



**FACULTE DES SCIENCES APPLIQUEES
Centre Wallon de Biologie Industrielle
Service de Technologie Microbienne**

**Production de biohydrogène par
fermentation anaérobie chimiotrophe de
substrats carbohydratés**

Année académique 2011-2012

Dissertation présentée par
Serge HILIGSMANN
en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'ingénieur

Les travaux de recherche rapportés dans ce document ont reçu le soutien financier de la l'IEPF (Institut de l'Energie et de l'Environnement de la Francophonie); de la Région Wallonne de Belgique; de la Communauté française de Belgique – Fédération Wallonie Bruxelles (Action de Recherche Concertée ARC-07/12-04); du FRS-FNRS (Fonds de la Communauté française de Belgique pour la Recherche Scientifique); du FRIA (Fonds de la Communauté française de Belgique pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture) et de l'Université de Liège.

Abstract

Hydrogen (H₂) is being considered as an ideal and clean energy carrier since the utilization of hydrogen, either via combustion or via fuel cells, results in pure water. The recent advances to produce biohydrogen from renewable sources such as biomass and particularly by fermentation of carbohydrate-rich substrates from agriculture and agro-industries appear promising. Such a process called “dark fermentation” enables both organic waste treatment and renewable energy production to be coupled. In the thesis different hydrogen-producing microorganisms were studied and some environmental parameters and bioreactors have been investigated in order to improve the hydrogen production yields and rates.

The experimental results compared the hydrogen production yield of 19 different pure strains and sludges : facultative and strict anaerobic H₂-producing strains along with anaerobic digester sludges thermally pre-treated (to enrich the microflora in high H₂-producers) or not. Significant yields variations were recorded even between different strains of the same species (up to 20% of variation). The pure *Clostridium butyricum* (*C. but.*) strains achieved the highest yields i.e. up to 172 L H₂ produced per kilogram of glucose consumed (1.38 mol H₂/ mol glucose).

Two efficient H₂-producing strains (*C. but.* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952) were further studied in order to determine the optimum culture conditions for the production of hydrogen. A 2.3 L bioreactor was operated at 30 °C in batch and sequenced-batch mode using glucose and starch as substrates. For glucose the maximum yield (211 L H₂ / kg or 1.7 mol H₂ / mol glucose) was measured with the *C. but.* strain when the pH was maintained at 5.2. In sequenced-batch reactor a 35% increase in H₂ yield was obtained with removal–addition of 40% of the culture medium at the beginning of each sequence.

For operation in continuous mode, original bioreactors such as an anaerobic biodisc reactor (AnBDR) were designed to both fix biomass and enable rapid liquid to gas transfer of hydrogen produced since H₂ partial pressure and H₂ supersaturation are known as hardly affecting hydrogen production performances. The highest and stable H₂ production rate (703 L H₂ per hour and per m³ of liquid volume inside the bioreactor) and yield (302 L / kg glucose consumed i.e. 2.4 mol/mol) with the pure culture of *C. but.* CWBI1009 were recorded in the AnBDR with 300 mL culture medium (total volume 2.3 L) at pH 5.2 and a glucose loading rate of 2.87 kg / m³.h. These results achieved with pure strains are relevant compared to the highest H₂ yields and rates reported in the literature with mixed cultures and achieved in reactors, such as trickle bed bioreactors, with high gas transfer performances.

Moreover, the soluble metabolites, mainly acetate and butyrate, contained in the spent medium of the dark fermentation bioreactor were efficiently converted to methane in a second anaerobic digester (20 L continuously stirred tank) with a methane yield of about 170 L/kg COD initially fed in the first stage. These results demonstrate that a two-step anaerobic digestion process may be carried out in two successive bioreactors, both with specific and optimized parameters, in order to generate separated biogas flows containing either H₂ or CH₄. In addition to the advantages related to both gaseous molecule properties, many technological improvements would be achieved by this way : better hydrolysis, higher process stability, etc.

The general discussion highlights the central and relevant position of the 2-stage anaerobic digestion process in the panorama of technologies able to both treat raw or residual organic matter and to produce energy or energy vectors for stationary or mobile end-use. The technical, economical and environmental aspects have been considered.

Résumé

L'hydrogène (H_2) est considéré comme un vecteur d'énergie idéal et propre : son utilisation dans des piles à combustible ou sa combustion résulte essentiellement en un rejet d'eau. Les dernières avancées au niveau de la valorisation énergétique de la biomasse laissent entrevoir une place non négligeable pour la production de biohydrogène par fermentation de substrats riches en composés hydratés tels que les sous-produits d'origine agricole ou eaux résiduelles des industries agro-alimentaires. Un tel procédé appelé "dark fermentation" permet de coupler épuration d'une charge organique et production d'énergie renouvelable. Dans la thèse, différents types de microorganismes producteurs d'hydrogène ainsi que plusieurs paramètres environnementaux et bioréacteurs ont été étudiés en vue d'améliorer les productivités et rendements de production d'hydrogène.

Les expérimentations ont permis de comparer les rendements de production d'hydrogène de 19 souches pures et cultures mixtes différentes : souches pures de bactéries anaérobies facultatives ou strictes ainsi que des boues de digesteurs anaérobies, après d'éventuels traitements thermiques pour enrichir la microflore en microorganismes hyper producteurs d' H_2 . Des variations significatives de rendement ont été enregistrées même pour des souches de la même espèce (jusqu'à 20 % de variation). Les rendements les plus élevés, de l'ordre de 172 L H_2 produits par kilogramme de glucose consommé (1.38 mol H_2 / mol glucose), ont été atteints par les souches pures de *Clostridium butyricum* (*C. but.*).

Deux souches productrices d' H_2 particulièrement intéressantes (*C. but.* CWBI1009 et *Citrobacter freundii* CWBI952) ont été étudiées de façon plus approfondie dans l'optique de déterminer les conditions de culture optimales pour la production d' H_2 . Ces travaux ont été menés en bioréacteur de 2.3L à 30°C en mode batch et séquentiel avec le glucose ou l'amidon comme substrat. Le rendement d' H_2 maximum a été mesuré sur glucose (211 L H_2 / kg ou 1.7 mol H_2 / mol glucose) avec la souche *C. but.* au pH contrôlé à une valeur de 5.2. En mode séquentiel, 35% d'augmentation du rendement ont pu être obtenus en opérant un retrait/ajout de 40% du milieu de culture en début de chaque séquence.

Pour les opérations en mode continu, des bioréacteurs originaux tels qu'un réacteur à biodisque anaérobie (AnBDR) ont été mis en œuvre pour, à la fois immobiliser la biomasse et permettre un transfert rapide vers la phase gazeuse de l'hydrogène produit en phase liquide. Il s'agit ainsi de pallier l'impact de la pression partielle et de la sursaturation en H_2 affectant lourdement les rendements et productivités d' H_2 . Les performances les plus remarquables en productivité d' H_2 (703 L H_2 par heure et par m^3 de volume liquide au sein du bioréacteur) et rendement (302 L / kg glucose dégradé, soit 2.4 mol/mol) ont été enregistrées avec la souche pure de *C. but.* CWBI1009 dans l'AnBDR avec 300 mL de milieu de culture (volume total de 2.3 L) au pH de 5.2 et avec une charge organique en glucose de 2.87 kg / m^3 .h. Ces résultats importants obtenus avec des souches pures sont comparables aux meilleurs rendements et productivités d' H_2 rapportés dans la littérature pour des cultures mixtes et concernant des réacteurs à haut pouvoir de transfert gazeux tels que les bioréacteurs à lit arrosé.

De plus, les métabolites solubles, principalement l'acétate et le butyrate, contenus dans l'effluent du bioréacteur de dark fermentation ont pu être convertis efficacement en méthane dans un second bioréacteur anaérobie (à cuve agitée de 20 L) avec un rendement en méthane de l'ordre de 170 ml/g DCO initialement introduite dans le premier bioréacteur. Ces résultats démontrent la faisabilité d'une digestion anaérobie classique en deux étages, optimisés individuellement pour produire deux types de biogaz contenant soit de l' H_2 ou du CH_4 . En plus des avantages liés aux propriétés intrinsèques de ces deux molécules gazeuses, plusieurs améliorations du procédé peuvent être visées de cette manière : hydrolyse plus approfondie, plus grande stabilité du procédé, etc.

La discussion générale met en évidence le rôle central et important du procédé de digestion anaérobie en deux phases dans le panel des technologies capables à la fois de traiter des matières premières organiques ou résiduelles et de produire de l'énergie ou un vecteur énergétique pour des applications stationnaires ou mobiles. Les aspects techniques, économiques et environnementaux ont été pris en considération.

Au terme de ce travail de recherche, une expérience en soi, et en prélude à votre lecture du manuscrit que je vous souhaite agréable, je tiens à adresser un MERCI à tous ceux qui ont contribué à son aboutissement. C'est un même MERCI franc, fort et chaleureux que je souffle à tous car, que ce soit de longue date ou épisodiquement, intense ou par un simple encouragement, votre attention a été un élément essentiel à la réussite de ce challenge.

MERCI au Professeur Philippe Thonart qui m'a ouvert la voie passionnante des biotechnologies en m'accueillant au Centre Wallon de Biologie Industrielle où j'ai pu acquérir un important bagage de connaissances et compétences.

MERCI aux Professeurs M. Crine, A. Germain, G. Heyen, B. Joris, F. Delvigne et à nouveau Ph. Thonart de l'Université de Liège ainsi qu'au Professeur R. Bayard de l'Université de Lyon pour leurs enseignements, regards critiques et leur participation à l'évaluation et à la soutenance de ce travail.

MERCI à mes parents, grands-parents que j'ai ou n'ai pas bien connu,qui, physiquement et/ou par leur exemple de vie, m'ont permis de m'enraciner dans la vie.

MERCI à ceux qui étaient aussi à l'origine de moments précis et précieux qui ont façonné ma vie : mon frère, Jean-Paul, Félix, Philippe J. SUPER MERCI tout particulier dans ce sens à Marie Louise et nos enfants pour leur patience, soutien, questionnements, compréhension, aide, etc. incommensurables.

MERCI à nos proches et amis pour leur fraternité, simplicité et encouragements.

MERCI à Christopher, Julien, Laurent mais aussi à Magda, Chi, Mourad, Annick, Bernard, Claire, Fabrice et al., pour leur expertise, ténacité, rigueur et leur contribution aux travaux sur le biohydrogène.

MERCI à notre chère Cécile, Valérie, Christian, Mathias, Marc, Mario, Xavier (mon premier « maître anaérobioseur ») et tous les collègues et stagiaires actuels ou qui sont passés au CWBI pour leur bonne humeur et leur collaboration.

Liste des principaux symboles et abréviations

ACV : analyse du cycle de vie
AGV ou VFA en anglais : acides gras volatils (volatile fatty acids)
AnBDR : bioréacteur anaérobie à biodisque (anaerobic biodisc reactor)
BHP : potentiel biochimique d'hydrogène (biochemical hydrogen potential)
BMP : potentiel biochimique de méthane (biochemical methane potential)
C. but. : souche de *Clostridium butyricum*
CET : centre d'enfouissement technique
CH₄ : molécule de méthane
Cit. fr. : souche de *Citrobacter freundii*
CSAD : digesteur anaérobie complètement mélangé (completely stirred anaerobic digester)
DA ou AD en anglais : digestion anaérobie produisant le méthane ou biométhanisation
DBO ou BOD en anglais : demande biochimique en oxygène (biochemical oxygen demand)
DCO ou COD en anglais : demande chimique en oxygène (chemical oxygen demand)
DF : dark fermentation : fermentation anaérobie chimiotrophe produisant le biohydrogène
DF+DA : association de la DF et DA
Fig. : figure
GC : technique analytique de chromatographie en phase gazeuse (gas chromatography ; GC-TCD or GC-FID : gas chromatography equipped with a thermal conductivity or a flame ionization detector)
gluc. : glucose
GLR : charge organique en glucose (glucose loading rate)
hex. : hexose (équivalent carbohydrate contenant 6 atomes de carbone)
H₂ : molécule d'hydrogène
HFBR : bioréacteur horizontal à lit fixe (horizontal fixed bed reactor)
HPLC : chromatographie en phase liquide (high performance liquid chromatography ; HPLC-RID : when equipped with a refractive index detector)
HPR : vitesse de production d'hydrogène (hydrogen production rate)
L/G : liquide/gaz
MB : bilan de matière (mass balance)
PEHD : matière plastique en polyéthylène haute densité
SBR : bioréacteur séquentiel à cuve agitée (sequenced-batch reactor)
sp. : espèce microbiologique (*species*)
Tab. : tableau (table)
UASB : biodigesteur anaérobie à boues granulaires fluidisées (upflow anaerobic sludge blanket)

Liste des principales unités

€ : unité monétaire européenne (Euro)
min, h, j ou d en anglais : unités de temps (minute, heure, jour)
g, kg, t : unités de masse (gramme, kilogramme, tonne)
mL, L, m³ : unités de volume (millilitre, litre, mètre cube)
kW, MW : unités de puissance (kilowatt, mégawatt)
kWh, MWh : unités d'énergie (kilowatt.heure, mégawatt.heure ; 1 kWh = 3600 kiloJoule)
Pa : unité de pression (Pascal ; 1 atmosphère atm = 101 325 Pa = 1,01 325 bar)
mol : unité de quantité de matière (mole)

Sommaire

ABSTRACT	3
RÉSUMÉ	4
SOMMAIRE	7
AVANT-PROPOS	9
1 INTRODUCTION	13
Chapitre 1.1. Les phénomènes de biodégradation de la matière organique et valorisation énergétique du biogaz	15
1. Mécanismes de biodégradation de la matière organique complexe	16
2. Conditions et impact environnementaux associés à la biodégradation anaérobie	17
3. Valorisation de la matière organique et du biogaz	20
4. Conclusions et perspectives	22
Chapitre 1.2. La production de biohydrogène à partir de substrats carbohydratés : état de l'art	25
1. Contexte énergétique	26
2. Différentes voies de production d'hydrogène	26
3. Production d'hydrogène par voie microbiologique	27
4. Les bactéries chimiotrophes productrices d'hydrogène	28
5. Les substrats potentiels pour la production de biohydrogène	29
6. Les métabolismes associés à la production d'hydrogène par les bactéries chimiotrophes	29
7. Production de biohydrogène et biométhanisation	30
8. Optimisation du procédé de production d'H ₂	31
9. Conclusions	33
2 RESULTATS	37
PLAN DE LA PARTIE RÉSULTATS	38
Chapitre 2.1. Etude comparative de la production d'hydrogène par différentes souches et cultures mixtes de microorganismes	39
1. Introduction	40
2. Materials and methods	41
Inocula and treatment conditions	41
Experimental procedures and culture conditions	42
Monitoring and analytical methods	42
3. Results and discussion	44
Validation of the biogas monitoring method	44
Comparative H ₂ production by mixed cultures and a pure <i>Clostridium</i> strain	45
Comparative H ₂ production by pure facultative and strict anaerobic strains	48
4. Conclusions	50
Chapitre 2.2. Etude et optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie facultative <i>Citrobacter freundii</i> CWBI952	53
1. Introduction	54
2. Materials and methods	55
Isolation of the strain and identification test	55
Composition of the fermentation media	55
Experimental procedures and culture conditions	56
Monitoring and analytical methods	57
3. Results	57
Isolation and identification of the hydrogen-producing strain	57
Effect of pH on glucose metabolism and H ₂ production	58
Fermentation profile at the optimum pH for H ₂ production	58
Effect of iron concentration on hydrogen production with an ammonia-based nitrogen source	60
Effect of the dilution rate on H ₂ production	61
4. Conclusions	64

Chapitre 2.3. Etude et optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie stricte <i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009.....	67
1. Introduction.....	68
2. Materials and Methods	68
Media and reactor setup	68
Isolation and identification test.....	69
Analytical methods.....	70
3. Results and discussion.....	70
Isolation and identification of the hydrogen-producing strain	70
Determination of optimal pH for H ₂ production from a glucose substrate in batch reactor mode ...	71
Investigation of H ₂ production from glucose in sequenced-batch reactor mode	74
Effect of pH on H ₂ production from starch in sequenced-batch reactor mode	75
4. Conclusions.....	76
Chapitre 2.4. Optimisation de la production d'hydrogène par <i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009 en bioréacteurs : effet de l'immobilisation cellulaire et de la surface d'échange L/G.....	79
1. Introduction.....	80
2. Materials and methods	81
Experimental procedures and culture conditions	81
Monitoring and analytical methods	82
3. Results and discussion.....	84
Hydrogen production in a 5 L bioreactor: effect of mixing and floc formation.....	84
Hydrogen production in a 400 mL horizontal fixed bed bioreactor	86
Hydrogen production in a 2.3 L biodisc reactor.....	90
General discussion about hydrogen production performances in (pseudo-) continuous bioreactors	94
4. Conclusions.....	96
Chapitre 2.5. Etude du procédé de digestion anaérobie en deux étages avec production d'hydrogène en culture pure ou culture mixte et production de méthane à partir des effluents solubles du premier bioréacteur	99
1. Introduction.....	100
2. Materials and methods	101
Experimental setup	101
Monitoring and analytical methods	101
3. Results and discussion.....	102
Investigation of H ₂ production from glucose in sequenced batch reactor mode.....	102
Investigation of CH ₄ production from the soluble metabolites of H ₂ -producing dark fermentation	105
4. Conclusions.....	106
3 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	109
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	111
1. SYNTHÈSE DES RESULTATS PERTINENTS DE LA THESE.....	111
2. ASPECTS ECONOMIQUES.....	114
3. VERS UNE GESTION INTEGREE DES FLUIDES ENERGETIQUES ET DES DECHETS	116
4. CHOIX TECHNOLOGIQUES POLYVALENTS ET DURABLES.....	118
CONCLUSIONS	123

Avant-propos

Les activités anthropiques dans les pays industrialisés génèrent plus d'un kilo de déchets fermentescibles par jour et par habitant : matière organique contenue dans les déchets ménagers, les eaux usées domestiques et les déchets industriels. Sachant que près de la moitié ne sont pas valorisés pour la matière en tant que telle, ils contribuent à un potentiel de matières organiques n'ayant pratiquement pas d'autre issue que la valorisation énergétique. En effet, depuis 2010, la principale alternative c'est-à-dire l'enfouissement pur et simple de ces déchets biodégradables d'origine industrielle et domestique n'est plus autorisé (transposition de la directive européenne 2008/98/CE). Suivant une autre directive européenne (2009/28/EC), la Belgique a un objectif d'atteindre une production de 13% d'énergies vertes d'ici 2020 mais à plus long terme c'est une indépendance énergétique qui devrait être visée. Pour atteindre ces objectifs, tous les moyens devront être mis en œuvre pour produire autant que de convertir l'énergie à un coût raisonnable et avec des rendements les plus élevés possibles. La biométhanisation s'est fait une place importante dans ce cadre socio-économico-énergético-environnemental. Elle permet grâce à l'intervention d'une cascade de microorganismes de valoriser les biomasses pour en faire du méthane qui peut ensuite être converti en énergie mécanique, électrique ou calorifique. La digestion anaérobie ou biométhanisation est bien maîtrisée tant dans le domaine académique qu'industriel. Cependant le bioréacteur est encore très souvent considéré comme une « boîte noire » dont on maîtrise les flux entrants et sortants mais on n'ose pas trop le perturber par crainte de mettre à mal son fonctionnement et ses performances. Les risques encourus sont de stresser, inhiber, voire anéantir la microflore méthanogène dont la sensibilité et les difficultés de croissance sont à la mesure de leur importance au sein d'un bioréacteur efficace et rentable : c'est-à-dire élevée.

Dans les années 1970, Pohland and Ghosh (1971) ont proposé un moyen efficace pour réduire l'impact des variations de la nature et de la charge des intrants sur le procédé de biométhanisation. Il s'agit de mettre en œuvre le procédé en deux étapes et donc deux bioréacteurs successifs plutôt qu'un seul (procédé dit « en deux étages »). Dans le premier bioréacteur se déroulent les mécanismes biologiques les plus variés en fonction des intrants et aussi les plus rapides et les plus influant sur la composition physico-chimique du mélange en cours de biodégradation. Cette première phase de la biodigestion anaérobie est appelée phase acidogène. Ensuite, le mélange est admis dans un second bioréacteur où se déroulent les mécanismes de biodégradation et minéralisation ultimes générant le méthane proprement dit. Cette seconde phase est identifiée comme la phase méthanogène. Toutefois, pour des raisons économiques principalement liées aux faibles prix des combustibles fossiles concurrents du biogaz et aux coûts des installations, la biométhanisation à grande échelle s'est peu généralisée durant la fin du vingtième siècle. Par contre cette dernière décennie a vu les procédés de biométhanisation à nouveau susciter un intérêt certain sous l'impulsion de la volatilité des prix pétroliers, des difficultés croissantes de trouver de nouveaux gisements, de la prise de conscience des importantes nuisances liées aux gaz à effet de serre et de la volonté de réduire drastiquement les pollutions afin de vivre dans un environnement plus sain. Avec ce nouvel avènement l'intérêt pour la technologie en deux étages s'est aussi progressivement ranimé mais sous une configuration nouvelle : le premier étage peut être associé à une production d'hydrogène aux multiples avantages. Sa densité énergétique est plus élevée que celle du méthane et il n'est pas associé à des rejets polluants lorsqu'il est converti en énergie mécanique, thermique ou électrique. Il peut aussi alimenter des piles à combustibles avec des rendements de conversion en électricité plus élevés que ceux des moteurs à explosion (associés à un alternateur).

Indépendamment de l'opportunité de l'associer à l'activité du premier étage d'un procédé de biométhanisation la production d'hydrogène par digestion anaérobie de matière organique est un procédé prometteur qui suscite un intérêt croissant depuis une vingtaine d'années. Il est

AVANT-PROPOS : Synthèse du cadre général et des expérimentations et structure de la thèse

d'autant plus intéressant lorsque les substrats utilisés sont des sous-produits, des eaux usées ou des déchets agro-alimentaires car il permet de coupler leur épuration avec la production d'une énergie verte à coût réduit. Ce procédé conduit à la production d'un biogaz riche en H₂ (40 à 70% du biogaz) et CO₂ et à un mélange de molécules organiques solubles (acides et alcools principalement). Le procédé de production d'H₂ peut alors être associé à divers procédés potentiels pour dégrader les composés solubles contenus dans les effluents du premier bioréacteur. Les plus étudiés impliquent d'autres microorganismes producteurs d'hydrogène (microorganismes photosynthétiques) ; des bactéries transférant directement des électrons au niveau d'une électrode (procédé des piles à combustibles microbiennes ou microbial fuel cells) ou encore des bactéries méthanogènes. Dans ce dernier cas, on en revient au procédé de biométhanisation en deux étages produisant indépendamment de l'H₂ et du CH₄. Cette association est sur le plan industriel la plus avancée à l'heure actuelle. Cependant de nombreux paramètres étaient encore à maîtriser, vérifier et optimiser pour permettre un développement de la technologie dans l'optique d'une application à grande échelle.

Dans ce travail, plusieurs facteurs d'optimisation de ce procédé biotechnologique de production d'hydrogène ont été étudiés : sélection des souches, influence du pH, du substrat, du mode réactionnel, etc. Des bioréacteurs originaux ont aussi été développés pour permettre d'améliorer le procédé dans l'optique d'une application à l'échelle industrielle. Finalement, la biodégradation ultime des matières organiques solubles dans un biodigester méthanogène a été abordée pour démontrer la faisabilité du procédé en deux étages produisant séparément de l'hydrogène et du méthane. Les avancements ont pu s'appuyer sur les compétences disponibles et/ou acquises au CWBI dans le cadre de l'étude et l'optimisation des processus d'hydrolyse des matières organiques, de la biodigestion anaérobie méthanogène (en bioréacteurs et en centres d'enfouissement technique), de la sulfato-réduction et des technologies de fermentation en général.

Ce travail est constitué d'une introduction en deux chapitres, d'une deuxième partie reprenant les résultats des recherches en cinq chapitres et finalement d'une partie de discussion générale reprenant les conclusions et perspectives des travaux.

L'introduction dresse le cadre général de la thèse et reprend de manière synthétique les bases de la littérature nécessaires à la compréhension des expérimentations réalisées et des résultats obtenus. Elle est divisée en deux chapitres. Le premier chapitre (1.1) décrit les phénomènes de biodégradation de la matière organique, les moyens pour les gérer efficacement et pour valoriser énergétiquement le biogaz obtenu par digestion anaérobie.

Ce chapitre est basé principalement sur des extraits de l'ouvrage *"Hilgsmann S., Lardinois M., Diabate S.I. et Thonart P. (2006) Guide pratique sur la gestion des déchets ménagers et des sites d'enfouissement technique dans les pays du Sud. Edition IEPF, Québec, Canada. 121 pp"*

Le second chapitre (1.2) est consacré à l'état de l'art sur la production d'hydrogène par voie microbiologique essentiellement. Y sont décrits le contexte énergétique; les différentes voies de production d'hydrogène dont la voie microbiologique ; le métabolisme et les principaux facteurs d'optimisation déjà étudiés concernant les bactéries chimiotrophes productrices d'H₂.

Ce chapitre est fondé en grande partie sur le contenu de l'article *"Hilgsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., & Thonart, P. (2011). La production de biohydrogène à partir de substrats carbohydratés : état de l'art. In Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 101"*

La partie consacrée aux résultats est composée de cinq chapitres correspondant à cinq publications qui retracent les expérimentations et développements menés dans le cadre de ce travail. Le premier chapitre (2.1) fait une étude comparative de la production d'hydrogène par différentes souches et cultures mixtes de microorganismes. De nombreuses souches sont connues pour leurs potentialités de production d'hydrogène mais peu d'études s'étaient

AVANT-PROPOS : Synthèse du cadre général et des expérimentations et structure de la thèse

réellement consacrées à les comparer selon un protocole d'expérimentation en conditions standardisées. En outre, la plupart des travaux rapportés dans la littérature sont menés avec des populations mixtes de microorganismes ayant subi d'éventuels prétraitements en vue d'opérer une certaine sélection de bactéries plus intéressantes pour leurs rendements en H₂. Les performances de ce type de populations mixtes sont également comparées dans ce chapitre à celles de cultures pures. Ces expérimentations comparatives ont pu être réalisées au moyen d'un test rapide mis au point, validé et décrit dans le premier chapitre. Il permet une quantification du potentiel de biohydrogène (ou autres gaz binaires tels que CH₄/CO₂ produit lors de la biométhanisation) en ne recourant pas à la chromatographie gazeuse, coûteuse et complexe. Les souches pures testées sont 2 souches de bactéries anaérobies facultatives (*E. coli* et *Citrobacter freundii*) et 11 souches de bactéries anaérobies strictes mésophiles ou thermophiles du genre *Clostridium* particulièrement intéressantes selon la bibliographie. Six cultures mixtes obtenues à partir de deux biométhaniseurs à microflore agitée ou granulaire fluidisée avec ou sans prétraitements thermiques pour enrichir les populations des microorganismes sporulants (prétraitements reconnus comme favorisant la production de biohydrogène) ont également été testées.

Le contenu a été publié dans l'article "*Hiligsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., Beckers, L., & Thonart, P. (2011). Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. Bioresource Technology, 102, 3810-3818.*"

L'étude comparative a permis de classer les souches et cultures mixtes selon leurs performances de production et productivité en H₂. Deux souches particulièrement intéressantes, l'une anaérobie facultative et l'autre anaérobie stricte ont été étudiées de façon approfondie dans les chapitres 2.2. et 2.3. Les avantages et inconvénients des deux types de microorganismes sont relativement débattus dans la littérature mais, à notre connaissance, ils n'ont jamais été comparés dans des conditions opératoires identiques en bioréacteurs de taille satisfaisante. De nombreux auteurs ont utilisé des fioles d'environ un litre de taille maximum sans régulation du pH alors que ce paramètre évolue très rapidement et fortement en cours de biodégradation (d'un pH 8.5 à 4.5 en moins de 24 heures par exemple). De surcroît son influence sur les performances de production d'H₂ est d'une importance majeure comme le confirment les résultats de nos travaux. Nous avons expérimenté un bioréacteur agité de 2.3 L équipé d'un système de régulation du pH et permettant des opérations en mode séquentiel (sequenced-batch reactor SBR). Le chapitre 2.2. est consacré à l'étude et l'optimisation des conditions de culture pour la production d'hydrogène par la souche *Citrobacter freundii* CWBI952. Il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative de la famille des entérobactéries. Les principaux avantages de ces microorganismes sont leur rapidité de croissance sur des substrats très variés et leurs facultés d'installer les conditions d'anaérobiose propices à la production d'H₂. Les modes réactionnels batch, séquentiel et semi-continu ont été abordés. Les expérimentations rapportées concernent (i) l'étude de l'effet du pH sur le métabolisme du glucose et la production d'hydrogène; (ii) l'étude du profil métabolique au pH optimum pour la production d'H₂; (iii) l'étude de l'effet de la concentration en fer sur la production d'hydrogène en fonction de la source d'azote peptidique/ammoniacal et (iv) l'étude de l'effet du taux de dilution sur la production d' H₂ en bioréacteur semi-continu.

Le contenu a été publié dans l'article "*Hamilton, C., Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., & Thonart, P. (2010). Optimisation of culture conditions for biological hydrogen production by Citrobacter freundii CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode. International Journal of Hydrogen Energy, 35, 1089-1098.*" (contribution équivalente des deux premiers auteurs ; C. Hamilton a apporté sa contribution pour l'identification de la souche, les travaux sur la source d'azote, dans la rédaction de l'article et dans la discussion)

Le chapitre 2.3. est consacré à l'étude de l'effet du pH sur la fermentation du glucose et de l'amidon et la production d'hydrogène par la souche pure *Clostridium butyricum* CWBI1009 en mode batch et séquentiel. Les souches de *Clostridium* sont reconnues pour leurs rendements plus élevés que ceux des entérobactéries. Elles présentent cependant un inconvénient de taille : elles sont anaérobies strictes. Cela signifie qu'elles ne peuvent se développer que dans des conditions d'anaérobiose profonde et qui doivent par conséquent être installées et maintenues. Un des objectifs de ce chapitre sera de démontrer la faisabilité de maintenir relativement aisément une activité biologique élevée de ces bactéries en culture pure dans un

AVANT-PROPOS : Synthèse du cadre général et des expérimentations et structure de la thèse

bioréacteur séquentiel. Ce chapitre décrit les résultats des expérimentations menées (i) pour déterminer le pH optimum pour la production d'H₂ à partir du substrat glucose en mode batch (bioréacteur de 2,3 L) ; (ii) pour étudier la production d'H₂ à partir du glucose en mode séquentiel et (iii) pour étudier l'effet du pH sur la production d'H₂ à partir d'amidon en mode séquentiel.

Le contenu a été publié dans l'article "Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., & Thonart, P. (2010). Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(8), 3371-3378. " (contribution équivalente des deux premiers auteurs ; J. Masset a apporté sa contribution pour l'identification de la souche et dans la rédaction de l'article)

Le quatrième chapitre 2.4. des résultats est consacré à l'étude de l'effet de l'agitation, de l'immobilisation des cellules et de la surface d'échange liquide-gaz sur la production d'hydrogène et autres métabolites par la souche *Clostridium butyricum* CWBI1009 en mode batch, séquentiel et continu. Les expérimentations décrites comparent les performances de production d'hydrogène et des métabolites solubles dans différents bioréacteurs avec rétention des flocs microbiens : bioréacteur à cuve agitée ou non, bioréacteur horizontal à lit fixe et bioréacteur à biodisque anaérobie. Ces bioréacteurs ont des surfaces spécifiques d'échange liquide-gaz (L/G) croissantes. Ce paramètre devrait permettre un transfert rapide vers la phase gazeuse de l'H₂ produit dans la phase liquide, là où son impact sur les mécanismes biochimiques est crucial. De nombreux auteurs mentionnent, peu l'ont quantifié expérimentalement, l'effet inhibiteur de la pression partielle en H₂ sur certaines voies métaboliques générant de l'hydrogène. L'objectif des expérimentations reprises dans ce chapitre était de démontrer l'effet positif sur les rendements de production d'une augmentation de la surface d'échange L/G d'un bioréacteur à cellules immobilisées. Il s'agit d'un moyen technologique différent mais avec le même objectif à la clé par rapport à l'utilisation d'un gaz neutre porteur pour dégazer le milieu de culture liquide de son H₂ et CO₂ dissous. L'effet positif du dégazage a quant à lui déjà été démontré par l'équipe de Kraemer et Bagley.

Le contenu a été soumis dans l'article "Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., & Thonart, P. "Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and biodisc anaerobic reactors with biomass retention"

Finalement, le chapitre 2.5. est consacré à l'étude du procédé de digestion anaérobie de carbohydrates en deux étages avec production d'hydrogène dans le premier bioréacteur et de méthane dans le second bioréacteur à partir des effluents solubles du premier. Une première partie de ce chapitre a permis de comparer en bioréacteur séquentiel de 2,3 L la production d'H₂ à partir du glucose par la souche pure *Clostridium butyricum* CWBI1009 et par une culture mixte issue d'un biodigester anaérobie UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) et prétraitée thermiquement pour enrichir la population microbienne en microorganismes sporulants (Culture mixte la plus performante Cf. chapitre 2.1.). La seconde partie du chapitre est focalisée sur l'étude de la faisabilité de la production de méthane en biométhaniseur de 20 L à partir des effluents du bioréacteur produisant l'hydrogène (cultures de *Clostridium butyricum* CWBI1009).

Le contenu a été publié dans l'article "Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Masset, J., & Thonart, P. (2010). Investigation of anaerobic digestion in a two-stage bioprocess producing hydrogen and methane. Paper presented at 15th European Biosolids and Organic Resources Conference, Leeds, United Kingdom"

La dernière partie de la thèse est consacrée à une synthèse des principaux résultats expérimentaux obtenus, à une discussion générale sur la position et perspectives d'application du procédé dans le panorama des technologies de traitement/valorisation énergétique des matières organiques et finalement aux conclusions.

1 INTRODUCTION

Chapitre 1.1. Les phénomènes de biodégradation de la matière organique et valorisation énergétique du biogaz

Toute matière organique d'origine animale ou végétale est naturellement appelée à subir des mécanismes de biodégradation. Elle sera tôt ou tard, en fonction des conditions physico-chimiques telles que la température et l'humidité, colonisée par des microorganismes. Ils y trouveront matière à se nourrir et se développer tout en produisant des gaz (CO_2 , H_2 et CH_4 notamment) et des substances ayant un effet positif (cas du compost en particulier) ou négatif (substances toxiques et/ou inhibitrices des effets attendus) sur le milieu environnant. Lorsque cette matière organique fait partie des rejets des activités anthropiques, c'est-à-dire des eaux usées et des déchets (semi-) solides domestiques ou industriels, et qu'ils sont collectés ou à défaut rejetés massivement dans l'environnement, on assiste à des phénomènes qu'il convient d'explicitier et de gérer tant les gisements sont importants. En effet, chaque jour dans nos pays à forte activité économique environ 1,5 kilo de déchets fermentescibles sont générés par tête d'habitant (Région wallonne, 1998). Ce chiffre prend en compte la matière organique des déchets ménagers (environ 500 g, non compris les papiers et cartons), la matière biodégradable en solution et/ou suspension dans les eaux usées domestiques (environ 100 g) et les matières fermentescibles des déchets industriels produits sur le territoire et rapportés à la taille de la population (environ 1 kg). Considérant que près de 10 % de ces derniers ne sont pas valorisés pour la matière en tant que telle (boues de station d'épuration et refus de production non valorisables en agriculture par exemple), ils contribuent avec les autres gisements domestiques à un potentiel journalier *per capita* de 600 à 800 g de matières organiques sans grande valeur a priori. Les objectifs de ce premier chapitre sont d'expliquer de façon succincte les phénomènes qui vont se développer naturellement au sein et aux dépens de cette matière organique pour générer notamment les molécules gazeuses énergétiques de CH_4 et H_2 . Il sera aussi question des paramètres d'influence et, pour bien montrer que ces matières doivent être gérées, des nuisances à court et long terme occasionnées par ces phénomènes et des moyens de les traiter. Le but est également d'identifier, progressivement et sur base des procédés de biométhanisation en général, quelles sont les matières et conditions physico—chimiques les plus intéressantes à considérer pour un procédé de digestion anaérobie en deux étages optimisés individuellement pour la production de H_2 et CH_4 . Les principales sources bibliographiques de cette partie sont des ouvrages de synthèse (Senior, 1990 ; Gendebien et al., 1992 ; Reinhart and Townsend, 1998 ; Lens *et al.*, 2004 ; Cervantes *et al.* 2006 ; De Lemos Chernicharo ; 2007); il n'y sera pas spécifiquement fait référence dans le texte afin de ne pas en alourdir la lecture.

Ce chapitre excepté l'introduction et les conclusions et perspectives est basé principalement sur des extraits de l'ouvrage "Hilgsmann S., Lardinois M., Diabate S.I. et Thonart P. (2006) Guide pratique sur la gestion des déchets ménagers et des sites d'enfouissement technique dans les pays du Sud. Édition IEPP, Québec, Canada. 121 pp"

1. Mécanismes de biodégradation de la matière organique complexe

La matière organique complexe que constituent les débris de végétaux et d'animaux, les produits dérivés (papier, cartons, sucres, graisses, produits manufacturés agroalimentaires liquides ou solides ...) ou leurs mélanges dans des matrices telles que des eaux usées ou des déchets non triés est une source de "nourriture" de choix pour de nombreux organismes et surtout de micro-organismes. Pour ces derniers, quelle que soit leur origine (présents dans la matière organique ou issus du milieu environnant), on distingue généralement les mécanismes de biodégradation en fonction de la présence ou non d'oxygène. On parle alors, respectivement, d'aérobiose ou d'anaérobiose.

Parallèlement aux processus de biodégradation, certaines molécules complexes telles que la lignine ou les tanins présents dans la matière organique telle que le bois vont subir des mécanismes de polymérisation que l'on appelle plus communément l'humification. Ces mécanismes naturels sont relativement lents et se réalisent de préférence en aérobiose avec peu d'impact négatif sur l'environnement. La résultante est un humus dont les propriétés sont bien connues.

Par contre, les processus de dégradation biologique en tant que tels, relativement rapides en aérobiose mais pouvant être très lents en anaérobiose et/ou si les conditions optimales de température et d'humidité ne sont pas satisfaites, produisent des molécules intermédiaires dont l'impact sur l'environnement peut avoir de lourdes conséquences lorsque les quantités sont importantes et que les effluents ne sont pas gérés. Attardons-nous davantage sur ces processus.

L'oxygène étant particulièrement apprécié par la plupart des microorganismes, ceux-ci vont se développer rapidement aux dépens de la matière organique disponible en rejetant principalement de l'eau et du dioxyde de carbone. Dans les cas qui nous concernent, c'est-à-dire lorsque la matière organique est suffisamment concentrée (dans des eaux usées par

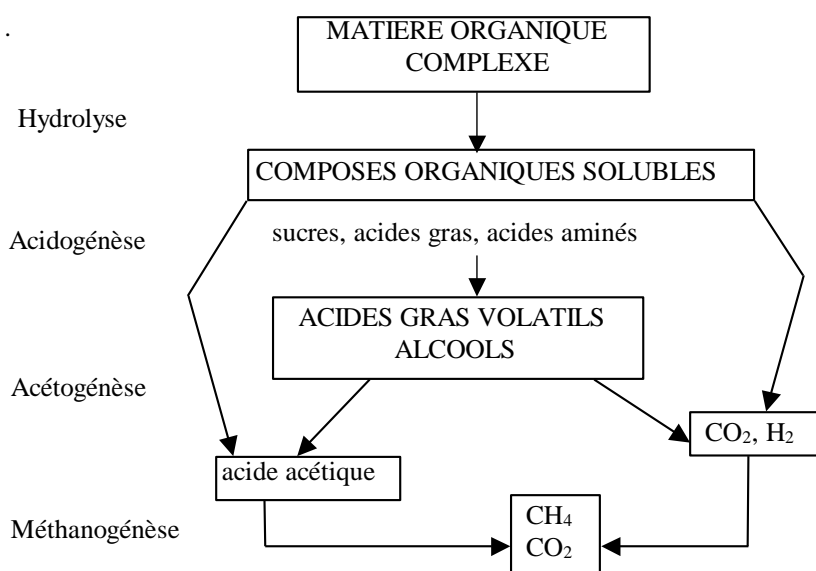


Fig 1.1 Quatre étapes caractéristiques du processus de biodégradation anaérobie de la matière organique complexe. La dernière étape de développement de la méthanogénèse est conditionnée par diverses propriétés telles que le pH.

INTRODUCTION : chapitre 1.1. Biodégradation de la matière organique et valorisation du biogaz

exemple), dense, voire sous forme solide, et que l'apport d'oxygène n'est pas forcé, des gradients de concentration se forment rapidement entre la surface de la masse de matières organiques ou de la matrice contenant ces matières organiques (eau par exemple dans le cas des eaux usées) et les couches inférieures. Par conséquent, l'aérobiose initiale laisse bientôt place à l'anaérobiose (au cœur de la matière liquide ou solide, voire à quelques centimètres de la surface). La succession de quatre étapes caractéristiques peut ainsi prendre cours. En effet, on subdivise généralement le processus de biodégradation anaérobie de la matière organique complexe en quatre étapes successives : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Fig 1.1). Si aucune intervention n'est opérée (par exemple un brassage, un broyage, un apport massif d'oxygène ou un retournement tel que préconisé pour le compostage), ces conditions, et les mécanismes de biodégradation associés, subsisteront tant que les microorganismes auront de la matière organique à profusion et que des conditions minimales de température et d'humidité seront rencontrées.

L'hydrolyse, c'est-à-dire la première étape des processus de biodégradation, est en relation avec des microorganismes producteurs d'enzymes extracellulaires (substances résultant de l'activité microbiologique). Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse (cassure) de macromolécules telles que les hydrates de carbone comme la cellulose (matière principale du bois et du papier), l'amidon, les protéines et les matières grasses en molécules plus petites et solubles (sucres, acides aminés, acides gras). Au cours de l'étape d'acidogénèse, ces molécules sont converties par des bactéries acidifiantes notamment en alcools et molécules acides de petites tailles (jusqu'à cinq ou six atomes de carbone) dont les plus importants sont appelés acides gras volatils (AGV). Très souvent les bactéries acidogènes du genre *Bacillus*, *Clostridium*, ou de la famille des entérobactéries (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, ...) sont également à l'origine de la production des enzymes hydrolytiques impliquées dans la biodégradation "spontanée" des matières organiques résiduelles. La raison fondamentale est liée à l'importante résistance, abondance et rapidité de développement de ces microorganismes à partir d'un grand nombre de molécules organiques complexes. Le groupe des bactéries acétogènes qui intervient dans la troisième étape est très hétérogène (*Clostridium*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacterium*, ...) et produit de l'acide acétique, de l'hydrogène (H_2) et du dioxyde de carbone (CO_2) à partir des AGV. Ces réactions de conversion sont cependant thermodynamiquement défavorables et ne sont possibles que lorsque la pression partielle en hydrogène produit P_{H_2} est inférieure à l'intervalle 10^{-4} - 10^{-2} atm (Kaspar and Wuhmann, 1978 ; Barnes et al., 1983) ; d'où la nécessité d'une association syntrophique avec une microflore consommatrice d'hydrogène homoacétogène (formation d'acétate à partir d'hydrogène et de dioxyde de carbone) et/ou méthanogène (Lowe et al., 1993; Pohland and Kim, 2000).

