y. Lee, Y.-Y. Li, T. Noike, G.-C. Cha. Behavior of extracellular polymers and bio-fouling during hydrogen fermentation with a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 322(1) **2008** 13-8.
- [13] L. Shen, D.M. Bagley, S.N. Liss. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(9) **2009** 3689-96.
- [14] D.-Y. Lee, Y.-Y. Li, Y.-K. Oh, M.-S. Kim, T. Noike. Effect of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(3) **2009** 1244-52.
- [15] D.-Y. Lee, Y.-Y. Li, T. Noike. Continuous H₂ production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 100(2) **2009** 690-5.
- [16] D.-Y. Lee, Y.-Y. Li, T. Noike. Influence of solids retention time on continuous H₂ production using membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1) **2010** 52-60.
- [17] L. Shen, Y. Zhou, B. Mahendran, D.M. Bagley, S.N. Liss. Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. *Journal of Membrane Science*, 360(1-2) **2010** 226-33.
- [18] M.-S. Kim, D.-Y. Lee, D.-H. Kim. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14) **2011** 8712-8.
- [19] D.-Y. Lee, K.-Q. Xu, T. Kobayashi, Y.-Y. Li, Y. Inamori. Effect of organic loading rate on continuous hydrogen production from food waste in submerged anaerobic membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30) **2014** 16863-71.
- [20] P. Bakonyi, N. Nemestóthy, J. Lankó, I. Rivera, G. Buitrón, K. Bélafi-Bakó. Simultaneous biohydrogen production and purification in a double-membrane bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(4) **2015** 1690-7.
- [21] H. Zheng, C. O'Sullivan, R. Mereddy, R.J. Zeng, M. Duke, W.P. Clarke. Experimental and theoretical investigation of diffusion processes in a membrane anaerobic reactor for bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11) **2010** 5301-11.
- [22] T.-M. Liang, S.-S. Cheng, K.-L. Wu. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12) **2002** 1157-65.
- [23] R. Mosseri, C. Jeandel. L'énergie à découvert. CNRS Edition. **2013**.
- [24] S. Giddey, S.P.S. Badwal, A. Kulkarni. Review of electrochemical ammonia production technologies and materials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(34) **2013** 14576-94.
- [25] C. Boyer. Hydrogène. Techniques de l'Ingénieur. **2012**.
- [26] M. Jehan, D. Fruchart. McPhy-Energy's proposal for solid state hydrogen storage materials and systems. *Journal of Alloys and Compounds*, 580, Supplement 1 **2013** S343-8.
- [27] E. Beeker. Y a-t-il une place pour l'hydrogène dans la transition énergétique ? France Stratégie; **2014**.
- [28] M. Elsherif, Z.A. Manan, M.Z. Kamsah. State-of-the-art of hydrogen management in refinery and industrial process plants. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, 24 **2015** 346-56.
- [29] J. Xu, G.F. Froment. Methane Steam Reforming, Methanation and Water-Gas Shift: 1 Intrinsic Kinetics. *AIChE Journal*, 35(1) **1989** 88-96.

Bibliographie

- [30] G.A. Olah, G.K.S. Prakash, A. Goepfert. Anthropogenic Chemical Carbon Cycle for a Sustainable Future. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(33) **2011** 12881-98.
- [31] H. Witschi. Fritz Haber: December 9, 1868 – January 29, 1934. *Toxicology*, 149(1) **2000** 3-15.
- [32] R. Ramachandran, R.K. Menon. An overview of industrial uses of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(7) **1998** 593-8.
- [33] J. Bilik, P. Pustejovska, S. Brozova, S. Jursova. Efficiency of hydrogen utilization in reduction processes in ferrous metallurgy. *Scientia Iranica*, 20(2) **2013** 337-42.
- [34] G. Luo, S. Johansson, K. Boe, L. Xie, Q. Zhou, I. Angelidaki. Simultaneous hydrogen utilization and in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 109(4) **2012** 1088-94.
- [35] G. Luo, I. Angelidaki. Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H₂: process performance and microbial insights. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(3) **2012** 1373-81.
- [36] I. Díaz, C. Pérez, N. Alfaro, F. Fdz-Polanco. A feasibility study on the bioconversion of CO₂ and H₂ to biomethane by gas sparging through polymeric membranes. *Bioresource Technology*, 185 **2015** 246-53.
- [37] T.N. Veziroğlu, S. Şahin. 21st Century's energy: Hydrogen energy system. *Energy Conversion and Management*, 49(7) **2008** 1820-31.
- [38] D. Cecere, E. Giacomazzi, A. Ingenito. A review on hydrogen industrial aerospace applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(20) **2014** 10731-47.
- [39] T. Wallner, H. Lohse-Busch, S. Gurski, M. Duoba, W. Thiel, D. Martin, T. Korn. Fuel economy and emissions evaluation of BMW Hydrogen 7 Mono-Fuel demonstration vehicles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(24) **2008** 7607-18.
- [40] S. Verhelst, T. Wallner. Hydrogen-fueled internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 35(6) **2009** 490-527.
- [41] F.R.L. Creek. The operation and maintenance of hydrogen-cooled generators I. *Vacuum*, 6 **1956** 202.
- [42] D. Carter, J. Wing. The Fuel Cell Industry Review 2013. *Fuel Cell Today*; **2013**.
- [43] A. Le Duigou, A. Smatti. On the comparison and the complementarity of batteries and fuel cells for electric driving. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(31) **2014** 17873-83.
- [44] J.-M. Bourgeois. Station énergétique autonome pour site isolé - Cassidian **2013**.
- [45] J. van Eijck, B. Batidzirai, A. Faaij. Current and future economic performance of first and second generation biofuels in developing countries. *Applied Energy*, 135 **2014** 115-41.
- [46] Produire des biocarburants avancés. ADEME, s. d. <http://www.ademe.fr/expertises/energies-renouvelables-reseaux-stockage/passer-a-l'action/produire-biocarburants/produire-biocarburants-avances> (consulté le 20 mars 2015).
- [47] S.P. Cuellar-Bermudez, J.S. Garcia-Perez, B.E. Rittmann, R. Parra-Saldivar. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Journal of Cleaner Production*, 98 **2015** 53-65.
- [48] L. Shao, B.T. Low, T.-S. Chung, A.R. Greenberg. Polymeric membranes for the hydrogen economy: Contemporary approaches and prospects for the future. *Journal of Membrane Science*, 327(1-2) **2009** 18-31.
- [49] B.D. James, G.N. Baum, J. Perez, K.N. Baum. Technoeconomic Boundary Analysis of Biological Pathways to Hydrogen Production. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO.; **2009**.
- [50] D.B. Levin, L. Pitt, M. Love. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2) **2004** 173-85.
- [51] P. Pasierb, M. Rekas. High-Temperature Electrochemical Hydrogen Pumps and Separators. *International Journal of Electrochemistry*, 2011 **2011**.
- [52] M. Balat. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15) **2008** 4013-29.
- [53] J.D. Holladay, J. Hu, D.L. King, Y. Wang. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, 139(4) **2009** 244-60.
- [54] M. Ni, D.Y.C. Leung, M.K.H. Leung, K. Sumathy. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*, 87(5) **2006** 461-72.
- [55] J.-L. Charlou, J.-P. Donval, C. Konn, H. Ondréas, Y. Fouquet, P. Jean-Baptiste, E. Fourré. High Production and Fluxes of H₂ and CH₄ and Evidence of Abiotic Hydrocarbon Synthesis by Serpentinization in Ultramafic-Hosted Hydrothermal Systems on the Mid-Atlantic Ridge. *Geophysical Monograph Series*, 188 **2010** 265-96.
- [56] C. Marcaillou. Serpentinisation et production d'hydrogène en contexte de dorsale lente: approche expérimentale et numérique. phdthesis. Université de Grenoble, **2011**.
- [57] N.Z. Muradov, T.N. Veziroğlu. « Green » path from fossil-based to hydrogen economy: An overview of carbon-neutral technologies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(23) **2008** 6804-39.
- [58] E. Albarrán-Zavala, F. Angulo-Brown. A Simple Thermodynamic Analysis of Photosynthesis. *Entropy*, 9(4) **2007** 152-68.
- [59] H. Argun, F. Kargi. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13) **2011** 7443-59.
- [60] M.Y. Azwar, M.A. Hussain, A.K. Abdul-Wahab. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31 **2014** 158-73.
- [61] F. Romagnoli, D. Blumberga, I. Pilicka. Life cycle assessment of biohydrogen production in photosynthetic processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13) **2011** 7866-71.

- [62] I. Valdez-Vazquez, H.M. Poggi-Varaldo. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5) **2009** 1000-13.
- [63] E. Latrille, E. Trably, C. Larroche. Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. *Techniques de l'Ingénieur* **2011**.
- [64] N. Khanna, D. Das. Biohydrogen production by dark fermentation. *WENE*, 2(4) **2013** 401-21.
- [65] I.C. Clark, R.H. Zhang, S.K. Upadhyaya. The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production via anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(15) **2012** 11504-13.
- [66] R.K. Thauer, K. Jungermann, K. Decker. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 41(1) **1977** 100-80.
- [67] V. Müller. Bacterial Fermentation. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd; **2001**.
- [68] KEGG PATHWAY: Pyruvate metabolism - Clostridium perfringens 13 s. d. http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=cpe&mapno=00620&mapscale=&show_description=hide (consulté le 5 avril 2016).
- [69] KEGG ENZYME: 2.3.1.54 s. d. http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?ec:2.3.1.54 (consulté le 5 avril 2016).
- [70] F.R. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D.L. Hawkes. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2) **2007** 172-84.
- [71] N.M.C. Saady. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30) **2013** 13172-91.
- [72] H.-B. Ding, G.-Y.A. Tan, J.-Y. Wang. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 101(24) **2010** 9550-9.
- [73] C. Li, H.H.P. Fang. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1) **2007** 1-39.
- [74] G. Davila-Vazquez, S. Arriaga, F. Alatríste-Mondragón, A. de León-Rodríguez, L.M. Rosales-Colunga, E. Razo-Flores. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 7(1) **2007** 27-45.
- [75] O. Elsharnouby, H. Hafez, G. Nakhla, M.H. El Naggat. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12) **2013** 4945-66.
- [76] J. Wiegler, R. Tanner, F.A. Rainey. An Introduction to the Family Clostridiaceae. In: Dr MDP, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, éditeurs. *The Prokaryotes*, Springer US; **2006**, p. 654-78.
- [77] N. Yutin, M.Y. Galperin. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 15(10) **2013** 2631-2641.
- [78] R. Nandi, S. Sengupta. Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1) **1998** 61-84.
- [79] T. Kurokawa, S. Tanisho. Effects of Formate on Fermentative Hydrogen Production by Enterobacter aerogenes. *Mar Biotechnol*, 7(2) **2005** 112-8.
- [80] Y. Xia, Y. Kong, T.R. Thomsen, P.H. Nielsen. Identification and Ecophysiological Characterization of Epiphytic Protein-Hydrolyzing Saprospiraceae (« Candidatus Epiflobacter » spp.) in Activated Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(7) **2008** 2229-38.
- [81] I.R. Ramsay, P.C. Pullammanappallil. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12(4) **2001** 247-56.
- [82] C.-H. Hung, Y.-T. Chang, Y.-J. Chang. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology*, 102(18) **2011** 8437-44.
- [83] T.T. More, J.S.S. Yadav, S. Yan, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144 **2014** 1-25.
- [84] Y. Shao, B.S. Chung, S.S. Lee, W. Park, S.-S. Lee, C.O. Jeon. Zoogloea caeni sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59(Pt 3) **2009** 526-30.
- [85] Y. Akutsu, Y.-Y. Li, H. Harada, H.-Q. Yu. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(6) **2009** 2558-66.
- [86] D. Karadag, J.A. Puhakka. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(20) **2010** 10954-9.
- [87] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16) **2016** 6713-33.
- [88] G. De Gioannis, A. Muntoni, A. Poletti, R. Pomi. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, 33(6) **2013** 1345-61.
- [89] G. Bastide. Estimation des gisements potentiels de substrats utilisables en méthanisation. ADEME; **2013**.
- [90] Présentation de la station d'épuration - Communauté Urbaine de Strasbourg. **2008**.
- [91] A. Mottet, E. François, E. Latrille, J.P. Steyer, S. Délérís, F. Vedrenne, H. Carrère. Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 160(2) **2010** 488-96.
- [92] H. Carrère, C. Dumas, A. Battimelli, D.J. Batstone, J.P. Delgenès, J.P. Steyer, I. Ferrer. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3) **2010** 1-15.
- [93] J. Jimenez, F. Vedrenne, C. Denis, A. Mottet, S. Délérís, J.-P. Steyer, J.A. Cacho Rivero. A statistical comparison of protein and carbohydrate characterisation methodology applied on sewage sludge samples. *Water Research*, 47(5) **2013** 1751-62.

Bibliographie

- [94] M. Huang, Y. Li, G. Gu. Chemical composition of organic matters in domestic wastewater. *Desalination*, 262(1-3) **2010** 36-42.
- [95] A. Muszyński, A. Tabernacka, A. Miłobędzka. Long-term dynamics of the microbial community in a full-scale wastewater treatment plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 100 **2015** 44-51.
- [96] J. Johnke, Y. Cohen, M. de Leeuw, A. Kushmaro, E. Jurkevitch, A. Chatzinotas. Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 27 **2014** 185-90.
- [97] Y.M. Wong, T.Y. Wu, J.C. Juan. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34 **2014** 471-82.
- [98] C.Y. Lin, C.H. Lay. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(3) **2005** 285-92.
- [99] H. Argun, F. Kargi, I.K. Kapdan, R. Öztekin. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(7) **2008** 1813-9.
- [100] C.-Y. Lin, C.H. Lay. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(3) **2004** 275-81.
- [101] A. Strelkauskas, A. Edwards, B. Fahnert, G. Pryor, J. Strelkauskas. *Microbiology A Clinical Approach*. Garland Science. Taylor & Francis Group; **2015**.
- [102] P. Sinha, A. Pandey. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13) **2011** 7460-78.
- [103] H. Alshiyab, M.S. Kalil, A.A. Hamid, W.M.W. Yusoff. Trace Metal Effect on Hydrogen Production Using *C. acetobutylicum*. *Online Journal of Biological Sciences*, 8(1) **2008** 1-9.
- [104] J. Wang, W. Wan. Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 99(18) **2008** 8864-8.
- [105] H.H.P. Fang. Inhibition of bioactivity of UASB biogranules by electroplating metals. *Pure Appl. Chem*, **1997** 2425-2429.
- [106] C.-Y. Lin, S.-H. Shei. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2) **2008** 587-93.
- [107] Y. Chen, S. Jiang, H. Yuan, Q. Zhou, G. Gu. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, 41(3) **2007** 683-9.
- [108] C. Dinamarca, R. Bakke. Process parameters affecting the sustainability of fermentative hydrogen production: A short review **2011**.
- [109] H. Yu, Z. Zhu, W. Hu, H. Zhang. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12) **2002** 1359-65.
- [110] G. Luo, L. Xie, Z. Zou, Q. Zhou, J.-Y. Wang. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. *Applied Energy*, 87(12) **2010** 3710-7.
- [111] S.I. Gadow, Y.-Y. Li, Y. Liu. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20) **2012** 15465-72.
- [112] G. Kumar, C.-Y. Lin. Bioconversion of de-oiled *Jatropha* Waste (DJW) to hydrogen and methane gas by anaerobic fermentation: Influence of substrate concentration, temperature and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1) **2013** 63-72.
- [113] O. Pakarinen, A. Lehtomäki, J. Rintala. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2) **2008** 594-601.
- [114] C.Z. Lazaro, V. Perna, C. Etchebehere, M.B.A. Varesche. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(12) **2014** 6407-18.
- [115] J.-H. Hwang, J.-A. Choi, R.A.I. Abou-Shanab, B. Min, H. Song, Y. Kim, E.S. Lee, B.-H. Jeon. Feasibility of hydrogen production from ripened fruits by a combined two-stage (dark/dark) fermentation system. *Bioresource Technology*, 102(2) **2011** 1051-8.
- [116] E. François-Lopez, C. Dumas, R. Gougeon, B. Ernst. Valorization of winery waste: Biohydrogen production from adapted flora by dark fermentation. 5th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation (WasteEng), Rio de Janeiro: **2014**.
- [117] A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144 **2015** 73-95.
- [118] S. Yossan, S. O-Thong, P. Prasertsan. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(18) **2012** 13806-14.
- [119] X. Shi, D.-H. Kim, H.-S. Shin, K.-W. Jung. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* by anaerobic mixed cultures. *Bioresource Technology*, 144 **2013** 225-31.
- [120] P. Prasertsan, S. O-Thong, N.-K. Birkeland. Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17) **2009** 7448-59.
- [121] S. Tarlera, L. Muxí, M. Soubes, A.J.M. Stams. *Caloramator proteoclasticus* sp. nov., a New Moderately Thermophilic Anaerobic Proteolytic Bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 47(3) **1997** 651-6.
- [122] C.-Y. Lin, C.-H. Lay, B. Sen, C.-Y. Chu, G. Kumar, C.-C. Chen, J.-S. Chang. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20) **2012** 15632-42.

- [123] S. Venkata Mohan. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17) **2009** 7460-74.
- [124] P. Sivagurunathan, G. Kumar, P. Bakonyi, S.-H. Kim, T. Kobayashi, K.Q. Xu, G. Lakner, G. Tóth, N. Nemestóthy, K. Bélafi-Bakó. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(6) **2016** 3820-36.
- [125] S. Van Ginkel, B.E. Logan. Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. *Environmental Science & Technology*, 39(23) **2005** 9351-6.
- [126] G.-L. Tang, J. Huang, Z.-J. Sun, Q.-Q. Tang, C.-H. Yan, G.-Q. Liu. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation temperature and pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1) **2008** 80-7.
- [127] M.-L. Chong, R.A. Rahim, Y. Shirai, M.A. Hassan. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2) **2009** 764-71.
- [128] D. Sivaramakrishna, D. Sreekanth, V. Himabindu, Y. Anjaneyulu. Biological hydrogen production from probiotic wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed microflora. *Renewable Energy*, 34(3) **2009** 937-40.
- [129] R.J. Lamed, J.H. Lobos, T.M. Su. Effects of Stirring and Hydrogen on Fermentation Products of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, 54(5) **1988** 1216-21.
- [130] N. Kataoka, A. Miya, K. Kiriya. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Science and Technology*, 36(6-7) **1997** 41-7.
- [131] K.-S. Lee, T.-S. Tseng, Y.-W. Liu, Y.-D. Hsiao. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20) **2012** 15556-62.
- [132] B. Mandal, K. Nath, D. Das. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol Lett*, 28(11) **2006** 831-5.
- [133] H. Rajhi, D. Puyol, M.C. Martínez, E.E. Díaz, J.L. Sanz. Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. *Front. Environ. Sci. Eng.*, 10(3) **2015** 513-21.
- [134] A. Sonnleitner, C. Peintner, W. Wukovits, A. Friedl, W. Schnitzhofer. Process investigations of extreme thermophilic fermentations for hydrogen production: Effect of bubble induction and reduced pressure. *Bioresource Technology*, 118(0) **2012** 170-6.
- [135] M. Kisielowska, M. Dębowski, M. Zieliński. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 38(10) **2015** 1925-33.
- [136] S. Tanisho, M. Kuromoto, N. Kadokura. Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(7) **1998** 559-63.
- [137] J.T. Kraemer, D.M. Bagley. Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22) **2008** 6558-65.
- [138] G. Kyazze, N. Martinez-Perez, R. Dinsdale, G.C. Premier, F.R. Hawkes, A.J. Guwy, D.L. Hawkes. Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5) **2006** 971-979.
- [139] D.-H. Kim, S.-K. Han, S.-H. Kim, H.-S. Shin. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15) **2006** 2158-69.
- [140] O. Mizuno, R. Dinsdale, F.R. Hawkes, D.L. Hawkes, T. Noike. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73(1) **2000** 59-65.
- [141] T.-A.D. Nguyen, S.J. Han, J.P. Kim, M.S. Kim, S.J. Sim. Hydrogen production of the hyperthermophilic eubacterium, *Thermotoga neapolitana* under N₂ sparging condition. *Bioresource Technology*, 101(1, Supplement) **2010** S38-41.
- [142] V. Clion, C. Dumas, S. Collin, B. Ernst. Key factors for biohydrogen production by dark fermentation. *Can. J. Chem. Eng.*, 93(2) **2015** 309-16.
- [143] B.E. Logan, S.-E. Oh, I.S. Kim, S. Van Ginkel. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. *Environmental Science & Technology*, 36(11) **2002** 2530-5.
- [144] W. Park, S.H. Hyun, S.-E. Oh, B.E. Logan, I.S. Kim. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ. Sci. Technol.*, 39(12) **2005** 4416-20.
- [145] H. Alshiyab, M.S. Kalil, A.A. Hamid, W.M.W. Yusoff. Removal of Headspace CO₂ Increases Biological Hydrogen Production by *C. acetobutylicum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(19) **2008** 2336-40.
- [146] D.-H. Kim, H.-S. Shin, S.-H. Kim. Enhanced H₂ fermentation of organic waste by CO₂ sparging. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20) **2012** 15563-8.
- [147] L. Dipasquale, G. d'Ippolito, A. Fontana. Capnophilic lactic fermentation and hydrogen synthesis by *Thermotoga neapolitana*: An unexpected deviation from the dark fermentation model. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(10) **2014** 4857-62.
- [148] P. Trambouze. Réacteurs chimiques - Technologie. *Techniques de l'Ingénieur* **1993**.
- [149] G. Bourat. Fermentations - Propriétés des micro-organismes. *Techniques de l'Ingénieur* **1992**.
- [150] K.-W. Jung, D.-H. Kim, S.-H. Kim, H.-S. Shin. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18) **2011** 8612-20.
- [151] I. Mariakakis, P. Bischoff, J. Krampe, C. Meyer, H. Steinmetz. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17) **2011** 10690-700.