Les archaebactéries méthanogènes forment une famille à part entière (*Methanobacter*, *Methanosarcina*, ...) et sont anaérobies strictes, c'est-à-dire que cette étape ne se produira qu'en absence totale d'oxygène gazeux. Un premier groupe consomme l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour donner du méthane (CH_4), un second transforme l'acide acétique en méthane et en dioxyde de carbone. Ces deux mécanismes constituent généralement la quatrième et dernière étape du processus de biodégradation anaérobie de la matière organique complexe conduisant à la production d'un mélange gazeux riche en CH_4 et CO_2 appelé "biogaz" et à la minéralisation de la matière d'origine.

2. Conditions et impact environnementaux associés à la biodégradation anaérobie

Globalement, après les premières étapes qui induisent une acidification du milieu pouvant atteindre un pH de l'ordre de 4, la consommation des AGV provoque une élévation du pH qui stimule également l'activité méthanogène. À terme, le pH peut atteindre des valeurs supérieures à 9 inhibant progressivement la méthanogénèse, notamment par la production importante d'ammoniaque ($NH_3 + NH_4^+$). La molécule d' H_2 intervient dans la plupart de ces mécanismes biologiques (Cf. chapitre 1.2.) sans nécessairement être détectable si les quatre étapes s'enchaînent exactement c'est-à-dire si le principal facteur limitant est

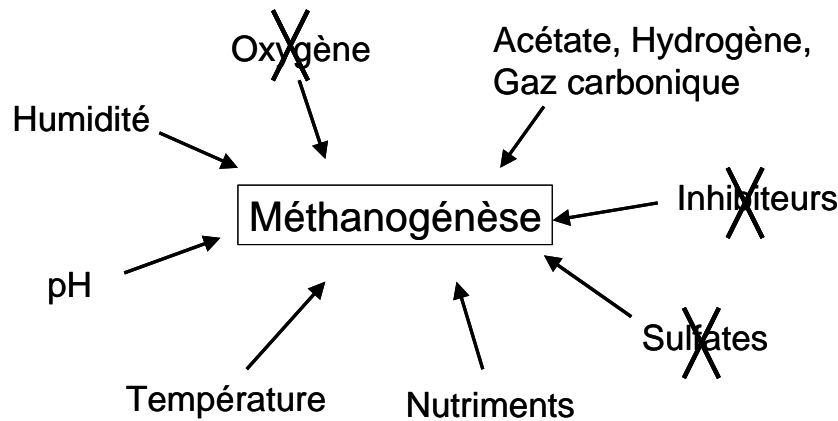


Fig 1.2 : Paramètres importants liés à la méthanogénèse

l'hydrolyse de la matière organique initiale. Parmi les microorganismes impliqués dans la biodégradation de la matière organique, la microflore méthanogène est la plus vulnérable. La Fig 1.2 fait une synthèse des paramètres importants qui interviennent dans le processus de méthanogénèse. Des conditions d'anaérobiose profonde, d'humidité optimale (55 à 80% par rapport au poids total, Senior 1990) et de pH compris entre 6,8 et 8 sont essentielles au bon déroulement de la méthanogénèse. Il est également bien démontré qu'un régime thermophile (environ 55°C) est particulièrement favorable à la méthanogénèse par rapport au régime mésophile (30-40°C). Un pH plus acide et une concentration élevée en sels et particulièrement en sulfates (se trouvant notamment dans les sols à proximité de la mer ou dans certains déchets de construction tels que le plâtre) sont, par contre, des conditions favorisant les bactéries sulfato-réductrices. Ces microorganismes (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, ...), également anaérobies strictes, utilisent l'hydrogène, l'acide acétique, les alcools et les AGV pour former du CO₂ et du sulfure d'hydrogène (H₂S facilement détectable grâce à son odeur d'œuf pourri). Cette molécule étant particulièrement toxique et volatil fait en sorte que le développement des bactéries sulfato-réductrices, notamment à partir des mêmes substrats que les méthanogènes, tend en général à inhiber rapidement l'ensemble de la microflore (Hilgsmann and Thonart, 1997). Le sulfure d'hydrogène étant aussi dommageable pour l'environnement et les équipements de traitement du biogaz, une limitation de cette bioconversion s'impose donc doublement.

Nous l'avons vu, les conditions d'aérobiose/anaérobiose et de pH influencent le développement des différentes populations de microorganismes impliqués dans les processus de biodégradation. Cependant, il est un paramètre essentiel, la teneur en humidité, dont l'incidence est primordiale sur l'ensemble des processus biologiques. En effet, que ce soit pour les enzymes, mais également pour les bactéries acido- et acétogènes ou méthanogènes l'activité augmente en fonction de la teneur en humidité du milieu (Rodriguez et al., 2005). Il est donc important de bien maîtriser ces paramètres en fonction de l'objectif poursuivi, qu'il soit d'empêcher ou de favoriser la biodégradation de la matière organique.

A l'échelle d'une masse importante de matière organique complexe (au minimum plusieurs litres ou kilos) se trouvant dans des conditions propices à la biodégradation et renfermant une microflore active, la phase de biodégradation anaérobie qui suit la très courte phase aérobie va s'étendre progressivement à toutes les molécules biodégradables en fonction de leur accessibilité et de leur nature. On définit généralement trois catégories de matières organiques selon la vitesse de biodégradation ou le temps de demi-vie (temps nécessaire pour dégrader la moitié de la quantité de matière considérée : mentionné dans des conditions favorables et défavorables) .

- Biodégradation rapide (temps de demi-vie moyen de quelques heures à quelques mois) : restes de cuisine, matières végétales non cellulosiques, matières d'origine animale, ...
- Biodégradation moyennement lente (temps de demi-vie moyen de quelques semaines à cinq années) : matières cellulosiques transformées telles que papiers et cartons

INTRODUCTION : chapitre 1.1. Biodégradation de la matière organique et valorisation du biogaz

- Biodégradation lente (temps de demi-vie moyen de quelques mois à quinze années) : matières cellulosiques naturelles (bois et pièces manufacturées en bois)

Dans les bioréacteurs ce sont surtout les matières de la première catégorie, voire en partie de la deuxième, qui sont visées. Les molécules les plus accessibles, à la surface des particules de matières complexes en suspension ou des débris individuels de déchets par exemple, vont entrer rapidement dans le processus de biodégradation et produire du gaz carbonique, des acides et ensuite du méthane. En fonction de leur nature ou vitesse de biodégradabilité, certaines molécules auront déjà atteint le stade de méthanogenèse alors que d'autres, la cellulose en particulier, seront toujours en cours d'attaque par les enzymes. A fortiori, lorsque les premières molécules de cellulose seront au stade de méthanogenèse, certaines matières protéiques ou glucidiques par exemple, auront déjà disparu. On comprend donc pourquoi à grande échelle on peut mettre en évidence différentes phases de biodégradation. On caractérise chacune de ces phases par des compositions différentes de la phase liquide (molécules solubles) et du biogaz.

La Fig 1.3 présente le profil type de concentration des différents composés majeurs en fonction du temps. Cette échelle de temps est relative et non linéaire car elle variera fortement en fonction des paramètres cités plus haut tels que la nature et l'accessibilité des molécules à dégrader. Elle peut s'étendre sur quelques jours pour des matières facilement biodégradables à plusieurs années pour les moins favorables. Dans la première phase qui correspond à la phase aérobie, le biogaz est composé essentiellement de gaz carbonique et d'eau. Toutefois ce type de biogaz n'est produit qu'en faible quantité si la phase aérobie est brève. Elle ne concerne donc que le début de l'accumulation des matières dans le biodigesteur ou sur le site et ultérieurement la couche supérieure lorsqu'elle est en contact direct avec l'atmosphère. Les phases II et III correspondent à la transition entre la phase aérobie et la phase anaérobie méthanogène stable. La phase II est caractérisée par la phase acidogène par excellence accompagnée d'une production massive de matières solubles dont les AGV et d'un biogaz contenant de l'hydrogène en plus du dioxyde de carbone. La phase III voit apparaître la production de méthane dont la concentration volumique dans le biogaz s'élève progressivement pour atteindre de l'ordre de 50 à 70%. L'hydrogène devient alors non détectable car instantanément consommé par les archaebactéries méthanogènes. Seule une inhibition de ces microorganismes permettrait de mettre en évidence cette molécule gazeuse. La durée de ces trois premières phases est de quelques jours à quelques semaines voire une année et demie selon les caractéristiques déjà citées pour un massif de déchets solides. La phase IV est la

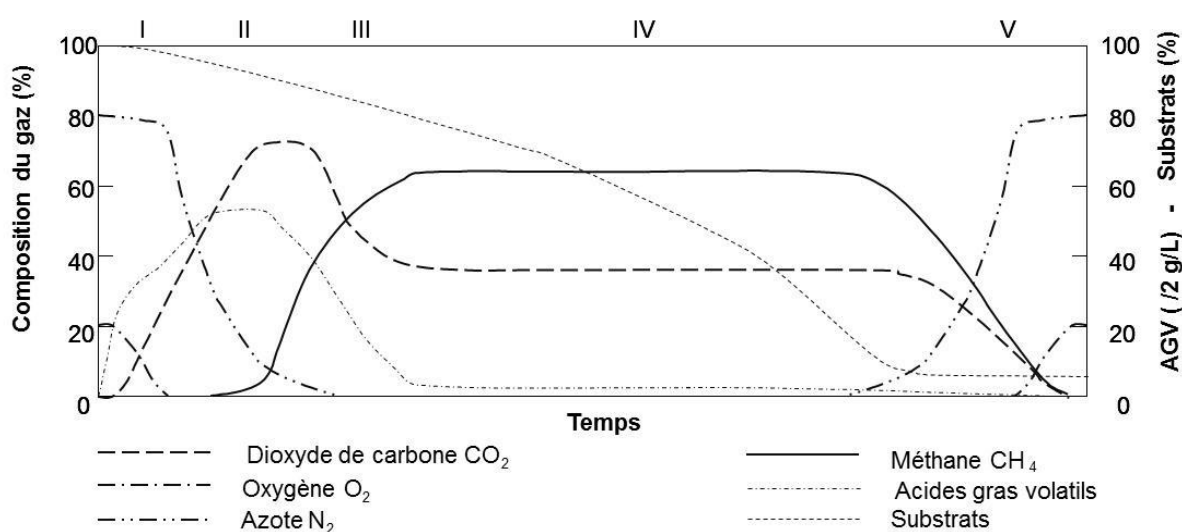


Fig 1.3 : Evolution-type de la composition du biogaz et autres molécules majeures (Substrats et acides gras volatils AGV) en fonction du temps (échelle relative non linéaire) lors de la biodégradation anaérobie de matières organiques - modifié de Farquhar and Rovers (1973)

INTRODUCTION : chapitre 1.1. Biodégradation de la matière organique et valorisation du biogaz

phase méthanogène par excellence. La production de méthane y est constante et en phase avec l'hydrolyse et la production d'AGV tant que les matières les plus difficilement biodégradables telles que la cellulose sont disponibles et accessibles jusqu'au cœur des particules de plus grandes tailles. Elle peut durer jusqu'à 50 ans et plus dans le cas de massifs de déchets renfermant de la matière organique à la fois fortement ligno-cellulosique, de grosse granulométrie et dans des conditions peu propices au développement des microorganismes méthanogènes. La phase V correspond à la phase terminale de l'activité par manque progressif de matière biodégradable. La production de gaz finit par s'annuler.

La plupart des composés intermédiaires de la biodégradation (sucres, acides, peptides, alcools, ...) étant solubles, ils constituent donc la charge majoritaire de la phase liquide durant les trois premières phases de biodégradation. A ceux-là viennent progressivement s'ajouter le cas échéant les acides humiques et fulviques dans leurs processus de condensation des matières carbonées et azotées complexes. Leur poids moléculaire augmentant progressivement, ils finissent par précipiter ou se fixer à la matière non dégradable. Entre-temps, les propriétés physico-chimiques de la phase liquide peuvent subir de profondes variations. Les liquides de percolation sont chargés bactériologiquement et surtout chimiquement de substances tant minérales qu'organiques (jusqu'à de l'ordre de 50 g/L de DBO et DCO et 5 g/L d'azote total) voire d'autres éléments toxiques (métaux lourds, ...) présents dans les rejets initiaux et mobilisés par les processus microbiologiques. S'ils ne sont pas collectés, ces liquides peuvent se mélanger aux eaux de surface comme aux eaux souterraines et donc constituer un élément polluant tant par leur aspect quantitatif que qualitatif (éléments écotoxicologiques).

Outre les composants majeurs (méthane, gaz carbonique, hydrogène, oxygène et azote) le biogaz véhicule également une multitude de substances organiques à l'état de traces (quelques dizaines à centaines de ppm de benzène, toluène, mercaptans, ...). L'origine de ces substances est également très variée via des processus particuliers de dégradation biologique et/ou chimique de certains déchets et ou molécules telles que les protéines sulfurées; plusieurs d'entre elles sont relativement nocives. Globalement, les risques liés au biogaz peuvent être séparés entre risques pour les humains (toxicité des substances traces, asphyxie pour les opérateurs de terrain, explosion du méthane et de l'hydrogène, incendies) et risques de pollution de l'atmosphère (les gaz majeurs CH_4 et CO_2 sont des gaz à effet de serre et initiateurs du smog).

3. Valorisation de la matière organique et du biogaz

La décomposition des matières organiques par l'activité biologique anaérobie intégrant les 4 étapes de biodégradation produit des gaz (en théorie de l'ordre de 350 L de CH_4 ou 500 L de biogaz à 70% de CH_4 par kilo de DCO selon les équations de la Tab. I.1) qui peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé de la population. Il faut donc les recueillir et les traiter. Lorsque la hauteur de la masse de matière organique en phase liquide ou solide excède 8 mètres, il est nécessaire de brasser la matière et/ou de pomper les gaz afin de limiter l'accumulation de ceux-ci par endroits (poches de gaz difficiles à maîtriser, risques d'inflammabilité) et de maintenir un approvisionnement en méthane relativement constant au niveau des dispositifs de traitement du biogaz (maximum 20 % de variation par rapport aux conditions optimales de fonctionnement). Une fois collectés, les gaz produits doivent être brûlés ou bien utilisés à des fins énergétiques. Un rapide historique sur le cadre et le développement des équipements en question est opportun car les évolutions futures en dépendent et notamment en lien avec le procédé de production d' H_2 .

Les premières grandes installations exploitant le biogaz produit lors de la biodigestion anaérobie de matières organiques se sont surtout développées dans les centres d'enfouissement technique de déchets ménagers (CET) durant la dernière décennie du vingtième siècle. La gestion des déchets ménagers par enfouissement en décharge était la voie la plus courante dans les pays industrialisés de sorte que ces CET renfermaient pas moins de quelques millions de tonnes de matière organique. Par conséquent, ils avaient à traiter les

INTRODUCTION : chapitre 1.1. Biodégradation de la matière organique et valorisation du biogaz

Tab. I.1. Equations chimiques de conversion des matières organiques types en méthane et potentiel de production de biogaz.

Matière organique	Equation de conversion chimique	Potentiel de production (L /kg DCO)			Biogaz 70% CH ₄
		CH ₄	CO ₂	Total	
Glucose	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3 CH_4 + 3 CO_2$	349	349	698	498
Cellulose/amidon	$(C_6H_{10}O_5 + H_2O \rightarrow 3 CH_4 + 3 CO_2)_n$	349	349	698	498
Protéine	$C_4H_6ON + 2,75 H_2O \rightarrow 2,13 CH_4 + 1,88 CO_2$	298	263	561	426
Matière grasse	$C_{55}H_{106}O_6 + 25,5 H_2O \rightarrow 39,25 CH_4 + 15,75 CO_2$	350	141	491	501

importantes quantités de biogaz produit : plusieurs milliers de mètres cubes par heure. Les technologies et équipements de captage et de traitement du biogaz se sont ainsi développés et fortement améliorés et disséminés. La maîtrise accrue de ces technologies, des processus microbiologiques de la digestion anaérobie, des technologies complémentaires y associées et l'évolution socio-économico-énergétique du monde ont induit la création d'un nombre croissant de plus petites installations de biométhanisation-cogénération pour la valorisation des matières organiques d'origines diverses (agriculture, industries agro-alimentaires, déchets ménagers, ...).

Sachant que le biogaz riche en méthane a un pouvoir calorifique d'environ 4 à 5 kWh par mètre cube, équivalent à celui d'un demi-litre de combustible de chauffage, il semblait intéressant de pouvoir le valoriser. Trois possibilités sont en général envisageables : la combustion en chaudière ou l'utilisation comme carburant dans un moteur à gaz ou une turbine gaz-vapeur. La première possibilité est de loin la moins onéreuse et la plus facile à mettre en œuvre si des opportunités locales d'utiliser les calories produites existent. Le transport du biogaz est en effet peu rentable parce qu'il est très corrosif (présence de H₂S) et son pouvoir calorifique est faible (il doit souvent être mélangé à du gaz naturel pour le bon fonctionnement des brûleurs).

Avec le développement des installations de biométhanisation des alternatives en cogénération ont vu le jour permettant de diversifier les flux énergétiques : vapeur, électricité, énergie mécanique et eau chaude en récupérant la chaleur des gaz de combustion. Pour permettre une alimentation au biogaz, des moteurs à explosion le plus souvent, ou parfois diesel ou multicarburants, (de l'ordre de 200 kW à 2 MW de puissance électrique installée) ont été adaptés afin de pallier au manque de propriétés lubrifiantes du mélange et aux risques de corrosion. Utilisant un gaz contenant des molécules pouvant être toxiques, une attention particulière doit être portée sur le réglage du moteur afin de garantir une certaine qualité des gaz d'échappement (absence de composés soufrés, dioxines, ...). Il en est de même pour les turbines, même si les températures atteintes dans la chambre de combustion sont normalement supérieures à 1800 °C.

Dans le cas du biogaz riche en hydrogène ces équipements restent applicables pour valoriser le contenu énergétique d'environ 2 kWh/m³. La technologie des piles à combustibles, complémentaire et spécifique, s'est également développée ces dernières décennies permettant des rendements de conversion électrique supérieurs (30-45%) par rapport à ceux des moteurs (25-30%).

Lorsqu'une valorisation énergétique n'est pas possible pour cause de débit insuffisant ou de qualité insatisfaisante (c'est-à-dire lorsque la teneur en gaz combustibles CH₄ ou H₂ dans le biogaz est inférieure à 35 %), il est simplement brûlé à l'air libre dans une torchère. La torchère est un dispositif permettant de brûler le biogaz à plus de 1000°C avec un excès d'air régulé automatiquement. Elle est également équipée d'un système d'auto-allumage et de contrôle en continu de son fonctionnement. Soulignons que, même si le biogaz est valorisé énergétiquement, la présence d'une torchère est indispensable sur le site, notamment pour suppléer aux dispositifs de valorisation en cas d'arrêt ou de surcharge.

4. Conclusions et perspectives

Depuis plusieurs dizaines d'années, les processus de biodégradation qui conduisent à la production de méthane sont bien connus au niveau microbiologique et biochimique. Au niveau technologique, de nombreux digesteurs ont pu être conçus, testés et améliorés pour être mis en œuvre à l'échelle industrielle en vue de valoriser énergétiquement des matières organiques de tout type (Cervantes *et al.* 2006; De Lemos Chernicharo 2007). Ils se limitent toutefois aux matières peu ligno-cellulosiques vu le temps important nécessaire à leur biodégradation et/ou les coûts élevés liés à une réduction de granulométrie ou une hydrolyse autre que microbiologique. Ces procédés industriels sont maintenant bien maîtrisés ainsi que les installations en aval de traitement et de conversion énergétique du biogaz. Celles-ci sont en général des installations modulaires associant plusieurs éléments dont des moteurs ou turbines de quelques centaines de kilowatts à 2 MW de puissance électrique avec leurs échangeurs de chaleur permettant de valoriser les calories issues du refroidissement de la machinerie et des gaz d'échappement. Très souvent plusieurs éléments de même puissance ou de puissances différentes sont associés en parallèle notamment pour permettre

- une certaine souplesse opérationnelle lors des phases de démarrage du procédé intégral, de maintenance de l'un des équipements, etc. ;
- l'utilisation de moteurs ou turbines fabriqués en série pour des raisons de coût et de maîtrise a posteriori (pièces de maintenance, compétences générales lors des interventions, ...)
- d'atteindre la valorisation optimale du méthane produit (plus de 80 % de conversion énergétique) dans le cas des installations de plusieurs mégawatts vu la puissance limitée des équipements de série.

Pour ces raisons mais aussi grâce à nombre de facteurs socio-économiques qui ont catalysé le développement d'équipements performants de conversion énergétique adaptés à la valorisation du biogaz, leur impact sur le coût d'une installation complète de biométhanisation ne représente que de l'ordre de 15 à 25%. Par contre, les coûts des installations de biométhanisation restent relativement élevés et réservés à des projets de grande envergure (environ 0,5 à 3 MW) et/ou fortement soutenus par les pouvoirs publics. Il faut en effet compter de l'ordre de 2,5 à 5 millions d'Euros pour construire une installation de biométhanisation-cogénération de 1 MW de puissance électrique installée (Kepp, 2010). Un des motifs principaux à de tels coûts est la taille des bioréacteurs nécessaires à la biodigestion ; laquelle est liée au temps de séjour des matières. Ce paramètre d'une importance extrême varie de quelques minutes à plus de 80 jours selon la nature des matières et sans pouvoir espérer valoriser plus que quelques pourcents de la cellulose disponible.

Fondamentalement et pour en revenir à la microbiologie, le temps de séjour doit permettre à la microflore méthanogène, la plus sensible au sein du bioréacteur, de se développer et d'activer son métabolisme dans un environnement physico-chimique sans trop de perturbations. Les chocs d'alimentation sont donc à proscrire car, sous l'action des bactéries acidogènes très rapides, ils conduisent à des variations importantes du pH, à des concentrations en AGV et à la production d'hydrogène pouvant inhiber l'acétogénèse. La biométhanisation en deux étages séparant la phase acidogène et la phase méthanogène a déjà été étudiée à de nombreuses reprises depuis les travaux de Pohland and Ghosh (1971) visant une résistance accrue du procédé face aux chocs d'alimentation (Cooney *et al.*, 2007). Cependant, peu d'applications industrielles ont été mises en œuvre (Bungay *et al.*, 2010 ; Wild, 2010) avec un objectif autre que l'optimisation de la production d'AGV (Kyazze *et al.*, 2007).

Récemment, Kyazze *et al.* (2007) ont soulevé l'intérêt du procédé en deux étages avec l'opportunité de produire indépendamment deux gaz, l'hydrogène et le méthane, aux propriétés bien spécifiques et complémentaires. Cette opportunité se prête particulièrement bien pour les installations traitant majoritairement des matières non ligno-cellulosiques notamment par le fait que l'hydrolyse n'y est pas le mécanisme limitant et donc la production d'acides et d'H₂ peut y être importante et rapide par rapport à la cinétique de méthanogénèse. Les chocs d'alimentation y sont donc les plus préjudiciables. Par la suite, un nombre relativement limité

INTRODUCTION : chapitre 1.1. Biodégradation de la matière organique et valorisation du biogaz

d'autres auteurs (Antonopoulou *et al.* 2008; Ding and Wang 2008; Xie et al 2008; Hafez et al 2010; Park et al 2010) et nos travaux ont étudié la faisabilité des deux étages dans diverses conditions et/ou se sont focalisés sur l'optimisation du bioréacteur acidogène dans le but d'atteindre les meilleurs rendements de production d'hydrogène. Nos travaux se sont toutefois centrés de manière originale sur l'optimisation du procédé acidogène en privilégiant des souches pures notamment dans le but de mieux comprendre les mécanismes microbiologiques et biochimiques et les paramètres qui les influencent.

Références

- Antonopoulou, G., Stamatelatos, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., and Lyberatos, G. (2008) Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47, 5227-5233.
- Barnes, D., Bliss, P. J., Grauer, B., Kuo, E. M., Robbins, K., and McLean, G. (1983) . Pretreatment of high-strength wastewaters by an anaerobic fluidized bed process. 1. Overall performance. *Environmental technology letters* 4(5), 195–202
- Bungay, S., O'Hara, L., Baloch, M.L (2010). Optimisation of the Advanced Digestion Plant at Avonmouth. *Proceedings of 15th European Biosolids and Organic Resources Conference*, Leeds, United Kingdom.
- Cervantes, F. J., Spyros, G., and Van Haandel, A. C. (2006) Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters, In *Integrated environmental technology series*, p 345, IWA publishing, London (UK).
- Cooney, M., N. Maynard, C. Cannizzaro, and J. Benemann. 2007. *Bioresource Technology* 98:2641-2651.
- De Lemos Chernicharo, C. A. (2007) Anaerobic reactors, In *Biological wastewater treatment series*, p 174, IWA publishing, London (UK).
- Directive 2008/98/CE du Parlement Européen et du Conseil (du 19 novembre 2008) relative aux déchets. . Journal officiel de l'Union européenne. L312/3-30.
- Directive 2009/28/CE du Parlement Européen et du Conseil (du 23 avril 2009) relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables. Journal officiel de l'Union européenne. L140/16-62.
- Ding, H. B., and Wang, J. Y. (2008) Responses of the methanogenic reactor to different effluent fractions of fermentative hydrogen production in a phase-separated anaerobic digestion system, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6993-7005.
- Farquhar G.J. and Rovers F.A. (1973), *Water, Air and Soil Pollutions*, 2, 483-495.
- Gendebien A, Pauwels M., Constant M., Ledrut-Damanet M-J, Nyns E.J., Willumsen H-C, Butson J., Fabry R. And Ferrero G-L (1992) *Landfill gas. From environment to energy*. Published by Commission of the European Communities.
- Hafez, H., Nakhla, G., and El Naggar, H. (2010) An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment, *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 5010-5014.
- Hilgsmann S. et Thonart P. (1997). Microflore anaérobie des décharges. *Actes de l'Atelier La problématique des déchets solides dans les villes africaines*, Ouagadougou, Burkina Faso, 25-28 mai.
- Kaspar, H. F. and Wuhmann, K. (1978) . Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Applied and environmental microbiology* 36(1), 1–7
- Kepp U. (2010). Design of AD plants for feedstock flexibility. *Proceedings of 15th European Biosolids and Organic Resources Conference*, Leeds, United Kingdom.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guvy, A. I., Hawkes, F. R., Premier, G. C., and Hawkes, D. L. (2007) Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously, *Biotechnol. Bioeng.* 97, 759-770.
- Lens, P., Hamelers, B., Hoitink, H., and Bidlingmaier, W. (2004) Resource recovery and reuse in organic solid waste management, In *Integrated environmental technology series*, p 516, IWA publishing, London (UK).
- Levin, D. B., Zhu, H. G., Beland, M., Cicek, N., and Holbein, B. E. (2007) Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada, *Bioresour. Technol.* 98, 654-660.
- Lowe, S.E., Jain, M.K., Zeikus, J.G., (1993) Biology, ecology and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiological Reviews*, 57(2), 451-509.
- Park, M. J., Jo, J. H., Park, D., Lee, D. S., and Park, J. M. (2010) Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses, *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 6194-6202.
- Pohland F, Ghosh S. 1971. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes—the two phase concept. *Environ Lett* 1:255–266.
- Pohland, F.G., Kim, J.C., (2000) Microbially mediated attenuation potential of landfill bioreactor systems. *Water Science and Technology*, 4(3), 247-254.

INTRODUCTION : chapitre 1.1. Biodégradation de la matière organique et valorisation du biogaz

Région wallonne, 1998. Plan wallon des déchets Horizon 2010.

Reinhart and Townsend. 1998. *Landfill bioreactor design and operation*. CRC Press, Boca Raton FL

Rodriguez C., Hiligsmann S., Ongena M., Charlier R. and P. Thonart (2005). Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in Municipal Solid Waste. *Biodegradation*. 16, 415-422.

Senior, E. (1990). *Microbiology of Landfill Sites*, CRC Press, USA

Verstraete, W., Van de Caveye, P., and Diamantis, V. (2009) Maximum use of resources present in domestic "used water", *Bioresour. Technol.* 100, 5537-5545.

Wild, R. (2010). Acid Phase Digestion at Derby - The Final Chapter. *Proceedings of 15th European Biosolids and Organic Resources Conference*, Leeds, United Kingdom

Chapitre 1.2. La production de biohydrogène à partir de substrats carbohydratés : état de l'art

L'hydrogène est considéré comme un vecteur d'énergie idéale et propre. Les dernières avancées au niveau de la valorisation énergétique de la biomasse laissent entrevoir une place non négligeable pour la production de biohydrogène par fermentation de substrats riches en composés carbohydratés tels que sous-produits d'origine agricole ou eaux résiduaires des industries agro-alimentaires. Un tel procédé permet de coupler épuration d'une charge organique et production d'énergie renouvelable. L'article présente l'état de l'art sur les différents types de microorganismes producteurs d'hydrogène et les paramètres qui ont été étudiés en vue d'améliorer les rendements et productivité.

Les points 1, 2, 3, 7, 8 et 9 de chapitre ont été publiés dans "Hilgsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., & Thonart, P. (2011). La production de biohydrogène à partir de substrats carbohydratés : état de l'art. In Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 101"

1. Contexte énergétique

De profondes mutations, tant sur le plan sociétal que technologique et économique, s'annoncent dans le domaine des sources d'énergie pour le XXI^e siècle. La dépendance par rapport aux combustibles fossiles, la diminution progressive de leurs ressources et la pollution qu'ils génèrent conduisent les économies mondiales à repenser leur politique énergétique en matière de consommation, de ressources et de vecteur énergétiques. Dans ce paysage, l'hydrogène (H₂) est considéré comme un vecteur d'énergie idéale et propre pour les raisons suivantes :

- sa densité énergétique est élevée : 33 kWh/kg H₂ contre 14 kWh/kg pour le méthane ou de l'ordre de 12 kWh/kg pour les carburants liquides essences ou diesels;
- l'eau est le seul effluent lié à sa combustion : $H_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$;
- son utilisation dans les piles à combustibles jouit de rendements plus élevés que dans les moteurs : respectivement 30-45% et 25-30%, au pouvoir calorifique inférieur, (Sammes et al., 2005).

La consommation mondiale d'hydrogène comme vecteur énergétique est toutefois encore marginale par rapport aux autres consommateurs de l'industrie chimique et pétrochimique (Tab. II.1, OECD/IEA 2007). Des progrès technologiques sont en effet encore attendus au niveau du stockage du gaz, de la sécurité, etc.

Tab. II.1. Bilan global des besoins en hydrogène de l'industrie mondiale (Source Debiais 2008)

Secteur industriel	Consommation mondiale (10 ⁹ Nm ³ /an)
Production d'ammoniac	212
Fabrication d'autres produits chimiques	98
Pétrochimie	320

2. Différentes voies de production d'hydrogène

Bien que l'hydrogène soit l'élément le plus répandu dans l'univers et fasse partie de trois quarts des molécules rencontrées sur la terre, on n'y trouve guère plus que quelques dixièmes de pourcents d'hydrogène moléculaire à l'état naturel (Das and Veziroglu 2001). Actuellement, plus de 95% de la production industrielle d'H₂ est réalisée aux dépens des sources d'énergie fossile dans des procédés thermo-chimiques (Tab. II.2) particulièrement énergivores car menés à des températures supérieures à 850°C et à des pressions élevées: reformage du méthane à la vapeur (48% de la production mondiale); reformage ou oxydation partielle d'autres hydrocarbures (30%) et gazéification du charbon (18%) (OECD/IEA 2007).

Depuis quelques années, de nombreuses recherches sont effectuées dans le but d'exploiter chimiquement ou biologiquement des sources d'énergies renouvelables telles que l'énergie solaire et la biomasse. La gazéification de biomasse et l'électrolyse de l'eau sont des candidats importants à court ou moyen terme pour une production de biohydrogène à grande échelle et pour des installations de taille réduite par rapport aux procédés actuels de production d'H₂. La gazéification n'est toutefois rentable que pour de la biomasse peu humide (plus de 25% de matière sèche) sachant que l'évaporation de l'eau associée à la matière première implique une perte de rendement énergétique. L'électrolyse, avec des coûts d'électricité représentant 80% des coûts de production de l'hydrogène, n'est a priori rentable que couplée à une production d'électricité excédentaire ou peu coûteuse par système photovoltaïque ou hydraulique par exemple (Kapdan and Kargi 2006).

Les avancées au niveau de l'exploitation de la biomasse laissent entrevoir une place non négligeable pour la production d'hydrogène par fermentation anaérobie de substrats riches en

INTRODUCTION : chapitre 1.2. Production de biohydrogène : état de l'art

Tab. II.2. Principaux procédés chimiques et biologiques de production d'hydrogène

Procédé (nature de l'apport énergétique)	Equation de transformation chimique du procédé complet
Procédés thermochimiques (calories)	
Reformage du méthane	$CH_4 + 2H_2O \rightarrow CO_2 + 4H_2$
Oxydation partielle d'hydrocarbures	$C_{10}H_{14} + 3 H_2O + 4 O_2 \rightarrow 9 CO + CO_2 + 10H_2$
Gazéification du charbon	$3C + 4 H_2O + O_2 \rightarrow 3CO_2 + 4H_2$
Gazéification de biomasse	$C_6H_9O_4 + 2 H_2O \rightarrow 6 CO + 6,5 H_2$
Procédé électrochimique (électricité)	
Electrolyse de l'eau	$2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$
Procédés biologiques phototrophes (énergie lumineuse)	
Biophotolyse directe	$2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$
Biophotolyse indirecte	$\left\{ \begin{array}{l} 12H_2O + 6CO_2 \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \\ C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \rightarrow 6CO_2 + 12H_2 \\ CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 4H_2 \end{array} \right.$
Décomposition photosynthétique	
Procédés biologiques chimiotrophes (substrat organique)	
Fermentation acétique	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
Fermentation butyrique	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$

composés carbohydrateés tels que les sous-produits d'origine agricole ou eaux résiduaaires des industries agro-alimentaires. Selon plusieurs auteurs (Levin 2004, Kapdan and Kargi 2006, Das and Veziroglu 2008, Wang and Wan 2009), il s'agit d'une voie incontournable et des plus prometteuses pour la production de biohydrogène et pour solutionner simultanément de nombreux problèmes environnementaux liés à la production de gaz à effet de serre, notamment lors de la dégradation non contrôlée de ce type de déchets responsable par exemple de 10% des gaz à effets de serre au Canada (Levin et al. 2007). De plus, les besoins énergétiques des procédés anaérobies sont relativement faibles puisqu'ils se déroulent à des températures comprises entre 20 et 90°C et à pression atmosphérique.

3. Production d'hydrogène par voie microbiologique

De nombreuses souches de microorganismes peuvent produire de l'hydrogène par voie microbiologique lors de la fermentation anaérobie de matières organiques ou par photolyse de l'eau (Tab. II.2). On distingue ainsi les métabolismes chimiotrophes, on parle aussi de "dark fermentation" par opposition aux autres métabolismes nécessitant l'apport d'énergie lumineuse, les phototrophes. Les algues vertes (*Chlamydomonas*, *Scenedesmus*...), les cyanobactéries (*Anabaena*, *Oscillatoria*,...) et les bactéries photosynthétiques hétérotrophes (bactéries vertes telles que *Chlorobium* et pourpres telles que *Rhodobacter* et *Rhodospseudomonas*) représentent les trois voies microbiologiques phototrophes connues (Ust'ak et al. 2007, Das and Veziroglu 2008, Kalia and Purohit 2008). Malgré des rendements quasi-totaux de production d'hydrogène (soit la production de 12 moles d'hydrogène par mole d'hexose consommée), les faibles productivités et les besoins élevés en énergie lumineuse de ces microorganismes et de ce fait le design spécifique du bioréacteur constituent des inconvénients majeurs pour un développement industriel du procédé biotechnologique (Hallenbeck and Benemann 2002, Bartacek et al. 2007, Das and Veziroglu 2008).

Par contre, les productivités d'hydrogène des bactéries chimiotrophes sont bien plus importantes que celles des phototrophes : de l'ordre de plusieurs centaines de litre d'hydrogène produit par heure par m³ de milieu de culture pour les premières, contre seulement quelques unités à dizaines de litre pour les microorganismes phototrophes (Das and Veziroglu 2008). Parmi les bactéries chimiotrophes productrices d'hydrogène, on trouve des micro-organismes qui tolèrent la présence d'oxygène (bactéries anaérobies facultatives) et d'autres qui sont inhibées par la moindre présence d'oxygène (anaérobies strictes). Les deux grandes familles bactériennes les plus performantes parmi ces deux groupes sont respectivement les entérobactéries (*Enterobacter*, *Citrobacter*, ...) et les clostridies (*Clostridium pasteurianum*, *butyricum*, ...) dont les rendements de conversion peuvent atteindre 2.5 mol H₂/mol hexose soit deux à trois fois plus que les entérobactéries (Bartacek et al. 2007, Wang and Wan 2009). On

cite également souvent la souche *Ruminococcus albus* et son rendement théorique de conversion totale du glucose en acétate avec un maximum de 4 moles d'hydrogène produit par mole de substrat (Tab. II.2 : équation de la fermentation acétique du glucose). Ntaikou et al. (2009) montrent cependant qu'il est difficile de produire plus de 2 mol H₂/mol hexose car, en fonction des conditions de culture, d'autres métabolites tels que l'éthanol et le formiate sont produits sans génération concomitante d'hydrogène. Cette souche est de surcroît très difficile à cultiver et sensible à la présence d'oxygène car anaérobie stricte et incapable de sporuler. De nombreux paramètres doivent encore être étudiés afin de l'envisager pour un procédé industriel qui se doit d'être robuste et stable sur le long terme.

Par comparaison aux autres procédés tant biologiques que chimiques, la "dark fermentation" est liée à des rendements de conversion du substrat en H₂ plus faibles : sur les 12 atomes d'hydrogène disponibles dans le glucose par exemple, moins de la moitié seront valorisés. Les 6 à 8 autres atomes, voire plus en fonction de divers paramètres, se retrouvent dans les métabolites solubles produits (Kraemer and Bagley 2007, Hallenbeck 2009). En effet, la production de biohydrogène à partir d'un substrat carbohydraté (les lipides et protéines sont peu générateurs d'H₂) par les entérobactéries conduit à la production d'éthanol, d'acétate, de succinate, de lactate et de formiate. Seul celui-ci est à l'origine d'une production d'hydrogène moléculaire, par dismutation via la formiate hydrogen lyase (Oh et al. 2008). Le biogaz produit contiendra de ce fait un mélange de 50% d'H₂ et 50% de CO₂. Dans les mêmes conditions, les clostridies vont produire de l'éthanol, du lactate, du formiate, de l'acétate, du butyrate et un biogaz contenant environ 70% d'H₂ et 30% de CO₂. La proportion théorique maximale entre ces deux molécules est de 66:33. En pratique, la proportion est influencée par la solubilisation partielle du CO₂ dans le milieu liquide et dépend des voies métaboliques empruntées dont les seules conduisant à la production d'H₂ sont la fermentation acétique et butyrique (Tab. II.2 ; Calusinska et al. 2010).

4. Les bactéries chimiotrophes productrices d'hydrogène

Les bactéries chimiotrophes ou fermentatives sont des procaryotes qui utilisent des composés chimiques comme source initiale d'énergie leur permettant d'élaborer, par oxydoréduction, leurs propres constituants organiques. Des micro-organismes chimiotrophes capables de produire de l'hydrogène existent en grand nombre dans les habitats naturels tels que les sols, sédiments, eaux usées, déjections, composts, rumens, etc (Bartacek et al. 2007, Wang and Wan 2009, Nath and Das 2011, Sinha and Pandey 2011). Ils présentent des processus de production d'hydrogène très divers mais presque essentiellement dans des conditions anaérobies. La plupart sont anaérobies stricts (*Clostridium* sp., *Caldicellulosiruptor* sp., *Thermoanaerobacterium* sp., *Ruminococcus* sp.,...) ou facultatifs (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Bacillus* sp., ...) (Chong et al. 2009, Baghchehsaraee et al. 2010, Lee et al. 2010b). Les plus étudiés pour leurs performances de production d'hydrogène sont les mésophiles des genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Citrobacter*.

L'avantage principal des bactéries anaérobies facultatives est leur résistance à l'oxygène. Par contre les *Clostridium* sont reconnues pour leur extrême sensibilité à l'oxygène qui peut poser de sévères problèmes opérationnels surtout en cultures pures (Yokoi et al. 1998, Hawkes et al. 2002, Bartacek et al. 2007, Wang and Wan 2009, Lee et al. 2010b, Jung et al. 2011). Toutefois, les rendements de conversion les plus élevés sont généralement renseignés pour les *Clostridium* avec de 1.9 à 3 mol H₂/mol hexose (Bartacek et al. 2007, Wang and Wan 2009, Lee et al. 2010b, Jung et al. 2011). Les *Clostridium* peuvent toutefois former des spores en réponse à des conditions environnementales défavorables telles qu'un manque en nutriments ou une augmentation de température (Hawkes et al. 2002). Ces spores peuvent ensuite résister à des conditions très rudes : présence d'oxygène, hautes températures au-delà de 100 °C ou négatives, chocs acides, etc.

5. Les substrats potentiels pour la production de biohydrogène

Les substrats simples tels que le glucose et le saccharose sont les plus utilisés dans la littérature pour produire du biohydrogène car ils sont assimilables par la plupart des bactéries intéressantes à l'heure actuelle (Bartacek et al. 2007, Holladay et al. 2009, Jung et al. 2011). Des expérimentations ont aussi été réalisées à partir de xylose, lactose, maltose, etc (Collet et al. 2004, Zhu and Yang 2004, Ferchichi et al. 2005, Lin et al. 2008).

Des substrats plus complexes comme l'amidon ont également été étudiés pour servir de substrat tel quel ou après hydrolyse. Cette étape de prétraitement est nécessaire pour fournir des substances assimilables à la plupart des entérobactéries, excepté pour certaines souches d'*Enterobacter* (Kumar and Das 2000, Argun et al. 2009). Cependant, seule la fraction soluble de l'amidon serait accessible pour ces microorganismes (Hawkes et al. 2002). Un nombre important de *Clostridium* peuvent produire des amylases et ensuite de l'hydrogène gazeux : les souches les plus souvent citées ou exploitées pour la production de biohydrogène sont *Clostridium butyricum* (Nakanishi et al. 2003, Chen et al. 2009, Li et al. 2010, Masset et al. 2010), *acetobutylicum* (Lay 2000, Argun et al. 2009), *beijerinckii* (Taguchi et al. 1992, Noparat et al. 2011). A défaut, l'hydrolyse de l'amidon en vue de produire du biohydrogène peut être menée par prétraitement acide (Kapdan et al. 2009) ou par d'autres microorganismes hydrolytiques tels que *Caldimonas* (Chen et al. 2009).