Bibliographie

- [152] K.-S. Lee, P.-J. Lin, J.-S. Chang. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4) **2006** 465-72.
- [153] Y. Ueno, S. Otsuka, M. Morimoto. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2) **1996** 194-7.
- [154] C.C. Chen, C.Y. Lin, J.S. Chang. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2) **2001** 56-64.
- [155] J.-I. Horiuchi, T. Shimizu, K. Tada, T. Kanno, M. Kobayashi. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*, 82(3) **2002** 209-13.
- [156] C.C. Chen, C.Y. Lin. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*, 7(3) **2003** 695-9.
- [157] S.W. Van Ginkel, B. Logan. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, 39(16) **2005** 3819-26.
- [158] F.-Y. Chang, C.-Y. Lin. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1) **2004** 33-9.
- [159] F.R. Hawkes, R. Dinsdale, D.L. Hawkes, I. Hussy. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12) **2002** 1339-47.
- [160] S.-H. Kim, S.-K. Han, H.-S. Shin. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41(1) **2006** 199-207.
- [161] Z.-P. Zhang, K.-Y. Show, J.-H. Tay, D.T. Liang, D.-J. Lee. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors - A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5) **2008** 1559-64.
- [162] P.J. Verbelen, D.P. De Schutter, F. Delvaux, K.J. Verstrepen, F.R. Delvaux. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett*, 28 **2006** 1515-25.
- [163] L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Micro*, 2(2) **2004** 95-108.
- [164] S.-Y. Wu, C.-N. Lin, J.-S. Chang, K.-S. Lee, P.-J. Lin. Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge. *Biotechnol. Prog.*, 18(5) **2002** 921-6.
- [165] P. Boulenger, Y. Gallouin. Traitements biologiques anaérobies des effluents industriels. *Techniques de l'Ingénieur* **2009**.
- [166] H.N. Gavala, I.V. Skiadas, B.K. Ahring. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(9) **2006** 1164-75.
- [167] N. Peng, N. Widjojo, P. Sukitpaneinit, M.M. Teoh, G.G. Lipscomb, T.-S. Chung, J.-Y. Lai. Evolution of polymeric hollow fibers as sustainable technologies: Past, present, and future. *Progress in Polymer Science*, 37(10) **2012** 1401-24.
- [168] G. Pearce. Introduction to membranes: An introduction to membrane bioreactors. *Filtration & Separation*, 45(1) **2008** 32-5.
- [169] R.R. Singhanica, G. Christophe, G. Perchet, J. Troquet, C. Larroche. Immersed membrane bioreactors: An overview with special emphasis on anaerobic bioprocesses. *Bioresource Technology*, 122(0) **2012** 171-80.
- [170] M. Miyamoto, Y. Nakashimada, S. Uemiya. 12 - Membrane reactors for biogas production and processing. *Membrane Reactors for Energy Applications and Basic Chemical Production*, Woodhead Publishing; **2015**, p. 345-65.
- [171] P. Bakonyi, N. Nemestóthy, K. Bélafi-Bakó. Biohydrogen purification by membranes: An overview on the operational conditions affecting the performance of non-porous, polymeric and ionic liquid based gas separation membranes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(23) **2013** 9673-87.
- [172] A.T. Nielsen, H. Amandusson, R. Bjorklund, H. Dannetun, J. Ejlerstson, L.-G. Ekedahl, I. Lundström, B.H. Svensson. Hydrogen production from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(6) **2001** 547-50.
- [173] V. Teplyakov, L. Gassanova, E. Sostina, E. Slepova, M. Modigell, A. Netrusov. Lab-scale bioreactor integrated with active membrane system for hydrogen production: experience and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12) **2002** 1149-55.
- [174] K. Bélafi-Bakó, D. Búcsú, Z. Pientka, B. Bálint, Z. Herbel, K.L. Kovács, M. Wessling. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11) **2006** 1490-5.
- [175] M.G. Shalygin, S.M. Abramov, A.I. Netrusov, V.V. Teplyakov. Membrane recovery of hydrogen from gaseous mixtures of biogenic and technogenic origin. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(8) **2015** 3438-51.
- [176] Z. Trad, J. Akimbomi, C. Vial, C. Larroche, M.J. Taherzadeh, J.-P. Fontaine. Development of a submerged anaerobic membrane bioreactor for concurrent extraction of volatile fatty acids and biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 196 **2015** 290-300.
- [177] C.Y. Lin, C.H. Lay. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1) **2004** 41-5.
- [178] W.T. Liu, T.L. Marsh, H. Cheng, L.J. Forney. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11) **1997** 4516-22.
- [179] Application Note: Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems **2005**.
- [180] The sequence list of 16S rRNA s. d. <http://trflp.info/trfma/largedb/list.php> (consulté le 10 janvier 2014).

- [181] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén, P. Nyrén. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry*, 242(1) **1996** 84-9.
- [182] History of Illumina Sequencing s. d. <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/solexa-technology.html> (consulté le 9 juillet 2015).
- [183] E.H. Simpson. Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148) **1949** 688.
- [184] M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts, K. van't Riet. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6) **1990** 1875-81.
- [185] B. Baghchehsaraee, G. Nakhla, D. Karamanev, A. Margaritis. Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10) **2010** 5021-7.
- [186] B. Xiao, J. Liu. Effects of various pretreatments on biohydrogen production from sewage sludge. *Chin. Sci. Bull.*, 54(12) **2009** 2038-44.
- [187] W. Wang, L. Xie, J. Chen, G. Luo, Q. Zhou. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. *Bioresource Technology*, 102(4) **2011** 3833-9.
- [188] C.C. Wang, C.. Chang, C.P. Chu, D.J. Lee, B.-V. Chang, C.S. Liao. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology*, 102(1) **2003** 83-92.
- [189] L. Guo, X.-M. Li, X. Bo, Q. Yang, G.-M. Zeng, D. Liao, J.-J. Liu. Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource Technology*, 99(9) **2008** 3651-8.
- [190] B. Baghchehsaraee, G. Nakhla, D. Karamanev, A. Margaritis, G. Reid. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15) **2008** 4064-73.
- [191] S. Venkata Mohan, Y. Vijaya Bhaskar, P.N. Sarma. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. *Water Research*, 41(12) **2007** 2652-64.
- [192] S.-E. Oh, S. Van Ginkel, B.E. Logan. The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. *Environ. Sci. Technol.*, 37(22) **2003** 5186-90.
- [193] B. Xiao, Y. Han, J. Liu. Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(12) **2010** 6152-60.
- [194] J. Wang, W. Wan. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12) **2008** 2934-41.
- [195] H. Zhu, M. Béland. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(14) **2006** 1980-8.
- [196] B. Hu, S. Chen. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15) **2007** 3266-73.
- [197] N.-Q. Ren, W.-Q. Guo, X.-J. Wang, W.-S. Xiang, B.-F. Liu, X.-Z. Wang, J. Ding, Z.-B. Chen. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(16) **2008** 4318-24.
- [198] X.M. Guo. Biohydrogen production and metabolic pathways in dark fermentation related to the composition of organic solid waste. Thèse en Génie des Procédés, Biotechnologie de l'Environnement. MONTPELLIER II, **2012**.
- [199] B. Xiao, J. Liu. Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1) **2009** 163-7.
- [200] S. Yan, K. Miyayaga, X.-H. Xing, Y. Tanji. Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3) **2008** 598-603.
- [201] K.T. Finneran. *Rhodoferrax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 53(3) **2003** 669-73.
- [202] R. Kaden, C. Sproer, D. Beyer, P. Krolla-Sidenstein. *Rhodoferrax saidenbachensis* sp. nov., a psychrotolerant, very slowly growing bacterium within the family Comamonadaceae, proposal of appropriate taxonomic position of *Albidiferrax ferrireducens* strain T118T in the genus *Rhodoferrax* and emended description of the genus *Rhodoferrax*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 64(Pt 4) **2014** 1186-93.
- [203] R. Fudou, Y. Jojima, T. Iizuka, S. Yamanaka. *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48(2) **2002** 109-16.
- [204] M.A. Horn, J. Ihssen, C. Matthies, A. Schramm, G. Acker, H.L. Drake. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3) **2005** 1255-65.
- [205] A. Wolterink, S. Kim, M. Muusse, I.S. Kim, P.J.M. Roholl, C.G. van Ginkel, A.J.M. Stams, S.W.M. Kengen. *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5) **2005** 2063-8.
- [206] S. Lu, M. Park, H. Ro, D.S. Lee, W. Park, C.O. Jeon. Analysis of microbial communities using culture-dependent and culture-independent approaches in an anaerobic/aerobic SBR reactor. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-*, 44(2) **2006** 155.

Bibliographie

- [207] D. Cui, A. Li, S. Zhang, C. Pang, J. Yang, J. Guo, F. Ma, J. Wang, N. Ren. Microbial community analysis of three municipal wastewater treatment plants in winter and spring using culture-dependent and culture-independent methods. *World J Microbiol Biotechnol*, 28(6) **2012** 2341-53.
- [208] M.F. Temudo, R. Kleerebezem, M. van Loosdrecht. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.*, 98(1) **2007** 69-79.
- [209] H.H.P. Fang, H. Liu. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82(1) **2002** 87-93.
- [210] K.-S. Lee, Y.-F. Hsu, Y.-C. Lo, P.-J. Lin, C.-Y. Lin, J.-S. Chang. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5) **2008** 1565-72.
- [211] D. Infantes, A. González del Campo, J. Villaseñor, F.J. Fernández. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(24) **2011** 15595-601.
- [212] C. Brannon Andersen. Understanding carbonate equilibria by measuring alkalinity in experimental and natural systems. *Journal of Geoscience Education*, 50(4) **2002** 389-403.
- [213] J. Wang, W. Wan. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(20) **2008** 5392-7.
- [214] G. De Gioannis, A. Muntoni, A. Poletini, R. Pomi. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, 33(6) **2013** 1345-61.
- [215] S.I. Gadow, H. Jiang, R. Watanabe, Y.-Y. Li. Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 142 **2013** 304-11.
- [216] Y. Mu, X.-J. Zheng, H.-Q. Yu, R.-F. Zhu. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(6) **2006** 780-5.
- [217] Y. Zhang, J. Shen. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4) **2006** 441-6.
- [218] C.-Y. Lin, C.-C. Wu, J.-H. Wu, F.-Y. Chang. Effect of cultivation temperature on fermentative hydrogen production from xylose by a mixed culture. *Biomass and Bioenergy*, 32(12) **2008** 1109-15.
- [219] J. Wang, W. Wan. Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge. *Biomass and Bioenergy*, 35(9) **2011** 3896-901.
- [220] W. Qiao, K. Takayanagi, Q. Niu, M. Shofie, Y.Y. Li. Long-term stability of thermophilic co-digestion submerged anaerobic membrane reactor encountering high organic loading rate, persistent propionate and detectable hydrogen in biogas. *Bioresource Technology*, 149 **2013** 92-102.
- [221] Y.-K. Oh, S.H. Kim, M.-S. Kim, S. Park. Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. *Biotechnol. Bioeng.*, 88(6) **2004** 690-8.
- [222] D. Karadag. Anaerobic H₂ production at elevated temperature (60 °C) by enriched mixed consortia from mesophilic sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1) **2011** 458-65.
- [223] S.M. Kotay, D. Das. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresource Technology*, 98(6) **2007** 1183-90.
- [224] S. Venkata Mohan, S.V. Raghavulu, R.K. Goud, S. Srikanth, V.L. Babu, P.N. Sarma. Microbial diversity analysis of long term operated biofilm configured anaerobic reactor producing biohydrogen from wastewater under diverse conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(22) **2010** 12208-15.
- [225] R.K. Goud, S.V. Raghavulu, G. Mohanakrishna, K. Naresh, S.V. Mohan. Predominance of Bacilli and Clostridia in microbial community of biohydrogen producing biofilm sustained under diverse acidogenic operating conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(5) **2012** 4068-76.
- [226] S.B. Carolina Rubiano-Labrador. *Caloramator quimbayensis* sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic bacterium isolated from an Andean terrestrial hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **2012**.
- [227] C.D. Ogg, B.K.C. Patel. *Fervidicella metallireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from geothermal waters. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 60(6) **2010** 1394-400.
- [228] K. Ma, T. Maeda, H. You, Y. Shirai. Open fermentative production of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient. *Bioresource Technology*, 151 **2014** 28-35.
- [229] B. Fraj, W. Ben Hania, A. Postec, M. Hamdi, B. Ollivier, M.-L. Fardeau. *Fonticella tunisiensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(Pt 6) **2013** 1947-50.
- [230] Y. Akutsu, Y.-Y. Li, M. Tandukar, K. Kubota, H. Harada. Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22) **2008** 6541-8.
- [231] S. Zhang, T.-H. Kim, Y. Lee, S.-J. Hwang. Effects of VFAs Concentration on Bio-hydrogen Production with *Clostridium Bifermentans* 3AT-ma. *Energy Procedia*, 14 **2012** 518-23.
- [232] P. Sivagurunathan, B. Sen, C.-Y. Lin. Batch fermentative hydrogen production by enriched mixed culture: Combination strategy and their microbial composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(2) **2014** 222-8.
- [233] P.C. Hallenbeck. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17) **2009** 7379-89.
- [234] J.-R. Bastidas-Oyanedel, Z. Mohd-Zaki, R.J. Zeng, N. Bernet, S. Pratt, J.-P. Steyer, D.J. Batstone. Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 110(0) **2012** 503-9.

- [235] P. Sivagurunathan, B. Sen, C.-Y. Lin. Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33) **2014** 19232-41.
- [236] A. Ueki, H. Akasaka, A. Satoh, D. Suzuki, K. Ueki. *Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field soil. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 57(8) **2007** 1803-9.
- [237] D. Xing, N. Ren, Q. Li, M. Lin, A. Wang, L. Zhao. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(4) **2006** 755-60.
- [238] J.R. Paterek. Method and apparatus for hydrogen production from organic wastes and manure. US6887692, **2005**.
- [239] D.E. Holmes, K.P. Nevin, T.L. Woodard, A.D. Peacock, D.R. Lovley. *Prolixibacter bellariivorans* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum Bacteroidetes, isolated from a marine-sediment fuel cell. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 57(4) **2007** 701-7.
- [240] Y. Sung, K.E. Fletcher, K.M. Ritalahti, R.P. Apkarian, N. Ramos-Hernández, R.A. Sanford, N.M. Mesbah, F.E. Löffler. *Geobacter lovleyi* sp. nov. Strain SZ, a Novel Metal-Reducing and Tetrachloroethene-Dechlorinating Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4) **2006** 2775-82.
- [241] K.P. Nevin, D.E. Holmes, T.L. Woodard, S.F. Covalla, D.R. Lovley. Reclassification of *Trichlorobacter thiogenes* as *Geobacter thiogenes* comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 57(3) **2007** 463-6.
- [242] O. Chertkov, J. Sikorski, E. Brambilla, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina Del Rio, M. Nolan, S. Lucas, H. Tice, J.-F. Cheng, et al. Complete genome sequence of *Aminobacterium colombiense* type strain (ALA-1T). *Standards in Genomic Sciences*, 2(3) **2010** 280-9.
- [243] J. Downes, S.R. Vartoukian, F.E. Dewhirst, J. Izard, T. Chen, W.-H. Yu, I.C. Sutcliffe, W.G. Wade. *Pyramidobacter piscicolens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum « Synergistetes » isolated from the human oral cavity. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(5) **2009** 972-80.
- [244] E.P. Cato, D.E. Hash, L.V. Holdeman, W.E. Moore. Electrophoretic study of *Clostridium* species. *J Clin Microbiol*, 15(4) **1982** 688-702.
- [245] C.-L. Cheng, J.-S. Chang. Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18) **2011** 8628-34.
- [246] B. Ernst, R. Gougeon, É. François-Lopez, C. Dumas, S. Vuilleumier, H. Alexandre. Method for Producing Hydrogen by Means of Dark Fermentation from Biomass from the Wine-Producing Industry, Without Using a Microbial Consortium. WO/2016/030623, **2016**.
- [247] S. Suzuki, M. Shintani, Z.K. Sanchez, K. Kimura, M. Numata, A. Yamazoe, K. Kimbara. Effects of phosphate addition on methane fermentation in the batch and upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24) **2015** 10457-66.
- [248] K.L. Christ, R.L. Burritt. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53 **2013** 232-42.
- [249] V. Lempereur, S. Penavayre, A. Descôtes, P. Naviaux, M.-N. Viaud, F. Pelenc, N. Lahitte, F. Bosque, F. Jolibert. *Marc de raisins, lies de vin et bourbes: Quelle gestion des sous-produits vinicoles?* Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV); **2013**.
- [250] G. Uden, T. Zauhmüller. Metabolism of Sugars and Organic Acids by Lactic Acid Bacteria from Wine and Must. In: König H, Uden G, Fröhlich J, éditeurs. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer Berlin Heidelberg; **2009**, p. 135-47.
- [251] J. Tabachnick, R.H. Vaughn. Characteristics of Tartrate-fermenting Species of *Clostridium*., Characteristics of Tartrate-fermenting Species of *Clostridium*. *Journal of Bacteriology*, 56(4) **1948** 435-43.
- [252] J.D. Oliver. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4) **2010** 415-25.
- [253] C.-Y. Chen, M.-H. Yang, K.-L. Yeh, C.-H. Liu, J.-S. Chang. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(18) **2008** 4755-62.

Table des figures

Figure 1. Diagramme présentant les capacités comparées de stockage d'énergie en volume et en masse [23]	6
Figure 2. Principe général du couplage des procédés de production d'hydrogène (adapté de [53])	20
Figure 3. Comparaison des coûts de production d'hydrogène pour différentes voies de production (adapté de [61])	21
Figure 4. Illustration schématique du processus de digestion anaérobie (adapté de [62])	22
Figure 5. Principales voies métaboliques de la production d'hydrogène par fermentation obscure (adaptée de [63] et [64])	23
Figure 6. Schéma de principe du traitement biologique des eaux usées en station d'épuration avec décantation primaire (adapté de [90])	28
Figure 7. Illustration schématique du fonctionnement d'un bioréacteur batch – t_D : début de fermentation ; t_F : fin de fermentation (adapté de [147])	37
Figure 8. Illustration schématique du fonctionnement d'un type de bioréacteur semibatch– t_D' : début de fermentation ; t_F' : fin de fermentation (adapté de [147])	37
Figure 9. Illustration schématique du fonctionnement d'un bioréacteur continu (adapté de [147])	38
Figure 10. Illustration schématique du fonctionnement de bioréacteurs continu avec cultures immobilisées. Réacteur à lit fixe (a) ; Réacteur à lit fluidisé (b) ; Réacteur à boues granuleuses (c)	41
Figure 11. Illustration schématique des différentes configurations de bioréacteurs membranaires généralement utilisés (adapté de [170])	43
Figure 12. Schéma du traitement des eaux usées de la station d'épuration avec les différents points de prélèvement des inocula testés (adapté de [90])	52
Figure 13. Schéma du dispositif expérimental du réacteur agité semibatch (RASB)	54
Figure 14. Profil de température dans le réacteur en fonction du temps pour un test de référence	55
Figure 15. Schéma du dispositif expérimental du réacteur agité continu	56
Figure 16. Photographie et schéma du module membranaire à fibres creuses Polymem utilisé dans cette étude	57
Figure 17. Schéma du dispositif expérimental du bioréacteur membranaire (BRM)	58
Figure 18. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour modes d'extraction des gaz : réacteur clos, avec extraction libre et en dépression	59
Figure 19. Schéma de principe de la T-RFLP (adapté de [179])	63
Figure 20. Schéma simplifié du traitement des eaux usées de la station d'épuration avec les points de prélèvements des inocula testés (adapté de [90])	70
Figure 21. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différents inocula sans apport de substrat additionnel	73
Figure 22. Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone initialement présent dans le milieu réactionnel, exprimé en pourcentage du carbone initial	77
Figure 23. Débit (a) et production cumulée (b) de H_2 en fonction du temps pour différents inocula avec apport de substrat modèle	79
Figure 24. Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone initialement présent dans le milieu réactionnel, exprimé en pourcentage du carbone initial	85
Figure 25 Chromatogramme de HPLC-UV du milieu réactionnel avant et après traitement thermique des boues activées de la zone anoxie – Le pic t_m correspond à l'ensemble des composés présents dans l'échantillon, non retenus par la colonne de chromatographie, composés apolaires, alcool, etc. ce pic correspond au temps mort de la méthode.	87