Il en est de même à partir de cellulose mais l'hydrolyse enzymatique (Chong et al. 2009, Lo et al. 2009b, Lo et al. 2010) est préférée à la voie microbiologique directe car les températures optimales pour la production et l'activité des cellulases sont significativement différentes, environ 35 et 45°C respectivement (Lo et al. 2009b). De nombreuses souches de *Clostridium* excréant des cellulases sont connues *cellulolyticum*, *cellulovorans*, *thermocellum*, etc. (Lay 2001, Levin et al. 2009, Lo et al. 2009a, Cho et al. 2010, Dharmagadda et al. 2010, Lee et al. 2010a).

6. Les métabolismes associés à la production d'hydrogène par les bactéries chimiotrophes

Il existe trois voies représentatives pour l'émission d'hydrogène par les bactéries chimiotrophes (Hallenbeck and Benemann 2002, Angenent et al. 2004, Hallenbeck 2009, Calusinska et al. 2010, Lee et al. 2011, Sinha and Pandey 2011). Ces voies (Tab. II.3) sont initiées à partir du pyruvate et du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) synthétisés au cours de la glycolyse. Deux enzymes différentes sont impliquées dans la conversion du pyruvate en Acetyl-CoA : la pyruvate formiate lyase (PFL) chez les entérobactéries et la pyruvate ferredoxine oxydoreductase (PFOR) chez les clostridies. La première conduit à la formation d'acide formique qui, si le pH du milieu devient acide, sera dismuté en hydrogène et dioxyde de carbone par la formiate hydrogène lyase (FHL). Par conséquent, le rendement maximum en hydrogène est de 2 moles par mole de glucose consommé. A pH neutre ou basique les bactéries n'ont pas d'intérêt à réaliser la dismutation dont le rôle fondamental est de pallier au stress acide (Hallenbeck 2009).

Tab. II.3. Principales réactions du métabolisme des bactéries chimiotrophes menant à la production d'hydrogène

Glycolyse	$\text{glucose} + 2 \text{NAD}^+ + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{pyruvate} + 2 \text{NADH}$	(1)
Conversion du pyruvate (PFL)	$2 \text{pyruvate} + 2 \text{CoA} \rightarrow 2 \text{acetyl-CoA} + 2 \text{formiate}$	(2)
Conversion du pyruvate (PFOR)	$2 \text{pyruvate} + 2 \text{CoA} + 4 \text{Fd}_{(\text{ox})} \rightarrow 2 \text{acetyl-CoA} + 2 \text{CO}_2 + 4 \text{Fd}_{(\text{rd})}$	(3)
Dismutation de l'acide formique (FHL)	$2 \text{formiate} + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2$	(4)
Oxydation du NADH (NFOR)	$2 \text{NADH} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{Fd}_{(\text{ox})} \rightarrow 2 \text{NAD}^+ + 4 \text{H}^+ + 2 \text{Fd}_{(\text{rd})}$	(5)
Oxydation de la ferredoxine (Hyd)	$4 \text{Fd}_{(\text{rd})} + 4 \text{H}^+ \rightarrow 4 \text{Fd}_{(\text{ox})} + 2 \text{H}_2$	(6)

INTRODUCTION : chapitre 1.2. Production de biohydrogène : état de l'art

Chez les microorganismes du genre *Clostridium* le pyruvate est converti en Acetyl-CoA, dioxyde de carbone et ferredoxine réduite (Hallenbeck, 2009). Celle-ci conduit ensuite à la formation d'hydrogène via transfert d'électrons au niveau des hydrogénases. A faible pression partielle en hydrogène (inférieure à 60 Pa ; Fig. II.1), les clostridies peuvent recouvrer une partie du NAD^+ pour faire tourner la glycolyse en utilisant la NADH ferredoxine oxydoreductase (NFOR) et produisant de l'hydrogène directement ou via la production de ferredoxine réduite. Cette voie serait aussi empruntée par *Enterobacter* qui réalise la fermentation formique butanediol du glucose pour produire davantage d'hydrogène que les autres entérobactéries réalisant la fermentation acide mixte (Zhang et al. 2009, Lu et al. 2011).

Comme le montre la Fig. II.1 les *Clostridium* peuvent produire dans les meilleures conditions de culture au maximum 4 moles d' H_2 par mole de glucose ainsi que deux moles d'acétate et de CO_2 . En réalité, ces conditions de très faible pression en hydrogène dans le milieu de culture sont rapidement dépassées et par ailleurs les microorganismes ont pour premier intérêt de produire de la biomasse plutôt que de l'hydrogène (Hallenbeck and Benemann, 2002). Par conséquent pour faire tourner la glycolyse la bactérie doit recouvrer le NAD^+ en empruntant notamment la voie métabolique conduisant au butyrate mais aussi d'autres voies complémentaires produisant de l'éthanol, du lactate ou du succinate mais pas d'hydrogène. Les rendements généralement mesurés se situent donc en-dessous de 4 mol H_2 /mol hexose.

7. Production de biohydrogène et biométhanisation

Les différents métabolites solubles représentant la quasi-totalité de la DCO initiale exploitée pour la production d' H_2 n'ont que peu d'intérêt économique excepté s'ils sont convertis en acétate et ensuite en une quantité complémentaire d'hydrogène ou de méthane : par des bactéries photohétérotrophes (Tao et al. 2007, Das and Veziroglu 2008) ou méthanogènes (Kyazze et al. 2007, Hiligsmann et al. 2010), respectivement. La voie méthanogène est toutefois plus intéressante car semblable sur le plan technique et complémentaire sur le plan énergétique au procédé anaérobie de production de biohydrogène. D'ailleurs, les métabolismes impliqués dans la production d' H_2 font partie intégrante des mécanismes acidogènes et acétogènes

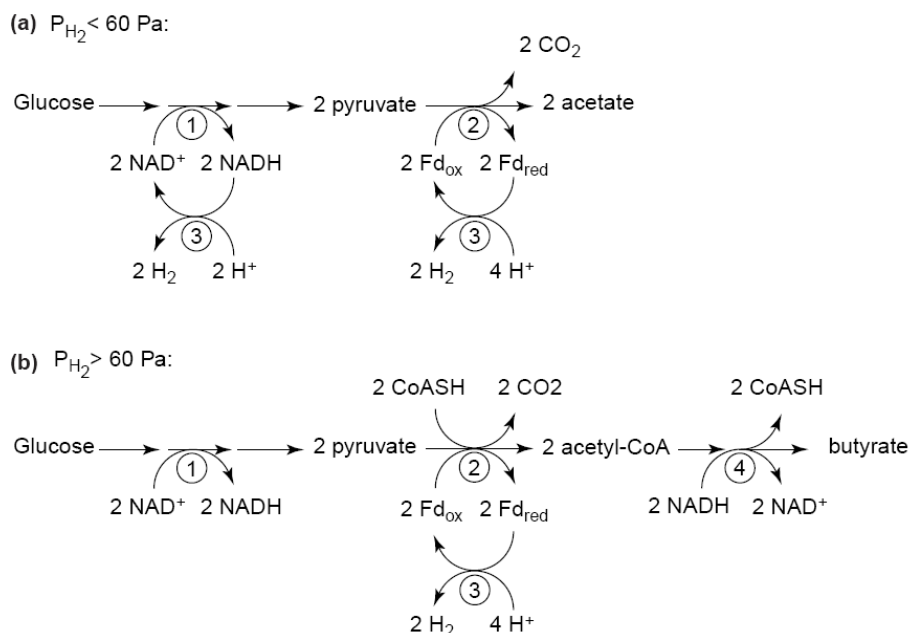


Fig. II.1 : Effet de la pression partielle P_{H_2} sur la production d'hydrogène par les clostridies : (1) métabolisme du glucose via la glycolyse ou la voie d'Entner-Doudoroff ; (2) décarboxylation oxydative du pyruvate par la pyruvate ferredoxine oxydoreductase ; (3) formation d'hydrogène par les hydrogenases ; (4) fermentation butyrique (Angenent et al. 2004).

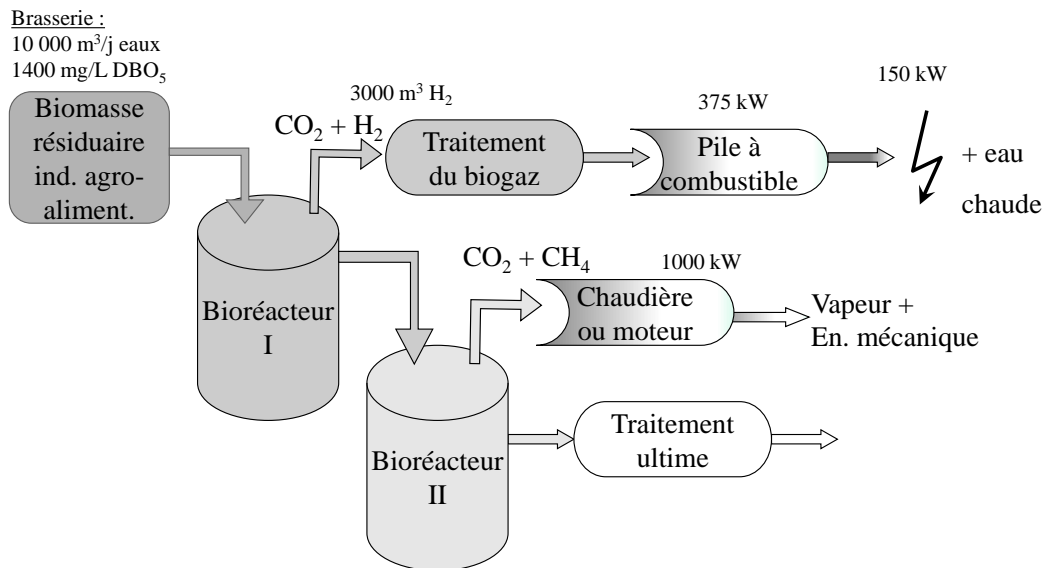


Fig. II.2. Schéma de principe d'un procédé de digestion anaérobie avec production de biohydrogène et méthane à partir de matières organiques résiduaire issues d'une industrie agro-alimentaire : données chiffrées du potentiel énergétique associé au traitement des eaux usées d'une brasserie.

rencontrés dans la cascade d'étapes constitutives du procédé de biométhanisation produisant du CH₄ à partir de matières plus ou moins complexes tels que le saccharose, l'amidon ou la cellulose. La Fig. II.2 illustre le schéma de principe d'un procédé de digestion anaérobie en deux étapes avec valorisation des volumes comparables d'hydrogène et de méthane produits respectivement dans une pile à combustible produisant de l'électricité et de l'eau chaude et un moteur ou une chaudière produisant de l'énergie mécanique et/ou thermique. Les avantages d'un tel procédé découpé sont :

- production de deux gaz aux propriétés bien spécifiques et complémentaires ;
- optimisation individuelle des deux étapes, dont les paramètres de fonctionnement sont différents notamment par rapport au pH, pour atteindre des rendements supérieurs de conversion de matière et énergétique du substrat;
- résistance accrue du procédé de biométhanisation généralement très sensible aux chocs d'alimentation (Cooney et al. 2007)

8. Optimisation du procédé de production d'H₂

Dans l'optique d'un développement industriel de la production de biohydrogène par voie microbienne, plusieurs facteurs d'optimisation ont déjà été considérés en vue de mettre en place un procédé performant, robuste, peu énergivore et polyvalent quant aux matières à traiter. Ces facteurs sont :

- la sélection de souches bactériennes ou des populations mixtes de microorganismes
- le choix des substrats potentiels hydratés et azotés
- la caractérisation et l'optimisation des conditions de culture
- le choix et l'optimisation du type de bioréacteur

La sélection des souches est délicate car elle doit se baser sur une étude comparative dans des conditions identiques et susceptibles de rendre compte de la variabilité de ces conditions dans un procédé à grande échelle. Peu de travaux ont établi une comparaison sur un large spectre de souches ou populations microbiennes dans ce type de conditions (Lin et al. 2007, Jeong et al. 2008, Baghchehsaraee et al. 2010, Hilgsmann et al. 2011). Le Tab. II.3 a été constituée à partir des résultats de Jeong et al. (2008) dans des conditions standardisées et relativement défavorables pour la production d'H₂ car en absence de substrat azoté organique.

INTRODUCTION : chapitre 1.2. Production de biohydrogène : état de l'art

Tab. II.3. Temps de latence, potentiel et productivité maximale d'hydrogène à partir de glucose (concentration initiale dans le milieu de culture variant de 5 à 20 g/L) par différentes souches et populations de bactéries phototrophes et chimiotrophes (Sources Jeong et al., 2008)

	Temps de latence (h)	Potentiel d'H ₂ (mmol/mol gluc.)		Productivité maximale (mL H ₂ /L.h)	
		Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> en présence de lumière	40	53,5	21,3	27,5	20,1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> en absence de lumière	40	31,3	8,2	15,9	6,6
<i>Clostridium Beijerinckii</i>	10	122,3	15,3	63,1	16,9
<i>Bacillus Megaterium</i>	0	38,8	5,9	29,1	6,6
boues de digesteur	10	32,3	26,1	57,3	54,3

Elle montre que la souche de *Clostridium* testée est de loin la plus intéressante pour ses rendements élevés de conversion du glucose mais aussi, comparativement aux boues de digesteur, pour la relative stabilité de sa productivité à des concentrations de glucose variant de 5 à 20 g/l. La souche *Rhodobacter sphaeroides* reconnue comme une des plus performantes parmi les microorganismes phototrophes producteurs d'H₂ conduit à des potentiels intéressants, clairement plus élevés en présence de lumière qu'en absence. Cependant, les productivités sont plus faibles que celles des autres microorganismes testés et la période de latence nettement plus longue. Les autres études citées ci-dessus confirment l'intérêt d'un nombre restreint de souches du genre *Clostridium* (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, ...) par rapport aux entérobactéries et aux populations mixtes de bactéries issues de digesteurs anaérobies, même traitées thermiquement pour enrichir la population en bactéries sporulantes dont les clostridies. Des essais comparatifs de plus grande taille (bioréacteur de 2,3 litres) et dans des conditions physico-chimiques plus stables (pH contrôlé ; milieu agité ; ...) obtenus dans un même bioréacteur batch vont également dans le même sens lorsqu'on compare la souche de *Citrobacter freundii* CWBI952 (productivité maximale de 26,4 mL H₂/L/h au pH optimum de 5,9), celle de *Clostridium butyricum* CWBI1009 (126 mL H₂/L/h au pH optimum de 5,2) et une population mixte obtenue par traitement thermique à partir de boues de biodigesteur UASB. (Hamilton et al. 2010, Hiligsmann et al. 2010, Masset et al. 2010).

Par rapport aux entérobactéries, de nombreux *Clostridium* ont également l'avantage de pouvoir exploiter une large gamme de substrats, des plus simples comme le glucose et le saccharose aux plus complexes tels que l'amidon voire les matières celluloses (Das and Veziroglu 2001, Wang and Wan 2009, Masset et al. 2010). Les substrats riches en carbohydrates et particulièrement en amidon sont potentiellement plus intéressants pour maintenir une écologie microbienne favorable aux Clostridies et des performances élevées (Bartacek et al. 2007, Das and Veziroglu 2008). De nombreuses publications émanant très souvent des pays d'Asie du Sud-Est rapportent l'expérimentation à l'échelle de laboratoire et pilote (bioréacteur de 1,5 m³ étudié par Ren et al. 2006) de la production de biohydrogène à partir de substrats résiduels d'industries agro-alimentaires traitant diverses matières telles que le riz, la patate douce, ou l'huile de palme.

L'influence de paramètres physico-chimiques tels que la température, la concentration en substrat, etc. est bien documentée mais ne conduit pas à des tendances approuvées globalement : une augmentation de température par exemple permet des productivités plus élevées mais des rendements plus faibles (Hallenbeck 2009). Par contre, le pH et la pression partielle en hydrogène sont à l'unanimité considérés parmi les paramètres les plus influents sur les performances du bioréacteur (Bartacek et al. 2007, Das and Veziroglu 2008, Hallenbeck 2009, Wang and Wan 2009). L'optimisation et le contrôle du pH permet par exemple pour une même souche un gain en performances pouvant atteindre un facteur 3 (Masset et al. 2010). Des recherches pour réduire l'influence de la pression partielle en H₂ sont nécessaires. Elles doivent se focaliser en priorité sur les types de bioréacteurs mettant en œuvre un transfert liquide/gaz important. Cela est possible en recourant au dégazage par un gaz inerte avec un doublement des rendements envisageable (Hallenbeck 2009). Toutefois, afin d'éviter des coûts de traitement du biogaz en aval, les bioréacteurs non saturés semblent plus avantageux (Zhang et al. 2006, Beckers et al. 2011).

9. Conclusions

La production d'hydrogène par digestion anaérobie de carbohydrates est un procédé prometteur. Il est d'autant plus intéressant lorsque les substrats sont des sous-produits, des eaux usées ou des déchets agro-alimentaires car il permet de coupler leur épuration avec la production d'une énergie verte. Le procédé de production d'H₂ peut alors être associé à un procédé de biométhanisation pour traiter les effluents solubles du premier bioréacteur. A côté des nombreux facteurs d'optimisation qui ont été développés, des progrès sont toutefois encore souhaités en vue d'améliorer les performances du bioréacteur notamment en améliorant le transfert liquide/gaz de l'hydrogène produit afin de réduire la pression partielle en H₂ dont l'impact sur la productivité est non négligeable.

Références

- Angenent, L. T., K. Karim, M. H. Al-Dahhan, and R. Domiguez-Espinosa. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology* 22:477-485.
- Argun, H., F. Kargi, and I. K. Kapdan. 2009. Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:2195-2200.
- Baghchehsaraee, B., G. Nakhla, D. Karamanev, and A. Margaritis. 2010. Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 35:5021-5027.
- Bartacek, J., J. Zabranska, and P. N. L. Lens. 2007. Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 1:201-214.
- Beckers, L., S. Hilgsmann, J. Masset, C. Hamilton, and P. Thonart. 2011. Effets de la pression partielle en hydrogène sur la production anaérobie de bioH₂ par une bactérie chimiotrophe du genre *Clostridium* dans un nouveau réacteur à cylindre horizontal rotatif. *Récents Progrès en Génie des Procédés* 101.
- Calusinska, M., T. Happe, B. Joris, and A. Wilmotte, *Microbiology* 156, 1575-1588. 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. *Microbiology* 156:1575-1588
- Chen, S. D., Y. C. Lo, K. S. Lee, T. I. Huang, and J. S. Chang. 2009. Sequencing batch reactor enhances bacterial hydrolysis of starch promoting continuous bio-hydrogen production from starch feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:8549-8557.
- Cho, W., S. D. Jeon, H. J. Shim, R. H. Doi, and S. O. Han. 2010. Cellulosomic profiling produced by *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources explored by the cohesin marker. *Journal of Biotechnology* 145:233-239.
- Chong, M. L., R. A. Rahim, Y. Shirai, and M. A. Hassan. 2009. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:764-771.
- Collet, C., N. Adler, J. P. Schwitzguebel, and P. Peringer. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy* 29:1479-1485.
- Cooney, M., N. Maynard, C. Cannizzaro, and J. Benemann. 2007. Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. *Bioresource Technology* 98:2641-2651.
- Das, D. and T. N. Veziroglu. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 26:13-28.
- Das, D. and T. N. Veziroglu. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33:6046-6057.
- Debiais, L. 2008. Production et consommation d'hydrogène aujourd'hui. *in* A. F. d. l'Hydrogène, editor. *Mémento de l'hydrogène*.
- Dharmagadda, V. S. S., S. E. Nokes, H. J. Strobel, and M. D. Flythe. 2010. Investigation of the metabolic inhibition observed in solid-substrate cultivation of *Clostridium thermocellum* on cellulose. *Bioresource Technology* 101:6039-6044.
- Ferchichi, M., E. Crabbe, G. H. Gil, W. Hintz, and A. Almadidy. 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology* 120:402-409.
- Hallenbeck, P. C. 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:7379-7389.
- Hallenbeck, P. C. and J. R. Benemann. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27:1185-1193.
- Hamilton, C., S. Hilgsmann, L. Beckers, J. Masset, A. Wilmotte, and P. Thonart. 2010. Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode. *International Journal of Hydrogen Energy* 35:1089-1098.
- Hawkes, F. R., R. Dinsdale, D. L. Hawkes, and I. Hussy. 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy* 27:1339-1347.

INTRODUCTION : chapitre 1.2. Production de biohydrogène : état de l'art

- Hilgsmann, S., C. Hamilton, L. Beckers, J. Masset, and P. Thonart. 2010. Investigation of anaerobic digestion in a two-stage bioprocess producing hydrogen and methane. *in* 15th European Biosolids and Organic Resources Conference Leeds, United Kingdom.
- Hilgsmann, S., J. Masset, C. Hamilton, L. Beckers, and P. Thonart. 2011. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology* 102:3810-3818.
- Holladay, J. D., J. Hu, D. L. King, and Y. Wang. 2009. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today* 139:244-260.
- Jeong, T. Y., G. C. Cha, S. H. Yeom, and S. S. Choi. 2008. Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 14:333-337.
- Jung, K.-W., D.-H. Kim, S.-H. Kim, and H.-S. Shin. 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology* 102:8612-8620.
- Kalia, V. C. and H. J. Purohit. 2008. Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:403-419.
- Kapdan, I. K. and F. Kargi. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 38:569-582.
- Kapdan, I. K., F. Kargi, R. Oztekin, and H. Argun. 2009. Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter* sp. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:2201-2207.
- Kraemer, J. T. and D. M. Bagley. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters* 29:685-695.
- Kumar, N. and D. Das. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry* 35:589-593.
- Kyazze, G., R. Dinsdale, A. I. Guwy, F. R. Hawkes, G. C. Premier, and D. L. Hawkes. 2007. Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnology and Bioengineering* 97:759-770.
- Lay, J. J. 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering* 68:269-278.
- Lay, J. J. 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 74:280-287.
- Lee, C. Y., K. O. Yu, S. W. Kim, and S. O. Han. 2010a. Enhancement of the thermostability and activity of mesophilic *Clostridium cellulovorans* EngD by *in vitro* DNA recombination with *Clostridium thermocellum* CelE. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109:331-336.
- Lee, D.-J., K.-Y. Show, and A. Su. 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology* 102:8393-8402.
- Lee, H. S., W. F. J. Vermaas, and B. E. Rittmann. 2010b. Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends in Biotechnology* 28:262-271.
- Levin, D. B. 2004. Re: Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application - Erratum. *International Journal of Hydrogen Energy* 29:1425-1426.
- Levin, D. B., C. R. Carere, N. Cicek, and R. Sparling. 2009. Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:7390-7403.
- Levin, D. B., H. G. Zhu, M. Beland, N. Cicek, and B. E. Holbein. 2007. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Bioresource Technology* 98:654-660.
- Li, S. L., L. M. Whang, Y. C. Chao, Y. H. Wang, Y. F. Wang, C. J. Hsiao, I. C. Tseng, M. D. Bai, and S. S. Cheng. 2010. Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *International Journal of Hydrogen Energy* 35:61-70.
- Lin, C. Y., C. C. Wu, and C. H. Hung. 2008. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33:43-50.
- Lin, P. Y., L. M. Whang, Y. R. Wu, W. J. Ren, C. J. Hsiao, S. L. Li, and J. S. Chang. 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy* 32:1728-1735.
- Lo, Y. C., W. C. Lu, C. Y. Chen, and J. S. Chang. 2010. Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium butyricum* CGS5. *Bioresource Technology* 101:5885-5891.
- Lo, Y. C., G. D. Saratale, W. M. Chen, M. D. Bai, and J. S. Chang. 2009a. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology* 44:417-425.
- Lo, Y. C., Y. C. Su, C. Y. Chen, W. M. Chen, K. S. Lee, and J. S. Chang. 2009b. Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology* 100:5802-5807.
- Lu, Y., L. Wang, K. Ma, G. Li, C. Zhang, H. Zhao, Q. Lai, H.-P. Li, and X.-H. Xing. 2011. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP). *Biochemical Engineering Journal* 55:17-22.

INTRODUCTION : chapitre 1.2. Production de biohydrogène : état de l'art

- Masset, J., S. Hilgsmann, C. Hamilton, L. Beckers, F. Franck, and P. Thonart. 2010. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy* 35:3371-3378.
- Nakanishi, S., K. Kataoka, T. Kuwahara, and Y. Ohnishi. 2003. Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiology and Immunology* 47:951-958.
- Nath, K. and D. Das. 2011. Modeling and optimization of fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology* 102:8569-8581.
- Noparat, P., P. Prasertsan, and S. O-Thong. 2011. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. *International Journal of Hydrogen Energy* 36:14086-14092.
- Ntaikou, I., H. N. Gavala, and G. Lyberatos. 2009. Modeling of fermentative hydrogen production from the bacterium *Ruminococcus albus*: Definition of metabolism and kinetics during growth on glucose. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:3697-3709.
- OECD/IEA. 2007. Hydrogen production and distribution. *in* I. E. Agency, editor. *Energy Technology Essentials*.
- Oh, Y. K., H. J. Kim, S. Park, M. S. Kim, and D. D. Y. Ryu. 2008. Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy* 33:1471-1482.
- Ren, N. Q., J. Z. Li, B. K. Li, Y. Wang, and S. R. Liu. 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy* 31:2147-2157.
- Sinha, P. and A. Pandey. 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 36:7460-7478.
- Taguchi, F., J. D. hang, S. Takiguchi, and M. Morimoto. 1992. Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73:244-245.
- Tao, Y. Z., Y. Chen, Y. Q. Wu, Y. L. He, and Z. H. Zhou. 2007. High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy* 32:200-206.
- Ust'ak, S., B. Havrland, J. O. J. Munoz, E. C. Fernandez, and J. Lachman. 2007. Experimental verification of various methods for biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 32:1736-1741.
- Wang, J. L. and W. Wan. 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:799-811.
- Yokoi, H., T. Tokushige, J. Hirose, S. Hayashi, and Y. Takasaki. 1998. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters* 20:143-147.
- Zhang, C., K. Ma, and X. H. Xing. 2009. Regulation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD(+). *International Journal of Hydrogen Energy* 34:1226-1232.
- Zhang, H. S., M. A. Bruns, and B. E. Logan. 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research* 40:728-734.
- Zhu, Y. and S. T. Yang. 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology* 110:143-157.

2 RESULTATS

Plan de la partie Résultats

Les recherches ont porté sur l'étude et l'optimisation du procédé biologique de production de biohydrogène par les bactéries chimiotrophes dans l'optique de l'intégrer dans un procédé global de biodigestion anaérobie de matières organiques diverses en deux étages.

Les résultats sont rapportés dans cinq chapitres consacrés successivement à :

1. l'étude comparative de la production d'hydrogène par différentes souches et cultures mixtes de microorganismes : *dans le but de sélectionner les microorganismes les plus performants qui seront étudiés de façon plus approfondie dans les chapitres suivant ;*
2. l'étude et optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie facultative *Citrobacter freundii* CWBI952 : *souche plus facile à maîtriser que les bactéries anaérobies strictes ;*
3. l'étude et optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie stricte *Clostridium butyricum* CWBI1009 : *dans le but de comparer ses performances dans des conditions identiques avec celles de Citrobacter freundii* CWBI952 ;
4. l'optimalisation de la production d'hydrogène par *Clostridium butyricum* CWBI1009 en bioréacteurs : effet de l'immobilisation cellulaire et de la surface d'échange L/G : *dans le but d'améliorer les performances et la stabilité de la microflore au sein du bioréacteur ;*
5. l'étude du procédé de digestion anaérobie en deux étages avec production d'hydrogène en culture pure ou culture mixte et production de méthane à partir des effluents solubles du premier bioréacteur : *dans le but de démontrer la faisabilité et l'intérêt du procédé en deux étages.*

Chapitre 2.1. Etude comparative de la production d'hydrogène par différentes souches et cultures mixtes de microorganismes

La sélection de microorganismes performants est une première étape essentielle des travaux de recherche dans le but d'étudier et d'optimiser le procédé biologique de production de biohydrogène et, à terme, de l'intégrer dans un procédé global de biodigestion anaérobie de matières organiques diverses en deux étapes. A priori, il est bien accepté que les bactéries chimiotrophes sont les microorganismes les plus intéressants. De nombreuses souches sont connues pour leurs potentialités de production d'hydrogène mais peu d'études ont réellement été consacrées à la comparaison de leurs performances selon un protocole d'expérimentation standardisé. En outre, la plupart des travaux rapportés dans la littérature sont menés avec des populations mixtes de microorganismes ayant subi d'éventuels prétraitements en vue d'opérer une certaine sélection de bactéries plus intéressantes pour leurs rendements en H₂. Des traitements thermiques pour isoler des bactéries sporulantes sont le plus fréquemment employés.

Dans ce chapitre, les performances de 19 souches pures et populations mixtes issues de bioréacteurs méthanogènes et ayant subi un prétraitement thermique ou non seront comparées lors de cultures en microcosmes de 270 mL. Les rendements de conversion du glucose en hydrogène, le pourcentage d'hydrogène dans le biogaz et la composition des métabolites solubles sont les trois critères de comparaison retenus. Parmi les souches pures testées 2 sont des bactéries anaérobies facultatives (*E. coli* et *Citrobacter freundii*) et 11 sont des bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium* particulièrement intéressantes selon la littérature pour leurs rendements élevés de production d'H₂ et leurs capacités de consommer l'amidon. Ce substrat est un candidat important dans l'optique d'une application industrielle car il est présent dans de nombreux résidus et eaux résiduaires et est en général plus difficilement biodégradable que les carbohydrates plus simples. Notons d'emblée que dans nos travaux les substrats carbohydratés sont privilégiés parce qu'ils conduisent à des rendements élevés en hydrogène comparativement aux matières grasses ou protéiques. En outre, les carbohydrates celluloseux ne seront pas considérés vu qu'ils sont peu exploités actuellement en biodigestion anaérobie en phase liquide ou semi-solide.

Parmi les souches de *Clostridium* testées certaines sont mésophiles et d'autres thermophiles dans le but d'évaluer l'intérêt de mener le procédé à une température de l'ordre de 30°C ou de 55°C, températures communément utilisées pour la biométhanisation. Trois souches différentes de *Clostridium butyricum* ont également été testées dans le but d'évaluer la variabilité des performances au sein d'une même espèce.

Le contenu a été publié dans l'article "Hilgsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., Beckers, L., & Thonart, P. (2011). Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. Bioresource Technology, 102, 3810-3818."

Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria

1. Introduction

For some decades, anaerobic digestion producing fuel gas has been largely investigated and many industrial processes are currently available for methane generation, an interesting renewable energy provider from various carbon sources (Cervantes et al., 2006; De Lemos Chernicharo, 2007; Lens et al., 2004; Verstraete et al., 2009). Since a large number of microorganisms have different and successive contribution in the methanogenic fermentation the process has been divided in four steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and eventually methanogenesis (Ding & Wang, 2008; Levin et al., 2007). Compared to the other microflora involved in methane production, the methanogenic Archaea group usually contains only a few strains and are restrained to very specific growth conditions. As a consequence, more scientific literature is available about operating parameters (e.g. pH or substrate loading rate) affecting the performances of methanogenic microorganisms rather than about the diversity and specific metabolism of the microflora involved in the first three anaerobic digestion stages.

Recently, a great interest has been shown for H₂, an intermediate biogas produced during acido- and aceto-genesis. Biologically produced hydrogen is a promising energy vector with some advantages and complementarities compared to methane : mainly no carbon dioxide emissions from hydrogen combustion and its potential use in fuel cells for higher energetic efficiency (30-45%, low heating value) than in internal combustion engines (25-30%) without co-generation (Sammes et al., 2005). Nevertheless, though the H₂ production rate is about ten times higher than the theoretical CH₄ production rate, the hydrogen produced in anaerobic digesters is rapidly consumed by methanogenic bacteria. In a two-step process, *i.e.* when acido- and aceto-genesis are carried out in a different vessel than methanogenesis, it is feasible to generate separated biogas flows containing either H₂ or CH₄ depending on specific operating parameters such as the pH (Antonopoulou et al., 2010; Ding & Wang, 2008). According to the highest yields reported by these authors, the mean volumetric H₂ and CH₄ potential would be in a stoichiometric ratio of 2:2 to 2:3.

Many investigations have been carried out in order to improve the H₂ production from organic matter. The results achieved and reviewed by many authors (Bartacek et al., 2007; Das & Veziroglu, 2008; Wang & Wan, 2009a; Wang & Wan, 2009b; Wang & Wan, 2009c) are useful for performance improvements of the whole anaerobic digestion process, whether performed in one or two stages. However, to our knowledge, no study has been conducted to compare a large number of pure strains and mixed cultures of HPB in the same experimental conditions.

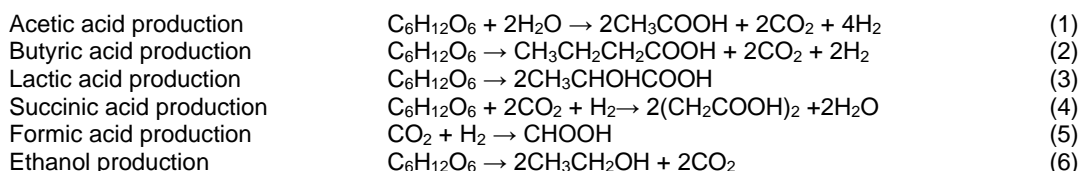
Some decades ago, Owen et al. (1979) developed a bioassay method to monitor the biochemical methane potential (BMP) of different organic materials. Many studies have used this method (Hansen et al., 2004; Gunaseelan, 2004; Raposo et al., 2008; Rodriguez et al., 2005) and adapted it to characterize other microorganisms such as sulphate-reducing bacteria (Hilgsmann et al., 1998). The basic approach of the BMP test is to incubate a small amount of the organic material with an anaerobic inoculum and specific minerals and nutrients. Methane generation in the culture vessels, usually serum bottles, is monitored by simultaneous measurement of gas volume and gas composition using syringes or water replacement equipment and gas chromatography respectively (GC-TCD or GC-FID). Other systems have been developed for monitoring gas evolution in multiple closed vessels (Angelidaki et al., 1998). These systems use specific electronic devices and are usually expensive or need high expertise.

Recently, the BMP test has been adapted to investigate the metabolism of carbohydrates fermentation and hydrogen production by different H₂-producing strains and sludges (Lin et al.,

2007; Ntaikou 2008; Panagiotopoulos et al., 2009; Patra et al., 2008). However, the culture medium and preparation are difficult to carry out and frequent sampling for biogas volume and composition analysis, by fastidious gas chromatography method, are not suitable, particularly when it is necessary to maintain pure cultures.

In our works, an easy-to-operate method was developed in order to assess binary biogas mixtures –H₂ and CO₂ or CH₄ and CO₂- production and composition by different strains and consortia from different substrates. This paper describes especially the experimental and biogas monitoring procedures for fermentative H₂-CO₂ production from glucose. The experimental culture procedure is an adaptation of the BHP assay developed by Lin et al. (2007), also based on the BMP assay described by Owen et al. (1979). By comparison to the relatively complex media used by these authors, our method uses a simple medium containing glucose as the carbohydrate source, peptone and yeast extract as the organic nitrogen sources, cysteine as the reducing agent, a phosphate buffer and magnesium sulphate salt. Moreover, a lower inoculum *i.e.* 2.5 % v/v was used in order to assess the adaptation and growth abilities of the strains and sludges. The biogas monitoring method is based on water replacement method. It was adapted *i.e.* using sterile syringes and CO₂-absorbing solution instead of water to assess both biogas production and composition at different incubation time avoiding culture contamination by other strains. Therefore, this biogas monitoring method does not require an expensive gas chromatographer. However it was validated in this paper by comparing the hydrogen production yields obtained in different cultures by both methods.

The purpose of the experimental researches reported here is to comprehensively compare the hydrogen production yield and rate of different facultative and strict anaerobic HPB strains and anaerobically digested sludges. The relationship between the metabolites and H₂ production has also been investigated taking into account the different equations (Eq. 1 to 6) of the metabolic pathways reported below (Tanisho et al., 1998). It should be noted that formic acid would be produced in the cell from by-products of the glucose metabolism. The strains were chosen according to the literature as high H₂ producers from the *Enterobacteriaceae* group (*Escherichia coli* and *Citrobacter freundii*) and the *Clostridium* genus (11 strains). The sludges were collected from both a completely stirred digester (CSAD) and an UASB anaerobic digester cultured with or without thermal pre-treatment to enrich the acidogenic microflora.



2. Materials and methods

Inocula and treatment conditions

Different facultative and strict anaerobic strains and two anaerobically digested sludges were used as inocula for comparative tests in serum bottles. The pure strains *Clostridium butyricum* DSM2478 (named *C. butyricum* 1 in this paper), *C. butyricum* DSM2477 (named *C. butyricum* 2 in this paper), *C. pasteurianum* DSM525, *C. aminovalericum* DSM1283, *C. aurantibutyricum* DSM793, *C. puniceum* DSM2619, *C. saccharolyticum* DSM2544, *C. polysaccharolyticum* DSM1801, *C. acetobutylicum* DSM792, *C. thermosaccharolyticum* DSM571 (also known as *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (O-Thong et al., 2008)) and *C. thermosulfurigenes* DSM2229 were obtained from the DSMZ collection (Germany). The strain *Escherichia coli* ATCC10536 was obtained from the ATCC collection. The lyophilized strains were first cultured on the DSMZ recommended medium and then transferred in 25 ml hermetically stoppered tubes filled with sterile MDT medium (Hamilton et al., 2010). The strains *C. butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 were isolated and identified by the authors (Hamilton et al., 2010; Masset et al., 2010). The facultative anaerobic strains were maintained at 4 °C on PCA solid medium and the Clostridia strains in liquid MDT medium

containing a lower glucose concentration (2 g/l) in order to promote spore formation after the growth phase. For fresh inoculum conservation 1 mL of culture was transferred twice a week to 25 mL of sterile MDT medium and incubated at 30°C (55°C for thermophilic strains).

The CSAD sludge was collected from a 20 liters stirred anaerobic digester used in CWBI for BMP assays of different agro-food organic wastes. This lab-scale digester was inoculated two years ago with a sludge collected from a full-scale anaerobic digester treating the activated sludge from a municipal wastewater treatment plant. The UASB sludge was collected from an UASB anaerobic digester treating organic wastewater from sugar-beet and bioethanol industries. In order to enrich the hydrogen-producing bacteria, both sludges were heat treated at 80 °C for 10 and 30 min. Untreated sludges were also used as control.

Experimental procedures and culture conditions

The BHP test developed in this study is a modified version of the biochemical hydrogen potential (BHP) test developed by Lin et al. (Lin et al., 2007). The tests were carried out in 250 ml serum bottles filled with 200 ml of MDT culture medium. The MDT medium contained, per liter of deionized water: glucose monohydrate (5 g), casein peptone (5 g), yeast extract (0.5 g), Na₂HPO₄ (5.1 g), KH₂PO₄ (1.2 g), MgSO₄·7H₂O (0.5 g), L-cysteine hydrochloride (0.5 g). The bottle containing the medium (except cysteine and glucose) with the pH adjusted to 8.5 with NaOH 5N was autoclaved at 120 °C for 20 minutes. The glucose monohydrate was sterilized separately in aqueous solution in order to prevent Maillard reactions between carbohydrates and amino acids. The aqueous cysteine solution was sterilized in hermetically stoppered tubes to prevent its oxidation by ambient air. After the medium had been prepared, sterilized and cooled down, the glucose and cysteine solutions were added sterilely and the medium was inoculated with 5ml of inoculum. The bottle was capped tightly with a sterile rubber septum, flushed with sterile nitrogen and then incubated at a temperature of 30°C (55°C for thermophilic strains as described by Wang et al. (2009)). Each BHP test was conducted at least in triplicated experiments. Purity check of *Clostridium* and *Enterobacteriaceae* cultures were realized by spreading a 100 µL sample or diluted sample, respectively, on a PCA Petri dish before incubation at 30°C for 24 to 48 h.

Monitoring and analytical methods

Water supplemented with KOH 9 N was used in a 100 ml-replacement equipment (Fig. 1.1 A) to monitor the biogas production and composition of the BHP tests. After sterilizing the rubber (using flamed ethanol) of the culture vessel, the biogas samples were collected (Fig. 1.1 B) with a graduated syringe (20 or 50 ml Terumo medical PEHD syringe) and a sterile needle before its transfer into the KOH solution through the immersed hole (H; Fig. 1.1 C). Carbon dioxide absorption enabled the measurement of the other gases volume. A rubber (R) is used to maintain the thin layer neopren tube (T, resistant to strong basic conditions) used to fill the graduated equipment with KOH by gas suction (Fig. 1.1 D) and gas removal (Fig. 1.1 E) via another syringe (S) and tubes closed by Hoffman clamps (C1 and C2). The absorption potential of the KOH solution was regularly controlled with gas mixtures containing 0, 20, 35, 80 and 100 % CO₂. Nitrogen, hydrogen and carbon dioxide content can be determined for each gas sample according to the equation below (Eq. 7 to 12) taking into account the initial nitrogen gas volume inside serum bottles gas phase and the further dilutions with the biologically produced gases. The composition of biogas was validated using a gas chromatographer fitted with a thermal conductivity detector as described elsewhere (Hamilton et al., 2010).

Culture samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate, acetate, propionate, butyrate, lactate and succinate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as described formerly (Masset et al., 2010). The data on the concentrations of glucose and metabolites present in the culture medium were used to calculate the mass balance (MB) of glucose conversion into the major soluble metabolites using the method reported elsewhere (Hamilton et al., 2010).

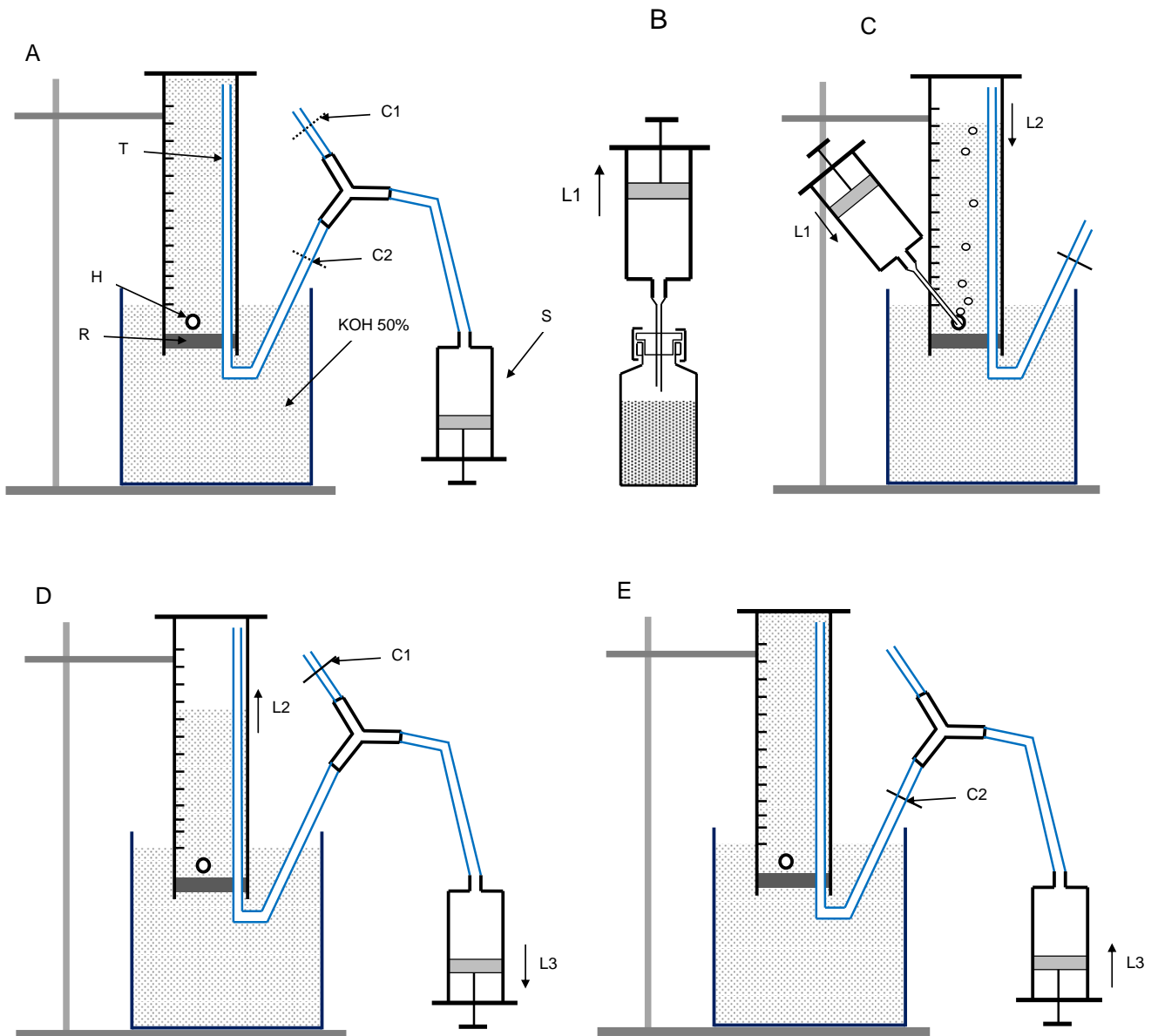


Fig. 1.1 Experimental setup and operating procedure used to monitor the biogas composition of the BHP tests : KOH replacement equipment (A); gas sampling operation (B); gas transfer for carbon dioxide absorption in KOH (C); equipment filling with KOH (D); gas removal from syringe (E) (the arrows L1 and L3 indicate the displacement of the syringe piston and L2 the displacement of the KOH level in the replacement equipment).

$$\text{The total volumetric hydrogen production } V_{HT} = \sum_{i=1}^n V_{H,i} \quad (7)$$

where $V_{H,i}$ is the volumetric hydrogen production measured at the i^{th} sampling
 therefore $V_{H,i} = (V_{S,i} + V_T) \%_{H,i} - V_T \cdot \%_{H,i-1}$ (8)

where $V_{S,i}$ is the total biogas volume sampled at the i^{th} sampling
 V_T is the total headspace volume in the culture vessel
 $\%_{H,i}$ is the hydrogen content in the gas phase measured at the i^{th} sampling
 $\%_{H,i-1}$ is the hydrogen content in the gas phase measured at the $(i-1)^{\text{th}}$ sampling

Since $\%_{H,i} = 1 - \%_{N,i} - \%_{C,i}$ (9)

where %_{N,i} and %_{C,i} are respectively the nitrogen and carbon dioxide content in the gas phase measured at the *i*th sampling,

$$\text{and } \%_{N,i} = \frac{V_{N,i}}{V_T} = \left(\frac{V_T}{V_T + V_{S,i}} \right) \%_{N,i-1} \quad (10)$$

$$\text{and } \%_{C,i} = \frac{V_{C,i}}{V_T} = \left(\frac{V_{S,i} - V_{R,i}}{V_{S,i}} \right) \quad (11)$$

where $V_{R,i}$ is the biogas volume recovered after injection of $V_{S,i}$ in the KOH replacement equipment at the *i*th sampling

then Eq. 8 becomes $V_{H,i} = (V_{S,i} + V_T) \cdot (1 - \%_{N,i} - \%_{C,i}) - V_T \cdot (1 - \%_{N,i-1} - \%_{C,i-1})$

$$\begin{aligned} \text{or } V_{H,i} = (V_{S,i} + V_T) \cdot \left[1 - \%_{N,i-1} \left(\frac{V_T}{V_T + V_{S,i}} \right) - \left(1 - \frac{V_{R,i}}{V_{S,i}} \right) \right] \\ - V_T \cdot \left[1 - \%_{N,i-1} - \left(1 - \frac{V_{R,i-1}}{V_{S,i-1}} \right) \right] \end{aligned} \quad (12)$$

For $i = 1$: %_{N,i} = %_{N,i-1} = 100 % ; $V_{R,i} = V_{S,i}$; $V_{R,i-1} = V_{S,i-1}$

3. Results and discussion

Validation of the biogas monitoring method

Seven cultures of HPB strains and sludges were carried out (in four replicates) in order to validate the biogas monitoring method described in section 2.3. Indeed, the biogas production and composition in the culture vessels were monitored using the new method and the H₂ content in biogas was also measured by gas chromatography after 96 h of incubation *i.e.* when no more glucose was consumed and the pH had decreased below 5.

Basically, the culture procedure described in section 2.2 was experimented on the pure *Clostridium* strain (*Clostridium butyricum* CWB11009) and two anaerobically digested sludges without a pretreatment or pretreated at 80°C for 10 or 30 minutes. After 48, 72 and 96 h of incubation the biogas produced in the serum bottles was sterilely collected and transferred to the replacement equipment filled with potassium hydroxide for carbon dioxide absorption as described in section 2.3. Also, taking into account the initial nitrogen gas volume inside the gas phase and its further dilutions by the produced biogas, it was possible for each gas sampling to assess the gas composition and therefore the volumetric biogas and H₂ production. The cumulative biogas and H₂ production are presented on Fig. 1.2 A and B respectively. Each dot on the Fig. 1. represents the average value over the 4 measurements. Standard deviations are not depicted on the graph for better reading; however the average standard deviation is about 25±2 ml and 15±1 ml respectively. The profiles are discussed in section 3.2.

Fig. 1.3 shows the H₂ production yields calculated after 96 h (A) as the molar ratio between the cumulative H₂ production (determined by the new biogas monitoring method) and the glucose consumed and (B) the cumulative biogas production (expressed in mole of gaseous mixture per mole of glucose consumed) multiplied by the H₂ content measured by gas chromatography. It is to notice that the results obtained by both measurement methods are similar. Indeed, the overall mean difference between the results of Fig. 1.3 A and B calculated over the four replicates of the 7 different samples is about 2.5 % and the standard deviation is about 5.7 %. Moreover, in similar conditions, regarding the medium and environmental parameters, Chen et al. (2005) achieved similar H₂ yields with *C. butyricum* compared with the results shown in Fig. 1.3 with the *C. butyricum* pure strain. Therefore, it can be assumed that the method developed in this paper has been validated and would be useful for other binary biogas potential assays e.g. CH₄/CO₂ biogas mixture produced by methanogenic bacteria. It has been tested successfully for anaerobic digestion of different substrates such as glucose, cellulose, straw and other (hemi-)

cellulosic materials (results not shown). Compared to other biogas monitoring methods the one described here has many advantages. It is less expensive than the system developed by Angelidaki et al. (1998) for monitoring gas evolution in multiple closed vessels. It is also simpler than the experimental and mathematical method developed by Hansen et al. (2004) for determination of methane potential of solid organic wastes. Furthermore, our method gives direct information on biogas production and does not require a gas chromatographer neither a GC-TCD (Gunaseelan, 2004; Lin et al., 2007) nor a GC-FID (Hansen et al., 2004), even if it is a relatively usual equipment in laboratories. This simple method is then suitable for small companies and low-income countries to assess the biogas potential from organic by-product or waste.

Comparative H₂ production by mixed cultures and a pure *Clostridium* strain

The results reported in Fig. 1.2 and 1.3 also allow comparing performances of the pure *Clostridium* strain and the different sludges. A low inoculum size was used in order to assess the adaptation and growth faculties of the strain and sludges. This explains the longer lag phase compared to those mentioned in other studies (Baghchehsaraee et al., 2008; Lin et al., 2007) with inoculum about ten times higher than the inoculum volume used in our experiments. Similar observation was deduced from Chen's 5 L-cultures inoculated with 1.2 % of preculture (Chen et al., 2005). In our experiments, the purity check on PCA medium of the *Clostridium* culture asserted that the culture was maintained pure. The biogas and H₂ curves have relatively similar trends showing that biogas composition is relatively constant along incubation time. The *Clostridium* pure strain has the highest H₂ production rate (HPR), *i.e.* 1.2 ml/h, during the initial 48 hours and the culture from UASB heat-treated for 10 min has the overall highest HPR, *i.e.* 2 ml/h recorded between 48 and 72 hours of culture. No significant difference was observed between the heat-treated cultures from stirred anaerobic digester (CSAD) nor between the untreated and heat-treated UASB microflora. By contrast, the untreated culture from the stirred digester led to relatively low H₂ production. As foreseen both autoclaved sludges and pure culture (121°C for 20 min) did not show any growth (results not shown).

By comparison to the results shown on Fig. 1.2, a lower difference is observed between the H₂ yields recorded for the heat-treated UASB sludges compared to the related H₂ cumulative curves. Therefore, higher HPR were related to a higher glucose intake rate. H₂ yields are then more relevant to compare different cultures. The yields achieved *i.e.* about 1 mol H₂ per mole glucose consumed are lower than those mentioned by other authors (Alalayah et al., 2008; Baghchehsaraee et al., 2010; Lin et al., 2007; Pattra et al., 2008). This trend is related to the environmental parameters in the culture medium that are largely affected by either the initial pH and buffer concentration or by the H₂ partial pressure (Das & Veziroglu, 2008). The latter is related to the initial gas composition inside the gas phase and to the total pressure that is affected by the initial gas to liquid phase ratio. The pH and pressure parameters are subject to relatively large variations during the culture *i.e.* in our experiments about 3 pH unit and 2 bars.

Therefore, our culture conditions are more restrictive compared to the culture conditions usually used in other small vessels experiments with higher volumetric gas to liquid ratio (Alalayah et al., 2008; Baghchehsaraee et al., 2010; Lin et al., 2007; Pattra et al., 2008). However the yields reported in this paper are comparable to those reported for H₂-producing bioreactors (Bartacek et al., 2007; Chen et al., 2005; Fang & Liu, 2002; Masset et al., 2010).

As already shown by Baghchehsaraee et al.(2008), the untreated anaerobic sludges achieved lower H₂ yields compared to the treated sludges. No significant difference was recorded for the sludge treated at 80°C for 10 or 30 minutes as for the treatment at 65° C or 80°C conducted by Baghchehsaraee. Moreover, the pure culture and heat-treated cultures from both digesters achieved similar yields.

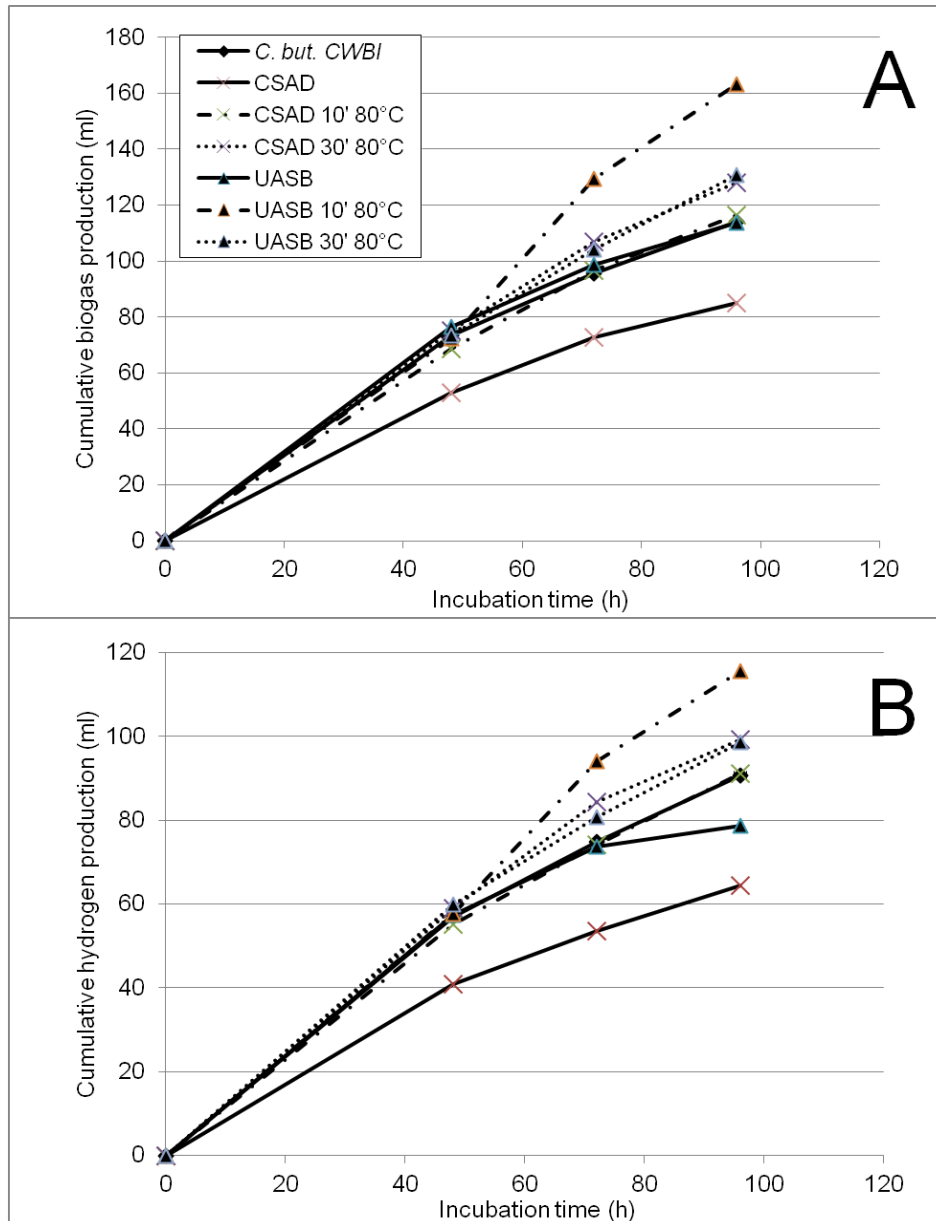


Fig. 1.2 Investigation of biogas (A) en H₂ (B) production from glucose by the pure *C. Butyricum* CWBI1009 and two sludges from stirred (CSAD) and UASB anaerobic digesters without a pretreatment or pretreated at 80°C for 10 or 30 min.

As shown in Tab. 1.1, the mass balance (MB) of glucose conversion into soluble metabolites is similar to each inoculum and limited to $77 \pm 5\%$. This indicates that about 25% of the glucose is converted into biomass, 25 % into butyrate, 15% into formate and lactate and 8% into acetate and into carbon dioxide. No propionate was detected at the end of the culture. These results are in accordance with those reported by other authors (Lin et al., 2007; Masset et al., 2010; Skonieczny & Yargeau, 2009; Wang et al., 2005). Ethanol was only produced by the untreated UASB sludge probably due to the presence of *Enterobacteriaceae* (Hamilton et al., 2010). In the glucose metabolic pathways ethanol, formate and lactate productions indicate a lack of potential hydrogen production that should be overcome for industrial prospects with optimized culture conditions. From this point of view, the culture conditions seem more adapted for the pure *Clostridium* strain. Indeed, the glucose conversion MB showed a lower concentration of these metabolites and higher H₂ production yields were obtained.

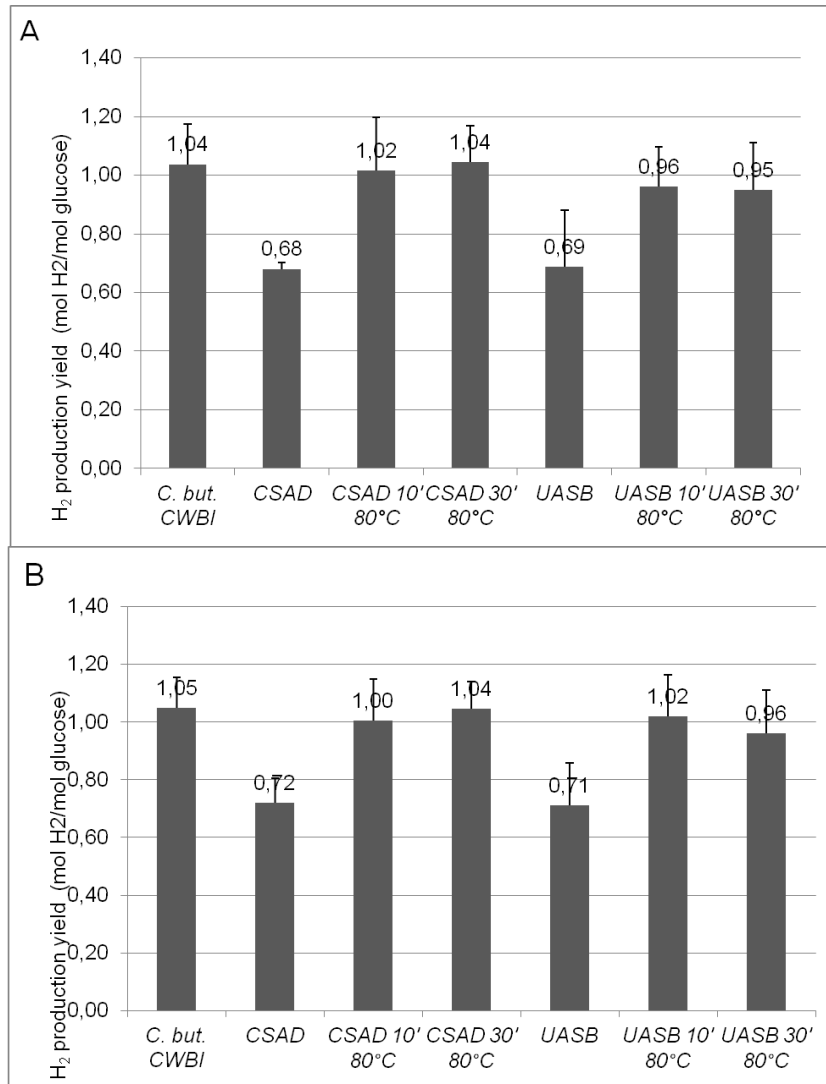


Fig. 1.3 Investigation of H₂ production yields from glucose by the pure *C. Butyricum* CWBI1009 and two sludges from stirred (CSAD) and UASB anaerobic digesters without a pretreatment or pretreated at 80°C for 10 to 30 min. Hydrogen yields are calculated as (A) the molar ratio between the cumulative H₂ production (determined by the new biogas monitoring method) and the glucose consumed and (B) the cumulative biogas production (expressed in mole of gaseous mixture per mole of glucose consumed) multiplied by the H₂ content measured by gas chromatography (errors bars meaning standard deviation on replicates).

Tab. 1.1 Metabolite analysis during H₂ fermentative production from glucose by pure *C. Butyricum* CWBI1009 and two sludges from stirred (CSAD) and UASB anaerobic digesters without a pretreatment or pretreated at 80°C for 10 to 30 min.

	Carbon converted from glucose (%)						Sum
	Lactate	Formate	Acetate	Ethanol	Butyrate	CO ₂	
<i>C. butyricum</i> CWBI	8.77	12.07	8.15	0.00	32.05	7.33	68.38
CSAD	16.50	10.85	11.33	0.00	36.85	4.08	79.61
CSAD 10' 80°C	13.57	15.01	8.82	0.00	33.79	6.66	77.85
CSAD 30' 80°C	12.66	14.09	7.76	0.00	35.34	5.60	75.44
UASB	19.12	13.67	9.97	2.01	24.85	8.89	78.51
UASB 10' 80°C	24.97	7.19	1.34	0.00	39.70	10.75	83.95
UASB 30' 80°C	15.18	13.36	6.85	0.00	34.61	8.33	78.32

Comparative H₂ production by pure facultative and strict anaerobic strains

In order to characterise hydrogen production of different pure strains, the BHP test method was carried out on two facultative anaerobic bacteria, *i.e.* *Citrobacter freundii* and *Escherichia coli*, and eleven other strict anaerobic HPB strains of the genus *Clostridium*. They were chosen amongst the mesophilic and thermophilic highest H₂ producers from a large range of carbohydrates including starch. Three different strains of *C. butyricum* have also been compared. The results are shown in Fig. 1.4 presenting the H₂ production yields and H₂ biogas content after 96 h of culture (in triplicate except for *C. puniceum* that was quite difficult to culture : only one from the three cultures grew). This strain seems less adapted to the experimented culture conditions. The *Clostridium* strains yielded the highest amount of H₂ and total biogas, *i.e.* approximately 20% and 30% more than the amount produced by the untreated sludge (Fig. 1.2) and the other pure strains.

Although all strains were chosen for their high H₂ production, wide hydrogen yield variations were recorded depending on the species, even for strains of the same species. Indeed, H₂ yields of the three *C. butyricum* species varied in a 20% range including the results achieved with *C. butyricum* CWBI1009 in the former experiments (Fig. 1.3). However, the biogas composition was quite similar (69 ± 8 % of H₂) compared to the average H₂ content of 60 ± 10 % calculated over the whole group of *Clostridium* strains tested. Lin et al. (2007) observed similar variations between different *Clostridium* strains *e.g.* a ratio of 1,27 between the H₂ yields of *C. Butyricum* and *C. Acetobutylicum* compared to a mean ratio of about 2,1 estimated in our results. Our resulting yields for *Clostridia* are however lower, probably due to more restrictive environmental parameters as already mentioned in section 3.2. The low H₂ production and H₂ content in the biogas recorded for *C. aminovalericum* should be related to the pH that did not decrease below 6 for this strain (pH 4,8 ± 0,4 for the other *Clostridium* strains at the end of

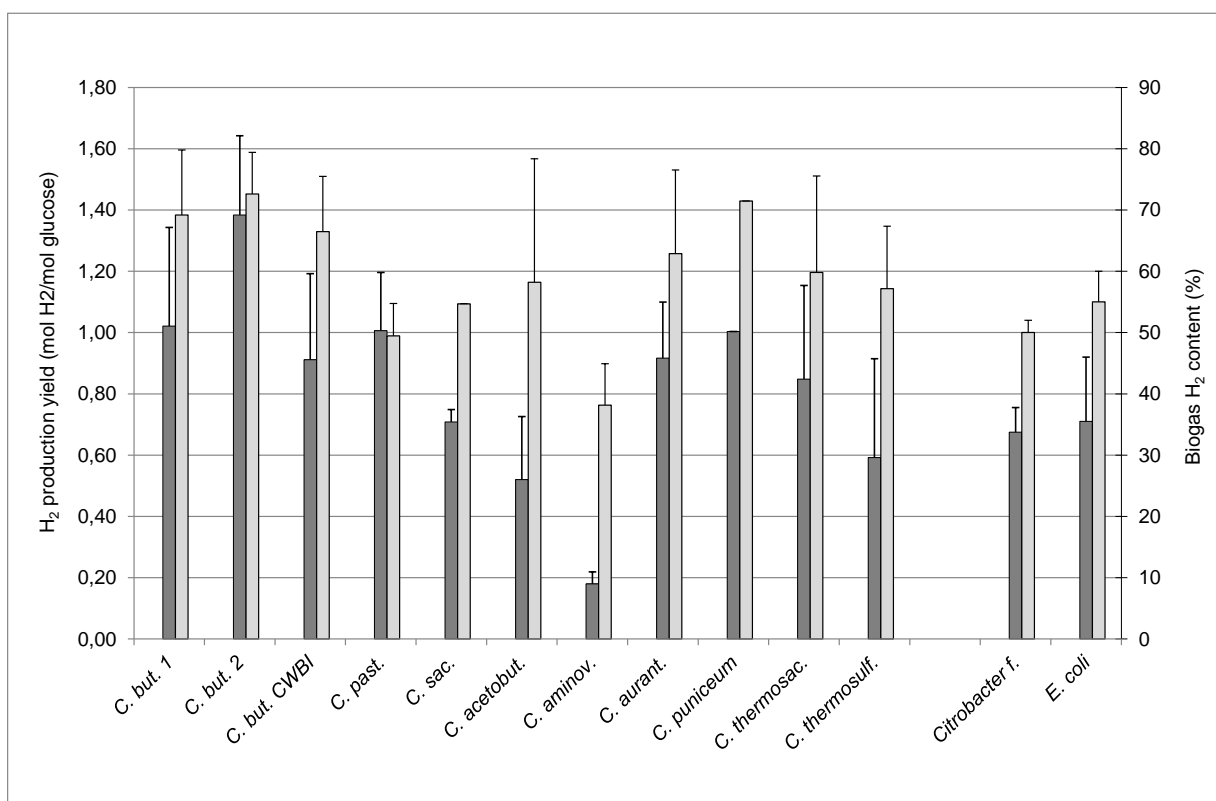


Fig. 1.4 Investigation on H₂ production yields (A) from glucose by different facultative and strict anaerobic pure strains and H₂ content in biogas (B) (errors bars meaning standard deviation on replicates).

Tab. 1.2 Metabolite analysis during H₂ fermentative production from glucose by different facultative and strict anaerobic pure strains.

	Carbon converted from glucose (%)							Sum
	Lactate	Formate	Acetate	Ethanol	Butyrate	CO ₂	Succinate	
<i>C. butyricum</i> 1	18.97	7.21	10.45	1.08	29.15	7.25	0.00	74.12
<i>C. butyricum</i> 2	11.52	9.05	12.73	13.68	33.94	8.48	0.00	89.39
<i>C. butyricum</i> CWBI	12.32	5.72	8.90	13.29	17.81	7.38	0.00	65.41
<i>C. pasteurianum</i>	23.43	2.46	10.09	4.39	22.31	16.89	0.00	79.57
<i>C. saccharolyticum</i>	23.66	6.22	12.78	32.11	7.49	6.50	0.00	88.75
<i>C. acetobutylicum</i>	39.45	0.69	4.96	7.78	13.61	7.09	0.00	73.58
<i>C. aminovalericum</i>	17.71	2.38	8.44	28.79	6.91	5.04	0.00	69.26
<i>C. aurantibutyricum</i>	18.72	0.45	5.96	0.73	11.02	10.01	0.00	68.50
<i>C. puniceum</i>	25.46	4.18	7.70	5.44	20.38	2.22	0.00	69.80
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	27.35	1.14	10.43	30.33	9.94	9.37	0.00	88.57
<i>C. thermosulfurigenes</i>	26.12	1.18	9.59	16.11	7.09	7.11	0.00	67.21
<i>Citrobacter freundii</i>	29.20	0.00	24.40	22.40	0.00	2.30	10.50	89.00
<i>Escherichia coli</i>	30.00	0.00	18.50	23.00	0.00	10.00	0.00	81.50

culture) although most of the glucose was consumed. Moreover, as shown in Tab. 1.2, the glucose amount converted by this strain to ethanol was relatively high : high ethanol yield (28,79 %) related to a low glucose conversion yield to metabolites (69,26 %).

The thermophilic *Clostridium* strains (cultured at 55°C) achieved interesting yields but lower than the highest mesophilic H₂ producers. The yields (H₂ and soluble metabolites shown on Tab. 1.2) recorded for *C. thermosaccharolyticum* are similar to those (0.96 mole H₂ produced per mole glucose) achieved at 60°C by O-Thong et al. (2008) with another strain of the same species. It is to mention that relatively few investigations have been carried out on glucose with *Clostridium* thermophilic pure strains and most of the studies with sludges achieved higher H₂ yields with thermophilic than mesophilic culture conditions (Bartacek et al., 2007; Shin et al., 2004; Zhang et al., 2003).

Compared to the hydrogen yields, the soluble metabolites yields (Tab. 1.2) also vary significantly between the *Enterobacteriaceae* family and the *Clostridium* genus, even between the different strains of the *Clostridium* genus. The average sum of the converted glucose into metabolites is similar to that mentioned for the experiments reported in section 3.2 (77 %); the standard deviation (20 %) is however larger. That implies that about 25% of the glucose is used for biosynthesis but it varies between 11 and 35 %, even for the three different strains of the *C. butyricum*. The butyrate yields and the acetate + butyrate yields are the highest for the *C. butyricum* and *C. pasteurianum* strains which are also the highest H₂ producers. This trend is consistent to the results of other authors (Lin et al., 2007; Wang et al., 2008).

By comparison to the results of Tab. 1.2 for the strains *C. butyricum* and *C. acetobutylicum*, the percentages calculated from the results of Lin et al. (2007) were similar for acetate and about 25 % and 3-fold higher for butyrate respectively. By contrast, Lin et al. reported a quite low lactate production and a 3-fold higher CO₂ production. These differences should be related to the different composition of the medium used by Lin et al, and in our experiments. However, it should be noticed that *C. pasteurianum* converted about twice more glucose to CO₂ (17 ± 1 %) than the other strains (7,5 ± 3,5 %). Therefore, this H₂ producer seems less interesting for an industrial process, particularly a two-stage anaerobic digestion process producing hydrogen and methane since a high CO₂ production in the first hydrogen-producing stage would be considered as a partial lack of methane potential in the second stage.

The highest yields in lactate were reported with *C. acetobutylicum*. Both *C. Saccharolyticum* and *thermosaccharolyticum* converted about 30 % of the carbon from the glucose to ethanol. *Enterobacteriaceae* and *C. aminovalericum* strains also produced large concentration of ethanol. These strains except the latest also produced high amounts of lactate.

4. Conclusions

The method developed in this paper for the evaluation of the biogas production and its composition has many advantages. It is relatively cheap and easy to operate and gives direct information without the need of a gas chromatographer. Moreover it is suitable for other binary biogas potential assays e.g. CH₄/CO₂ biogas production from different substrates.

The results of the comparative tests show that the hydrogen yields vary significantly between the 19 different pure strains and sludges, even between different strains of the same species *i.e.* about 20% variation. Therefore, this paper asserts that strain selection is an important way in order to optimize anaerobic digestion processes with H₂ production.

References

- Alalayah, W.M., Kalil, M.S., Kadhun, A.A.H., Jahim, J.M., Alauj, N.M. 2008. Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(24), 7392-7396.
- Angelidaki, I., Schmidt, J.E., Ellegaard, L., Ahring, B.K. 1998. An automatic system for simultaneous monitoring of gas evolution in multiple closed vessels. *Journal of Microbiological Methods*, 33(1), 93-100.
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Lyberatos, G. 2010. Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(5), 1921-1928.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A. 2010. Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10), 5021-5027.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., Reid, G. 2008. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15), 4064-4073.
- Bartacek, J., Zabranska, J., Lens, P.N.L. 2007. Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 1(3), 201-214.
- Cervantes, F.J., Pavlostathis, S.G., Van Haandel, A.C. 2006. Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters. in: *Integrated environmental technology series*, IWA publishing. London, pp. 345.
- Chen, W.M., Tseng, Z.J., Lee, K.S., Chang, J.S. 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(10), 1063-1070.
- Das, D., Veziroglu, T.N. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046-6057.
- De Lemos Chernicharo, C.A. 2007. Anaerobic reactors. in: *Biological wastewater treatment series*, IWA publishing. London, pp. 174.
- Ding, H.B., Wang, J.Y. 2008. Responses of the methanogenic reactor to different effluent fractions of fermentative hydrogen production in a phase-separated anaerobic digestion system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(23), 6993-7005.
- Fang, H.H.P., Liu, H. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82(1), 87-93.
- Gunaseelan, V.N. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 389-399.
- Hamilton, C., Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., Thonart, P. 2010. Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(3), 1089-1098.
- Hansen, T.L., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., Marca, E., Jansen, J.I.C., Mosbæk, H., Christensen, T.H. 2004. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*, 24(4), 393-400.
- Hiligsmann, S., Jacques, P., Thonart, P. 1998. Isolation of highly performant sulfate reducers from sulfate-rich environments. *Biodegradation*, 9(3-4), 285-292.
- Lens, P., Hamelers, B., Hoitink, H., Bidlingmaier, W. 2004. Resource recovery and reuse in organic solid waste management. in: *Integrated environment technology series*, IWA publishing. London, pp. 516.
- Levin, D.B., Zhu, H.G., Beland, M., Cicek, N., Holbein, B.E. 2007. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Bioresource Technology*, 98(3), 654-660.

- Lin, P.Y., Whang, L.M., Wu, Y.R., Ren, W.J., Hsiao, C.J., Li, S.L., Chang, J.S. 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 1728-1735.
- Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., Thonart, P. 2010. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(8), 3371-3378.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., Angelidaki, I. 2008. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1204-1214.
- Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy Jr, J.B., Young, L.Y., McCarty, P.L. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13(6), 485-492.
- Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Reungsang, A. 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolyzate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 5256-5265.
- Raposo, F., Borja, R., Rincon, B., Jimenez, A.M. 2008. Assessment of process control parameters in the biochemical methane potential of sunflower oil cake. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1235-1244.
- Rodriguez, C., Hiligsmann, S., Ongena, M., Charlier, R., Thonart, P. 2005. Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation*, 16(5), 415-422.
- Sammes, N., Du, Y., Bove, R. 2005 Fuel cell principles and prospective, In Lens, P., Westermann, P., Haberbauer, M., and Moreno, A. (Eds.) *Biofuels for fuel cells. In Integrated environment technology series*, IWA publishing, London, pp 235-247.
- Shin, H.S., Youn, J.H., Kim, S.H. 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(13), 1355-1363.
- Skonieczny, M.T., Yargeau, V. 2009. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3288-3294.
- Tanisho, S., Kuromoto, M., Kadokura, N. 1998 Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 23, 559-563.
- Verstraete, W., Van de Caveye, P., Diamantis, V. 2009. Maximum use of resources present in domestic "used water". *Bioresource Technology*, 100(23), 5537-5545.
- Wang, G., Mu, Y., Yu, H.Q. 2005. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 23(2), 175-184.
- Wang, X. Y., Jin, B., Mulcahy, D. 2008 Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 4998-5005.
- Wang, J., Wan, W. 2009a. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1), 235-244.
- Wang, J.L., Wan, W. 2009b. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799-811.
- Wang, J.L., Wan, W. 2009c. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3313-3323.
- Wang, Y.H., Li, S.L., Chen, I.C., Cheng, S.S. 2009. Starch hydrolysis characteristics of hydrogen producing sludge in thermophilic hydrogen fermentor fed with kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7435-7440.
- Zhang, T., Liu, H., Fang, H.H.P. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*, 69(2), 149-156.

Chapitre 2.2. Etude et optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie facultative *Citrobacter freundii* CWBI952

Le chapitre précédent a permis de comparer dans des conditions expérimentales identiques les principales souches productrices d'H₂. On y voit dans l'ensemble un écart de performances relativement réduit entre les deux grandes familles de bactéries chimiotrophes productrices d'H₂ que sont les entérobactéries et les clostridies. L'écart se creuse cependant lorsque l'on compare entre elles les souches les plus performantes de chacune des familles. La variabilité est par contre très importante entre les différentes souches du genre *Clostridium* et, bien que plus réduite, une certaine variabilité (de l'ordre de 20%) existe aussi entre les souches d'une même espèce. Il faut cependant signaler que les conditions de pression dans les microcosmes étaient très défavorables puisqu'elle pouvait varier de plus de 2 bar entre deux prélèvements vu que le gaz produit n'était libéré qu'à l'occasion des prélèvements. De même le pH n'était pas régulé de sorte qu'il pouvait varier d'environ 4 unités de pH, ce qui est élevé et peu favorable. Ce chapitre et le suivant visent à confirmer ces résultats mais en bioréacteur de plus grande taille (2,3 L), dans des conditions physico-chimiques plus stables et favorables (pression et pH). Les deux souches isolées au CWBI aux performances intéressantes seront impliquées dans ces travaux. Le chapitre 2.2. concerne la souche anaérobie facultative de *Citrobacter freundii* CWBI952. L'intérêt de considérer une souche anaérobie facultative est qu'elle est très robuste, non inhibée par la présence d'oxygène et capable d'installer les conditions d'anaérobiose propices à la production d'H₂. En outre, par ce fait, elle est une candidate de choix pour éventuellement l'associer à une bactérie anaérobie stricte pour installer l'anaérobiose et consommer les traces éventuelles d'oxygène qui entreraient fortuitement dans le biodigester. Plusieurs paramètres opérationnels ont été étudiés avec cette souche notamment l'effet du pH sur le métabolisme du glucose, la production d'hydrogène et le profil métabolique. L'objectif était de définir le pH optimum pour la production d'H₂. L'effet de la concentration en fer sur la production d'hydrogène en fonction de la source d'azote peptidique/ammoniacal et l'effet du taux de dilution en bioréacteur semi-continu ont également été investigués.

Le contenu a été publié dans l'article "*Hamilton, C., Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., & Thonart, P. (2010). Optimisation of culture conditions for biological hydrogen production by Citrobacter freundii CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode. International Journal of Hydrogen Energy, 35, 1089-1098.*"

Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode

1. Introduction

In recent years policy makers have started looking for alternatives to fossil fuels, not only to counter the threat of global warming, but also to reduce the risk of overdependence on imported oil and gas supplies. The major alternative, nuclear energy, has an inherent problem of waste management. Hydropower is a mature technology, but is subject to site restrictions. Solar and wind power are well developed energy technologies, but are highly susceptible to climatic conditions. By contrast with fossil fuels hydrogen, whether burned directly or used in fuel cells, is intrinsically a clean energy vector with near zero carbon emissions. However the main current method of producing hydrogen, steam reforming of methane, involves the release of large quantities of greenhouse gases. So although hydrogen already accounts for around 2 % of world consumption of energy, its more widespread adoption as a fuel is still limited by several challenges [1-3]. Consequently there has been increasing interest in recent years in the biological production of hydrogen using microorganisms: mainly algae and bacteria in which the generation of molecular hydrogen is an essential part of the energy metabolism, since it provides a way of eliminating excess electrons [4]. The two main exemplars of such biochemical pathways are photosynthetic microorganisms such as *Chlamydomonas reinhardtii* (oxygenic) or *Rhodobacter sphaeroides* (anoxygenic) and fermentative bacteria such as *Enterobacteriaceae* (facultative anaerobe species) or *Clostridium* (obligate anaerobe species) [5-8]. The approach with the greatest commercial potential is fermentative hydrogen generation (dark fermentation) coupled with proton exchange membrane fuel cells (PEMFC). This type of system is very promising since it allows the production of hydrogen from a wide variety of renewable resources such as carbohydrate waste from the agricultural and agro-food industries or processed urban waste and sewage [9, 10]. Hydrogen generation from such renewable biomass would reduce our dependence on fossil fuels and decrease carbon dioxide emissions [11, 12]. Furthermore dark fermentation process units are feasible at mesophilic temperatures and at pressures requiring very little energy input.

The highest hydrogen production rates (HPR) have been obtained with *Enterobacteriaceae*, which use formate - an intermediate in the glucose metabolism - to promote the formation of molecular hydrogen via the catalytic action of formate hydrogen lyase (FHL) [13]. The FHL complex consists of a formate dehydrogenase (FDH-H), a [Fe-Fe]-hydrogenase (HYD-3) and electron transfer mediators such as 2[Fe₄S₄]-ferredoxin and NADH. The degradation of 1 mole of formate by FDH-H produces 2 H⁺ moles which are subsequently reduced by the action of HYD-3, providing 1 mol H₂ (HCOOH → H₂ + CO₂). Reoxidation of the NADH by NADH-ferredoxin oxidoreductase followed by the interaction of high potential ferredoxin with HYD-3 produces another mol of H₂ (NADH + H⁺ → NAD⁺ + H₂), resulting in a final theoretical conversion yield of 2 mol_{H₂}/mol_{glucose} [14, 15]. In practice the experimental yield ranges from 0.37 to 1.9 mol_{H₂}/mol_{glucose} depending on key factors such as pH and temperature [16-19], nitrogen source [20, 21], iron concentration [22, 23] and, in semi-continuous and continuous cultures, the dilution rate of the medium in the bioreactor [24, 25]. Higher yields can be obtained with pure *Clostridium* strains since their theoretical conversion yield is 4 mol_{H₂}/mol_{glucose}. However their HPRs are lower than those of *Enterobacteriaceae* and the required culture conditions are more difficult to maintain. Furthermore, *Enterobacteriaceae* can provide anaerobic conditions without the need for expensive reducing agents [26, 27].

The aim of the study described in this paper was to characterize the fermentative hydrogen production of pure *Citrobacter freundii* CWBI952 cultures and determine the optimum conditions for sustainable cost effective production. Initially the effect of pH on hydrogen yields, biomass and metabolite concentrations was investigated in order to find the optimum pH for H₂ production. Subsequent investigations examined outcomes when the casein peptone nitrogen source was replaced with a cheaper ammonia-based source. Finally the effect of the dilution

rate was studied in a semi-continuous bioreactor using the ammonia-based nitrogen source and running the reactor vessel with all the previously optimized parameters.

2. Materials and methods

Isolation of the strain and identification test

The strain was isolated from a sample of cow manure cultured in a medium for isolating sulfate reducing bacteria (Postgate's medium E [28, 29]) and it rapidly disrupted the agar. One mL of inoculum was successively diluted in 9 mL of sterile peptone water (consisting of: 2 g/L Tween 80, 5 g/L NaCl and 1 g/L casein peptone). One mL of each dilution was then added to 25 mL sterile tubes and mixed with 24 mL of Postgate's medium E maintained in fluid state at 43°C. After incubation at 30 °C the tube was broken at a convenient point; a white colony was withdrawn with a platinum loop and transferred successively on to agar plates prepared with PCA medium (containing 1 g/L glucose monohydrate, 5 g/L casein peptone, 2.5 g/L yeast extract and 15 g/L agar). Isolated colonies developed after 1 day of incubation and one of them was then transferred to 250 mL serum bottles for BHP tests (as described in Material and Methods, see section 2.3.). Based on the fact that the volume and hydrogen content of the biogas produced by the different samples were similar (i.e. 80 ± 2 mL and 51 ± 4 %), the cultures were considered to contain pure strains. Identification was carried out by 16S rRNA gene amplification and sequencing. Bacterial cell lysates were used to amplify the 16S rRNA gene with universal bacterial primers 16S27F and 16S1492R in a 50 μ L reaction volume under the following conditions: initial denaturation at 94 °C during 5 min, followed by 36 cycles with denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 60 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 2 min. The PCR products of the correct size obtained in this way were purified with the GeneJET™ PCR Purification Kit (Fermentas). Sequences were determined by GIGA (Genomic Facility, Liège, Belgium) using the 27F and 1492R primers.

Composition of the fermentation media

The growth of the strain was carried out in different modified synthetic media adapted from Ueno [30] and widely used for anaerobic bacterial growth and biological production of hydrogen by *Enterobacteriaceae* and *Clostridium*. The composition of the media was changed depending on the parameters being studied. The standard synthetic medium A was rich in organic nitrogen. This medium was used to determine the optimum pH and the fermentation profile for the strain and as a control test condition in the serum bottle experiments. It contained: 5 g/L glucose monohydrate, 5 g/L casein peptone, 0.5 g/L yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4 and 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Medium B was used in serum bottles to study the effect of using an ammonia-based nitrogen source on hydrogen production (with an equivalent N content and replacing MgSO_4 with MgCl_2 to avoid higher SO_4 concentration compared to the former medium). It consisted of: 5 g/L glucose monohydrate, 6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4 and 0.4 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Medium C, which was used to investigate the effect of iron when using an ammonia-based nitrogen source, had the same composition as medium B except for the addition of 0.125 g/L FeSO_4 .