Table des figures

Figure 26. Evolution de la composition des échantillons prélevés dans le milieu réactionnel après traitement thermique sur la période des tests de fermentation présentés – Valeur normalisée par rapport à leur moyenne globale.	88
Figure 27. Electrophorégrammes obtenus par T-RFLP pour l'analyse des échantillons de boues activées de la zone anoxie, prélevés dans le bioréacteur avant et après traitement thermique.....	89
Figure 28. Débit de H ₂ et CO ₂ et suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps pour les tests sans (a) et avec régulation du pH (b).....	95
Figure 29. Débit de CO ₂ et suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps lors d'un test de fermentation en continu (RAC-a) avec régulation du pH – détail des variations conjointes du pH et de la production de CO ₂	96
Figure 30. Débit (a) et production cumulée (b) de H ₂ en fonction du temps pour différentes températures de fermentation.....	99
Figure 31. Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différentes températures de fermentation, exprimé en pourcentage du carbone initial.....	105
Figure 32. Evolution du profil de l'analyse par T-RFLP pendant les tests réalisés à différentes températures de fermentation.....	106
Figure 33. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons finaux de fermentation à 38°C, 49°C et 59°C - Abondance > 2% pour au moins un échantillon.....	113
Figure 34. Evolution de la concentration en métabolites et substrat, et de la production cumulée de gaz pendant la fermentation obscure en fonction du temps	115
Figure 35 Bilan carbone final réalisé par rapport au carbone présent dans le milieu réactionnel à t ₀ pour le suivi temporel de la fermentation obscure, exprimé en pourcentage du carbone à t ₀	117
Figure 36 Chromatogramme de HPLC-UV du milieu réactionnel à 4 h, 5 h et 20 h de fermentation	118
Figure 37. Evolution de la production de H ₂ (mL/min) pendant le test de fermentation de référence.....	119
Figure 38. Evolution du profil de l'analyse par T-RFLP pendant le test de fermentation de référence	119
Figure 39. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons AvTT°, ApTT°, 5 h et 20 h de fermentation - Abondance > 2% pour au moins un échantillon	123
Figure 40. Débit (a) et production cumulée (b) de H ₂ en fonction du temps pour différents modes d'extraction des gaz– concernant le mode du réacteur clos, seule la pression dans le bioréacteur est représentée (b).....	129
Figure 41. Suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps pour différents mode d'extraction des gaz	131
Figure 42. Pressions partielles des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur en fonction du mode d'extraction des gaz (valeur au maximum de la production d'hydrogène pour les modes de fonctionnement semibatch - valeur au début du dégazage pour le mode de fonctionnement avec réacteur clos, normalisée sur 1 bar) - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliquats de fermentation	131
Figure 43. Rendement en H ₂ (a) et rapport molaire H ₂ /CO ₂ (b) en fonction du mode d'extraction des gaz, avant et après dégazage du milieu réactionnel - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des répliquats de fermentation	132
Figure 44. Bilan carbone final réalisé par rapport au pourcentage de carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différents modes d'extraction des gaz produits	135
Figure 45. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons finaux (20 h) de fermentation clos et avec gaz de balayage - Abondance > 2% pour au moins un des échantillons.....	137
Figure 46. Débit (a) et production cumulée (b) de H ₂ en fonction du temps pour différents débits de gaz de balayage	141

Figure 47. Pressions partielles des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur en fonction du débit de gaz de balayage (valeur au maximum de la production d'hydrogène) - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des réplicats de fermentation.....	142
Figure 48. Evolution des volumes produits de H ₂ (a) et de CO ₂ (b), du rendements en H ₂ (c), des paramètres H _{max} (d), R _{max} (e) et λ (f), et des rapports H ₂ /CO ₂ (g), B/A (h) et H ₂ /(B+A) (i) en fonction du débit de gaz de balayage - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des réplicats de fermentation	143
Figure 49. Bilan carbone final réalisé par rapport au pourcentage de carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différents débits de gaz de balayage	146
Figure 50. Profil d'analyse par T-RFLP pour les tests de fermentation à différent débits de gaz de balayage	147
Figure 51. Débit (a) et production cumulée (b) de H ₂ en fonction du temps pour différentes compositions du gaz de balayage.....	152
Figure 52. Suivi du pH du milieu réactionnel en fonction du temps pour différentes compositions du gaz de balayage	152
Figure 53. Pressions partielles des gaz dans le ciel gazeux du bioréacteur pour différentes compositions du gaz de balayage (valeur au maximum de la production d'hydrogène) - les barres d'erreurs correspondent à l'écart type des réplicats de fermentation.....	153
Figure 54. Bilan carbone final réalisé par rapport au pourcentage de carbone initialement présent dans le milieu réactionnel pour les tests réalisés avec différentes compositions (CO ₂ : N ₂) de gaz de balayage	156
Figure 55. Profil d'analyse par T-RFLP pour les tests de fermentation pour différentes compositions du gaz de balayage	157
Figure 56. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux dans les échantillons finaux de fermentation avec les gaz de balayage N ₂ et CO ₂ : N ₂ (75 : 25) - Abondance > 2% pour au moins un échantillon	160
Figure 57. Schéma du réacteur agité en mode continu (RAC)	165
Figure 59. Débits de H ₂ et CO ₂ en fonction du temps pour le test de fermentation RAC-a	166
Figure 58. Schéma du test RAC-a.....	166
Figure 60. Valeurs de productions de gaz, d'hexose, et de métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du système, en fonction du temps pour le test de fermentation RAC-a.....	168
Figure 61. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée.....	169
Figure 62. Schéma du test RAC-b.....	170
Figure 63. Débits de H ₂ et CO ₂ en fonction du temps pour le test de fermentation RAC-b	171
Figure 64. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, en fonction du TSH pour le RAC et pour le test de référence RASB (moyenne à 6-7 h)	172
Figure 65. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du RAC, en fonction du TSH	173
Figure 66. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel en fonction du TSH pour le RAC et pour le test de référence RASB - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée	173
Figure 67. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation de test RAC-a et RAC-b - Abondance > 2% pour au moins un échantillon	175
Figure 68. Schéma de principe du BRM	180
Figure 69. Schéma du test BRM-a.....	181
Figure 70. Pression relative dans la calandre du BRM et débit de H ₂ pour le test de fermentation BRM-a	182

Table des figures

Figure 71. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-a en mode de fonctionnement BRM.....	183
Figure 72. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du système, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-a.....	185
Figure 73. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel – moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée.....	185
Figure 74. Schéma du test BRM-b.....	186
Figure 75. Débits de H ₂ et CO ₂ en fonction du temps pour les tests de fermentation BRM-b (a) et RAC-b (b).....	187
Figure 76. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, en fonction du TSH pour les tests RAC-b et le BRM-b.....	189
Figure 77. Valeurs de production des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, en fonction du TSH pour les tests RAC-b et le BRM-b.....	189
Figure 78. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne sur les échantillons réalisés dans le bioréacteur sur la phase considérée.....	190
Figure 79. Schéma des tests BRM-b, BRM-c et BRM-d.....	190
Figure 80. Débits de H ₂ en fonction du temps pour les tests de fermentation BRM-b, BRM-c et BRM-d.....	191
Figure 81. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, pour les tests BRM-b, BRM-c, BRM-d.....	192
Figure 82. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée.....	193
Figure 83. Schéma du test BRM-b.....	193
Figure 84. Débits de H ₂ et CO ₂ en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-b avec modification du TSH de 12 h à 17 h puis 20 h.....	194
Figure 85. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, calculées sur une durée minimale de deux fois le TSH, en fonction du TSH pour les tests en mode BRM.....	196
Figure 86. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, en fonction du TSH pour les tests en mode BRM.....	196
Figure 87. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel – moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée.....	197
Figure 88. Schéma du test BRM-c.....	198
Figure 89. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avec ajouts ponctuels successifs de métabolites dans le milieu réactionnel.....	199
Figure 90. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avec ajouts ponctuels successifs de métabolites dans le milieu réactionnel.....	200
Figure 91. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminé sur la boucle de recirculation, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c.....	200
Figure 92. Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation de test RAC et BRM, à 68 h, avec un TSH de 12 h - Abondance > 2% pour au moins un échantillon.....	203
Figure 94. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-e sans boucle de recirculation.....	207

Figure 93. Schéma du test BRM-e	207
Figure 95. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent, pour la moyenne des tests réalisés avec recirculation (BRM-b, BRM-c, BRM-d) et le test réalisé sans recirculation (BRM-e).....	208
Figure 96. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée	209
Figure 97. Schéma du test BRM-c	211
Figure 98. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avec coupure de la régulation de température du bioréacteur.....	212
Figure 99. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c, avant et après la coupure de la régulation de température du bioréacteur	213
Figure 100. Schéma du test BRM-d en mode d'extraction libre des gaz.....	213
Figure 101. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-d avec l'utilisation des modes avec et sans gaz de balayage pour l'extraction des gaz produits par la fermentation	214
Figure 102. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du système, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-d.....	216
Figure 103. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée	216
Figure 105. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-c avant et après ajout ponctuel de KH ₂ PO ₄ en cours de fermentation	220
Figure 104. Schéma du test BRM-c	220
Figure 106. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, avant et après ajout ponctuel de KH ₂ PO ₄ en cours de fermentation pour le test de fermentation BRM-c	221
Figure 107. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée	222
Figure 108. Schéma des tests BRM-f et BRM-g.....	222
Figure 109. Débit de production de gaz en fonction du temps pour les tests de fermentation BRM-f et BRM-g avec alimentation avec nutriments (a) et des tests de fermentation BRM-b, BRM-c et BRM-d avec alimentation sans nutriments (b)	223
Figure 110. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, pour les tests de fermentation avec et sans ajout de nutriments	225
Figure 111. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présent dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la gamme de temps considérée	225
Figure 112. Schéma du test BRM-i.....	227
Figure 113. Débits de H ₂ et CO ₂ en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-i avec l'utilisation de bourbes comme substrat	228
Figure 114. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-i.....	229
Figure 115. Concentrations moyennes (hexose et métabolites) présentes dans le milieu réactionnel, déterminées sur la boucle de recirculation, en fonction du temps pour le test BRM-i et concentration moyenne des échantillons prélevés dans le réservoir d'alimentation au cours du test BRM-i – comparaison avec la moyenne des résultats obtenus pour les trois tests de fermentation réalisés avec l'utilisation de substrat modèle (BRM-b, BRM-c et BRM-d)	230

Table des figures

Figure 116. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel - moyenne réalisée sur les échantillons du bioréacteur sur la phase considérée pour le test BRM-i – comparaison avec la moyenne des résultats obtenus pour les trois tests de fermentation réalisés avec l'utilisation de substrat modèle (BRM-b, BRM-c et BRM-d)	231
Figure 117. Schéma du test BRM-k	232
Figure 118. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-k sans apport d'inoculum microbien extérieur(a) et pour les tests de fermentation BRM-f et BRM-g avec apport de boues activées comme inoculum microbien (b)	233
Figure 119. Valeurs de productions des gaz, de l'hexose, et des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons entrant et effluent du BRM, en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-k comparée à la moyenne obtenu sur la phase de production pour les tests BRM-e et BRM-f avec apport d'inoculum microbien	234
Figure 120. Bilan carbone réalisé sur la quantité de carbone présente dans l'effluent par rapport à celle introduite dans le milieu réactionnel en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-k comparée à la moyenne obtenu sur la phase de production pour les tests BRM-e et BRM-f avec apport d'inoculum microbien	235
Figure 121. Schéma du test BRM-l et BRM-m	236
Figure 122. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-l sans apport d'inoculum microbien externe	237
Figure 123. Débits de H ₂ et CO ₂ et pH en fonction du temps pour le test de fermentation BRM-m sans apport d'inoculum microbien externe	238
Figure 124. Principales voies métaboliques de la production de biohydrogène par fermentation obscure (adaptée de [63] et [64])	17

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des voies biologiques de production d'hydrogène	18
Tableau 2. Conditions et performances moyennes de tests de fermentation obscure relevées dans la littérature sur 185 expériences, (données adaptées de l'étude de Elsharnouby et al. [75])	26
Tableau 3. Composition de la solution d'alimentation utilisée lors des tests de fermentation avec nutriments	53
Tableau 4. Description de la configuration des modules du μ GC-TCD utilisé pour l'analyse des gaz	60
Tableau 5. Valeurs des MES, des volumes produits de H_2 et de CO_2 , du rendement en H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose en fonction de l'inoculum sans apport de substrat additionnel	74
Tableau 6. Concentrations initiales d'hexose et valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de l'inoculum sans apport de substrat additionnel – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure	76
Tableau 7. Valeurs des MES, des volumes produits de H_2 et de CO_2 , du rendement en H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose en fonction de l'inoculum avec apport de substrat modèle	80
Tableau 8. Recensement d'études portant sur la fermentation obscure à partir d'un consortium microbien issu de boues de station d'épuration, traitées thermiquement, et alimentées avec saccharose ou glucose	82
Tableau 9. Valeurs de production des métabolites analysées, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de l'inoculum avec apport de substrat modèle – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure	84
Tableau 10. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, avant et après traitement thermique - nombre d'OTU et indice de Simpson calculés sur la répartition des OTU de l'échantillon	90
Tableau 11. Résultats obtenus par séquençage des échantillons de boues activées de la zone anoxie A et B, avant et après traitement thermique - groupes ayant une abondance > 2% pour au moins un des échantillons– un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible	91
Tableau 12. Valeurs du rendement de H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ pour les tests sans et avec régulation du pH	97
Tableau 13. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, pour les tests sans et avec régulation du pH - un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure	98
Tableau 14. Valeurs du rendement de H_2 , des paramètres H_{max} , R_{max} et λ , des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ en fonction de la température de fermentation –les incertitudes correspondent à l'écart type des réplicats de fermentation	100
Tableau 15. Recensement d'études de l'impact de la température sur les performance de fermentation obscure à partir d'un consortium microbien mixte - Valeurs du rendement et de la productivité en H_2 et des rapports molaire H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$	102
Tableau 16. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de la température de fermentation – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure	104
Tableau 17. Correspondances des pics majeures de l'analyse T-RFLP à différentes température de fermentation avec la base de données [180]	107
Tableau 18. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés à 38°C, 49°C et 59°C - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	108

Liste des tableaux

Tableau 19. Résultats obtenus par séquençage des échantillons finaux de fermentation à 38°C, 49°C et 59°C - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons- un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible ou nulle	109
Tableau 20. Quantité de matière des métabolites analysés en fonction de la durée de fermentation – un code par dégradé de couleur est utilisé, allant du jaune pâle pour l'absence du métabolite au vert pour les quantités de matière importantes.....	116
Tableau 21. Correspondances des pics majeurs de l'analyse T-RFLP à 5 h de fermentation avec la base de données [180]	120
Tableau 22. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, avant et après traitement thermique, à 5 h et 20 h de fermentation - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon.....	121
Tableau 23. Résultats obtenus par séquençage des échantillons AvTT°, ApTT°, 5 h et 20 h de fermentation - groupes ayant une abondance > 2% pour au moins un des échantillons- un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible	122
Tableau 24. Valeurs des volumes produits de H ₂ et de CO ₂ , du rendement en H ₂ , des paramètres H _{max} , R _{max} et λ, du rapport H ₂ /CO ₂ en fonction du mode d'extraction des gaz produits, avant dégazage du milieu réactionnel - et valeurs des volumes produits de H ₂ et de CO ₂ , du rendement en H ₂ et des rapports H ₂ /CO ₂ , B/A et H ₂ /2(B+A) en fonction du mode d'extraction des gaz produits, après dégazage du milieu réactionnel.....	130
Tableau 25. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction du mode d'extraction des gaz produits – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure	134
Tableau 26. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés avec gaz de balayage et réacteur clos - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	136
Tableau 27. Résultats obtenus par séquençage des échantillons de fermentation en réacteur clos et avec gaz de balayage - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons- un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible.....	138
Tableau 28. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction du débit de gaz de balayage – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure.....	145
Tableau 29. Correspondances des pics majeurs de l'analyse T-RFLP avec la base de données T-RFLP [180] pour le test de fermentation avec un débit de gaz de balayage de 65 mL/Lmilieu/min	147
Tableau 30. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés avec N ₂ comme gaz de balayage, à 65 et 174 mL/Lmilieu/min - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	148
Tableau 31. Résultats obtenus par séquençage des échantillons finaux de fermentation avec le gaz de balayage de 65 et 174 mL/min - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons- un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible	149
Tableau 32. Valeurs du rendement en H ₂ , des paramètres H _{max} , R _{max} et λ, des rapports molaires H ₂ /CO ₂ , B/A et H ₂ /2(B+A) et de la consommation en hexose en fonction de la composition du gaz de balayage - les incertitudes correspondent à l'écart type des réplicats de fermentation.....	154
Tableau 33. Valeurs de production des métabolites analysés, calculées par différence entre les échantillons initiaux et finaux, en fonction de la composition (CO ₂ : N ₂) de gaz de balayage – un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = consommation majeure ; jaune = peu de variation de concentration ; vert = production majeure	155
Tableau 34. Correspondances des pics majeurs de l'analyse T-RFLP pour différentes compositions de gaz de balayage avec la base de données T-RFLP [180]	158
Tableau 35. Paramètres correspondants aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation réalisés avec N ₂ et CO ₂ : N ₂ (75 : 25) comme gaz de balayage - nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	159

Tableau 36. Résultats obtenus par séquençage des échantillons finaux de fermentation avec les gaz de balayage N_2 et $CO_2 : N_2$ (75 : 25) - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons- un code par dégradé de couleur est utilisé : rouge = abondance importante ; jaune = abondance moyenne ; bleu = abondance faible.....	161
Tableau 37. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test RAC-a, comparées aux résultats obtenus en RASB.....	167
Tableau 38. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour les tests RAC-a et RAC-b sur la phase de production stabilisée après deux TSH, comparées aux résultats obtenus en RASB.....	171
Tableau 39. Paramètres correspondant aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation RAC-a à 29 h et 241 h et RAC-b à 68 h – nombre de TSH écoulé avant échantillonnage, nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	174
Tableau 40. Résultats obtenus par séquençage des échantillons de biomasses des tests de fermentation RAC-a et RAC-b - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons	176
Tableau 41. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour les tests de fermentation BRM-a et RAC-a	183
Tableau 42. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose en fonction du mode de fonctionnement RAC et BRM pour deux TSH (≈ 12 h et ≈ 18 h)	188
Tableau 43. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour trois tests de référence en mode de fonctionnement BRM.....	191
Tableau 44. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour les tests de fermentation BRM avec différents TSH	195
Tableau 45. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-c avec ajouts ponctuels successifs de métabolites dans le milieu réactionnel – comparée aux résultats du test BRM-a (TSH long = 46 h) sur la phase stabilisée.....	199
Tableau 46. Paramètres correspondant aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation RAC-b et BRM-c à 68 h – TSH, nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	202
Tableau 47. Résultats obtenus par séquençage des échantillons à 68 h de fermentation de test RAC et BRM avec un TSH de 12 h - groupes ayant une abondance > 1% pour au moins un des échantillons	204
Tableau 48. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour la moyenne des tests réalisés avec recirculation (BRM-b, BRM-c, BRM-d) et le test réalisé sans recirculation (BRM-e).....	208
Tableau 49. Paramètres correspondant aux échantillons analysés par séquençage, pour les tests de fermentation BRM-c et BRM-e à 68 h – TSH, nombre d'OTU et indice de Simpson calculé sur la répartition des OTU de l'échantillon	209
Tableau 50. Résultats obtenus par séquençage des échantillons à 68 h de fermentation de test BRM-c et BRM-e - groupes ayant une abondance > 2% pour au moins un des échantillons	210
Tableau 51. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-c avant et après la coupure de la régulation de température du bioréacteur.....	212
Tableau 52. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-d.....	215
Tableau 53. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose, avant et après ajout ponctuel de KH_2PO_4 en cours de fermentation pour le test de fermentation BRM-c	221