The first batch sequence of the sequenced-batch cultures in the 2.3 L bioreactor was started with medium C. After complete depletion of the glucose, 20 % of the culture medium was racked and an identical volume of medium C (supplemented with 25 g/L glucose monohydrate) was added in order to perform a second culture sequence with the same initial substance concentrations. This procedure had already been used successfully for 8 successive sequences with medium A yielding similar performances in every sequence (results not shown). A third culture sequence was carried out in a similar way by racking 68 % of the culture medium and adding an identical volume of medium B, supplemented with glucose monohydrate (7.35 g/L).

The semi-continuous experiment (see section 3.5) was preceded by a batch phase during which the substances were at similar concentrations to our estimates for the beginning of the third sequence of the sequenced-batch experiment, taking into account NH_4^+ and iron incorporation by the biomass and the dilution of the substances during the previous sequences. This medium

(medium D) contained : 5 g/L glucose monohydrate, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4 , 0.4 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.03 g/L FeSO_4 . The medium added semi-continuously to the bioreactor (medium E) contained : 20 g/L glucose monohydrate, 2.4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L yeast extract, 1.6 g/L KH_2PO_4 , 0.32 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.03 g/L FeSO_4 . Compared to medium D, the glucose monohydrate was tested at 20 g/L to approach the carbon load of agro-industry wastewaters and the other compounds at a 80 % proportion (except for iron sulfate maintained at 0.03 g/L).

Hydrochloric acid and sodium hydroxide were used to adjust the pH to 8.5 in all media before autoclaving. After sterilization the pH was ca. 7.1. All the chemicals used were of analytical or extra pure quality and were supplied by Merck, UCB and Sigma. Casein peptone and yeast extract were supplied by Organotechnie (La Courneuve, France).

Experimental procedures and culture conditions

Pure colonies of *C. freundii* CWBI952 were maintained at 4 °C on PCA solid medium. For fresh inoculum conservation 1 mL of culture was transferred weekly to 25 mL of sterile peptoned medium A and stored at 30°C. To allow a quick characterization of the isolates and of the influence of iron on hydrogen production of the strain when using an ammonia-based substitute, BHP (Biochemical Hydrogen Potential) tests were carried out respectively in 250 or 100 mL sterile glass serum bottles filled with 200 or 50 mL of medium A, B or C. The sterile carbon source (glucose monohydrate in solution in deionized water) was added separately to obtain a final concentration of 5 g/L. After the medium had been prepared with the pH adjusted to 8.5 and sterilized the glucose solution was added and the medium was then inoculated with a single colony collected with a platinum loop from a previously spread PCA medium plate. The bottles were capped with a butyl stopper as described by Lin et al. [31] however the use of a reducing agent and flushing with nitrogen gas was not necessary since the bacteria consume any oxygen present before entering in anaerobiosis. The bottles were then incubated at 30 °C and monitored after 22 hours of culture.

The batch, sequenced-batch and semi-continuous cultures were run in the same 2.3 L laboratory scale bioreactor (Biolafitte) consisting of a glass vessel with a double envelope and a stainless steel lid equipped with septa, a shaft with 2 Rushton turbines (4 blades, height 10 mm, diameter 45 mm), 0.2 μm gas filters, and tubing for sampling, gas inlet, gas outlet and medium removal or addition. The glass vessel was fitted with a lateral glass overflow tube to remove any liquid in excess of ~ 2 L (working volume) due to overfilling during the semi-continuous operations. Needles were inserted through a septum to control the pH (Mettler Toledo 465 35 90 K9/250 combined probe) by automatic addition of sterile 2.5 N potassium hydroxide. The temperature was maintained at 30 °C and stirring was constant at 110 RPM. The bioreactor containing 1.8 L of deionized water and the ingredients for the different media except glucose was autoclaved at 120 °C for 20 minutes and then cooled under nitrogen gas. The pre-cultures were obtained by transferring 25 mL of inoculum into a 1 L bottle containing 250 mL of sterile medium A, C or D before incubation for 24 hours at 30°C and inoculation of the bioreactor with 10 % of its liquid capacity (200 mL).

The batch cultures were monitored until conversion of the carbon substrate was complete (*i.e.* one day) to determine the optimum pH and the fermentation profile for the strain. The first batch phase and the following 2 sequences of the sequenced-batch experiment were also monitored for one day in order to monitor the effect over time of iron when using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as a nitrogen source. The two dilutions of the medium, using a peristaltic pump after racking off an identical volume, were carried out to prevent any by-product inhibition from interfering with the parameters under study.

In the semi-continuous culture the bioreactor was first run in batch mode for one day before dilution of the medium. The effect of the dilution rate and the influence of ammonia assimilation on microbial growth for cost-effective H_2 production were then investigated during 9 days in semi-continuous mode. A time slot sequencer was connected to a peristaltic pump (Verder Autoclave EV) for additions of sterile substrate and to an electric valve for removal of excess

medium from overflowing. When investigating the effect of the first dilution rate (0.009 h⁻¹) additions and removals were made every 120 min based on the glucose consumption rate (0.45 g/L.h) during the batch phase. Removal took 30 seconds and each addition was set to take 15 min.

Monitoring and analytical methods

Cell concentration was determined by consecutive dilutions in peptoned water. A 100 µL sample of the three final dilutions were spread on PCA Petri dishes before incubation at 30°C for 18 to 24 h. This method was also used to confirm the absence of microorganisms other than *Citrobacter freundii* CWBI952.

Culture samples were collected regularly to make measurements and harvest culture components. These samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The HPLC analyses for glucose, ethanol, lactate, acetate, formate and succinate were performed using an Agilent 1110 series HPLC equipped with a Supelcogel C 610H column preceded by a Supelguard H precolumn (oven temperature 40 °C) and a differential refraction index detector (RID, detection cell maintained at 35 °C). An isocratic mobile phase consisting of 0.1 % H₃PO₄ (in MilliQ water) was used at a flow rate of 0.5 mL/min. The method lasted for 35 min at a maximum pressure of 60 bars. The data on the concentrations of glucose and metabolites present in the culture medium were used to calculate the mass balance (MB) of glucose conversion into the major soluble metabolites using the equation: $MB = \sum N_i \cdot \Delta C_i / N_G \cdot \Delta C_G$; where N_i is the number of carbon atoms in a molecule of metabolite i ; ΔC_i is the concentration of metabolite produced during the culture sequence i ; N_G is the number of carbon atoms in the glucose molecule (6) and ΔC_G is the concentration of glucose consumed during the culture sequence.

The proportion of hydrogen gas was determined using a gas chromatograph (GC) (Hewlett Packard 5890 Series II, UK) fitted with a thermal conductivity detector (TCD) and a 30 m x 0.32 mm GAS PRO GSC capillary column (Altech) in series with a 20 m x 0.25 mm CarboPLOT P7 column (Chrompak). The temperatures of the injection, TCD chambers and the oven were maintained at 90°, 110° and 55 °C respectively. Nitrogen was used as the carrier gas in the column at a flow rate of 20 mL/min. Water supplemented with KOH 9 N was used in replacement equipment to monitor the biogas production of the batch and sequenced-batch cultures. In the semi-continuous culture and in the preceding batch culture, the GC was fitted with a 1.2 m x 5 mm stainless steel column packed with Porapak Q Supelco (80/100 mesh). The biogas was constantly extracted by degassing with nitrogen (28.6 mL/min) gas and automatically analyzed on GC for H₂ composition every 30 min via a 250 µL injection loop (Valco, Canada). HACH (USA) kits 26069 45 and method 1003 were used for the determination of the ammonia concentration in the harvested culture samples. The readings were carried out with a HACH DR/2010 spectrophotometer.

3. Results

Isolation and identification of the hydrogen producing strain

The isolated bacteria were observed to be gram negative, mobile and approximately 1 x 3-4 µm in size. Colonies were generally 2-4 mm in diameter, smooth, slightly convex, opaque with a shiny surface and an entire edge as described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [32]. The bacteria grew aerobically in presence of organic carbon and produced hydrogen through formate bioconversion under anaerobic conditions. To further characterize the strain, the sequenced 16S rRNA gene (accession number in Genbank EU373418.1) was aligned to the 20 most similar sequences obtained using the SeqMatch option of the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Compared to the type strain *Citrobacter freundii* DSM 30039, our strain has ambiguities at 7 positions out of an alignment of 1440 positions. In one region at positions 455, 460, 472 and 477 (*E. coli* positions), our strain has C/T, A/T, T/G and G/A whereas the type strain has C, T, G and G. These positions in helix 18 are base paired. In a second region at positions 1134, 1137, and 1140, our strain has A/G, A/C and C/T whereas the

type strain has G, C, and C. These ambiguities are in helix 43 and the first one is base paired with the last one. The last ambiguity is also present in the sequences of the CDC62164 and YRL11 strains. These ambiguities probably represent microheterogeneities between operon copies. If we exclude these ambiguous positions from the alignment, the sequence of our strain is identical to that of the type's 16S rRNA; we therefore designated it as *Citrobacter freundii* CWBI952.

Effect of pH on glucose metabolism and H₂ production

Since pH variations within a narrow range is known to lead to large fluctuations in metabolic activity [33, 34], optimization of pH conditions was determined as a first essential step in promoting hydrogenesis by the fermentative bacteria. The effect of pH on fermentative H₂ production by the pure *C. freundii* CWBI952 strain was investigated in a 2.3 L batch bioreactor equipped with pH regulation. The tests were conducted at eight different pH levels ranging from 3.6 to 8.2 (± 0.1) which were maintained and monitored for one day while keeping other operating conditions constant (stirring at 110 RPM, temperature at 30 °C, atmospheric pressure and initial medium A). Our results are in line with the work of Yokoi et al. with *E. aerogenes* [35] and Oh et al. with *Citrobacter* sp. Y19 [36] which indicated that the optimum pH for H₂ production is situated within a weakly acidic range (*i.e.* pH 5 to 6). We found that H₂ production by *C. freundii* CWBI 952 underperformed at pH 3.6 and at 8.2, reaching an optimum at pH 5.9 and yielding 0.63 mol_{H₂}/mol_{glucose} (Fig. 2.1.A). This optimum pH is very different from that observed for cell growth, namely 7.2. These results are also consistent with the data of Tanisho et al. with *E. aerogenes* since they observed a Δ_{pH} of 1.2 between these two optima (*ca.* 5.8 and 7.0) with yields ranging from 0.52 to 1.58 mol_{H₂}/mol_{hexose} at pH 5.8 depending on their culture conditions [37, 38].

The results presented in Fig. 2.1.B highlight the impact of pH on the glucose intake rate and its conversion to formate (according to the MB calculation; see section 2.4). At low and at high pH values, namely pH 4.5 and 8.2, the glucose intake rate was very low and the growth of the strain was limited. As expected the higher glucose intake rate, *ca.* 0.7 g_{glucose}/h, was obtained at the optimum pH for growth. At pH 5.9 the glucose intake rate and biomass decreased by about 30 % and 11 % of the glucose was converted to formate. Formate accumulation in the glucose metabolic pathways of *Enterobacteriaceae* indicates a gain of potential hydrogen production. Therefore the potential for additional H₂ can be stoichiometrically estimated from the quantity of formate that is not converted in the bioreactor [39]. For example at pH 5.9 and 7.2 the glucose mass balance for the accumulated formate reached 11 and 4.1 % which could potentially lead, after dismutation into CO₂ and H₂, to an increase in yield of 0.27 mol_{H₂}/mol_{glucose} and 0.10 mol_{H₂}/mol_{glucose} respectively.

Fermentation profile at the optimum pH for H₂ production

Fig. 2.2.A characterizes the cell growth and H₂ production capacity of *C. freundii* CWBI952 in a batch culture with the peptoned medium A monitored for one day at pH 5.9. The growth curve depicts a short lag phase of 2 hours followed by exponential growth at a rate of 0.53 h⁻¹, reaching 1.45 10⁺⁰⁹ CFU/mL after 8 hours. H₂ production was observed very soon after inoculation and was continuous, totaling 825 mL H₂ over 24 hours. The maximum hydrogen production rate (HPR), *ca.* 26.4 mL_{H₂}/L.h, and yield, *ca.* 0.63 mol_{H₂}/mol_{glucose}, were recorded during the exponential growth phase.

Glucose utilization and the fermentation profile are illustrated in Fig. 2.2.B. The monitored soluble compounds include glucose, volatile fatty acids (VFAs) and ethanol. The chromatographic analysis showed that the primary metabolites on completion of fermentation were ethanol (24.4 mM), lactate (15.7 mM) and acetate (15.0 mM) followed by formate (4.8 mM) and succinate (4.2 mM). Since only formate bioconversion leads to hydrogen gas generation, any production of other metabolites involves a diversion away from potential hydrogen production [14]. Although Oh et al. [36] reported similar patterns with *Citrobacter* sp. Y19 in 165 mL serum bottles with no pH control; they did not detect lactate as a primary metabolite of pyruvate degradation. In a more recent study [13], they found that ethanol, lactate and

succinate were the main by-products of glucose. This is generally consistent with the results in Fig. 2.2.B, but our data did not indicate transformation of succinate into propionate in any of our cultures. During the stationary phase H₂ production continued due to further bioconversion of the residual formate. About 445 mL H₂ was produced during this phase, but at 50 % of the maximum HPR. Given that metabolization of the formate started after 8 hours, resulting in the bioconversion of 8.7 mM after 15.5 hours of growth, the formate bioconversion rate was calculated to be 2.7 times slower than its accumulation rate. And since that at pH 4.5 and 8.2 formate accounted for only 0.9 % and 0.2 % of glucose transformation (Fig. 2.1.B) the rate limiting factor probably resides in the pathway converting formate (via the FHL complex) into H₂ and CO₂ [14, 40].

The mass balance of glucose conversion into the major metabolites is summarized in Tab. 2.1 (column 4) and reaches a total of 92.7 %. The CO₂ content in the biogas measured by GC was 49 % therefore the CO₂ contribution in the total mass balance can be estimated to be 9.6 % of 92.7 % with biomass accounting for the remaining 7.3 % of the glucose consumed. The same experiment was carried out in a 15 L batch bioreactor: the carbon recovery and the glucose intake rate observed, 91.3 % and 0.5 g_{glucose}/h respectively, were not significantly different (results not shown).

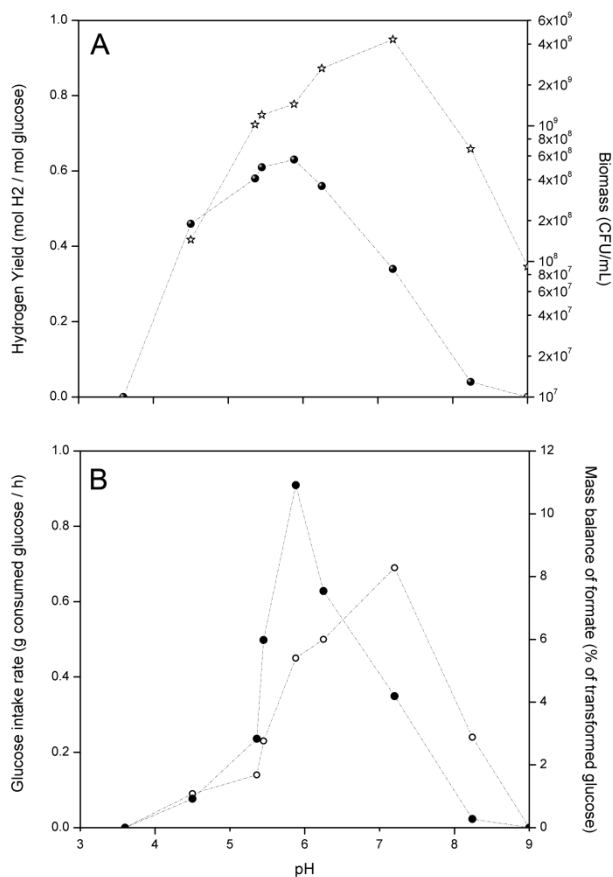


Fig. 2.1. Investigation of H₂ production by the pure *C. freundii* CWBI952 culture growing on glucose at eight pH values ranging from 3.6 to 8.2 in a 2.3 L batch bioreactor. (A) Evolution of H₂ yield (●) and biomass (☆). (B) Glucose intake rate (○) and transformation to formate (●).

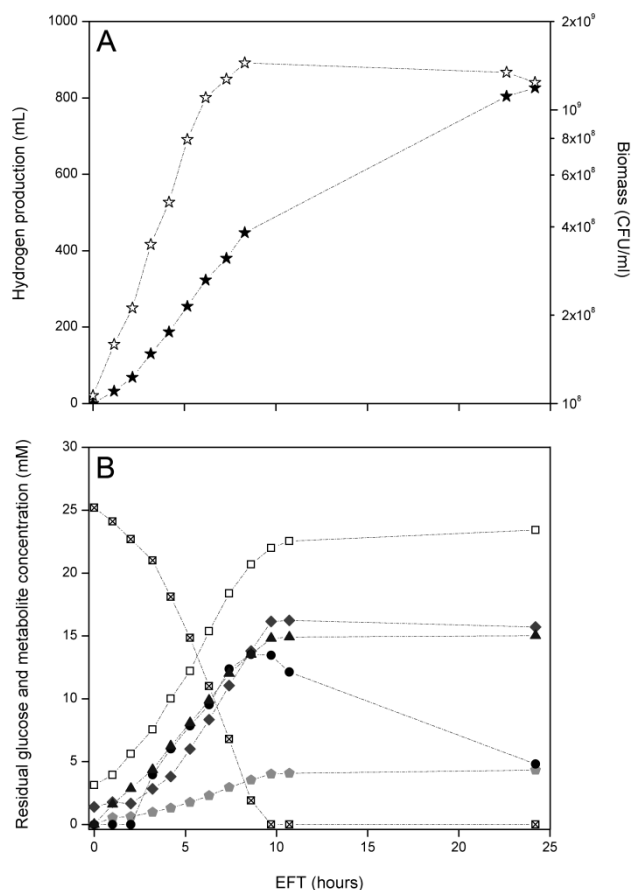


Fig. 2.2. Investigation of H₂ production by the pure *C. freundii* CWBI952 culture growing on glucose at the optimum pH (5.9) in a 2.3 L batch bioreactor. (A) Growth curve (☆) and cumulative hydrogen production (★). (B) Glucose utilization and fermentation profile (▣ glucose, □ ethanol, ● succinate, ◆ lactate, ● formate, ▲ acetate).

Tab. 2.1 Metabolite synthesis and performance of H₂ production with *Citrobacter freundii* CWBI952 growing in 100 mL, 2.3 L batch and sequenced-batch cultures.

	100 mL serum bottles			2.3 L bioreactor			
	Peptone without FeSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ without FeSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ with 0.125 g/L FeSO ₄	Batch Peptone without FeSO ₄	Batch (NH ₄) ₂ SO ₄ with 0.125 g/L FeSO ₄	Sequence 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ with 0.125 g/L FeSO ₄ ^a	Sequence 3 (NH ₄) ₂ SO ₄ with 0.045 g/L FeSO ₄ ^a
Nitrogen source and iron sulfate concentration in the medium							
Mass balance (%)							
Ethanol	22.4	14.7	18.1	23.7	18.8	15.2	18
Lactate	29.2	26.1	23.8	28.3	23.5	29.2	26.8
Acetate	24.4	26.4	21.22	16.5	14.7	12.2	13.1
Succinate	10.5	3.8	8.7	9.7	9.4	8.4	9.6
Formate	0	11.8	0	4.9	3.9	4.5	3.4
CO ₂	2.3	0	3.1	9.6	0	0.2	8.9
Total	88.8	82.9	74.9	92.7	70.3	69.7	79.9
Biomass (CFU/mL)	1.4 10 ⁺⁰⁹	1.1 10 ⁺⁰⁹	1.1 10 ⁺⁰⁹	1.2 10 ⁺⁰⁹	6.7 10 ⁺⁰⁸	6.1 10 ⁺⁰⁸	7.1 10 ⁺⁰⁸
Yield (mol_{H2}/mol_{glucose})	0.22	0	0.23	0.63	0	0.01	0.58
Hydrogen production rate (ml_{H2}/L.h)	27.5	0	29	26.4	0	0.54	31.32

a. estimated due to removal/addition of culture medium

Effect of iron concentration on hydrogen production with an ammonia-based nitrogen source

The common use of casein peptone as a nitrogen source is not economically viable in an industrial prospect. Ammonia-based substitutes have already been applied successfully in mixed cultures [20] or *Clostridium* cultures [41] whereas it has been less studied with pure *Enterobacteriaceae*. *C. freundii* CWBI952's ability to produce H₂ when growing with (NH₄)₂SO₄ was first investigated in 100 mL bottles with no pH regulation (BHP tests, see section 2.3). The first experimental data, collected after 22 hours of growth, indicated that when using peptone as the nitrogen source (medium A), biomass and hydrogen yield reached 1.4 10⁺⁰⁹ CFU/mL and 0.22 mol_{H2}/mol_{glucose}. In terms of mass balance lactate was the main soluble by-product followed by acetate, ethanol, and succinate representing in all 88.8 % of the initial glucose (Tab. 2.1, column 1). The yield obtained with the serum bottles was only about one third of the yield obtained in the 2.3 L bioreactor using the same medium (ca. 0.63 mol_{H2}/mol_{glucose}). This can be explained by the absence of pH regulation (ΔpH up to 3 units) and increasing pressure in the gas phase (up to 0.5 bars) during growth of the strain.

When replacing casein peptone by an equivalent mineral nitrogen containing source, *i.e.* 6 g/L (NH₄)₂SO₄ and no iron added (medium B), similar cell concentrations were obtained (1.1 10⁺⁰⁹ CFU/mL), but no biogas was produced. Furthermore high formate accumulation (8.7 ± 1.5 mM) and residual glucose (9.4 ± 1 mM from an initial 25 mM concentration) were detected. By contrast when 0.125 g/L FeSO₄ were added to the culture medium (medium C), biomass reached 1.1 10⁺⁰⁹ CFU/mL and a yield of 0.23 mol_{H2}/mol_{glucose} was obtained. In this case the metabolites accounted for 74.9 % of glucose utilization and the formate was entirely converted. Lee [23], using anaerobic mixed microflora, reported that a ferrous iron concentration of 20 mg/L could have an inhibitory effect on hydrogenase activity. Nevertheless our data indicated that no suppression of the hydrogen production activity had occurred in our experiments with 6 times this level of ferrous iron. However, Yang [42] has suggested that the accessible iron in the

culture medium was often overestimated due to precipitation phenomena. Our observations confirm this statement: after sterilization ferrous sediments were formed as a consequence of the precipitation of compounds such as $\text{Fe}(\text{OH})_2$, FeCO_3 . When the VFA concentration gradually increased (as pH decreased), the precipitate was dissolved and ferrous iron gradually became available to the strain, maintaining bacterial growth with no inhibitory influence on H_2 production.

The effect of iron on ammonia-based cultures was further investigated in a 2.3 L sequenced-batch reactor with pH regulation since H_2 production can only be increased if the iron is present within the appropriate range of concentration [22]. In order to avoid ferrous iron flocculation pH was maintained at an optimum of 5.9 during the experiment. The bioreactor was run with 3 sequences: a first batch sequence was followed by 2 successive sequences with removal-addition of 20 % of the culture medium and then 68 % with no addition of ferrous compounds. All the sequences were started after complete depletion of the glucose (*i.e.* one day). During the first batch phase, with 6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.125 g/L FeSO_4 (medium C), no hydrogen was produced but biomass reached $6.7 \cdot 10^{+08}$ CFU/mL (Tab. 2.1, column 5). In accordance with Lee's results [23], H_2 production might have been suppressed by a decrease in hydrogenase activity due to iron inhibition of cellular enzymes. Wang [43] also reported that hydrogen production activity decreased gradually with increasing ferrous iron concentration. In the serum bottles, when using the same medium, $0.23 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ were obtained due to the lower levels of iron as ferrous sediments formed. By contrast during the former batch culture pH was controlled at 5.9 leading to an increase in iron levels and the associated inhibitory effect on H_2 production. The second sequence did not restore hydrogen production activity, yielding only $0.01 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$. With the third sequence the resulting final FeSO_4 concentration was of 0.045 g/L. Under these conditions a yield of $0.58 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ was obtained, which is comparable to the yield obtained with peptone medium A, ca. $0.63 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$.

The carbon mass balance calculation indicated that 79.9 % of the consumed glucose was converted into the detected metabolites and, compared to the batch culture with peptone medium illustrated in Fig 2. , the carbon recovery from glucose decreased by 12.8 %. This metabolic deviation may be explained by a decrease in the glucose degradation efficiency occurring when ammonia is present as the main nitrogen source. Several mechanisms for ammonia inhibition have already been proposed, such as a change in the intracellular pH, increase of maintenance energy requirement, and inhibition of specific enzymatic reactions [20, 44].

Effect of the dilution rate on H_2 production

In this experiment the production of hydrogen by *C. freundii* CWBI952 was studied in a semi-continuous culture in order to investigate the influence of the dilution rate on growth, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ assimilation and hydrogen production activity (Fig. 2.3.). In line with the findings of Kraemer et al. [45] and Mizuno et al. [46] a flow of nitrogen gas (28.6 mL of N_2/min) was used to expel the biogas to the gas chromatographer and to further sparge the culture medium decreasing inhibition effect of hydrogen partial pressure. A first batch phase was performed with medium D and led to higher yields and hydrogen production rates (HPR) compared to previous experiments in the bioreactor confirming the positive effect of degassing the medium. After one day of batch culture, the reactor was operated in semi-continuous mode at 4 different dilution rates (0.009, 0.012, 0.018 and 0.024 h^{-1}) for 9 days with a substrate feed of $20 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$ (medium E) to approach the typical biochemical organic demand (BOD) of biodegradable organic matter from agro-industry wastewaters. At this concentration glucose accumulation was not detected except at a dilution rate of 0.024 h^{-1} . Given that the culture was semi-continuous the resulting curve of HPR versus time has a saw-toothed appearance due to the periodic dilution of the carbon substrate (Fig. 2.3.A). In addition a reduction in the HPR amplitude can be observed when the dilution rate increases. This could be related to the more regular sequential addition of glucose.

As shown in Tab. 2.2, the maximum H_2 yield of $0.95 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ was obtained with a dilution rate of 0.009 h^{-1} before growth restriction took place probably as a consequence of by-product

inhibition. The hydrogen yield then decreased to $0.74 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ when the dilution rate was increased to 0.018 h^{-1} . The opposite trend was observed for HPR since, in accordance with the findings of Zhang et al. [47], our data indicated that when the dilution rate was doubled (from 0.009 to 0.018 h^{-1}), the HPR nearly doubled too. At 0.009 h^{-1} , the assimilation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was lower (ca. $64 \text{ mg}_\text{N}/\text{L}$) than at 0.018 h^{-1} (ca. $99 \text{ mg}_\text{N}/\text{L}$), confirming that microbial activity peaked when approaching the washout point [12]. However dilution rates of 0.018 h^{-1} or higher resulted in lower overall performance due to growth inhibition by the accumulated metabolites.

During the former 24 h batch culture the total mass balance increased by 8.6 % compared to the first sequenced-batch culture using $6 \text{ g/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the nitrogen source (detailed in Tab. 2.1, column 5). This indicated that a decrease by half in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ allowed more effective uptake and degradation of the glucose. It should be noted that total mass balance remained very stable at $86.0 \pm 2.1 \%$ at all dilution rates. This result indicates that the differences in performance reside principally in the dissimilarities in the fermentation profiles. Fig. 2.3.C illustrates the significant accumulation of soluble metabolites. In fact, except for the dilution rate of 0.024 h^{-1} , under which metabolites were gradually removed from the medium, ethanol, acetate and succinate accumulated independently of the dilution rate. By contrast lactate and formate concentrations varied in line with the dilution rate and the H_2 production activity. As shown in Tab. 2.2, yields gradually decreased as glucose conversion to lactate and formate increased. HPRs, however, were highly dependent on formate bioconversion into H_2 and CO_2 , but independent of lactate accumulation. For example during the first day at a dilution rate of 0.009 h^{-1} lactate and formate started to accumulate at a higher rate and after 24 h the formate had been totally converted leading to an increase of 6.0 % in H_2 yield and a 120 % increase in HPR (from 15.6 to $36.6 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L.h}$). In addition lactate production increased by 11.9 % when switching from a batch to a semi-continuous culture at a dilution rate of 0.024 h^{-1} . This suggests a stronger activation of lactate dehydrogenase (LDH) in the glucose catabolic pathway with high coenzyme ratios inducing lactate production and a concomitant loss of potential hydrogen production [48, 49]. Bearing this in mind the optimum trade off point for improved H_2 yield and higher HPR was found to be a dilution rate of 0.012 h^{-1} .

*Tab. 2.2. Metabolite synthesis and performance of H_2 production with *Citrobacter freundii* CWBI 952 growing on $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in a 2.3 L semi-continuous culture at different dilution rates.*

	Dilution rate (h^{-1})					
	Batch	0.009 ^a	0.012	0.018	0.024	0.012
Mass balance (%)						
Ethanol	19.3	21	20.3	19	17.6	19.9
Lactate	23.7	30.9	31.2	33.7	35.6	32.6
Acetate	14.5	14	13.4	13.2	12.1	13.2
Succinate	7.9	7.8	7.1	6.4	6.3	7.1
Formate	0	0	0	2.7	0.9	0.8
CO_2	13.5	14.6	12.8	11.4	10.6	14.1
Total	78.9	88.3	84.8	86.4	83.1	87.7
Biomass (CFU/mL)	$1.2 \cdot 10^{+09}$	$7.8 \cdot 10^{+08}$	$1.4 \cdot 10^{+09}$	$8.2 \cdot 10^{+08}$	$3.4 \cdot 10^{+08}$	$4.5 \cdot 10^{+08}$
Yield ($\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$)	0.88	0.95	0.83	0.74	0.69	0.92
Hydrogen production rate ($\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L.h}$)	48.2	24.6	33.2	40.2	28.8	25.4

a. at the end of the first day

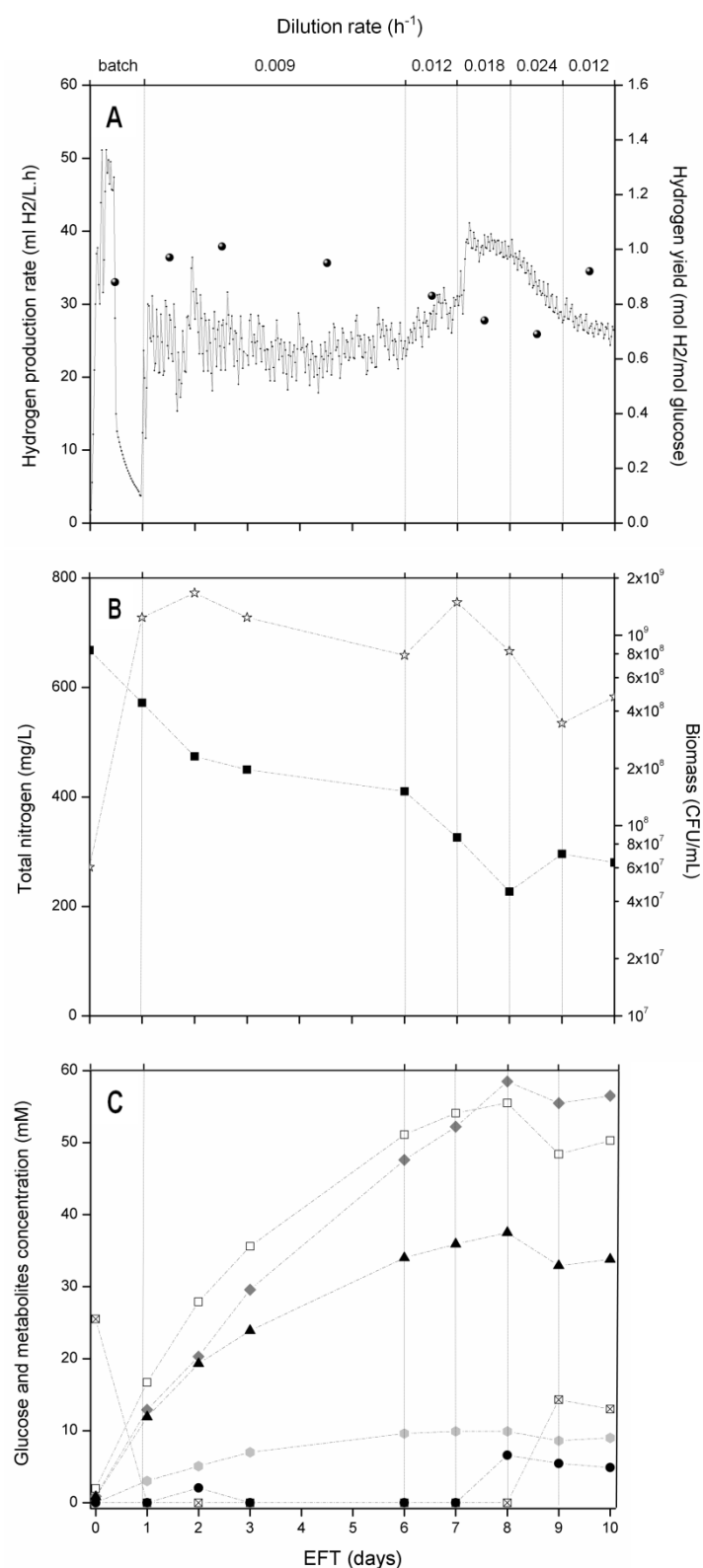


Fig. 2.3. Effect of various dilution rates (0.009, 0.012, 0.018 and 0.024 h⁻¹) on the H₂ production activity of the pure *C. freundii* CWBI952 growing on glucose in a 2.3 L semi-continuous culture. (A) Hydrogen production rate (— * —) monitored during 10 days with GC-TCD and hydrogen yield (●). (B) Total NH₄ (■) and biomass (☆) contained in the effluents. (C) Glucose utilization and metabolites concentration (⊠ glucose, □ ethanol, ● succinate, ◆ lactate, ● formate, ▲ acetate).

4. Conclusions

This paper has shown that the recently isolated *Citrobacter freundii* CWBI952 can be used to maintain anaerobic conditions and produce hydrogen via dark fermentation of glucose in batch, sequenced-batch and in semi-continuous cultures. The growth and generation of hydrogen by the pure strain was accompanied by the production of ethanol, lactate, acetate, formate and succinate but no propionic acid. Investigations into the effect of ambient factors such as the pH, the nitrogen source, the iron concentration in batch and sequenced-batch tests and the dilution rate in a semi-continuous culture highlighted important trends which allowed the following conclusions to be drawn. pH must be carefully regulated given its major impact on the hydrogen production activity of the strain. The optimal pH value (ca. 5.9) was shown to be a favorable condition for formate bioconversion and for the production of H₂ with lower biomass yield.

While an organic nitrogen source such as casein peptone was found to be suitable for bacterial growth and hydrogen production, (NH₄)₂SO₄ proved to be an excellent low-cost substitute. Within a certain concentration range FeSO₄ (ca. 0.045 and 0.03 g/L respectively tested in sequenced-batch and semi-continuous cultures) enhanced the HPR and hydrogen yield when growing the strain on (NH₄)₂SO₄.

In semi-continuous culture an increase of the dilution rate from 0.009 to 0.018 h⁻¹ led to a doubling of the HPR from 24.6 to 40.2 mL-H₂/L.h, but also to a 20 % decrease in yields from 0.95 to 0.69 mol_{H₂}/mol_{glucose}. Optimal overall performances (an HPR of 33.2 mL-H₂/L.h and a yield of 0.83 mol_{H₂}/mol_{glucose}) were obtained when combining the previously optimized parameters for the pH (5.9), nitrogen (2.4 g/L (NH₄)₂SO₄), and iron (0.03 g/L FeSO₄) with a dilution rate of 0.012 h⁻¹ and degassing of the biogas by N₂ at a 28 mL/min flow rate.

These findings should contribute to a better understanding of the processes involved in the optimization of hydrogen production by enteric bacteria and facilitate efforts to obtain enhanced performance and reduced costs by identifying key parameters such as pH conditions, the nitrogen substrate, the iron concentration and the dilution rate. Furthermore the study shows that the selection of the strain and the control of its optimized culture conditions have a real impact on bioreactor performance. Nevertheless since the overall yields obtained in the present study are lower than the theoretical maximum and lower than some others reported in the literature further research is needed in this area. Among the options that could be explored are the introduction of suspended or immobilized cells in continuous cultures, and hybrid approaches using a pure *Clostridium* strain in association with *Enterobacteriaceae* to initiate H₂ production.

References

1. Lens, P., Westermann, P., Haberbauer, M., Moreno, A., 2005. Biofuels for fuel cells. Integrated environmental technology series. IWA publishing, London.
2. Balat, M., 2009. Possible methods for hydrogen production. Energy sources part A-Recovery utilization and environmental effects. 31, 39-50.
3. Moriarty, P., Honnery, D., 2009. Hydrogen's role in an uncertain energy future. Int. J. Hydrogen Energy. 34, 31-39.
4. Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L. et al., 2009. An overview of hydrogen production technologies. Catal. Today. 139, 244-260.
5. Winkler, M., Maeurer, C., Hemschemeier, A. et al., 2004. The Isolation of green algal strains with outstanding H₂-productivity. Biohydrogen III. Amsterdam, Elsevier Science. p. 103-115.
6. Rocha, J.S., Barbosa, M. J., Wijffels, R.H. et al., 2001. Hydrogen production by photosynthetic bacteria: culture media, yields and efficiencies. Biohydrogen II. ed. Oxford, Pergamon. p. 3-32.
7. Das, D., Veziroglu, T.N., 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. Int. J. Hydrogen Energy. 26, 13-28.
8. Meher Kotay, S., Das, D., 2008. Biohydrogen as a renewable energy resource, prospects and potentials. Int. J. Hydrogen Energy. 33, 258-263.
9. Das, D., Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. Int. J. Hydrogen Energy. In Press, Corrected Proof.

10. Das, D., Veziroglu, T.N., 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 6046-6057.
11. Oh, S., Logan, B.E., 2005. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* 39, 4673-4682.
12. Cervantes, F., Pavlostathis, S., Van Haandel, A., 2006. Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters. *Integrated environmental technology series*, 345. IWA publishing, London.
13. Oh, Y.K., Kim, H.J., Park, S. et al., 2008. Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 1471-1482.
14. Kim, S., Seol, E., Raj, S.M. et al., 2008. Various hydrogenases and formate-dependent hydrogen production in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 1509-1515.
15. Bisailon, A., Turcot, J., Hallenbeck, P.C., 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31, 1504-1508.
16. Nath, K., Kumar, A., Das, D., 2006. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Can. J. Microbiol.* 52, 525-532.
17. Tang, G.L., Huang, J., Sun, Z.J. et al., 2008. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation temperature and pH. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 80-87.
18. Wang, J., Wan, W., 2008. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 5392-5397.
19. Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L. et al., 2009. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Int. J. Hydrogen Energy*. Submitted.
20. Wang, B., Wan, W., Wang, J., 2009. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresour. Technol.* 100, 1211-1213.
21. Lin, C.Y., Lay C.H., 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 29, 41-45.
22. Yang, H., Shen, J., 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31, 2137-2146.
23. Lee, D.Y., Li, Y.Y., Oh, Y.K. et al., 2009. Effect of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy*. 34, 1244-1252.
24. Arooj, M.F., Han, S.K., Kim, S.H. et al., 2008. Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 6509-6514.
25. Fan, K.S., Kan, N.R., Lay, J.J., 2006. Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresour. Technol.* 97, 84-89.
26. Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J. et al., 1998. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol. Lett.* 20, 143-147.
27. Yuan, Z.L., Yang, H.J., Zhi, X.H. et al., 2008. Enhancement effect of L-cysteine on dark fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 6535-6540.
28. Postgate, J.R., 1984. *The sulfate-reducing bacteria*. Cambridge University Press, London.
29. Hiligsmann, S., Jacques, P., Thonart, P., 1998. Isolation of highly performant sulfate reducers from sulfate-rich environments. *Biodegradation*. 9, 285-292.
30. Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S. et al., 1995. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 395-397.
31. Lin, P.Y., Whang, L.M., Wu, Y.R. et al., 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *Int. J. Hydrogen Energy*. 32, 1728-1735.
32. Bergey's, 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. London, p. 458-461.
33. Ying, Z., Yang, S.T., 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *J. Biotechnol.* 110, 143-157.
34. Dabrock, B., Bahl, H., Gottschalk, G., 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1233-1239.
35. Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J. et al., 1995. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 571-574.
36. Oh, Y.K., Seol, E.H., Kim, J.R. et al., 2003. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp Y19. *Int. J. Hydrogen Energy*. 28, 1353-1359.
37. Tanisho, S., Kamiya, N., Wakao, N., 1989. Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. *Biochim. Biophys.* 973, 1-6.
38. Tanisho, S., Kuromoto, M., Kadokura, N., 1998. Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*. 23, 559-563.
39. Matsumoto, M., Nishimura, Y., 2007. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 236-241.
40. Yoshida, A., Nishimura, T., Kawaguchi, H. et al., 2006. Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh-* and *frd-*inactivated *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 67-72.
41. Wang, X.Y., Jin, B., Mulcahy, D., 2008. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 4998-5005.

42. Yang, H.J., Shen, J.Q., 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31, 2137-2146.
43. Wang, J.L., Wan, W., 2008. Effect of Fe²⁺ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 1215-1220.
44. Chen, Y., Cheng J.J., and Creamer K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044-4064.45.
45. Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2008. Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 6558-6565.
46. Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R. et al., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* 73, 59-65.
47. Zhang, Z.P., Show, K.Y., Tay, J.H. et al., 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem.* 41, 2118-2123.
48. Garrigues, C., Goupipl-Feuillerat, N., Cocaign-Bousquet, M. et al., 2001. Glucose metabolism and regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* strains with decreased lactate dehydrogenase activity. *Metab. Eng.* 3, 211-217.
49. Mercade, M., Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D. et al., 2000. Regulation of glycolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363 at acidic culture conditions. *Prog. Biotechnol. ed., Elsevier.* p. 269-273.

Chapitre 2.3. Etude et optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie stricte *Clostridium butyricum* CWBI1009

Ce chapitre est focalisé sur l'étude de la seconde souche d'intérêt productrice d'H₂ et isolée au CWBI. Cette souche est anaérobie stricte et donc très sensible à la présence même de traces d'oxygène dans le milieu. L'objectif est de comparer ses performances avec celles de *Citrobacter freundii* dans des conditions de bioréacteur identiques et au pH optimum, à déterminer. La souche anaérobie facultative étudiée dans le chapitre précédent avait atteint des rendements de l'ordre de 0,83 mol d'H₂ par mol de substrat glucose consommé et une productivité horaire de 33,2 ml d'H₂ par litre de bioréacteur (résultats obtenus en bioréacteur semi-continu au pH optimum de 5,9 et avec un taux de dilution de 0,012 h⁻¹). Les travaux rapportés dans ce chapitre ont aussi été menés dans le but de démontrer la faisabilité de maintenir des bonnes performances sur le long terme dans un bioréacteur en culture pure alimenté en glucose et en amidon. L'enjeu était surtout d'éviter l'utilisation de manière récurrente des substances réductrices au coût non négligeable pour éliminer les dernières traces d'oxygène et faire chuter le potentiel d'oxydo-réduction.

De plus, à l'encontre de la plupart des travaux rapportés dans la littérature qui travaillent avec des cultures mixtes de microorganismes non identifiées initialement, l'utilisation de souches pures dans nos travaux n'est pas écartée a priori. Elle est même favorisée et considérée comme un moyen efficace pour étudier avec précision le métabolisme des microorganismes et les facteurs qui influencent les performances recherchées de rendement et productivité en hydrogène. Cette stratégie est consciente qu'il sera probablement nécessaire à terme de développer les moyens spécifiques pour maintenir une écologie stable comprenant les souches sélectionnées. C'est dans ce sens que le système réactionnel séquentiel (Sequenced-batch reactor SBR) a été expérimenté parce qu'il est relativement simple à mettre en œuvre et les risques de contamination sont limités. De plus, il permet d'établir des rendements en H₂ fiables et des bilans précis de la conversion du substrat en métabolites solubles. Le taux de renouvellement du milieu de culture lors de chaque séquence a également été étudié dans le but de maintenir des performances stables et les plus élevées sans inhibition par excès de l'un ou l'autre métabolite soluble.

Le contenu a été publié dans l'article "Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., & Thonart, P. (2010). Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(8), 3371-3378. "

Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009

1. Introduction

Dependence on fossil fuels as our primary energy source is a significant cause of global warming, environmental degradation, and health problems [1, 2]. Hydrogen (H₂) is a promising energy vector for the future since CO₂ is not released during its combustion [3-5]. At present hydrogen is produced by chemical methods, such as steam reforming or partial oxidation of fossil fuels, which involve the release of large quantities of greenhouse gases into the atmosphere. Biological hydrogen production by "dark-fermentation" of organic waste or effluent is a promising means of producing renewable energy from waste products [6]. The main means of producing hydrogen via dark-fermentation involve either facultative anaerobic enterobacteriaceae or strict anaerobic bacteria of the geni *Clostridium* and *Ruminococcus*. Enterobacteriaceae use formate, an intermediate of glucose metabolism, to produce hydrogen through catalytic action of the formate hydrogen lyase complex with a theoretical yield of two mol of hydrogen per mol of glucose consumed. The alternative metabolic pathway involving strict anaerobic bacteria has a maximum yield of four mol of hydrogen per mol of glucose [4]. Clostridia can extract energy from carbohydrates using various different metabolic pathways which are promoted or inhibited by the prevailing culture conditions. Each pathway is characterized by a specific metabolite such as acetate, butyrate, ethanol, lactate or formate. The acetate and butyrate pathways are the only ones which involve the release of molecular hydrogen, *i.e.* 4 mol hydrogen per mol glucose with acetate production and 2 mol hydrogen per mol glucose with butyrate production. Thus the butyrate/acetate ratio can be used as a reliable indicator of the efficiency of fermentative hydrogen production and of the metabolic pathways used during glucose fermentation [7].

Although the *Clostridium* genus is promising for fermentative hydrogen production, few investigations have used pure strains to make a detailed study of the optimal conditions for hydrogen production [8-11].

Many authors have reported that initial pH has a marked effect on hydrogen production from carbohydrate substrates. However, since most of these studies investigated mixed cultures of microorganisms or pure cultures without pH control, little is known about the precise impact of a stable pH on the metabolic pathways and hydrogen production rates and yields of specific strains. Various studies have indicated that the optimal pH for the degradation of simple substrates is between 4.5 and 7 [8, 10, 12-18]. In the investigations reported here a pure *Clostridium butyricum* strain was cultured in a 2.3 l bioreactor at different controlled pH levels. The hydrogen production rate and yield and the proportions of the soluble products resulting from the fermentation of glucose and starch were studied. In addition the bioreactor was operated in batch and sequenced-batch mode in order to study the effect of a large inoculum and inhibition by metabolites such as volatile fatty acids (VFA) or alcohols.

2. Materials and Methods

Media and reactor setup

To ensure a viable culture for a long time, 1 ml of culture was transferred weekly in 25 ml hermetically stoppered tubes completely filled with sterile MDT medium and incubated at 30 °C. The MDT medium contained, per litre of deionised water : glucose monohydrate (5 g), casein pepton (5 g), yeast extract (0.5 g) Na₂HPO₄ (5.1 g), KH₂PO₄ (1.2 g), MgSO₄·7H₂O (0.5 g), cysteine hydrochloride (0.5 g). The PCA (Plate Count Agar) medium for the aerobic purity check contained, per litre of deionised water : glucose monohydrate (1 g), casein pepton (5 g), yeast extract (2.5 g), agar (15 g).

Pre-cultures for bioreactor experiments were obtained by transferring 5 ml of inoculum into 250 ml serum bottles with 200 ml of sterile MDT medium, degassed with nitrogen, and incubated for 24 hours at 30 °C.

Batch and sequenced-batch fermentations were carried out in a laboratory-scale bioreactor (Biolafitte manufacture) composed of a 2.3 l glass vessel with double envelope and a stainless-steel lid equipped with septum, shaft with blades, 0.20 µm (Midisart, Sartorius) gas filters and tubing for sampling, gas inlet, gas outlet and medium removal or addition. The bioreactor containing 1.5 l of water and the ingredients for the MDT medium (except cysteine and glucose) was autoclaved at 120 °C for 20 minutes, and then cooled under nitrogen gas, prior to injection of 200 ml of the inoculum. Autoclaved cysteine and glucose solutions were added sterilely during inoculation. Needles placed through the septum were used to control the pH level (METTLER TOLEDO combined probe) by automatic addition of sterile 1.5 N sodium hydroxide (maximum range of 0.15 pH unit around the pH level). During fermentation the bioreactor was maintained at 30 °C and stirred at 60 rpm.

Isolation and identification test

The strain was isolated from a culture in serum bottles with MDT medium in which glucose had been replaced by non-sterile rice starch for laundry (Remy, Belgium). The additional inoculum provided by this substrate led to high H₂ production. The culture at the completion of gas production was treated at 80 °C for 10 min. One ml of inoculum was successively diluted in 25 ml stoppered glass tubes containing 24 ml of sterile TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) agar medium (Merck) and maintained in molten state at 43 °C. This medium was used in order to grow isolated colonies in anaerobic conditions. The tubes were closed hermetically and then incubated at 30 °C. After one week the tubes were broken at convenient points in order to sample black colonies (due to precipitation of iron sulfide). Single colonies were selected and placed in a 5 ml tube containing the liquid TSC culture medium for 3 days and then transferred to 250 ml serum bottles for BHP (Biochemical Hydrogen Potential) tests [7]. Since the hydrogen production by the different samples was similar, *i.e.* 132 ± 11 ml, the cultures were considered to contain pure strains.

Strain identification was carried out by examination under a transmitted light microscope (Olympus, CH-2) and by 16S rDNA/ITS (Internal Transcribed Spacer) gene sequencing. The genomic DNA was extracted from the cells using the Promega extraction kit (Madison, USA) and the 16S rDNA and ITS gene were amplified by PCR. Bacterial cell lysates were used to amplify the 16S rDNA Eurogentec (Seraing, Belgium) primers 16SA₁ and 16SA₂ (Tab. 3.1) under the following temperature profile: initial denaturation at 95 °C during 5 min, followed by 25 cycles with denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 55 °C for 30 sec and elongation at 72 °C for 2 min. For ITS universal bacterial primers R16 and R23 from Eurogentec (Seraing, Belgium) (Tab. 3.1) were used under the following temperature profile: initial denaturation at 95 °C during 5 min, followed by 30 cycles with denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 2 min. Amplification of 16S rDNA was performed in a volume of 50 µl containing: 5 µl of bacterial genomic DNA solution obtained as above, 5 µl of 10 x PCR reaction buffer (50 mM KC1, 10 mM Tris-HCl (pH 9 at 25 °C), 0.5 % (w/v) triton® X-100), 1 µl of each dNTP (Deoxynucleotide triphosphates) 10 µM, 5µl of MgCl₂ 25 mM, 1 µl of each primer 10 µM and 0,2 µl of Taq polymerase (Promega). The PCR products obtained in this way were purified with the Microcon® YM-100 (Millipore) Kit. Sequences were determined by ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems).

Tab. 3.1: Sequence primer used to amplify 16S rDNA and ITS

Primer	Sequence
16SA ₁	5' –TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC- 3'
16SA ₂	5' –TACCTTGTTACGACTTCACCCCA- 3'
R16	5' –KASTGCCAGGGCATCCAC- 3'
R23	5' –GGGTGAAGTCGTAACAAG- 3'

The ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) test was carried out by restriction digestion of the amplified 16S rDNA and the ITS rDNA fragments for 1 h at 37 °C in 20 µl reaction mixture containing 15 µl of the PCR product solution, 2 µl of incubation buffer and 15 U of one of the following restriction enzymes, EcoRI, CfoI, MboI, AclII (Eurogentec). Restriction digests were subsequently analysed by 2 % (w/v) agarose gel electrophoresis. The gel was stained in a solution containing ethidium bromide and photographed in UV light.

Analytical methods

Cell concentration was determined by microscopic observations on a Bürker counting chamber (mean of 10 counts) after dilution and cell settlement in a 0.4 % (final concentration) fresh formaldehyde solution. Absence of aerobic contaminants during fermentation was verified by spreading 0.1 ml of culture on PCA medium plates and incubating for 48h at 30 °C. The absence of bacterial growth confirmed the absence of aerobic contaminants.

Collected liquid samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants obtained were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Minisart Sartorius) and analysed by HPLC for glucose, ethanol, lactate, acetate, formate and butyrate. The HPLC analysis was carried out using an Agilent 1110 series (HP Chemstation software) with a Supelcogel C-610H column preceded by a Supelguard H pre-column (oven temperature 40 °C), 0.1 % H₃PO₄ (in milliQ water) as the isocratic mobile phase at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ and a differential refraction index detector (RID, heated at 35 °C). The process lasted for 35 min at a maximum pressure of 60 bars. The data for the glucose and metabolite concentrations were used to calculate the mass balance (MB) of the glucose conversion using the equation:

$$MB = \frac{\sum N_i \cdot \Delta C_i}{N_G \cdot \Delta C_G} \quad (1)$$

where N_i is the number of carbon atoms in a molecule of metabolite i; ΔC_i is the concentration of metabolite i effectively produced (*i.e.* the difference between the final and initial concentrations for a given culture sequence); N_G is the number of carbon atoms in the glucose molecule (*i.e.* 6) and ΔC_G is the concentration of the glucose consumed during the culture sequence (Eq.(1)).

The proportion of hydrogen gas was determined using a gas chromatograph (GC) (Hewlett-Packard 5890 Series II) fitted with a thermal conductivity detector (TCD) and a 30 m x 0.32 mm GAS PRO GSC capillary column (Altech) in series with a 20 m x 0.25 mm CarboPLOT P7 column (Chrompak). The temperatures of the injection, TCD chambers and the oven were maintained at 90°, 110° and 55 °C respectively. Nitrogen was used as the carrier gas in the column at a flow rate of 20 mL min⁻¹. Water supplemented with 9 N KOH was used in replacement equipment to monitor the biogas production of the batch and sequenced-batch bioreactors.

3. Results and discussion

Isolation and identification of the hydrogen-producing strain

The strain was isolated following the isolation procedure described in Material and Methods. The bacteria were mobile and rod shaped and approximately 0.5-2 x 2.5-8 µm in size. Long filaments were occasionally present. Endospores, when observed, were central or subterminalis as described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[19]. The bacteria grew anaerobically in presence of organic carbon source and produced hydrogen in presence of carbohydrates. To further characterize the strain, sequencing of the 16S rDNA and ITS was carried out (accession number in Genbank GU395290). The sequences obtained were compared with others available using Gene Runner® and the strain was identified as *Clostridium butyricum*. ARDRA genotyping of the 16S rDNA was also performed and confirmed the identification. The strain is kept at -80 °C in the laboratory culture collection.

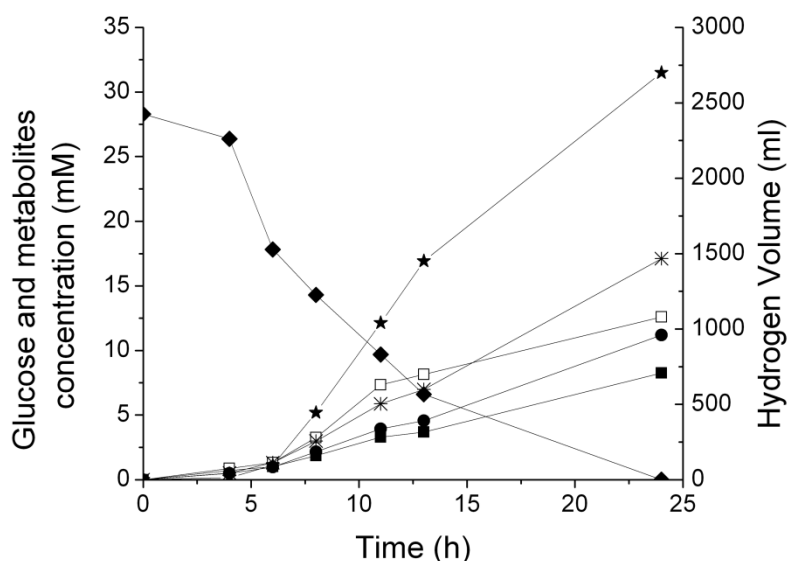


Fig. 3.1. Hydrogen production (ml H₂), and glucose, ethanol and VFA concentration (mM) plotted against time (hours) in 2.3 l batch cultures with *C. butyricum* CWBI1009 at pH 5.2. —◆— Glucose —■— Lactate —□— Formate —●— Acetate —○— Ethanol —*— Butyrate —★— Hydrogen volume

Determination of optimal pH for H₂ production from a glucose substrate in batch reactor mode

The effect of pH on fermentative H₂ production by the pure *Clostridium butyricum* strain was investigated in a 2.3 l batch bioreactor equipped with pH regulation (as described in Materials and Methods). Tests were conducted at eight different pH levels ranging from 4.7 to 7.3 while keeping other operating conditions constant (stirring, temperature, pressure, initial culture medium). The test at pH 5.2 ± 0.15 provided the most promising results: Fig. 3.1 illustrates the related profiles for the intake of the glucose substrate and the production of hydrogen, VFA and ethanol. The results show that the various VFAs and H₂ are all primary metabolites of the glucose intake. Similar profiles of the first order were recorded at 4.85±0.1 and 5.4±0.1.

The hydrogen production rates, plotted against time, for the eight different pH tests are indicated in Fig. 3.2. A lag phase of about 3 to 5 hours was observed at all pH levels. Subsequently the production rate increased exponentially reaching a maximum level which was maintained, for all the tests except those at pH 6.3 and 6.7, until substrate depletion.

In Fig. 3.3 maximum H₂ production yields are indicated for different pH conditions with the related final VFA and ethanol concentrations. The maximum hydrogen production yield and production rate, i.e. 1.69 mol H₂ mol⁻¹ glucose or 211 ml H₂ g⁻¹ glucose and 9.59 mmol H₂ h⁻¹ or 126 ml H₂ h⁻¹ l⁻¹ respectively, were obtained at a pH of 5.2. These optimum pH and yields are in accordance with other studies with pure or mixed cultures [13, 15, 20-22]. Since at this pH level butyrate and acetate concentrations also peaked, overall performance for the process was at a maximum.

Ethanol was released at lower amounts than the other metabolites. At pH levels below 6 ethanol production tended to occur during the stationary growth phase as already noted by other authors [23, 24]. Therefore the negligible amounts of ethanol production in these experiments indicate that the *Clostridium* population consisted mainly of vegetative cells. For all the pH levels investigated the final concentrations of lactate, acetate and butyrate were in relatively narrow ranges, i.e. 8±1.5; 10.5±1.8 and 15±2 mM respectively. However formate production increased from 6 mM to 31 mM with pH rising from 4.7 to 7.3. Although Wang *et al* [25] obtained similar hydrogen and total VFA yields with a *C. butyricum* strain in a 1.5 l bioreactor with pH maintained at 6.5, the main metabolite they analysed was lactate (60 mM), followed by acetate (22 mM) and

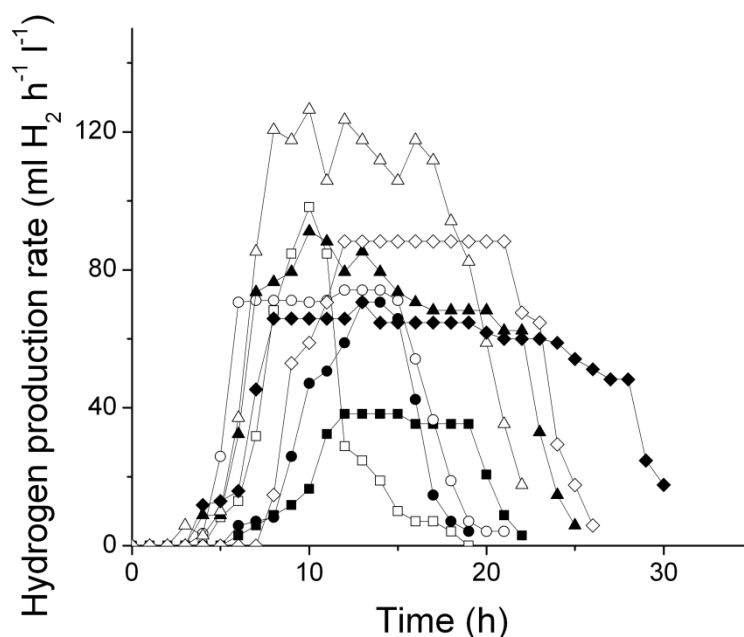


Fig. 3.2. Hydrogen production rate per litre of culture medium ($\text{ml H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ l}^{-1}$) plotted against time (hours) in 2.3 l batch cultures at different pH levels. —■— pH 7.3 —□— pH 6.7 —●— pH 6.3 —○— pH 5.85 —▲— pH 5.4 —△— pH 5.2 —◆— pH 4.85 —◇— pH 4.7

then butyrate (15 mM). Similar results for ethanol and VFA concentration ranges at different pH levels were reported by Chen [21] with acetate as the main metabolite followed by butyrate and ethanol. As shown in Tab. 3.2, the mass balance of glucose conversion into soluble metabolites is limited to $70\% \pm 3\%$ for the cultures carried out at pH levels below 6. This indicates that about

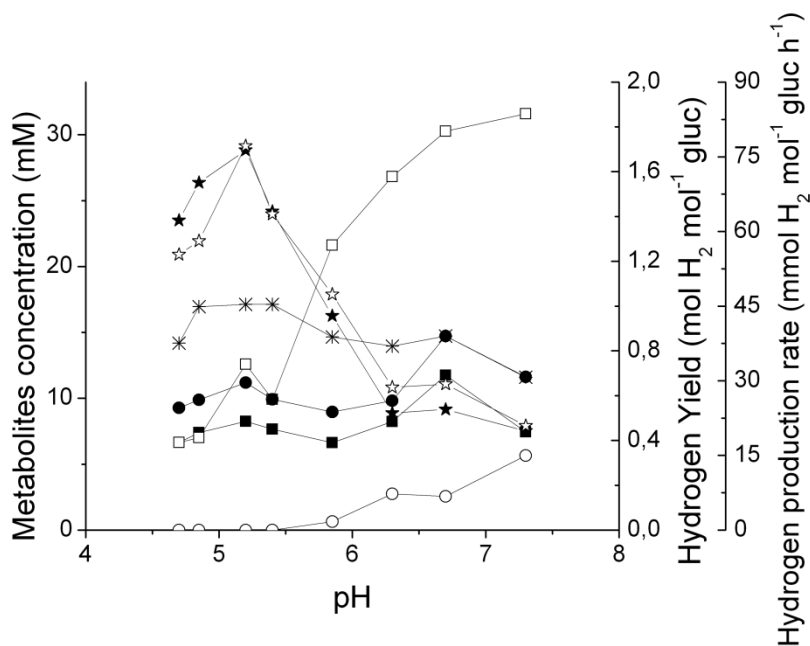


Fig. 3.3. Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 glucose fermentation at different pH levels in a 2.3 l batch bioreactor. Hydrogen production yield ($\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ gluc}$), hydrogen production rate ($\text{mmol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ gluc h}^{-1}$) and final VFA concentrations (mM) —■— Lactate —□— Formate —●— Acetate —○— Ethanol —*— Butyrate —★— Hydrogen yield —☆— Hydrogen production rate.

RESULTATS : chapitre 2.3. Etude de la souche anaérobie stricte *Clostridium butyricum* CWBI1009

Tab. 3.2. Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 glucose fermentation at different pH levels in a 2.3 l batch bioreactor

pH	Carbon converted from glucose (%)					
	Lactate	Formiate	Acetate	Ethanol	Butyrate	Sum
4,7	14,13	4,21	11,03	0	34,93	66,24
4,85	13,30	4,2	11,83	0	40,62	69,95
5,2	13,53	8,09	11,67	0	40,34	73,63
5,4	13,32	6,78	12,06	2,25	36,89	71,3
5,85	11,08	12,07	10,01	0,72	32,72	66,6
6,3	14,35	15,58	11,40	3,18	32,42	76,93
6,7	20,59	17,68	12,25	2,98	34,41	87,91
7,3	13,52	19,10	14,04	6,83	28,04	81,53

30% of the glucose is converted into CO₂ and biomass. Assuming a mean 35% CO₂ content in the biogas [26], the CO₂ contribution in the mass balance would be about 13%. Therefore the biomass yield would account for 17% of the glucose consumed. Similar results were obtained at pH levels higher than 6, in which the mass balance reached about 80% and the CO₂ contribution was estimated to be 5%. These results are in accordance with the 12% calculated from Wang's data [25]. In addition biomass stabilisation was also apparent during our experiments from the counts on a Bürker chamber : at the end of the cultures the biomass population ranged, independently of pH, from 1.2 x 10⁸ to 2.5 x 10⁸ cells per ml.

In the glucose metabolic pathways ethanol, formate and lactate productions indicate a lack of potential hydrogen production. Therefore the potential for additional H₂ production can be stoichiometrically estimated from the quantity of metabolite that was not converted in the bioreactor [27], e.g. for lactate, 850 mL at pH 5.2 and 1200 mL at pH 6.7. Investigations into ways of realizing this potential would advance the prospects for industrialization.

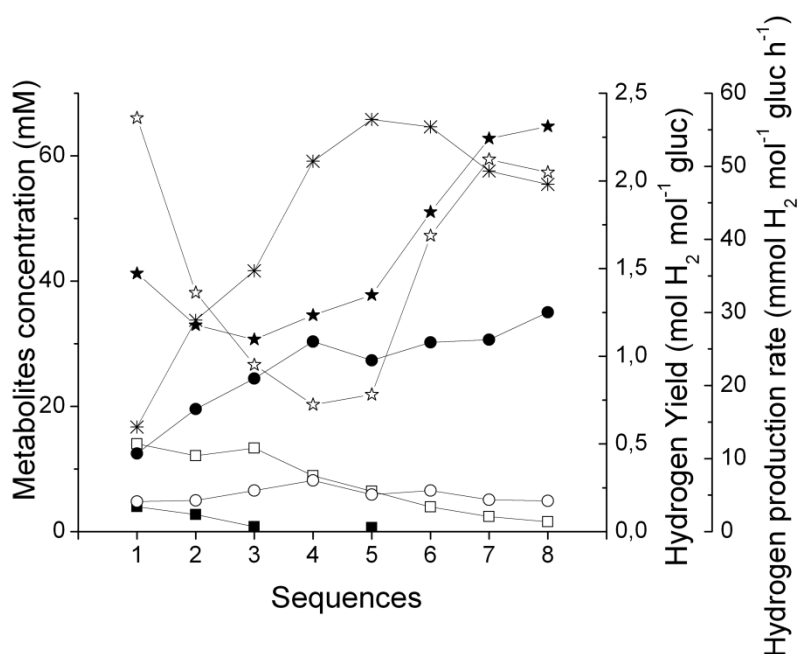


Fig. 3.4 Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 glucose fermentation in a 2.3 l sequenced-batch bioreactor. Hydrogen production yield (mol H₂ mol⁻¹ glucose), hydrogen production rate (mmol H₂ mol⁻¹ gluc h⁻¹) and final VFA concentrations (mM) —■— Lactate —□— Formate —●— Acetate —○— Ethanol —*— Butyrate —★— Hydrogen yield —☆— Hydrogen production rate.

Investigation of H₂ production from glucose in sequenced-batch reactor mode

Industrial application of this biological process requires the use of a continuous or sequenced-batch mode. Therefore a sequenced-batch reactor (SBR) mode was investigated in order to optimize the process by testing different culture conditions while using the same methodology as described above for the batch tests. The SBR mode was studied at pH 5.2 ± 0.15 after running the culture in batch mode under the same conditions. A former series of tests involved a simple addition of 5g of glucose at the end of the batch culture. Since no further hydrogen was produced under these conditions, even at pH 4.85 and 5.3, the results are not reported here. Additional hydrogen production only took place when the pH level was increased to 7. A second series of experiments involved 4 sequences of removal-addition of 20 % (450 ml) of the culture medium and addition of glucose up to the standard initial concentration, *i.e.* 5 g l⁻¹ glucose monohydrate. These 4 sequences followed the batch culture and each sequence was started after complete depletion of the glucose added previously. Finally a third series of 3 sequences was carried out with removal-addition of 40 % of the culture medium and, as before, addition of glucose monohydrate to 5g l⁻¹.

Mean values were calculated for the H₂ production rates and yields during the active period of each series, *i.e.* while hydrogen production was effective. The results of the 8 sequences, including the batch culture (referred to as sequence 1), are shown in figures 4. Sequence 1 achieved similar results to those mentioned in Fig. 3.1. The duration of the active period when H₂ production was effective increased progressively from sequence 1 through sequence 5 going from 26 hours to 36, 48, 71, and finally 74 hours. So although the mean H₂ production yield did not change markedly, the production rates decreased sharply. By contrast the conditions tested in sequences 6 to 8 were favorable for H₂ production since the active period stabilized at about 46 h. Also H₂ production rates increased again reaching levels similar to those measured during sequence 1 and yields increased by about 50 %. The maximum yield, *i.e.* 2.3 mol H₂ mol⁻¹ glucose, was twice as high as the yield per mole hexose reported by Chen et al. [21] in SBR with a sucrose substrate.

The major cause for the decrease of production rate would be VFA inhibition. In fact as indicated in Fig. 3.4, the total VFA concentration measured at the end of sequence 5 was twice as high as the value measured after the batch culture (sequence 1). The increase can be mainly attributed to acetate and butyrate release that approaches a total of 90mM. The results are consistent with the conclusions of Wang [25] who investigated the inhibitory effect of metabolites on fermentative H₂ production in mixed cultures. They showed that performance tends to decrease with increasing ethanol and VFA concentrations. Moreover acetate had the highest inhibitory effect since H₂ production rate and yields dropped by 50% when the initial concentration was increased from 50 to 100 mM and from 100 to 200 mM, respectively.

To better understand how each sequence contributed to the production of VFAs and ethanol, the mass balance of glucose conversion into metabolites has been plotted in Tab. 3.3. The results show a similar 70% level for all sequences meaning that biomass formation is stabilized. In

Tab. 3.3: Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 glucose fermentation in a 2.3 l sequenced-batch bioreactor.

Sequence	Carbon converted from glucose (%)					Sum
	Lactate	Formiate	Acetate	Ethanol	Butyrate	
1	6.74	7.64	14.03	5.35	37.47	71.23
2	0	2.62	12.52	1.47	53.3	69.91
3	0	2.89	14.01	4.2	47.05	68.15
4	0	0	12.25	3.33	58.1	73.68
5	1.64	0	5.05	0	61.6	68.29
6	0	0	15.03	3.28	54.45	72.76
7	0	0.01	17.12	1.62	50.83	69.57
8	0	0.06	19.89	2.17	49.6	71.72

addition the metabolite distribution analyzed for sequences 1 to 5 confirms the literature trends since both increasing of acetate and butyrate initial concentration induced change in metabolite distribution with decrease of acetate proportion and increase of butyrate proportion [25]. The trends are less obvious in sequences 6 to 8 where acetate and butyrate production correlate with the related metabolite concentrations in culture medium. It should be noted that the higher H₂ production performance observed in sequences 7 and 8 are related to higher butyrate and acetate yields and a lower butyrate/acetate ratio. These results are in close agreement with metabolic studies reporting higher H₂ yields with the acetate pathway.

Effect of pH on H₂ production from starch in sequenced-batch reactor mode

Many industrial activities involve the discharge of large volumes of effluent loaded with starch. Yokoi has shown the feasibility of producing H₂ from starch using *Clostridium* strains in association with an *Enterobacter* strain [28, 29]. More recently Chen studied H₂ production from starch using pure strains of *C. butyricum* and *C. pasteurianum* and mixed cultures [9]. They achieved higher H₂ yields with pure *C. but.* strains. However pH was not controlled (initial pH was 7.5) and H₂ production rates were low compared to those of mixed cultures. In our investigations *C. but.* was cultured in a 2.3 l SBR with soluble starch as the sole carbohydrate source (starch concentration calculated as half the COD of the glucose added in MDT medium in order to avoid starch settlement during sterilization). Then using the previous methodology a batch culture with glucose was followed by four sequences carried out successively at pH 5.2, 5.4, 5.6 and 5.8. The hydrogen production yields, presented in Fig. 3.5, are similar to those indicated for sequences 7 and 8 in Fig. 3.4. The optimal pH level for hydrogen production from starch by *Clostridium butyricum* CWBI1009, as well as the optimal pH for H₂ production from glucose, are comparable to those found in the literature and vary depending on the substrate [9-11].

By comparison with the yields recorded for the glucose substrate, the H₂ yields for the starch substrate seem less affected by pH than those for the glucose substrate. By contrast the H₂ production rate from starch decreased sharply at pH levels below 5.6. Moreover, at this optimal pH the hydrogen production rate was about 5 times lower than that recorded for glucose substrate. These results highlight the impact of pH on starch hydrolysis and are consistent with

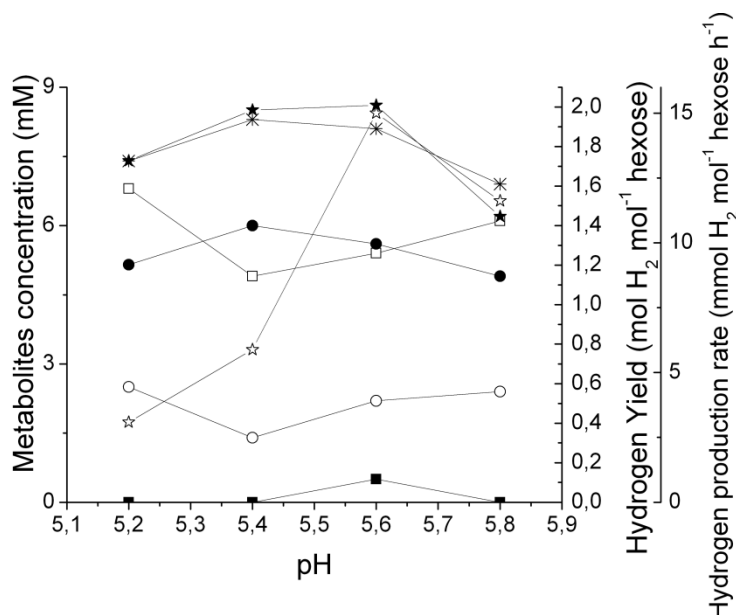


Fig. 3.5: Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 starch fermentation at different pH levels in a 2.3 l sequenced-batch bioreactor. Hydrogen yield (mol H₂ mol⁻¹ hexose), hydrogen production rate (mmol H₂ mol⁻¹ hexose h⁻¹) and final VFA concentrations —■— Lactate —□— Formate —●— Acetate —○— Ethanol —*— Butyrate —★— Hydrogen yield —☆— Hydrogen production rate.

Tab. 3.4: Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 starch fermentation at different pH levels in a 2.3 l sequenced-batch bioreactor.

pH	Carbon converted from starch (%)					
	Lactate	Formiate	Acetate	Ethanol	Butyrate	Sum
5.2	0	9.7	13.8	6.2	41.6	71.3
5.4	0	7.1	14.9	3.4	46.8	72.2
5.6	2.1	10.2	15.7	5.8	44.8	78.6
5.8	0	8.9	13.8	5.3	39.2	67.2

the work of Chen showing that the activity of amylases strongly decreases when the pH is close to 5 [30]. Therefore it seems reasonable to suggest that starch hydrolysis could be the rate-limiting step for H₂ production and that pH 5.6 is optimum for the overall enzymatic and metabolic kinetics. This is in close agreement with earlier works [18, 31, 32]. The metabolites released during each sequence at different pH levels are shown in Fig. 3.5 and the carbon balance in Tab. 3.4. When determining the VFA concentrations at the end of starch fermentation, maximum acetate (6mM) and butyrate (8.3mM) concentrations were observed at pH 5.4. It was also at this pH level that lactate (0mM), formate (4.9mM) and ethanol (1.4mM) were at their lowest concentration. Likewise for H₂ production from glucose substrate (sequences 7 and 8 in Tab. 3.4), butyrate and acetate are the major metabolites and about 70 % of the starch is converted into VFAs or ethanol. Whereas lactate and formate were not produced with the glucose substrate at optimal pH, 10 % of the starch was converted into formate whatever the pH level. The butyrate/acetate ratio, *i.e.* about 1.3, mentioned by Chen et al. [9] is similar to those calculated from the data in Fig. 3.5, but it was lower than those obtained during the glucose fermentation (1,8). In addition they also analyzed propionic and valeric acids that were not detected in our cultures.

4. Conclusions

In this study the strain *Clostridium butyricum* CWBI1009 was characterized as a new hydrogen-producing strain and some culture conditions (pH, substrates and operation mode) were optimized to maximize production of hydrogen. The first step was to determine the optimal pH for cultures using glucose or starch as the substrate. The results confirm that low pH variations caused large variations in the activity of hydrogenases and metabolic pathways [14, 33]. For glucose the maximum yield (1.7 mol H₂ mol⁻¹ glucose) was measured at pH 5.2. For starch a maximum yield of 2.0 mol H₂ mol⁻¹ hexose and a maximum production rate of 15 mol H₂ mol⁻¹ hexose h⁻¹, were obtained at pH 5.6. These results are relevant to the prospects for using effluents from agro-food industries as an organic substrate for fermentative H₂ production. However since such effluents often contain various different substrates, determining and maintaining an optimum intermediate pH level will be crucial to achieve efficient fermentation of the substrate mixture. For instance a sharp decrease (80%) in the hydrogen production rate for starch occurred when the pH decreased from 5.6 to 5.2, while the yield only declined by 14%.

Carrying out the investigations with a pure strain at various different controlled pH levels while tracking all the potential metabolites (*i.e.* formate, acetate, ethanol, lactate and butyrate), provided a better understanding of the metabolic pathways involved and the factors affecting them. The results highlight the important role of parameters such as pH, the nature of the carbohydrate substrate, the growth phase, VFA concentrations and inoculum. Indeed for instance, significant differences in metabolite distribution have been evidenced by comparing our results and those of Wang [25] obtained with another *Clostridium butyricum* strain cultured under similar conditions. In our experiments H₂-producing glucose fermentation at optimum pH 5,2 released acetate and butyrate at respectively 11.2 and 17.1 mM meaning that about 12 % and 40 % of the initial glucose carbon content were converted in these compounds, respectively. Bearing this in mind tests in a sequenced-batch bioreactor were designed to promote the metabolic pathways which release butyrate and acetate, since these pathways are the only ones producing H₂ from carbohydrates. As a result, a 35 % increase in H₂ yield was obtained with removal-addition of 40 % of the culture medium and 15 % more glucose was converted in acetate and

butyrate. In conclusion an analysis of the mass balance of the various metabolites converted from the carbohydrate substrate should be considered in any future studies.

References

- [1] Sivaramakrishna D, Srekanth D, Himabindu V, Anjaneyulu Y, Biological hydrogen production from probiotic wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed microflora, *Renew. Energ.* (2009) 937-40
- [2] Levin DB, Pitt L, Love M, Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 29 (2004) 173-185
- [3] Lee M-J, Song J-H, Hwang S-J, Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation, *Bioresource. Technol.* 100 (2009) 1491-1493
- [4] Kraemer JT, Bagley DM, Improving the yield from fermentative hydrogen production, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 685-695
- [5] Jo JH, Lee DS, Park JM, The effects of pH on carbon material and energy balances in hydrogen-producing *Clostridium tyrobutyricum* JM1, *Bioresource. Technol.* 99 (2008) 8485-8491
- [6] Gomez X, Cuetos MJ, Prieto JI, Moran A, Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions, *Renew. Energ.* 34 (2009) 970-975
- [7] Lin P-Y, Whang L-M, Wu Y-R, Wei J, Hsiao C-J, Li S-L, Chang JS, Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation, *Int. J. Hydrogen. Energ.* (2007) 1728-35
- [8] Skonieczny MT, Yargeau V, Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 34 (2009) 3288-3294
- [9] Chen SD, Lee KS, Lo YC, Chen WM, Wu JF, Lin CY, Chang JS, Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species, *Int. J. Hydrog. Energy.* 33 (2008) 1803-1812
- [10] Pan C-M, Fan Y-T, Zhao P, Hou H-W, Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 33 (2008) 5383-5391
- [11] Liu Y, Yu P, Song X, Qu YB, Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 33 (2008) 2927-2933
- [12] Zhao QB, Yu HQ, Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values, *Bioresource. Technol.* 99 (2008) 1353-1358
- [13] Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS, Chang JS, Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 30 (2005) 1063-1070
- [14] Ying Z, Yang ST, Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*, *J. Biotechnol.* 110 (2004) 143-157
- [15] Fang HHP, Liu H, Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Bioresource. Technol.* 82 (2002) 87-93
- [16] Kataoka N, Miya A, Kiriya K, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water. Sci. Tech.* 36 (1997) 41-47
- [17] Chen CC, Lin CY, Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor, *Adv. Environ. Res.* 7 (2003) 695-699
- [18] Van Ginkel S, Sung SW, Lay JJ, Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration, *Environ. Sci. Tech.* 35 (2001) 4726-4730
- [19] Bergey's, Bergey's manual of systematic bacteriology, London, 1984
- [20] Wang JL, Wan W, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 34 (2009) 235-244
- [21] Chen WH, Sung S, Chen SY, Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 34 (2009) 227-234
- [22] Kim JK, Nhat L, Chun YN, Kim SW, Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 13 (2008) 499-504
- [23] Kapdan IK, Kargi F, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzym. Microb. Tech.* 38 (2006) 569-582
- [24] Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I, Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 27 (2002) 1339-1347
- [25] Wang XY, Jin B, Mulcahy D, Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 33 (2008) 4998-5005
- [26] Chong ML, Rahim RA, Shirai Y, Hassan MA, Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 34 (2009) 764-771
- [27] Matsumoto M, Nishimura Y, Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid, *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2007) 236-241
- [28] Yokoi H, Maki R, Hirose J, Hayashi S, Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes, *Biomass & Bioenergy.* 22 (2002) PII S0961-9534(02)00014-4
- [29] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y, H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*, *Biotechnol. Lett.* 20 (1998) 143-147

- [30] Chen SD, Shen DS, Chen WM, Lo YC, Huang TI, Lin CY, Chang JS, Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1, *Biotechnol. Lett.* 23 (2007) 1312-1320
- [31] Lay JJ, Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen, *Bioeressour. Technol.* 68 (2000) 269-278
- [32] Khanal SK, Chen WH, Li L, Sung SW, Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 29 (2004) 1123-1131
- [33] Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G, Parameters affecting solvent production by *clostridium-pasteurianum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 1233-1239

Chapitre 2.4. Optimisation de la production d'hydrogène par *Clostridium butyricum* CWBI1009 en bioréacteurs : effet de l'immobilisation cellulaire et de la surface d'échange L/G

Les travaux présentés dans les trois chapitres qui précèdent ont permis de comparer les performances de différentes souches pures dans des conditions identiques. Deux souches particulièrement intéressantes de la famille des entérobactéries et des clostridies ont été investiguées plus en profondeur. Au pH optimum de chacune pour la production d'H₂, les rendements sont manifestement différents et à l'avantage des clostridies : 2.5 fois supérieurs à ceux de la souche du genre *Citrobacter*. Les productivités vont dans le même sens : près de 5 fois supérieures pour la souche du genre *Clostridium*. De plus celle-ci s'est montrée capable de métaboliser l'amidon, ce qui est un atout majeur pour une application dans le domaine industriel. En outre, des expérimentations en bioréacteur séquentiel montrent qu'il est tout à fait réalisable de maintenir les performances (productivité équivalente), voire de les améliorer de 35 % au niveau du rendement en conservant 60 % du volume réactionnel et sans ajout récurrent de molécules réductrices. Ces conditions conduisent à une exploitation plus efficace du substrat comparativement à une culture en mode batch. L'analyse des métabolites l'atteste puisque ce sont essentiellement l'acétate et le butyrate qui sont produits lors des expérimentations en SBR : selon la biochimie, ce sont les seuls métabolites solubles associés à une production d'H₂. Ces résultats sont donc encourageant sur la faisabilité d'utiliser une souche pure anaérobie stricte pour produire de l'hydrogène à partir de carbohydrates en bioréacteur continu. Jusqu'à présent, plusieurs paramètres ont été optimisés à savoir le choix de la souche (*Clostridium butyricum* CWBI1009) ; le pH (5.2) et la charge organique minimum (de l'ordre de 2.5 g/L de glucose par jour).

Toutefois, en vue d'augmenter les chances en bioréacteurs de maintenir une culture pure et ses performances, il était indispensable d'étudier les moyens adéquats pour dissocier le temps de rétention des cellules du temps de rétention du liquide au sein du bioréacteur. Des expérimentations en bouteilles non agitées selon le même protocole que celles menées en SBR de 2.3 L ont montré que la souche pure était capable de former des floccs de microorganismes. Ces floccs étant facilement séparables du surnageant de culture par un tamis (1 mm² de maille), il devenait envisageable de les maintenir dans les 60% de volume réactionnel lors du passage d'une séquence à l'autre. Les expériences en bioréacteur de 5 L le démontrent (point 4.1. de ce chapitre). Cependant, l'analyse des rendements en H₂ (plus faibles que lors des travaux précédents) et autres métabolites a soulevé l'hypothèse d'un effet crucial des propriétés de transfert gazeux au sein du milieu de culture. Cet impact a maintes fois été évoqué dans la littérature mais peu souvent quantifié car il est associé à l'impact de la pression partielle en H₂ sur certaines voies métaboliques. Pression partielle qui est difficilement mesurable surtout aux niveaux reconnus comme critiques : de l'ordre de quelques dizaines de Pascal.

Les expériences en bioréacteurs originaux pour le domaine (point 4.2 et 4.3) ont permis de caractériser davantage cet impact du transfert L/G. En plus de permettre la rétention des microorganismes, ils offrent une surface d'échange importante pour permettre à l'hydrogène formé en phase liquide d'être rapidement transféré vers la phase gazeuse.

Le contenu a été soumis dans l'article "Hilgsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., & Thonart, P. "Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and bioreactor with biomass retention"

Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and biodisc anaerobic reactors with biomass retention.