Liste des tableaux

Tableau 54. Valeurs moyennes du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour les tests de fermentation avec et sans ajout de nutriments.....224


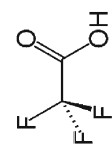
Tableau 55. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-i avec l'utilisation de bourbes comme substrat et des tests de fermentation BRM-b, BRM-c et BRM-d avec alimentation en substrat modèle228

Tableau 56. Valeurs du rendement et de la productivité en hydrogène, des rapports molaires H_2/CO_2 , B/A et $H_2/2(B+A)$ et de la consommation en hexose pour le test de fermentation BRM-k (sans apport d'inoculum externe) comparé à la moyenne des tests de fermentation BRM-f et BRM-g réalisé avec apport de boues activées comme inoculum microbien.....233

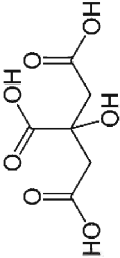
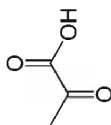
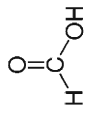
Tableau 57. Valeurs de durée de la période de repos avant remise en fonctionnement du BRM, du temps de latence, du rendement et de la productivité en hydrogène et du rapport molaire H_2/CO_2 , pour les tests de fermentation BRM-k, BRM-l et BRM-m.....237

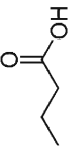
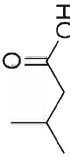


Annexes

Annexe I. Métabolites analysés par GC-FID et agent acidifiant (TFA)

Formule semi-développée	Nom	Ethanol
	Formule	C ₂ H ₆ O
	CAS	64-17-5
	Masse molaire (g/mol)	46,07 g/mol
	Masse volumique (g/cm ³)	0,79 g/cm ³
	Point de fusion (°C)	-117°C
	Point d'ébullition (°C)	79°C
	pKa	/
	Nom	Butanol
	Formule	C ₄ H ₁₀ O
	CAS	71-36-3
	Masse molaire (g/mol)	74,12 g/mol
	Masse volumique (g/cm ³)	0,81 g/cm ³
	Point de fusion (°C)	-90°C
	Point d'ébullition (°C)	117°C
	pKa	/
	Nom	Acide trifluoroacétique - TFA
	Formule	C ₂ HF ₃ O ₂
	CAS	76-05-1
	Masse molaire (g/mol)	114,02 g/mol
	Masse volumique (g/cm ³)	1,489 g/cm ³
	Point de fusion (°C)	-15,4°C
	Point d'ébullition (°C)	72,4°C
	pKa	0,23

Annexe 2. Métabolites analysés par HPLC-UV

Formule semi-développée		Acide citrique		Acidetartrique L	
Nom					
Formule		$C_6H_8O_7$		$C_4H_6O_6$	
CAS		201-069-1		526-83-0	
Masse molaire (g/mol)		192,12 g/mol		150,09 g/mol	
Masse volumique (g/cm ³)		1,67 g/cm ³		1,79 g/cm ³	
Point de fusion (°C)		156°C		171-3°C	
Point d'ébullition (°C)		310°C		/	
pKa		3,13 ; 4,76 ; 6,40		2,89 ; 4,40	
Acide pyruvique		Acide succinique		Acide lactique L	
$C_3H_4O_3$		$C_4H_6O_4$		$C_3H_6O_3$	
127-17-3		110-15-6		50-21-5	
88,06 g/mol		118,09 g/mol		90,08 g/mol	
1,25 g/cm ³		1,56 g/cm ³		g/cm ³	
11,8°C		184°C		53°C	
165°C		235°C		122°C	
2,50		4,2 ; 5,6		3,86	
Acide formique		Acide acétique		Acide propionique	
CH_2O_2		$C_2H_4O_2$		$C_3H_6O_2$	
64-18-6		64-19-7		79-09-4	
46,03 g/mol		60,05 g/mol		74,08 g/mol	
1,22 g/cm ³		1,05 g/cm ³		0,99 g/cm ³	
8,4°C		16,5°C		-21°C	
100,8°C		118,1°C		141°C	
3,77		4,76		4,87	

Acide butyrique	Acide isovalérique	Acide valérique
		
$C_4H_8O_2$	$C_5H_{10}O_2$	$C_5H_{10}O_2$
107-92-6	503-74-2	109-52-4
88,11 g/mol	102,13 g/mol	102,13 g/mol
0,96 g/cm ³	0,93 g/cm ³	0,94 g/cm ³
-7,9°C	-29°C	-34,5°C
163,5°C	176°C	186°C
4,82	4,77	4,82
Acide caproïque		
		
$C_6H_{12}O_2$		
142-62-1		
116,16 g/mol		
0,93 g/cm ³		
-3,4°C		
205,8°C		
4,88		

Annexe 3. Liste des tests de fermentation réalisés en conditions RASB

Paragraphe concernés	Série de tests et tests de référence	Volume de milieu (L _{-milieu})	Nature de l'inoculum	T° de fermentation	Substrat	Mode d'extraction des gaz	Nature du gdb	Débit de gdb (mL/min /L _{-milieu})	Nombre de réplicats
III.A.1	différents <i>inocula</i> sans ajout substrat additionnel	0,8	boues primaires	38°C	n.a.	gdb	N ₂	63	1
		0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	n.a.	gdb	N ₂	65	3
		0,8	boues activées de la zone aérée	38°C	n.a.	gdb	N ₂	65	1
		0,8	boues biologiques épaissies	38°C	n.a.	gdb	N ₂	65	1
		0,8	boues primaires épaissies	38°C	n.a.	gdb	N ₂	65	1
		0,8	boues biologiques digérées	38°C	n.a.	gdb	N ₂	65	1
		0,8	boues primaires	38°C	saccharose	gdb	N ₂	63	1
		0,8	boues activées de la zone aérée	38°C	saccharose	gdb	N ₂	63	1
		0,8	boues biologiques	38°C	saccharose	gdb	N ₂	63	1
		0,8	boues biologiques épaissies	38°C	glucose	gdb	N ₂	65	1
III.A.2 ; III.D ; IV.B.1	conditions de référence (réacteur de 1,0 L)	0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	65	5
		1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	174	3
III.C ; IV.A ; IV.B.2	test avec régulation du pH (pH > 5,5)	1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	174	1
		0,8	boues activées de la zone anoxie	59°C	glucose	gdb	N ₂	65	2
III.D	différentes températures de fermentation	0,8	boues activées de la zone anoxie	49°C	glucose	gdb	N ₂	65	2
		0,8	boues activées de la zone anoxie	35°C	glucose	gdb	N ₂	65	1
		0,8	boues activées de la zone anoxie	44°C	glucose	gdb	N ₂	65	1
		0,8	boues activées de la zone anoxie	54°C	glucose	gdb	N ₂	65	1

Paragraphe concernés	Série de tests et tests de référence	Volume de milieu (L _{-milieu})	Nature de l' <i>inoculum</i>	T° de fermentation	Substrat	Mode d'extraction des gaz	Nature du gdb	Débit de gdb (mL/min /L _{-milieu})	Nombre de réplicats
III.E	test avec échantillonnage de milieu fermentaire régulier	0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	65	2
IV.A	différents modes d'extraction des gaz	1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	extraction libre	n.a.	n.a.	4
		1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	réacteur clos	n.a.	n.a.	5
		1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	dépression	n.a.	n.a.	3
IV.B.1	différents débits de gaz de balayage	0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	13	3
		0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	26	3
		0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	97	4
		0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	130	3
		0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	192	3
		0,8	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	N ₂	259	3
IV.B.2	différentes compositions du gaz de balayage	1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	CO ₂ :N ₂ (50:50)	177	3
		1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	CO ₂ :N ₂ (75:25)	189	3
		1,2	boues activées de la zone anoxie	38°C	glucose	gdb	CO ₂	186	3

n.a. : non applicable

gdb : gaz de balayage

Annexe 4. Listes de tests de fermentation réalisée en conditions continus, RAC et BRM

Paragraphe concernés	Code manip	VOLUME de milieu (L _{milieu})	TSH (h)	Substrat	DAS (g _{hexose} /L _{milieu} /h)	Commentaire
V.A.1	RAC-a	0,88	73	glucose	0,6	test préliminaire RAC
V.A.2	RAC-b	0,91	12	glucose	1,0	test avancé RAC
V.B.1	BRM-a	0,44	46	glucose	0,9	test préliminaire BRM
			11		1,1	
V.B.2	BRM-b	0,49	17	glucose	1,0	test avancé BRM - modification du TSH
			20		1,1	
V.B.2.2 ; V.C.2 ; VI.A.1	BRM-c	0,44	12	glucose	1,0	test avancé BRM - ajout de KH ₂ PO ₄ et de métabolites
V.B.2.2 ; V.C.3	BRM-d	0,44	12	glucose	1,0	test avancé BRM - test de l'extraction libre des gaz
V.C.1	BRM-e	0,49	13	glucose	0,9	test sans boucle de recirculation
VI.A.2	BRM-f	0,44	12	glucose + nutriments	0,9	test avec apport continu de nutriment
VI.A.2	BRM-g	0,44	12	glucose + nutriments	0,9	test avec apport continu de nutriment
Erreur ! Source du renvoi introuvable.	BRM-i	0,49	12	bourbes vitivinicoles	1,0	test avec alimentation en bourbes vitivinicoles
VI.C	BRM-k	0,49	12	glucose + nutriments	1,0	test sans apport d' <i>inoculum</i> externe
VI.D	BRM-l	0,49	13	glucose + nutriments	0,8	test sans apport d' <i>inoculum</i> externe
VI.D	BRM-m	0,49	13	glucose + nutriments	0,8	test sans apport d' <i>inoculum</i> externe