1. Introduction

The fermentative production of hydrogen has drawn increased attention in recent years. This biological process called “dark fermentation” (DF) offers new opportunities to produce “green” energy from various renewable resources and organic wastes. While significant improvements have been made in development of such alternative H₂ production systems, more technical progress and cost reduction needs to occur for them to compete with current large scale technologies e.g. methane-reforming process. By contrast, for local and smaller scale DF and some other biohydrogen production processes would be cost competitive since the feedstocks are available almost anywhere and crucial interest is paid for both energy independence and efficient utilization (Holladay et al. 2009; Kapdan and Kargi 2006; Nath and Das 2011). However, optimization is still needed for DF regarding the bioreactor design, rapid removal and purification of gases, use of cheaper feedstock, genetic and molecular engineering to redirect metabolic pathway (Argun and Kargi 2011; Das and Veziroglu 2008; Hallenbeck 2009; Levin et al. 2004; Show et al. 2011; Sinha and Pandey 2011). Moreover, DF is only likely to be viable as an industrial process if integrated with a process that maximizes energy recovery from the fermentation end-products. The traditional methane-producing anaerobic digestion process is the most promising since about 10 to 30 % more energy could be generated in the two-stage integrated system comparing to a single stage methanogenic process (Guwy et al. 2011). Besides, very prospective processes to convert acetate from DF spent medium exist such as further biohydrogen production (towards the maximum theoretical yield of 12 mol/mol glucose) by photosynthetic non-sulfur bacteria or direct electricity production in microbial fuel cells (Argun and Kargi 2011; Guwy et al. 2011; Perera et al. 2010).

In the past decades, most studies on biohydrogen production processes dealt with suspended culture systems such as the conventional (dis-)continuous stirred tank reactors (CSTR) since they are relatively simple and easy to operate. These investigations, several times reviewed (Bartacek et al. 2007; Jung et al. 2011; Nath and Das 2011; Sinha and Pandey 2011; Wang and Wan 2009), enabled to optimize number of operating parameters such as the inoculum improvement, pH, temperature, hydraulic retention time and other culture conditions. However, cell washout results in low active biomass in these systems (Argun and Kargi 2011; Chu et al. 2011a; Ren et al. 2011). Considering the low biomass in suspended systems, biofilms or microbial aggregates were used in recent years for fermentative H₂ production since they accommodate higher active biomass and fermentation rate (Chu et al. 2011b; Peintner et al. 2010; Zhang et al. 2008b). The reactors employing such immobilization systems, e.g. upflow anaerobic sludge blanket and fluidized bed bioreactors, generally show higher and more stable performances as aggregated cells are more resistant to changes in environmental conditions e.g. temperature, pH, hydraulic retention time, substrate load, etc. (Chu et al. 2011b; Ivanova et al. 2008; Lee et al. 2004; Ren et al. 2010; Show et al. 2011).

Many bacteria and mixed cultures are known to form biofilms, granules or flocs that were characterized by microscopy, physicochemical or biomolecular techniques (Ahn et al. 2005; Fang et al. 2002; Kim et al. 2005; Koskinen et al. 2007; Li and Yu 2011; Liang et al. 2010; Mohan et al. 2010; Zhang et al. 2004; Zhang et al. 2008a). Most of them highlighted that Clostridia were the dominant strains in the mixed microbial populations. However, the ability of pure *Clostridium* hydrogen-producing strains to form stable flocs has not been well studied (Lee et al. 2011). Zhang et al. (2006) tested a *C. acetobutylicum* strain in a trickle bed made of glass beads; Zhu and Yang (2004) tested *C. tyrobutyricum* bacteria immobilized in a cotton-fibrous bed bioreactor; Mitchell et al. (2009) tested the same strain immobilized on porous particles (made of

polyurethane and activated carbon) in a stirred-tank bioreactor and Jo et al. (2008) tested another strain of the same species immobilized on a fixed-bed reactor (polyurethane foam matrix).

The purpose of the experimentations reported in this paper was to study the ability of a pure *Clostridium butyricum* strain to form microbial aggregates in different bioreactor systems in order to improve the culture conditions and performances. The investigations were first carried out in a 5 L bioreactor operated in sequenced-batch (SBR) mode with flocs-retention sieve and without stirring since experiments in 250 mL serum bottles without mixing (not reported here) proved floc formation of pure culture of *C. butyricum* CWBI1009 after a few sequences of SBR.

Specific bioreactors were further designed to both fix biomass and enable rapid liquid to gas transfer of hydrogen produced since H₂ partial pressure is known to strongly affect hydrogen production rates and yields (Angenent et al. 2004; Kraemer and Bagley 2007). Therefore, a horizontal tubular fixed bed bioreactor (HFBR) and an anaerobic biodisc reactor (AnBDR) were experimented. To our knowledge, no biodisc reactor was tested for fermentative H₂ production. By contrast, a horizontal fixed bed bioreactor was used for DF by Leite et al. (2008). However, the expanded clay beads used as support strongly reduced the working volume. Our experiments were carried out with a high void support material also acting as a sieve to retain microbial flocs of *Clostridium* and prevent retention of non biofilm-forming microorganisms. A pure culture was not maintained for the HFBR whereas the culture was pure for the whole experimentation in the AnBDR.

2. Materials and methods

Experimental procedures and culture conditions

The strain *Clostridium butyricum* CWBI1009 was isolated and identified by the authors (Hamilton et al. 2010; Masset et al. 2010). It was maintained in liquid MDT medium (Hamilton et al. 2010; Masset et al. 2010) containing a lower glucose concentration (2 g/l) in order to promote spore formation after the growth phase.

The first tests were carried out in 5 L glass bottles (Schott) filled with 5 L of MDT culture medium. The bottle containing the medium (except cysteine and glucose) with the pH adjusted to 8.5 with NaOH 5N was autoclaved at 120 °C for 20 minutes. The glucose monohydrate was sterilized separately in aqueous solution in order to prevent Maillard reactions between carbohydrates and amino acids. The aqueous cysteine solution was sterilized in hermetically stoppered tubes to prevent its oxidation by ambient air. After the medium had been prepared, sterilized and cooled down, the glucose and cysteine solutions were added sterilely and the medium was inoculated with 500 mL of inoculum. The bottle was capped tightly with a lid equipped with tubings for liquid or gas transfer and gas collection through gas filter (Sartorius Midisart 0.2 µm) One tubing was equipped with flocs-retention sieve (section 1 mm²) used to maintain cell agglomerates inside the bioreactor during the removal of culture medium at the end of each sequence. The bioreactor was flushed after inoculation with sterile nitrogen and then incubated at a temperature of 30°C. Purity check of *Clostridium* cultures was realized by spreading a 100 µL sample on a PCA Petri dish before incubation at 30°C for 24 to 48 h.

The horizontal fixed bed bioreactor (Fig. 4.1) was self-made with a glass cylinder (400 mL total volume) and silicone tubings for liquid or gas transfer and gas collection through gas filter (Sartorius Midisart 0.2 µm). Expanded polypropylene cubes (1.5 cm x 1.5 cm size as used by Tawfik et al. (2006) and forming a 3D sieve of 2 mm² section) were used as immobilization support for microorganisms. The liquid volume in the bioreactor was maintained at 200 mL in order to attain both a larger exchange surface and head-space volume for rapid gas transfer. The bioreactor was flushed after inoculation with sterile nitrogen and then incubated at a temperature of 30°C. The nutrients was pumped from the nutrients feed vessel to the bioreactor. The spent medium was collected separately from the biogas that flowed through a bubble-soap flowmeter and a foam-collecting vessel before being collected in a water replacement equipment filled with KOH 9N (gasmeter).

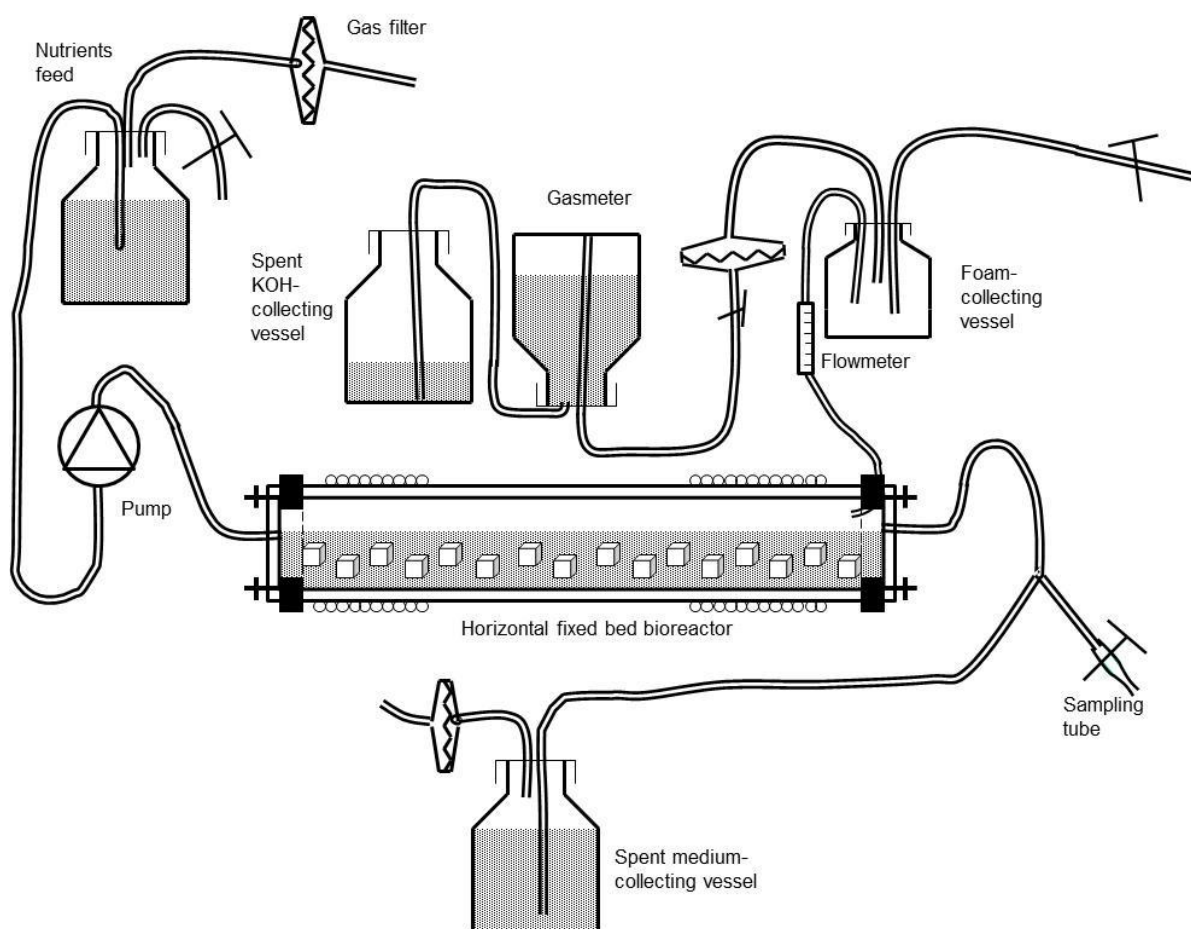


Fig. 4.1. Setup of the horizontal fixed-bed reactor (400 mL total volume and 200 mL liquid medium).

The anaerobic biodisc reactor (Fig. 4.2 A) was composed of a 2.3 L glass vessel with double envelope (Bibby Quickfit JRV2L, UK) and a stainless-steel lid with septum, shaft, pH probe (465-35-SC-P-K9/320, Mettler Toledo), gas filters (Sartorius Midisart 0.2 μm) and silicone tubings for gas outlet and medium removal or addition. The shaft was equipped with a tubular-rotating support (60 RPM; Fig. 4.2 B) to enable floc immobilization. The medium removal tubing was placed at the specific overflow level to maintain the required liquid volume inside the bioreactor (varying from 0.3 to 1.5 L) before being collected in the spent medium vessel. The nutrients were pumped from the nutrients feedstock to the bioreactor using a peristaltic pump. In order to prevent impact of liquid pumping on the gas measurement, the biogas flowed through a foam-collecting vessel and the other vessels containing nutrients and spent medium before being measured in a gas-flowmeter (Ritter, D).

Monitoring and analytical methods

Both a 5l-replacement equipment (filled with KOH 9 N) or a Ritter gasmeter (TG-01) and a ABB catharometric gas analyser (EL1020) were used to monitor the biogas production and composition during the experimentations. The composition of biogas was validated using a gas chromatographer fitted with a thermal conductivity detector as described elsewhere (Hamilton et al. 2010).

Culture samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 μm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate,

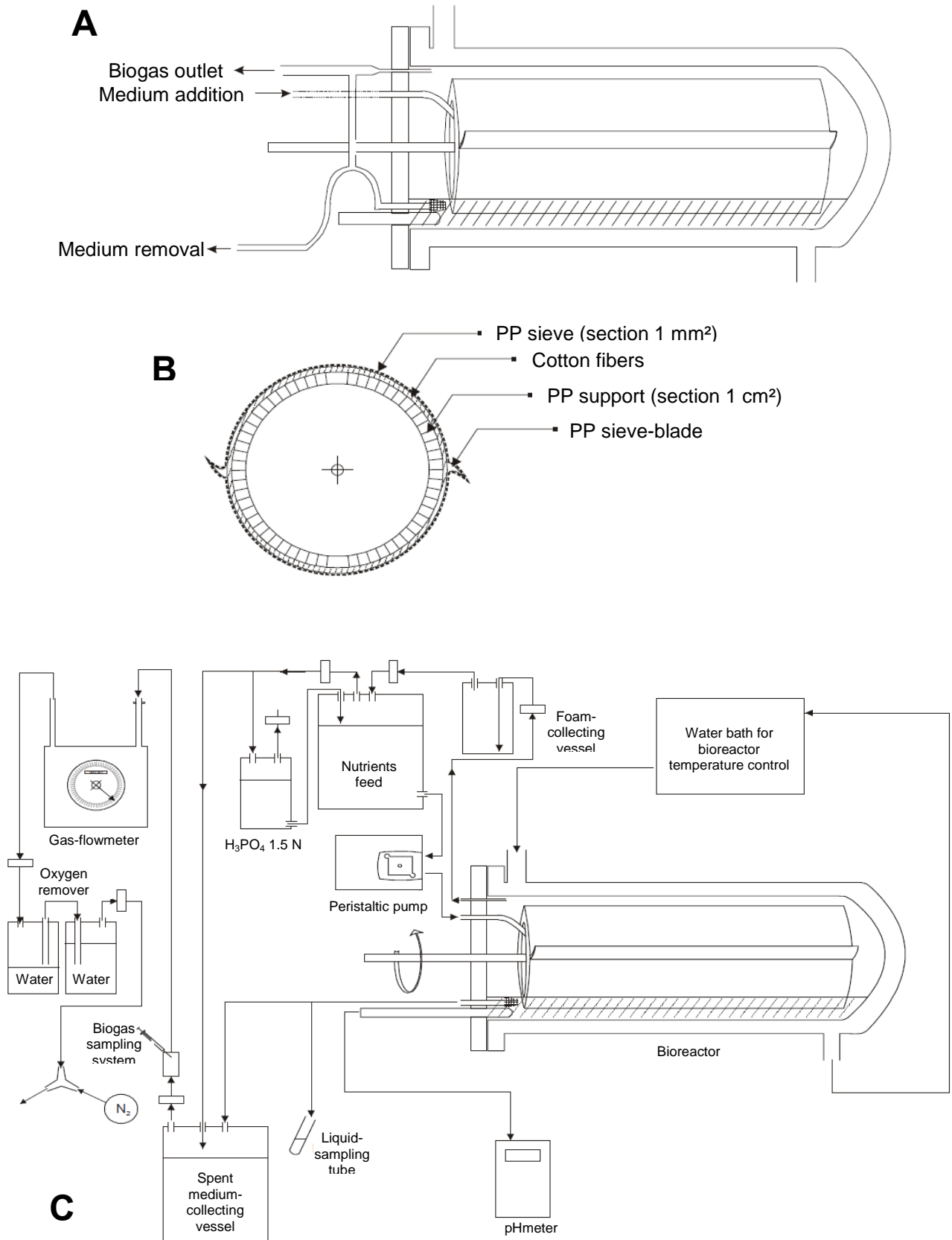


Fig. 4.2. Setup of the anaerobic biodisc reactor : cross-section view (A), section view (B) and complete setup (C).

acetate, propionate, butyrate, and lactate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as described formerly (Masset et al. 2010). The data on the concentrations of glucose and metabolites present in the culture medium were used to calculate the mass balance (MB) of glucose conversion into the major soluble metabolites using the method reported elsewhere (Hamilton et al. 2010).

3. Results and discussion

Hydrogen production in a 5 L bioreactor: effect of mixing and floc formation

- *Study of H₂ production yields*

The fermentative hydrogen production by a pure strain of *Clostridium butyricum* CWBI1009 was monitored in a 5-l bioreactor with glucose substrate. The culture conditions were similar to that used in 250-mL BHP tests described elsewhere (Hilgsmann et al. 2011) except for the total gas pressure. In the experiments reported here, a constant atmospheric pressure was maintained in the vessel during the 8 days of culture due to continuous removal of the biogas and accumulation in a water replacement system (filled with 9N KOH for carbon dioxide capture).

After 24 h of batch culture and complete depletion of the glucose, the hydrogen production decreased and stopped. A hydrogen production yield of 84 mL/g of glucose consumed was achieved *i.e.* 0.68 mol H₂/mol. This result is 26% lower than that obtained with the same strain in 250 mL serum bottles (Hilgsmann et al. 2011). This could be related to the different partial pressure and H₂ supersaturation in the culture medium as reported by Kraemer and Bagley (2006). A sequenced-batch reactor (SBR) mode was further performed as investigated before (Masset et al. 2010) with removal-addition of 40 % of the culture medium at each sequence and addition of glucose monohydrate to 5g / L. The removal of the culture medium was carried out through tubing equipped with floc retention sieve (section 1 mm²). Indeed experiments not reported here showed floc formation of pure *C. butyricum* CWBI1009 cultures after a few sequences of SBR in 250 mL serum bottles without mixing. Zhang et al. (2004) and many authors already mentioned floc formation containing *Clostridium* hydrogen-producing strains. The experiments reported here confirm these observations and that the sieve used at each sequence for the removal of spent culture medium was suitable to keep large flocs inside the bioreactor. It is to notice that floc formation occurred in the bioreactor without any acid treatment of the inoculum as mentioned by Zhang et al. (2008c). A mean H₂ yield of 0.62 ± 0.005 mol/mol glucose consumed was achieved for a series of three sequences carried out in these conditions. The low standard deviation indicates a relative stability of the process that is promising for further developments at higher scale. However, the yield was 8% lower than during the batch culture.

A second series of 4 similar sequences was carried out with gentle mixing (60 RPM performed by a magnetic stirrer bar). A H₂ production yield of 1.17 ± 0.02 mol/mol glucose was achieved. This result is 73% higher than the yield reported for the batch culture and is in accordance with Lamed et al. (1988) who achieved 1.5 to 3 fold higher H₂ yields in stirred vessels compared to unstirred cultures. Furthermore, the results reported here should be related to the 2.3 mol H₂/mol glucose recorded by Masset et al (2010) in a 2.3 L SBR completely mixed with the same strain. However, their pH was controlled at the optimal value of 5.2 whereas in the 5 L bioreactor the pH varied from 6.9 ± 0.1 to 5 ± 0.1. Therefore pH control at the optimal pH enabled to achieve H₂ yield about twice higher than without pH control.

- *Study of soluble metabolite yields*

Regarding the soluble metabolites produced from glucose, the Fig. 4.3 shows that the SBR mode without mixing, compared to that with mixing, leads to a higher production of lactate and formate which is balanced by a lower production of butyrate. These results are in accordance with those mentioned by other authors (Masset et al. 2010; Wang et al. 2008). More precisely, taking into account the carbon mass balance of glucose conversion to metabolites (Tab. 4.1), the percentages may be compared to those recorded by Masset et al (2010) in a 2.3 L SBR with pH control. The formate yield (about 24%) was higher in the 5 L experiments than in the 2.3 L

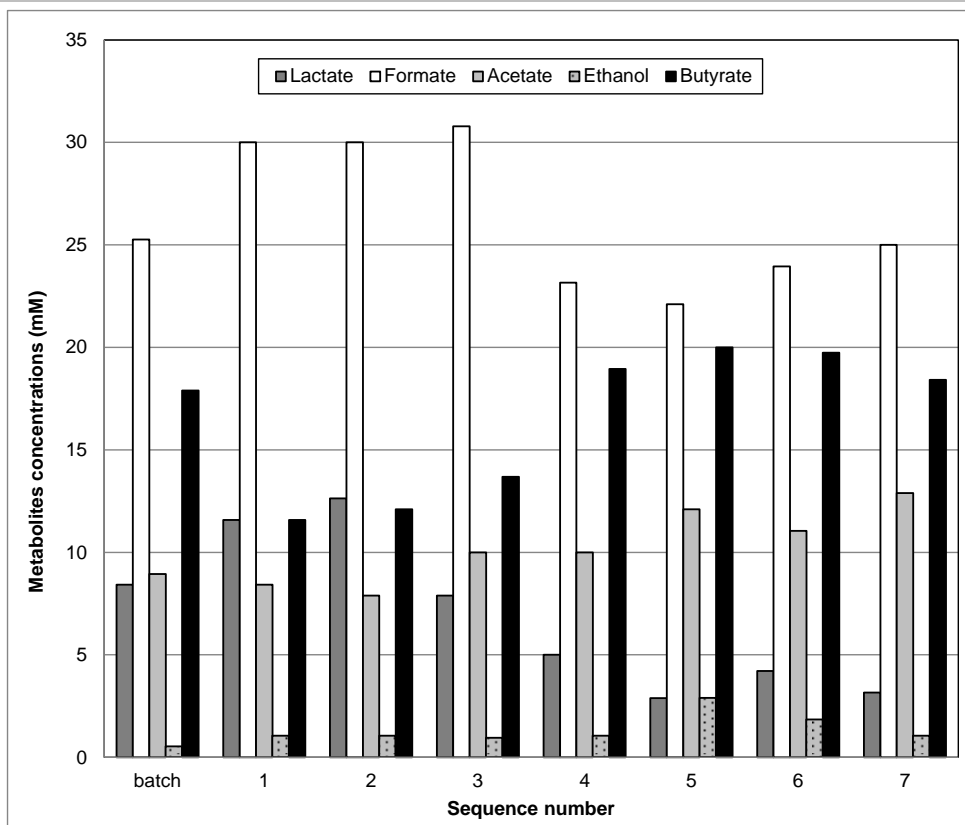


Fig. 4.3. Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 glucose fermentation in a 5 L SBR with floc retention. Sequences "batch" 1 to 3 were performed without mixing; sequences 4 to 7 were performed with gentle mixing (60 RPM).

bioreactor whatever the culture conditions. Indeed, the formate yield in the 2.3 L bioreactor was of 19.1 and 8.1 % for batch cultures at pH 7.3 and 5.2 respectively (these pH values correspond to the limits of the pH range in uncontrolled pH culture in the 5 L bioreactor). Moreover, SBR mode in the 5 L bioreactor did not enabled to considerably decrease the formate yield as achieved in 2.3 L SBR at optimal pH (with a formate yield of 0.06 %). This suggests that the uncontrolled pH is not the sole parameter involved in the high formate and low butyrate and acetate production as well as their associated H₂ production (Wang and Wan 2009). As highlighted by many authors (Angenent et al. 2004; Kraemer and Bagley 2006; Kraemer and Bagley 2007), the effect of H₂ partial pressure and gas-liquid transfer coefficient should be considered as major improvement parameters to investigate. It is easily understandable that both these parameters are less favourable for DF in the 5 L bioreactor than in the 2.3 L bioreactor and furthermore in the 250 mL serum bottles.

- Study of floc formation

Regarding the biomass, floc formation was observed already at the end of the batch culture and was amplified during the further sequences. The phase-contrast microscope observations of the

Tab. 4.1. Metabolite analysis of *Clostridium butyricum* CWBI1009 glucose fermentation in a 5 L SBR with floc retention. Carbon mass balance for the batch sequence and average balance for the 3 sequences without mixing and the 4 sequences with gentle mixing (60 RPM).

	Lactate	Formate	Acetate	Ethanol	Butyrate
Batch sequence	9	25	9	0	18
Without mixing	12	26	10	2	13
With mixing	4	22	11	3	19

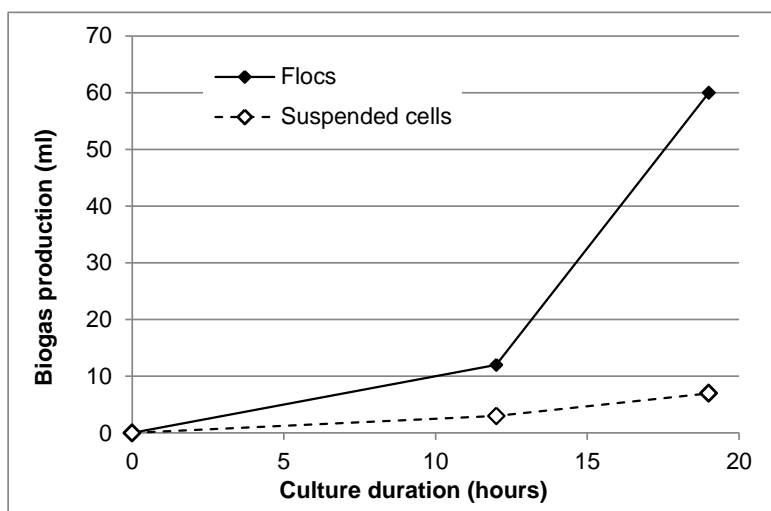


Fig. 4.4. Investigation of biogas production from glucose by a pure culture of *C. butyricum* CWBI1009 inoculated with 3mL of suspended cells or floccs sampled from a 250 mL culture.

floccs collected at the end of the experiment showed dense microorganisms agglomeration as reported by Van Ginkel and Logan (2005). Floccs settled in the vessel and suspended cells were collected separately (using the 1 mm² section sieve) and used as inoculum (3 mL) for 250 mL BHP tests in order to compare the viability and performances of the microorganisms. A 6-fold higher H₂ production was achieved (Fig. 4.4) after 18h of culture in the bottles inoculated with floccs. This result confirms the high potential of cell retention to improve H₂ production performances due to biofilm formation with the pure *C. butyricum* CWBI1009 strain.

Hydrogen production in a 400 mL horizontal fixed bed bioreactor

In further experimentations, specific bioreactors were designed to enable cell immobilisation and increase the L/G exchange surface in order to improve H₂ gas transfer from liquid to gas phase since H₂ partial pressure higher than 60 Pa have a negative impact on hydrogen yields (Angenent et al. 2004).

In a first step, a horizontal fixed bed bioreactor was used to study the effect of these conditions on H₂ production from glucose and investigate how cell immobilisation may enable to maintain pure culture. The L/G surface exchange in this bioreactor (140 cm² of clear area without taking the presence of the immobilisation support into account) is similar to that of the 2.3 L bioreactor (95 cm²) whereas the maximum liquid depth was about 13 times lower (1.8 cm and 24 cm respectively). The bioreactor (non sterile) was filled with 200 mL of sterile liquid medium and inoculated with 100 mL of pure *C. butyricum* CWBI1009. No other care was taken to maintain the pure culture inside the bioreactor. After a few days of culture and along the whole experiment a relatively homogenous population of about 10⁸ cells of *bacillus*-like bacteria was regularly measured in the culture medium sampled from the bioreactor. The pH of these samples also stabilized at 5.9±0.2 during the experimentation.

After the batch culture, a first series of experiments in SBR mode involved 20 sequences of removal-addition of 80 mL of culture medium (*i.e.* 40% of total liquid volume as performed with 2.3 L and 5 L bioreactors) containing 5 g/L glucose. The measures before day 6 are not shown due to inefficient gas collection.

- Study of H₂ production yields and HPR

Fig. 4.5 shows progressive and regular increase of cumulative H₂ production except between day 10 and 13 and between day 18 and 20 corresponding to a longer sequence duration respectively

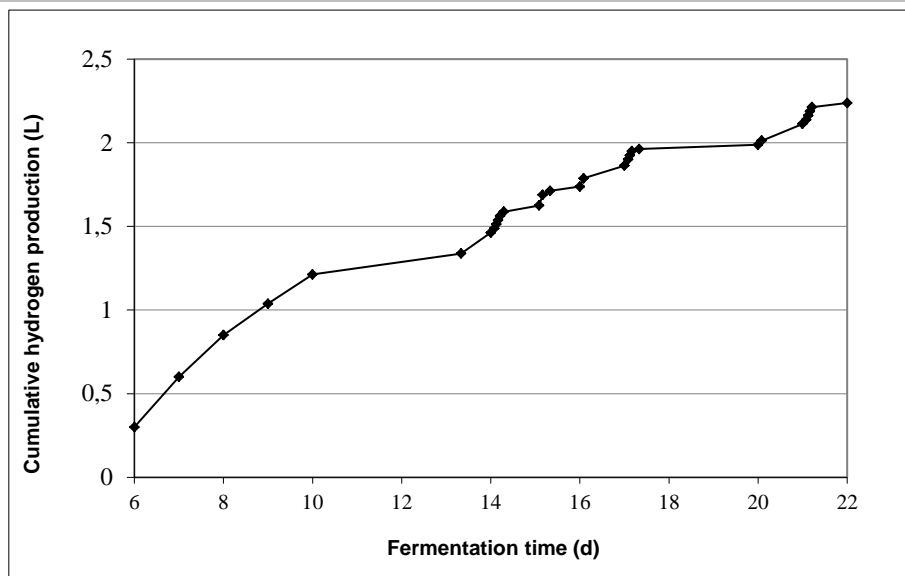


Fig. 4.5. Cumulative hydrogen production from glucose in a 400 mL horizontal fixed-bed reactor inoculated with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009.

with and without removal-addition of fresh culture medium. After 13 days a relatively stable process was achieved with a mean production rate of 125 mL H₂/day. The corresponding H₂ yield reached 312 mL/g glucose consumed *i.e.* 2.5 mol H₂/mol glucose. This result is similar to the 2.3 mol H₂/mol glucose recorded with the 2.3 L SBR.

H₂ production starts rapidly after substrate addition and for sequences at day 14, 17 and 21, it is shown that the majority of the H₂ cumulated volume was released during an average of 6 h (Fig. 4.5). This suggests that sequences shorter in time might be performed in the next experimentations. The further series of experimentation in this bioreactor were carried out in pseudo continuous mode with removal/addition of 30 mL liquid volume at higher frequency than in the former SBR mode. Finally the continuous mode was investigated. Tab. 4.2 describes the different operating parameters used for the 400 mL HFBR.

Analysis of the removed medium between each sequence showed that glucose was completely metabolised. The biogas flowrate was measured several times per day using a bubble soap flowmeter connected to the bioreactor preceding the gasmeter equipment. The hydrogen content in the biogas was regularly measured at an average of 80±2 % H₂ and 20 ±2 % CO₂ by gas chromatography. High H₂ concentration of 70 to 79% in gas phase was also reported by Zhang et al. (2006) in an unsaturated flow reactor. However the low CO₂ content would also be related to CO₂ absorption in the unstirred liquid medium and in the replacement equipment (Kraemer and Bagley 2007).

Tab. 4.2. Successive operating conditions investigated in a 400 mL horizontal fixed-bed reactor inoculated with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009.

Pseudo hydraulic retention time (h)	60	23	11	8	6	4	1.4
Number of sequences per day	1	7	14	21	28	42	continuous
Liquid volume removal/addition per sequence (ml)	80	30	30	30	30	30	continuous
Glucose load per hour (g)	0.017	0.04	0.09	0.13	0.18	0.26	0.72
Glucose loading rate (g/l.h)	0.083	0.22	0.44	0.66	0.88	1.31	3.60
Experimental period with the related mode (days)	1-22	22-34	34-41	41-45	48-50	50-52	52-53

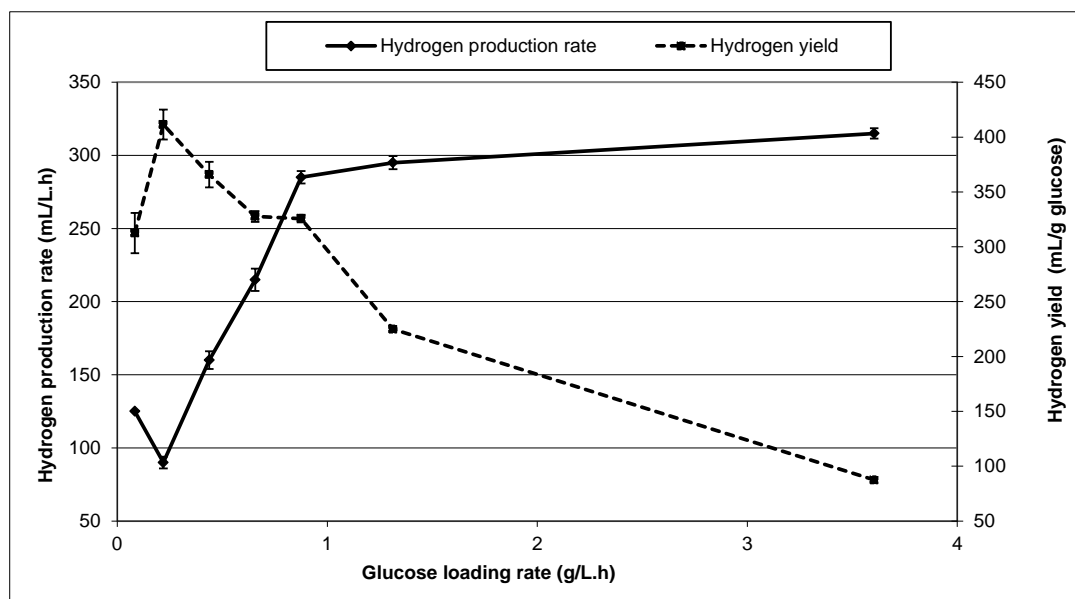


Fig. 4.6. Evolution of hydrogen production rate per litre of culture medium and yield versus glucose loading rate in a 400 mL horizontal fixed-bed reactor inoculated with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009.

The H₂ production rate was calculated as the product of the biogas flowrate and the H₂ content. The results were in accordance with the average H₂ production rate measured with the replacement equipment (with KOH) during the period of time between two addition/removal of culture medium. Indeed, during that time the measurement of the cumulative H₂ production was relevant and not affected by any other flow (such as pump flow) since the H₂ flow was the sole flow exhausting from the bioreactor.

Fig. 4.6 depicts the H₂ production rate and yield versus glucose loading rate (GLR) including the maximum HPR recorded for the first series of experiment at a GLR of 0.083 g/L.h. For better comparison with the results of section 3.3. the HPR is reported to a 1 L liquid volume. It increases constantly from 90 mL H₂/L.h to 285 mL H₂/L.h with the GLR increasing from 0.22 to 0.88 g/L.h. By contrast the H₂ yield slightly decreases from 411 mL/g (3.3 mol H₂/mol glucose) to 326 mL/g (2.6 mol/mol) respectively. This yield is similar to that recorded for SBR mode (Fig. 4.5) with a pseudo HRT of 60 h *i.e.* at a GLR of 0.083 g/L.h. The HPR and yields reported at a GLR of 0.22 g/L.h are consistent with the results reported by Van Ginkel and Logan (2005 at a HRT of 10 h) and Mitchell et al. (2009 at a HRT of 16.7 h) in similar loading and physico-chemical conditions. At a GLR higher than 0.88 g/L.h, only a marginal increase of HPR could be observed. By contrast, the H₂ yield dramatically decreased to 225 mL/g and 87 mL/g (0.7 mol/mol) respectively at a GLR of 1.31 and 3.6 g/L.h. Therefore an important amount of glucose was consumed for other metabolic pathways than H₂ production. These results suggest that the HRT of 6h and the organic loading rate of 0.88 g/L.h are the maximum affordable conditions for H₂ production by the *C. butyricum* CWBI1009 in mixed culture. They are confirmed by the study of soluble metabolites.

- *Study of soluble metabolite yields*

Relatively specific metabolites distributions were recorded according to the different HRT as depicted in Fig. 4.7 and Tab. 4.3. During the first 10 days of culture in our bioreactor the major metabolites *i.e.* butyrate and acetate were associated with *Clostridium* strain activity since the related yields from glucose (Tab. 4.3) were similar to that recorded by Masset et al (2010) in sequencing-batch conditions. After each change of operating mode, a stable distribution of metabolites was achieved within a period of about 6 times the HRT as also reported by Jo et al. (2008). Their experimentations were carried out with a pure *C. tyrobutyricum* strain cultured in similar medium conditions in a fixed bed column packed with a high void support as in the 400 mL

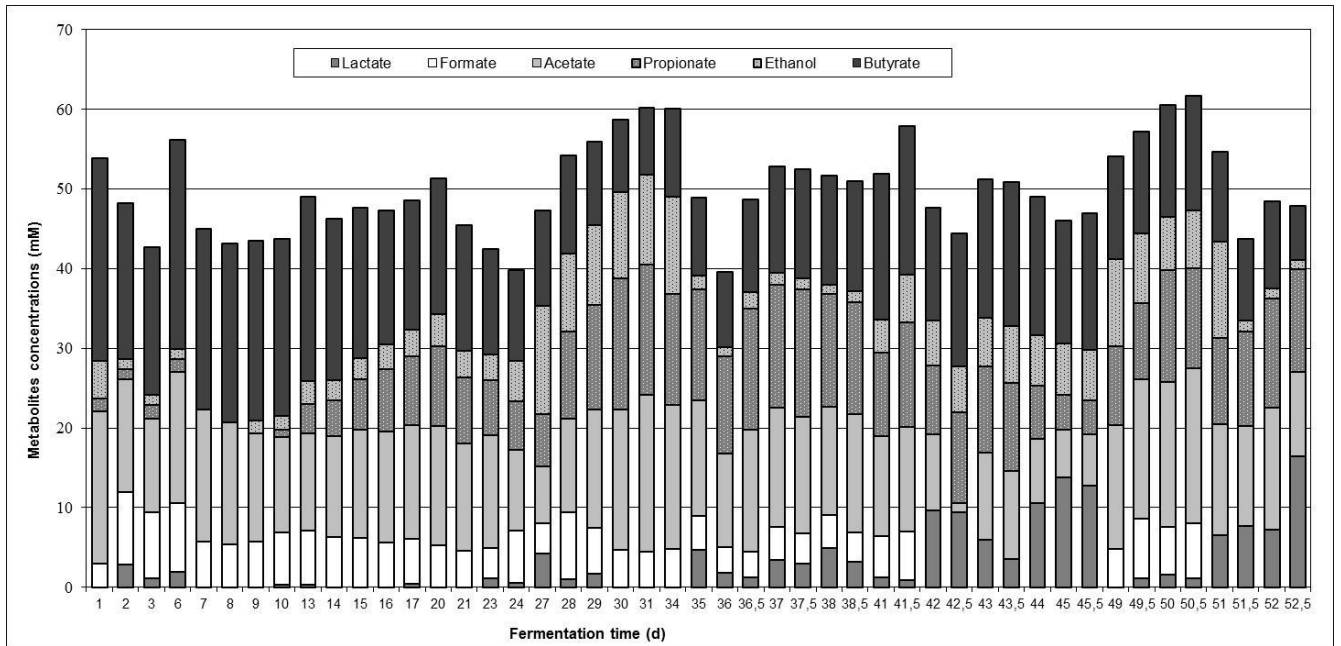


Fig. 4.7. Metabolite analysis in the culture medium at the end of the sequences related to the different GLR in a 400-mL horizontal fixed-bed reactor inoculated with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009.

HFBR. Comparing to the metabolites profile of Fig. 4.7, Jo et al. (2008) at HRT higher than 2h, measured a 2-fold higher butyrate concentration. By contrast their HPR and both acetate and H₂ yields were 2-fold lower than ours. These different metabolite distributions should be related to the different *Clostridium* species involved in our and their experiments since high butyrate yields and low acetate yields were also reported by Mitchell et al (2009) with another *C. tyrobutyricum* strain.

Comparing to the results reported in section 3.1 the distribution of the metabolites detected in the 400-mL HFBR is in favour of H₂ production. Indeed the formate yield was about 4 to 5-fold lower than in the 5 L mixed bioreactor and about half of that recorded in the 2.3 L batch bioreactor at pH 5.85 (Masset et al. 2010). Therefore the decreasing of formate yield and increasing of acetate, butyrate and H₂ yields should be related to increasing H₂-L/G transfer (Angenent et al. 2004) and not only to stirring or pH control in the culture medium.

A relatively low production of propionate (not exceeding 3 % of carbon converted from glucose) is recorded during some of the sequences performed during the first 10 days of culture. This is in

Tab. 4.3. Carbon mass balance at the end of the sequences related to the different GLR in a 400 mL horizontal fixed-bed reactor inoculated with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009. For a GLR of 0.083 g/L.h, two periods were considered : the sequences of days 1 to 10 whereas the pure strain was dominant and those of days 13 to 21.

GLR (g/L.h)	Lactate	Formate	Acetate	Propionate	Ethanol	Butyrate
0.083 (1-10)	1.8	4.7	15.3	1.2	0.4	51.2
0.083 (13-21)	0.1	3.2	16.7	15.5	4.1	40.6
0.22	2.0	3.2	17.0	20.3	11.4	26.4
0.44	5.3	2.9	19.8	29.4	3.2	37.3
0.66	17.0	0.0	9.1	14.7	7.5	39.8
0.88	1.8	3.8	21.2	20.8	10.1	32.4
1.31	13.0	0.0	16.7	21.8	5.9	26.1
3.6	29.6	0.0	12.8	23.2	1.4	16.3

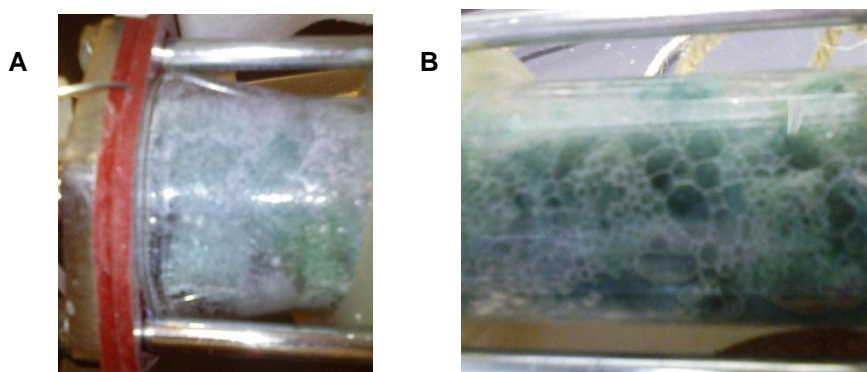


Fig. 4.8. Biofilm and biogas bubbles development on expanded polypropylene support in a 400 mL horizontal fixed-bed reactor inoculated with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009.

accordance with the presence of other microorganisms than the *C. butyricum* CWBI1009 strain, already observed in the first sequence. After day 13 and until the experimentation was set in continuous mode (at day 52 and at a GLR of 3.6 g/L.h) a higher propionate concentration was measured in the culture medium with a related carbon recovery from glucose of about 15 to 30 %. However at a GLR of 0.66 g/L.h the propionate yields and also the whole fermentation profile seemed quite different than those for other GLR values. Therefore, while those conditions led to a similar H_2 yield than for a GLR of 0.88 g/L.h, they should be considered as unfavourable for the process as well as those with the highest GLR in continuous mode. In these conditions other microorganisms would progressively outcompete *C. butyricum* CWBI1009. As a consequence a HRT of 6 h and a GLR of 0.88 g/L.h can be considered as the optimal condition for H_2 production rate and yield but also for metabolite distribution since a high yield is recorded for cumulated acetate and butyrate (53.6% of carbon converted from glucose). Moreover higher H_2 production performances would be expected at this GLR with pure culture since no or relatively low amount of propionate, ethanol and formate would be produced.