Annexe 5. Liste des principales réactions utilisées dans l'étude

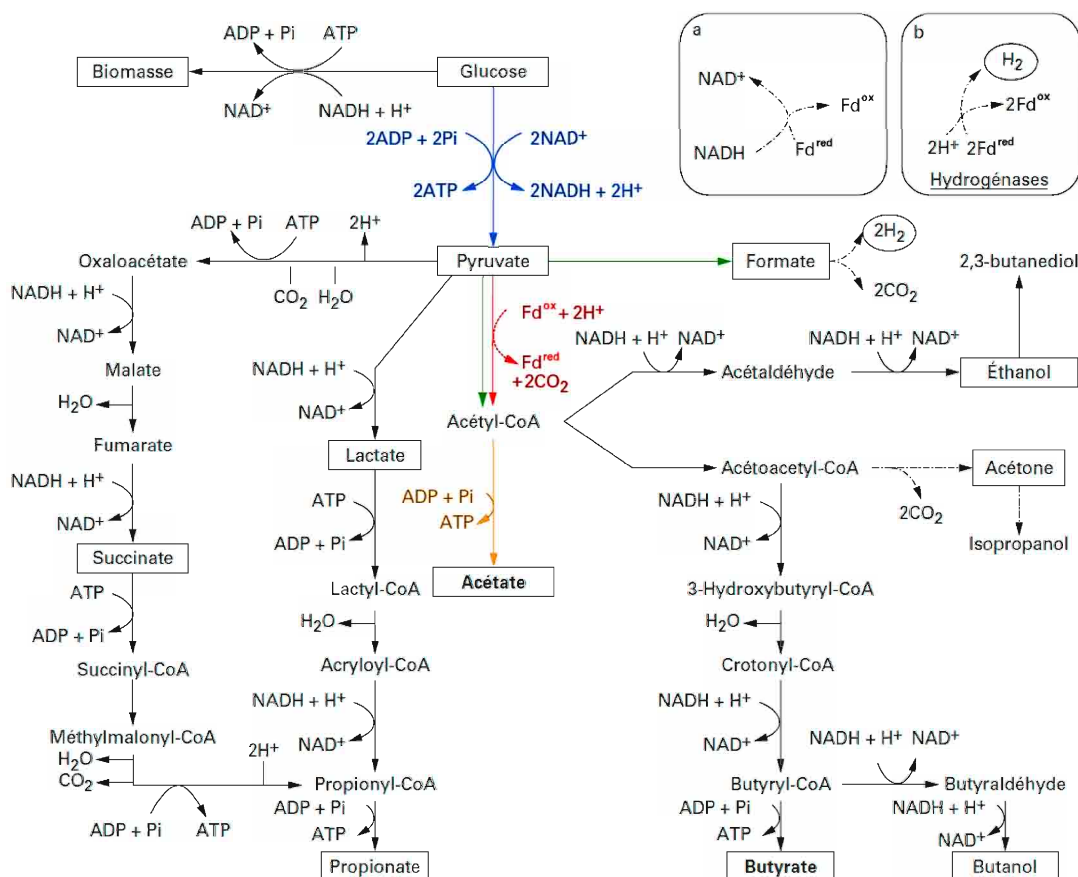
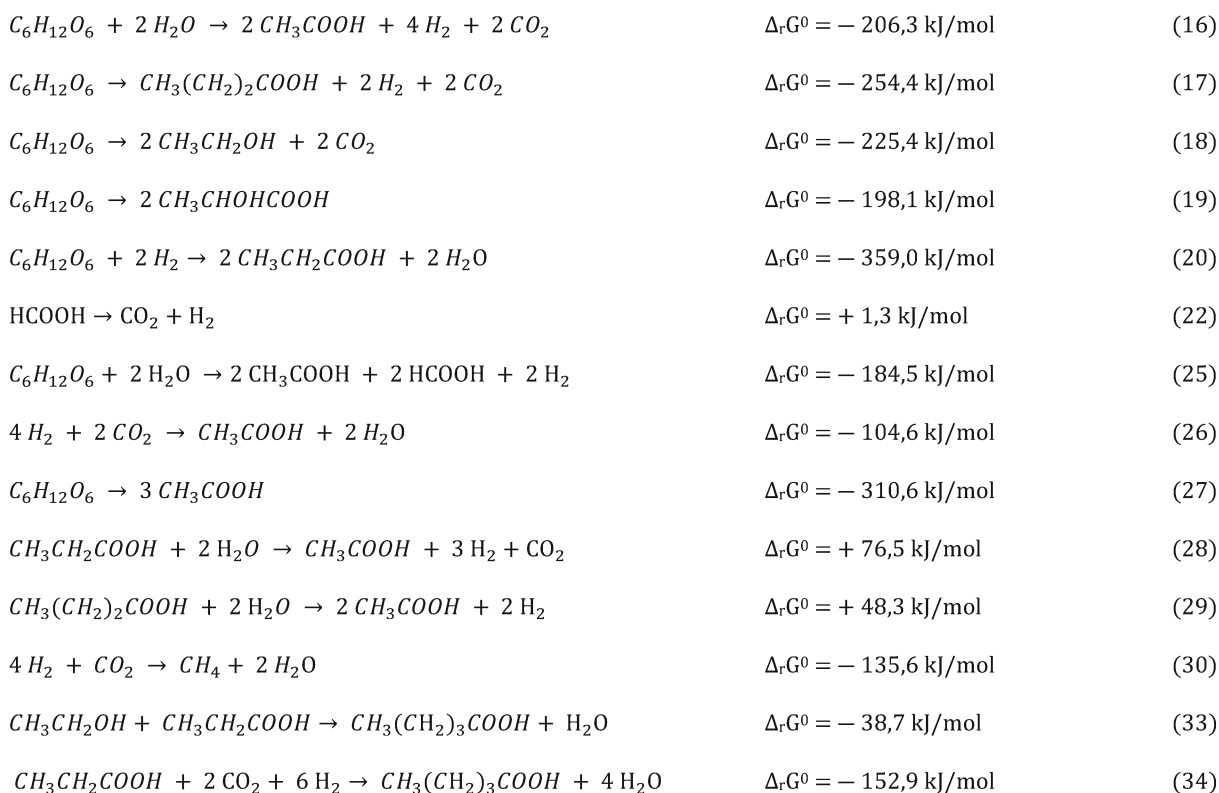


Figure 124. Principales voies métaboliques de la production de biohydrogène par fermentation obscure (adaptée de [63] et [64])

Annexe 6. Liste des principales abréviations utilisées dans l'étude

AGV	Acide gras volatil
APM / PSA	Adsorption à pression modulée
ApTT°	Après traitement thermique
ATM / TSA	Adsorption à température modulée
AvTT°	Avant traitement thermique
B/A	Rapport molaire du butyrate sur l'acétate produit au cours de la fermentation
BRM	Bioréacteur membranaire
DAS	Débit d'alimentation en substrat
DCO	Demande chimique en oxygène
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
H ₂ /2(B+A)	Rapport molaire de la production d'hydrogène sur le double de la production de butyrate et d'acétate au cours de la fermentation
H ₂ /CO ₂	Rapport molaire de l'hydrogène et du dioxyde de carbone produit au cours de la fermentation
H _{i,max}	Production maximale cumulée d'hydrogène
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
MES	Matières en suspension
MOF	Matières organiques fermentescibles
MS	Matières sèches
OTU	Operational taxon unit
PAC	Pile à combustible
pb	Paire de bases
PCI	Pouvoir calorifique inférieur
PCS	Pouvoir calorifique supérieur
RAC	Réacteur agité continu
RASB	Réacteur agité semibatch
R _{max}	Vitesse maximale de production
SPE	Substances polymériques extracellulaires
STEP	Station d'épuration
t ₀	Instant initial de la fermentation, correspondant au temps = 0 min
TCD	Détecteur à conductivité thermique
T-RFLP	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux
TSH	Temps de séjour hydraulique
TSS	Temps de séjour des solides
λ	Temps de latence
μGC	Microchromatographie en phase gazeuse

Valentin CLION

Production d'hydrogène par fermentation obscure : Intensification du procédé par extraction des gaz et développement d'un bioréacteur à membrane



Résumé

Dans le contexte du développement de l'hydrogène-énergie, de nouvelles voies de production renouvelables sont étudiées, parmi lesquelles la fermentation obscure est un processus biologique convertissant la biomasse. Dans cette étude, ce procédé a été optimisé en réacteur agité semibatch par la sélection de cultures mixtes (boues de station d'épuration) et l'optimisation des paramètres de fermentation associés (température, ajout de substrat, régulation du pH). La présence majoritaire de bactéries du genre *Clostridium* a été observée dans le milieu fermentaire. Différents modes d'extraction des gaz produits ont été évalués, permettant d'intensifier le procédé par l'utilisation d'un gaz de balayage (N_2 ou CO_2). La mise en œuvre efficace en fonctionnement continu d'un bioréacteur membranaire dans une configuration d'extraction gaz/liquide a permis d'améliorer le rendement (> + 90%) et la productivité en H_2 (> + 300%) par rapport au mode de fonctionnement continu en réacteur agité. Enfin, l'utilisation d'un substrat réel (bourbes viticoles) a permis de prouver la faisabilité du procédé dans une perspective d'industrialisation.

Mots clefs : génie des procédés ; fermentation obscure ; hydrogène ; bioréacteur membranaire ; cultures mixtes ; biomasse

Résumé en anglais

In the context of the development of hydrogen-energy, new renewable production ways are studied, among which dark fermentation is a biological process converting the biomass. In this study, this process was optimized for a semibatch reactor by the selection of mixed cultures (waste water treatment plant sludges) and the optimization of associated parameters of fermentation (temperature, add of substrate, pH regulation). The presence in majority of bacteria from the genus *Clostridium* was observed in the fermentation broth. Different extraction modes of the produced gas were evaluated, allowing to intensify the process by the use of a sparging gas (N_2 or CO_2). The successful implementation in continuous mode of a membrane bioreactor in a configuration of gas/liquid extraction allowed an increase in H_2 yield (> + 90%) and productivity (> + 300%) compared to the continuous stirred tank reactor. Finally, the use of a real substrate (winery waste) allowed to prove the feasibility of this process in the prospect of industrialization.

Key words: process engineering; dark fermentation; hydrogen; membrane bioreactor; mixed cultures; biomass