- *Study of biomass*

Regarding biomass, as seen on Fig. 4.8A biofilm developed on the immobilisation support (about completely covered) in the first quarter of the bioreactor length. The other part of the bioreactor volume was filled by biogas bubbles (Fig. 4.8B). They confirm the relevance of a bioreactor with biomass immobilisation and large surface exchange for efficient L/G transfer. The experimentation reported in this section also demonstrated the need for mixing or for intermediate sampling along the bioreactor length in order to investigate the distribution of metabolites in the bioreactor. This system would be considered as a piston-like reactor regarding the liquid medium flow.

Hydrogen production in a 2.3 L biodisc reactor

A third type of bioreactor was designed to investigate H_2 production in optimal conditions of mixing, homogeneity, L/G transfer and biomass immobilisation. The anaerobic biodisc reactor (AnBDR, Fig. 4.2) enables to distribute substrate equally on the biofilm, to collect homogeneous

Tab. 4.4. Successive operating conditions investigated in an anaerobic biodisc reactor with the pure strain *C. butyricum* CWBI1009.

HRT (h)	10.9	6.6	10.9	6.6	3.9
Volume of liquid phase (ml)	500	500	500	500	300
Liquid volume removal/addition per hour (ml)	46	76	46	76	76
Glucose load per hour (g)	0.21	0.34	0.52	0.86	0.86
Glucose loading rate (g/L h)	0.42	0.68	1.04	1.72	2.87
Experiment duration with the related HRT (days)	2	1	1	1	9

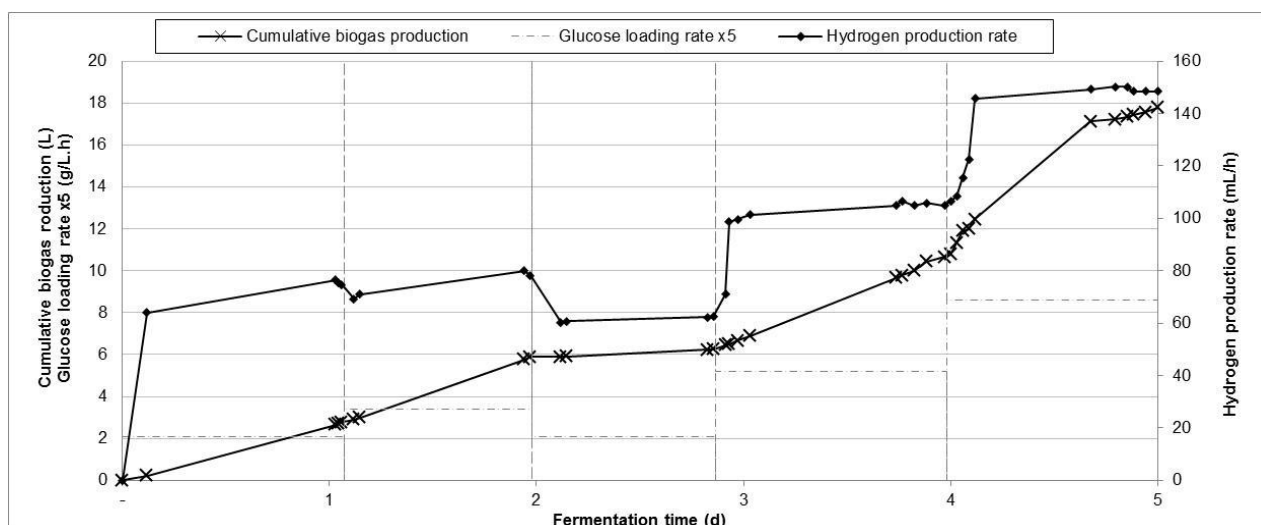


Fig. 4.9. Cumulative biogas production and HPR during the pure culture of *C. butyricum* CWBI1009 in a 2.3 L anaerobic biodisc reactor containing 500 mL of culture medium (First step of the AnBDR operation)

liquid samples, to prevent H₂ supersaturation in the liquid phase and to limit substrate consumption for biomass growth. In order to maximize the control of purity, the bioreactor was sterilised empty and inoculated under a nitrogen gas flow by transferring (at a flowrate of 76 mL/h) a 5 L culture carried out in a SBR (see section 3.1). The liquid volume exceeding 1.5 L was sterilised empty and inoculated under a nitrogen gas flow by transferring (at a flowrate of 76 mL/h) a 5 L culture carried out in a SBR (see section 3.1). The liquid volume exceeding 1.5 L was removed continuously and flocs of biomass were let to settle inside the tubular-rotating support. Following that operation the bioreactor was operated for 14 days with continuous addition of fresh culture medium and removal of spent medium exceeding 500 mL in the first step and 300 mL in the second step.

The biogas production rate was measured with a gas-flowmeter and H₂/CO₂ composition determined by a gas analyser. During the experimentation the H₂ content in the biogas stabilized at 64 ± 3 %. Four different glucose loading rates (GLR) ranging from 0.42 to 2.87 g/L.h were tested as mentioned in Tab. 4.4 with the related HRT.

Cysteine was used as reducing agent only for the first 48 h of culture. While this compound was not added in the following operations, the anaerobiosis was maintained in the bioreactor without affecting the pure culture performances. The purity checks performed regularly did not reveal contamination. A second test at a GLR of 0.42 g/L.h was carried out after the operation at 0.68 g/L.h since the first one was affected by residual glucose from the pre-culture and a pH of 5.5±0.2, slightly higher than the pH recorded for the other operation *i.e.* 5.1±0.3.

- Study of the performances of the AnBDR with 500 mL culture medium

The evolution of cumulative biogas production and HPR are presented in Fig. 4.9 for the first step of the AnBDR operation. It shows that the HPR stabilized about 5 h after the changing of operating parameters *i.e.* faster than in the 400 mL HFBR due to mixing in the AnBDR. The HPR increases with increasing GLR up to 1.04 g/L.h without glucose accumulation. At a GLR of 1.72 g/L.h a residual glucose concentration of 2.3 g/l was measured in the spent medium. This suggests that the culture would operate without any limitation (glucose accumulation) at a maximum GLR of 1.36 g/L.h. However, as shown on Fig. 4.10 reporting the mean HPR and yields versus GLR, the H₂ yield decreases of 23 % (*i.e.* from 286 mL/g to 220 mL/g, respectively 2.3 to 1.8 mol H₂/mol glucose consumed) with increasing GLR from 0.42 to 1.72 g/L.h. It is to notice that the yield of 286 mL/g recorded at a GLR of 0.42 g/L.h and a load of 0.21 g/h glucose added to the culture medium is consistent with the H₂ yield estimated for the same glucose load in the 400 mL HFBR (*i.e.* 273 mL/g at a GLR of 1.05 g/L.h). The results are further discussed in section 3.4.

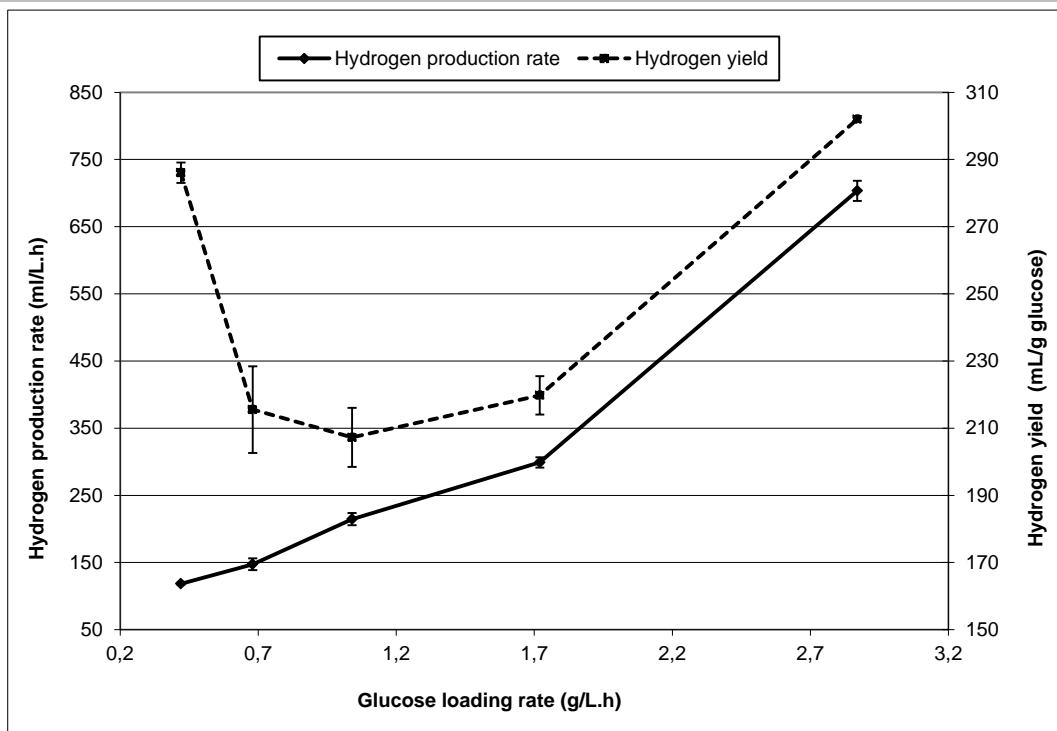


Fig. 4.10. Hydrogen production rate and yields versus glucose loading rate during pure culture of *C. butyricum* CWBI1009 in a 2.3 L anaerobic biodisc reactor containing 500 mL of culture medium (only the results of the second test at a GLR of 0.42 g/L.h are reported in this Fig.) or 300 mL (results at a GLR of 2.87 g/L.h).

- Study of the performances of the AnBDR with 300 mL culture medium

In the second step the bioreactor was operated with the same glucose load of 0.86 g/h but the volume of liquid culture medium in the bioreactor was reduced from 500 to 300 ml. Therefore the GLR was of 2.87 g/L.h. Fig. 4.11 shows the evolution of the cumulative biogas production and H₂ production rate during the 9 days of operation. Continuous H₂ production was recorded following the activity of the former step. However the pH (4.8) measured in the spent culture medium was lower than the optimum value of 5.2 and the glucose residual reached 4 g/L. Therefore the pH in the feed was progressively adapted with KOH 1.5 N in order to reach optimum and stable conditions of pH for H₂ production at day 3 (the mean pH at day 2 was of 5.1±0.3). As a consequence the HPR increased progressively to stabilize at 211 mL H₂/h between day 4 and 6.

Moreover the glucose residual concentration decreased to 2 g/L leading to a H₂ yield of 302 mL/g glucose (2.4 mol/mol) *i.e.* about 30 % higher than in the first step with 500 mL culture medium. It should be mentioned that a similar glucose consumption rate of about 0.7 g/h was measured in both conditions suggesting a stable maximum population in the bioreactor. Such a maximum affordable glucose consumption corresponding to a GLR of 2.34 g/L.h was confirmed during days 6 to 8 where the pH was regulated at pH 5.6±0.05 aiming to test the effect of pH on H₂ production in these culture and bioreactor conditions by comparison to the effect discussed by Masset et al (2010). As shown on Fig. 4.11 the H₂ production rate decreased to 190±10 mL/h and the H₂ yield decreased to 270 mL/g glucose consumed (2.2 mol/mol).

These results confirm that the optimum pH for H₂ production from glucose by the strain *C. butyricum* CWBI1009 is about 5.2 (Masset et al., 2010). Compared to that study the H₂ yield recorded in this work is similar to the 2.3 mol/mol at pH 5.2 reported by Masset et al. (2010) in the 2.3L SBR. However, they are about twice the results achieved at similar GLR in the 400 mL HFBR. Before being discussed further in section 3.4, these results should be related to soluble metabolites distribution. H₂

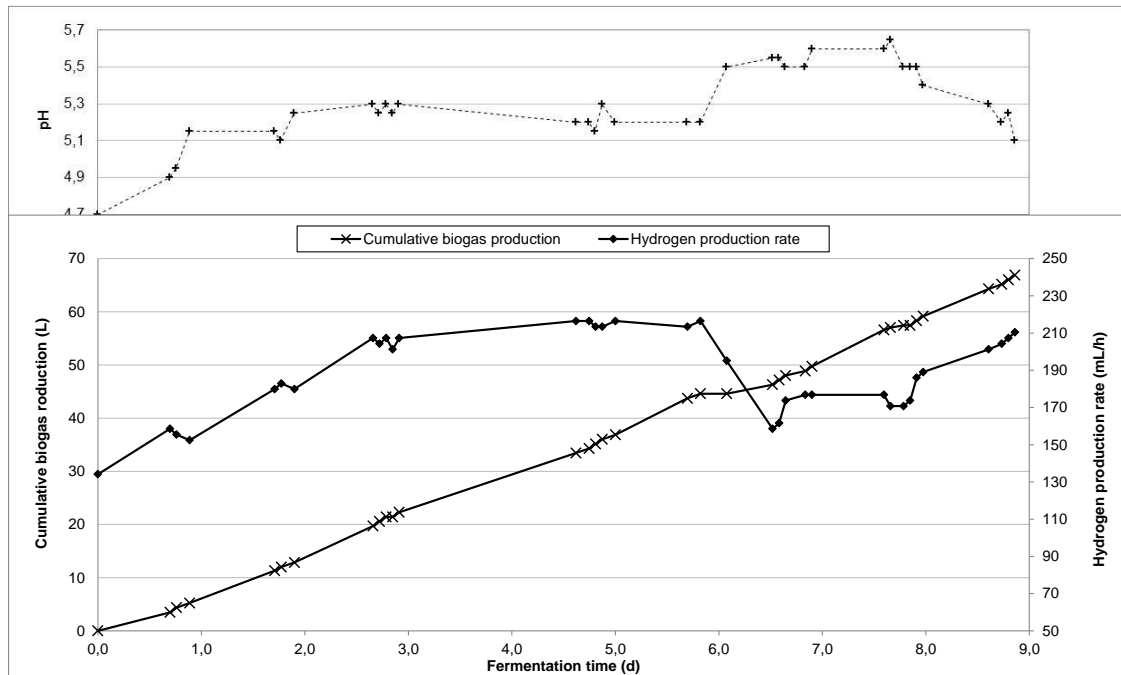


Fig. 4.11. Cumulative H_2 production and HPR during pure culture of *C. butyricum* CWBI1009 in an anaerobic biodisc reactor containing 300 mL of culture medium. (Second step of the AnBDR operation)

- Study of soluble metabolites yields

The analysis of the carbon mass balance (Tab. 4.5) shows that the highest H_2 yield is correlated with high acetate and butyrate production. According to Tab. 4.5 the metabolite yields are stable with an average acetate and butyrate yields of 29 ± 2 and 42 ± 3 calculated all over the experimentation excluding the 1st day. These yields are respectively about 50 % higher and 20 % lower than those achieved in 2.3 L SBR in similar physico-chemical conditions except for L/G transfer parameters. The improved H_2 transfer conditions from liquid to gas phase experimented in the AnBDR enabled to achieve a HPR (reported to the liquid volume in the bioreactor) about 5.5 fold higher ($703 \text{ mL } H_2/L \text{ h}$) compared to the $126 \text{ mL } H_2/l \text{ h}$ for the 2.3 L SBR.

No propionate was detected in the spent culture medium. This confirms that pure culture of *Clostridium butyricum* was maintained in the bioreactor. Biofilm growth was observed on the immobilisation support (Fig. 4.12).

Tab. 4.5. Average carbon mass balance related to different hydraulic retention times in an anaerobic biodisc reactor with a pure culture of *C. butyricum* CWBI1009 (the results of days 8 to 11 are related to a pH at 5.2).

Liquid phase volume (ml)	Duration (d)	Lactate	Formiate	Acetate	Ethanol	Butyrate
500	1	14	4	26	2	38
500	2	0	2	30	0	45
500	3	0	1	27	0	46
500	4	3	0	26	1	38
500	5	3	0	28	1	47
300	6	5	0	30	0	44
300	7	4	0	30	1	43
300	8	2	1	29	1	39
300	9	2	0	28	1	41
300	10	2	0	29	1	40
300	11	5	0	28	1	41
300	12	4	1	31	1	40
300	13	3	0	30	1	41
300	14	4	0	34	1	47

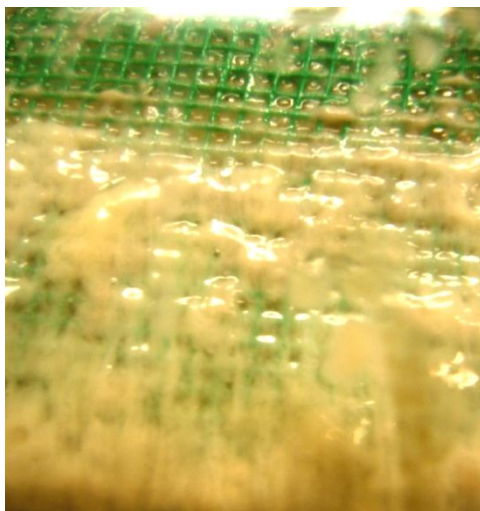


Fig. 4.12. Biofilm growth of *C. butyricum* CWBI1009 on the polypropylene immobilisation support in an anaerobic biodisc reactor.

General discussion about hydrogen production performances in (pseudo-) continuous bioreactors

The different HPR and H₂ yields recorded versus GLR in both bioreactors tested and some of the highest performances reported in the literature are reviewed in Fig. 4.13. Though the yields and also the HPR recorded in the AnBDR were 30% lower than in the HFBR (Fig. 4.6) a similar decrease in yields was evidenced in the HFBR with GLR increasing from 0.22 to 1.04 g/L.h. A same trend was reported by Van Ginkel and Logan (2005) with H₂ yields decreasing from 348 to 236 mL/g with GLR increasing from 0.23 to 1.82 g/L.h. At higher GLR, up to 9.1 g/L.h, their yields stabilized at 246.8 ± 14.5 mL/g. Recently Chu et al. (2011b) confirmed the trend for GLR varying from 2.34 to 18.75 in three different bioreactors with suspended sludge (SS) or granules in two configurations (height to diameter ratios H/D of 3.2 and 9.1). De Amorim et al. (2009) observed a quite different trend with increasing GLR. However, other parameters would be strongly influenced considering the high H/D ratio of 36 of their reactor.

In our experiments with a *C. butyricum* CWBI1009 pure strain a stable H₂ yield was already achieved in the AnBDR for a GLR varying from 0.68 to 1.72 whereas in the HFBR with mixed culture it dramatically decreased at GLR higher than 0.88 g/L.h. This confirms that in the HFBR other microorganisms (non H₂ producers) were progressively competing with the *Clostridium* strain for the glucose substrate.

Therefore taking into account that the HPR stabilized in this bioreactor at a GLR higher than at a GLR of 0.88 g/L.h it can be assumed that the *Clostridium* strain had achieved its maximum population and contributed to glucose consumption for H₂ production at a yield of about 325 mL/g (*i.e.* that obtained at a GLR of 0.66 and 0.88 g/L.h). A yield of that order was reached by the pure culture in the AnBDR with 300 mL liquid medium (GLR of 2.87 g/L.h). It is about 30% higher than that achieved in the same bioreactor with 500 mL liquid medium and the same glucose consumption rate. Chu et al. (2011b) also mentioned H₂ yields higher in a bioreactor with a high H/D ratio than with a lower ratio. Few papers mention H₂ yields of the order of 370 mL/g *i.e.* 3 mol/mol hexose (Peintner et al. 2010) or H₂ yields higher than 280 mL/g (2.25 mol/mol) at GLR higher than 2 g/L.h (Barros et al. 2010; de Amorim et al. 2009; Mitchell et al. 2009). The results of these authors are reported in Fig. 4.13 in the curve "Max". These relevant results would be related to the high L/G transfer of H₂ occurring in the bioreactors tested that were trickle bed system or characterized by a high superficial liquid and gas velocity *e.g.* 7 · 10⁻³ and 7.4 · 10⁻² cm/s in the bioreactor with H/D ratio of 9.1 used by Chu et al. (2011b) at a GLR of 9.4 g/L.h (*i.e.* a HRT of 2 h). By comparison, these velocities were 1.8 and 2.7-fold higher respectively than those reported at the same GLR in the bioreactor with H/D ratio of 3.2.

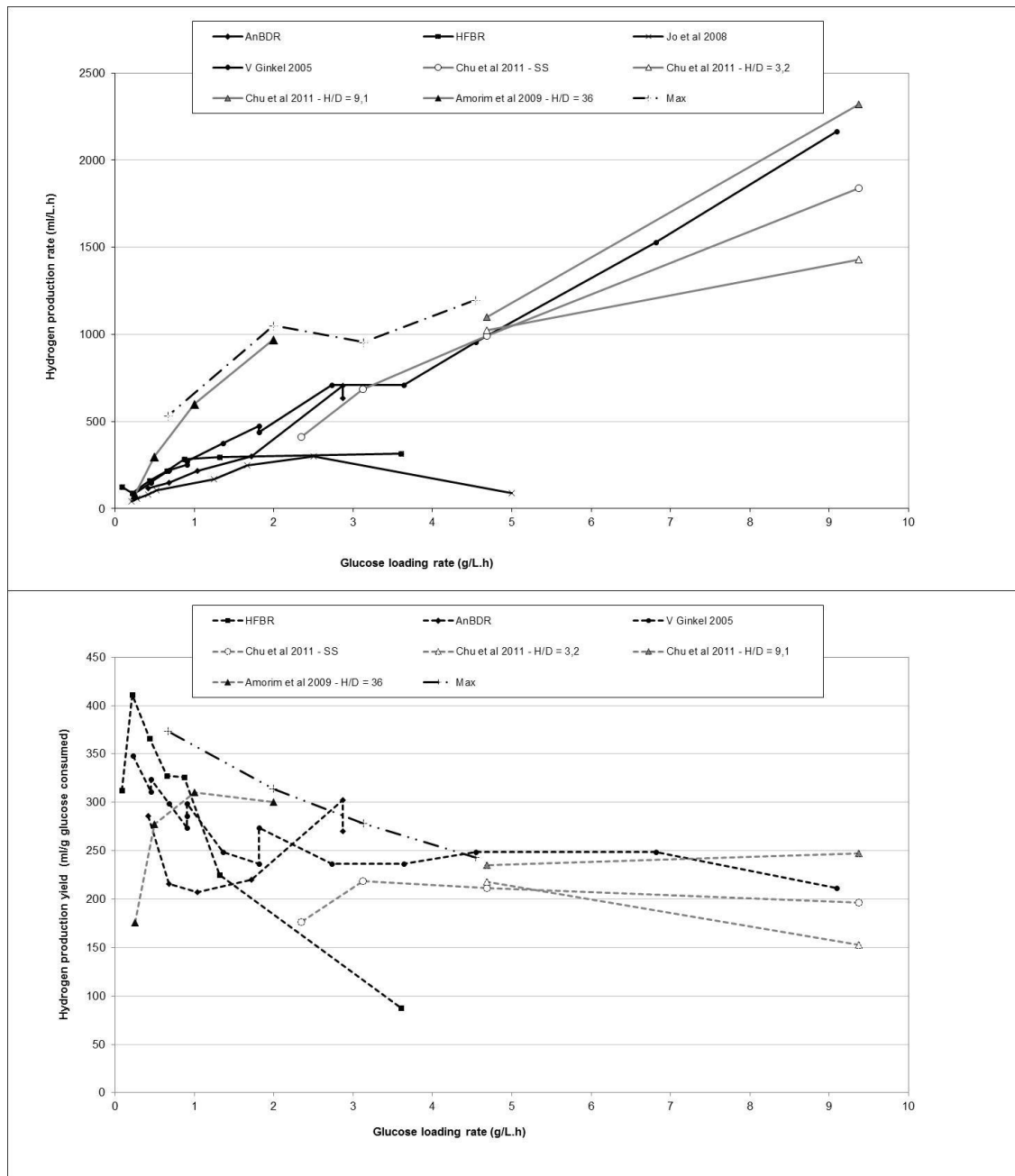


Fig. 4.13. Evolution of HPR and yields versus GLR : review of the results achieved in the HFBR and AnBDR (this study; the data at a GLR of 2.87 g/L.h for the AnBDR are related to the experimentation step with a liquid volume of 300 mL at pH 5.2 and 5.6) and some of the highest or most relevant performances reported in the literature by Van Ginkel and Logan (2005); Jo et al. (2008); de Amorim et al. (2009; in a bioreactor with a height to diameter ratio H/D of 36); Chu et al. (2011b; in 3 different bioreactors with suspended sludge SS or with a H/D ratio of 3.2 or 9.1) and for the curve "Max" : Peintner et al. (2011); Barros et al. (2010); Mitchell et al. (2009) and Lee et al. (2003) at a GLR of 0.67; 2.00; 3.13 and 4.55 respectively.

The evolution of HPR versus GLR in both HFBR and AnBDR reactors are consistent with those reported by Van Ginkel and Logan (2005) and other authors (Fig. 4.12), except in the HFBR at GLR higher than 0.88 g/L.h suggesting that such an organic loading rate and a HRT of 6 h are the optimum conditions leading to efficient use of glucose substrate by the mixed culture containing *C. butyricum* CWBI1009 strain. Jo et al. (2009) already reported a HRT or GLR for maximum HPR. The general performances of their mixed culture were however lower than that

experimented here. The best results regarding HPR are depicted by the curve "Max" (Fig. 4.13) and those recorded by de Amorim et al. (2009) at a high liquid velocity. It is to mention that the HPR reported at a GLR higher than 3 g/L.h are closer to those mentioned by other authors.

4. Conclusions

The experimentations reported in this paper showed the ability of a pure *Clostridium butyricum* strain to form microbial aggregates in bioreactor without specific treatment as reported by many authors. This opportunity was tested in different bioreactor systems e.g. a horizontal tubular fixed bed bioreactor (HFBR) and an anaerobic biodisc reactor (AnBDR) designed to both fix biomass and enable rapid liquid to gas transfer of hydrogen produced since H₂ partial pressure and H₂ supersaturation are known as hardly affecting hydrogen production rates and yields. To our knowledge, no biodisc reactor was formerly tested for H₂ production.

The highest H₂ production rate (703 mL H₂/L.h) and yield (302 mL/g glucose consumed *i.e.* 2.4 mol/mol) with the pure culture were recorded in the AnBDR with 300 mL culture medium (total bioreactor volume being 2.3 L) at pH 5.2 and a glucose loading rate of 2.87 g/L.h. These results are about 2.3 and 1.3-fold higher than those achieved in the same bioreactor with 500 mL liquid medium and the same glucose consumption rate. An even higher yield (411 mL/g or 3.3 mol H₂/mol glucose) was observed in the HFBR at a GLR of 0.22 g/L.h with a mixed culture containing the *Clostridium* strain. At higher GLR the yield dramatically decreased and the HPR was only marginally raised suggesting that non H₂-producing microorganisms were progressively competing for glucose with the *Clostridium* strain.

These results are amongst the most relevant results reported in the literature. They would be related to the high L/G transfer of H₂ occurring in the bioreactors referred that were trickle bed system or characterized by a high superficial liquid and gas velocity. This confirms the strong effect of H₂ partial pressure and H₂ supersaturation on the performances of *Clostridium* strains and the relevance of performing bioreactors with high L/G transfer.

References

- Ahn Y, Park EJ, Oh YK, Park S, Webster G, Weightman AJ. 2005. Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *Fems Microbiology Letters* 249(1):31-38.
- Angenent LT, Karim K, Al-Dahhan MH, Domiguez-Espinosa R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology* 22(9):477-485.
- Argun H, Kargi F. 2011. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(13):7443-7459.
- Barros AR, de Amorim ELC, Reis CM, Shida GM, Silva EL. 2010. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(8):3379-3388.
- Bartacek J, Zabranska J, Lens PNL. 2007. Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 1(3):201-214.
- Chu C-Y, Wu S-Y, Hsieh P-C, Lin C-Y. 2011a. Biohydrogen production from immobilized cells and suspended sludge systems with condensed molasses fermentation solubles. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(21):14078-14085.
- Chu CY, Wu SY, Wu YC, Lin CY. 2011b. Hydrodynamic behaviors in fermentative hydrogen bioreactors by pressure fluctuation analysis. *Bioresource Technology* 102(18):8669-8675.
- Das D, Veziroglu TN. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(21):6046-6057.
- de Amorim ELC, Barros AR, Damianouic M, Silva EL. 2009. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2):783-790.
- Fang HHP, Liu H, Zhang T. 2002. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 78(1):44-52.
- Guwy AJ, Dinsdale RM, Kim JR, Massanet-Nicolau J, Premier G. 2011. Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource Technology* 102(18):8534-8542.

- Hallenbeck PC. 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(17):7379-7389.
- Hamilton C, Hiligsmann S, Beckers L, Masset J, Wilmotte A, Thonart P. 2010. Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(3):1089-1098.
- Hiligsmann S, Masset J, Hamilton C, Beckers L, Thonart P. 2011. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology* 102(4):3810-3818.
- Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. 2009. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today* 139(4):244-260.
- Ivanova G, Rakhely G, Kovacs KL. 2008. Hydrogen production from biopolymers by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and stabilization of the system by immobilization. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(23):6953-6961.
- Jo JH, Lee DS, Park D, Park JM. 2008. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology* 99(14):6666-6672.
- Jung K-W, Kim D-H, Kim S-H, Shin H-S. 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology* 102(18):8612-8620.
- Kapdan IK, Kargi F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 38(5):569-582.
- Kim JO, Kim YH, Ryu JY, Song BK, Kim IH, Yeom SH. 2005. Immobilization methods for continuous hydrogen gas production biofilm formation versus granulation. *Process Biochemistry* 40(3-4):1331-1337.
- Koskinen PEP, Kaksonen AH, Puhakka LA. 2007. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 97(4):742-758.
- Kraemer JT, Bagley DM. 2006. Supersaturation of dissolved H₂ and CO₂ during fermentative hydrogen production with N-2 sparging. *Biotechnology Letters* 28(18):1485-1491.
- Kraemer JT, Bagley DM. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters* 29(5):685-695.
- Lamed RJ, Lobos JH, Su TM. 1988. Effects of stirring and hydrogen on fermentation products of *clostridium-thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(5):1216-1221.
- Lee D-J, Show K-Y, Su A. 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology* 102(18):8393-8402.
- Lee KS, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. 2003. H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology Letters* 25(2):133-138.
- Lee KS, Wu JF, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. 2004. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 87(5):648-657.
- Leite JAC, Fernandes BS, Pozzi E, Barboza M, Zaiat M. 2008. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(2):579-586.
- Levin DB, Pitt L, Love M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29(2):173-185.
- Li W-W, Yu H-Q. 2011. Physicochemical characteristics of anaerobic H₂-producing granular sludge. *Bioresource Technology* 102(18):8653-8660.
- Liang DW, Shayegan SS, Ng WJ, He JZ. 2010. Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochemical Engineering Journal* 49(1):119-125.
- Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, Beckers L, Franck F, Thonart P. 2010. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(8):3371-3378.
- Mitchell RJ, Kim JS, Jeon BS, Sang BI. 2009. Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: Effects of the glucose concentration and hydraulic retention time. *Bioresource Technology* 100(21):5352-5355.
- Mohan SV, Raghavulu SV, Goud RK, Srikanth S, Babu VL, Sarma PN. 2010. 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):12208-12215.
- Nath K, Das D. 2011. Modeling and optimization of fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology* 102(18):8569-8581.
- Peintner C, Zeidan AA, Schnitzhofer W. 2010. Bioreactor systems for thermophilic fermentative hydrogen production: evaluation and comparison of appropriate systems. *Journal of Cleaner Production* 18, Supplement 1(0):S15-S22.
- Perera KRJ, Ketheesan B, Gadhamshetty V, Nirmalakhandan N. 2010. Fermentative biohydrogen production: Evaluation of net energy gain. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(22):12224-12233.

- Ren N, Guo W, Liu B, Cao G, Ding J. 2011. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology* 22(3):365-370.
- Ren NQ, Tang J, Liu BF, Guo WQ. 2010. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(7):2807-2813.
- Show K-Y, Lee D-J, Chang J-S. 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology* 102(18):8524-8533.
- Sinha P, Pandey A. 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(13):7460-7478.
- Tawfik A, El-Gohary F, Ohashi A, Harada H. 2006. The influence of physical–chemical and biological factors on the removal of faecal coliform through down-flow hanging sponge (DHS) system treating UASB reactor effluent. *Water Research* 40(9):1877-1883.
- Van Ginkel SW, Logan B. 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research* 39(16):3819-3826.
- Wang JL, Wan W. 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2):799-811.
- Wang XY, Jin B, Mulcahy D. 2008. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19):4998-5005.
- Zhang HS, Bruns MA, Logan BE. 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research* 40(4):728-734.
- Zhang JJ, Li XY, Oh SE, Logan BE. 2004. Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering* 88(7):854-860.
- Zhang ZP, Adiv SS, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Su A. 2008a. Characteristics of Rapidly Formed Hydrogen-Producing Granules and Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 101(5):926-936.
- Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ. 2008b. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors - A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(5):1559-1564.
- Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Su A. 2008c. The role of acid incubation in rapid immobilization of hydrogen-producing culture in anaerobic upflow column reactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19):5151-5160.
- Zhu Y, Yang ST. 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology* 110(2):143-157.

Chapitre 2.5. Etude du procédé de digestion anaérobie en deux étages avec production d'hydrogène en culture pure ou culture mixte et production de méthane à partir des effluents solubles du premier bioréacteur

Les expérimentations menées jusqu'à présent ont permis de sélectionner des souches performantes de bactéries chimiotrophes produisant de l'hydrogène et d'améliorer les performances du bioréacteur en termes de rendement et de productivité. Des améliorations significatives d'un facteur 2 à 3 pour chacun des trois paramètres qui suivent ont pu être apportées (i) en utilisant la souche *Clostridium butyricum* CWBI1009 ; (ii) en contrôlant le pH à son optimum pour la production d'hydrogène et (iii) en améliorant le transfert de l'hydrogène produit en phase liquide vers la phase gazeuse. Les meilleurs rendements et productivités obtenus dans un procédé continu avec immobilisation cellulaire s'élevaient à 300 mL H₂/g glucose consommé (soit 2.4 mol/mol) et 700 mL H₂/h par litre de milieu de culture. Le système réactionnel utilisé est un bioréacteur anaérobie à biodisque alimenté par une charge organique en substrat glucose de 2.9 g/L.h. A plus grande échelle, ce type de bioréacteur pourrait être substitué par un bioréacteur à lit fixe arrosé peu énergivore (ne nécessitant pas de consommation énergétique pour le mélangeage du milieu) mais assurant des propriétés de transfert L/G comparables.

Notons que la charge organique appliquée dans ce bioréacteur est 10 à 20 fois supérieure à celles communément acceptées dans des biodigesteurs anaérobies. Par conséquent, on entrevoit facilement la possibilité de mettre en œuvre un procédé de digestion anaérobie en deux étages avec un premier bioréacteur de taille significativement inférieure au second et réalisant l'hydrolyse et l'acidogenèse des matières premières avec production optimale d'hydrogène. Il fallait cependant démontrer que les effluents du premier bioréacteur étaient compatibles pour le second, surtout au niveau d'éventuelles molécules produites par les *Clostridium* et potentiellement inhibitrices de la méthanogenèse. Des essais ont été réalisés dans ce sens dans un biométhaniseur agité de 20 L à la flore polyvalente car alimenté antérieurement par des matières organiques de toute nature et stable depuis plusieurs mois. Ces essais ont également permis de tester un temps de séjour de minimum 10 jours (tout à fait courant pour un digesteur classique) et d'évaluer les rendements de conversion en méthane de la charge organique ajoutée.

Ce chapitre s'est aussi focalisé sur l'étude d'une culture mixte issue d'un biodigesteur anaérobie UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) et prétraitée thermiquement pour enrichir la population microbienne en bactéries capables de sporuler et de produire de l'hydrogène (Culture mixte la plus performante Cf. chapitre 2.1.). Il s'agissait, dans la suite des chapitres 2.2 et 2.3. et dans les mêmes conditions réactionnelles, d'investiguer les performances d'une culture mixte particulièrement efficace pour les comparer à celles de *Clostridium butyricum* CWBI1009 et de *Citrobacter freundii* CWBI 952.

Le contenu a été publié dans l'article "Hilgsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Masset, J., & Thonart, P. (2010). Investigation of anaerobic digestion in a two-stage bioprocess producing hydrogen and methane. Paper presented at 15th European Biosolids and Organic Resources Conference, Leeds, United Kingdom"

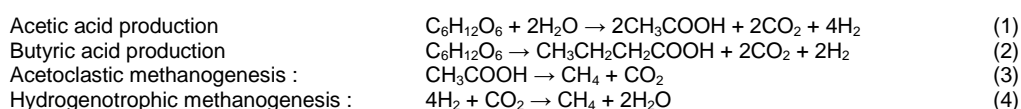
Investigation of anaerobic digestion in a two-stage bioprocess producing hydrogen and methane

1. Introduction

From different point of view methane is considered as an interesting renewable energy provider. Anaerobic digestion producing methane has been largely investigated and many industrial processes are currently available for the methanogenic fermentation of various carbon sources (Cervantes *et al.* 2006; De Lemos Chernicharo 2007). Moreover, the energy recovery from simple carbohydrates such as molasses is about 46% higher than with alcoholic fermentation (Park *et al.* 2010). Therefore, aiming at the reduction of their dependence on fossil fuels, most of agro-food industries and waste treatment plants are investing in anaerobic digestion of their residual organic matter (Lens *et al.* 2004; Levin *et al.* 2007; Trzcinski and Stuckey 2009; Verstraete *et al.* 2009).

From the microbiological point of view since a large number of microorganisms have different and successive contribution in this bioprocess it has been divided in four steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and eventually methanogenesis (Levin *et al.* 2007; Ding and Wang 2008). Many literature is available about operating parameters (e.g. C/N ratio, hydraulic retention time, etc.) affecting the performances of the methanogenic microorganisms rather than about the diversity and specific metabolism of the microbial populations involved in the first three anaerobic digestion stages. Recently, a great interest has been shown for H₂, an intermediate biogas produced during acido- and aceto-genesis. Hydrogen is a promising energy vector with some advantages and complementarities compared to methane : 2.4-fold higher energy density (*i.e.* 33 kWh/kg H₂), no carbon dioxide emissions from hydrogen combustion and potential use of hydrogen for high energy conversion in fuel cells. Nevertheless, though the metabolism of the acidogenic bacteria producing H₂ is faster than that of methanogenic Archaea, the hydrogen produced in anaerobic digesters is rapidly converted to methane. Indeed, even a small amount of H₂ (> 0.1%) in the gas phase indicates a malfunctioning process (Cooney *et al.* 2007).

In a two-step process, *i.e.* when acido- and aceto-genesis are carried out in a different bioreactor than methanogenesis, it is feasible to generate separated biogas flows containing either H₂ or CH₄ depending on specific operating parameters such as the pH (Kyazze *et al.* 2007; Antonopoulou *et al.* 2008; Ding and Wang 2008; Xie *et al.* 2008; Hafez *et al.* 2010; Park *et al.* 2010). According to the highest yields reported by these authors, the mean volumetric H₂ and CH₄ potential would be in a stoichiometric ratio of 2:2 to 2:3. Equations 1 to 4 (Mohan *et al.* 2008, Calusinska *et al.* 2010) describe the main metabolic pathways involved in optimised two-stage anaerobic digestion from carbohydrates. Pathways from protein or lipid substrates or with other acid intermediates occur in methanogenic fermentation but with, if any, a low production of the intermediate H₂. Besides the fore-mentioned advantages for producing both H₂ and CH₄ biogas mixtures, decoupling the faster acidogenic fermentation from the methanogenic production is quite interesting for an industrial process with non-regular energy needs, likely in agro-food industries. Indeed, this makes the process more resistant to shock loading (Cooney *et al.* 2008) and would allow satisfying daily peaks of energy demand with rapidly produced hydrogen without the need of a costly and hazardous CH₄ storage.



Many investigations have been carried out in order to improve the H₂ production from organic matter. The results achieved and reviewed by many authors (Bartacek *et al.* 2007; Das and Veziroglu, 2008; Wang and Wan, 2009a, b, c) are useful for improvement of the whole anaerobic digestion process, whether performed in one or two stages. Predominance of spore-forming H₂-producers and an optimum pH around 5.5 are reported for high H₂ production with

pure or mixed cultures (Fang *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005; Kim *et al.* 2008; Wang and Wan 2009a; Chen *et al.* 2009; Masset *et al.* 2010). They achieved hydrogen production yields of about 1.5 - 2 mol H₂ / mol glucose or 200 ml H₂ / g glucose and production rates of about 10 mmol H₂ / h or 120 ml H₂ / h.l of culture medium.

The purpose of the researches reported here is to comprehensively compare the yields achieved in the first stage operated in optimum conditions for H₂ production with a mixed culture (this study) or a pure *Clostridium butyricum* strain (results reported in Masset *et al.* 2010). The mixed culture was collected from an anaerobic digester and was thermally pre-treated to enrich the acidogenic microflora with spore-forming H₂ producers. By comparison to other studies of the two-stage anaerobic digestion (Kyazze *et al.* 2007; Xie *et al.* 2008; Hafez *et al.* 2010; Ljungren and Zacchi 2010), we promoted the simple technology of sequenced-batch reactor for both stages instead of a more complex setup e.g. using a UASB digester. This research also studied the feasibility of the second stage converting the metabolites of the first stage to methane.

2. Materials and methods

Experimental setup

Acidogenic fermentation (1st stage) was carried out in a 2.3 l bench-scale batch bioreactor as described elsewhere (Masset *et al.* 2010). The bioreactor containing 2.3 l of the MDT medium was inoculated with 200 ml of a sludge collected from an UASB anaerobic digester treating organic wastewater from sugar-beet and bioethanol industries. In order to enrich the hydrogen-producing microflora, the sludge was heat treated at 80 °C for 30 min. The MDT medium contained, per litre of deionised water : glucose monohydrate (5g), casein pepton (5g), yeast extract (0.5g), Na₂HPO₄ (5.1g), KH₂PO₄ (1.2g), MgSO₄.7H₂O (0.5g).

Needles placed through the septum were used to control the pH level (METTLER TOLEDO combined probe) by automatic addition of sterile 1.5 N sodium hydroxide (maximum range of 0.15 pH unit around the pH level). During fermentation the bioreactor was maintained at 30 °C and stirred at 60 rpm.

Methanogenic fermentation (2nd stage) was carried out in a 20 liters stirred anaerobic digester used in CWBI for biochemical methane potential assays of different agro-food organic wastes. This lab-scale digester is similar to the 2.3 L bioreactor and has been inoculated two years ago with a sludge collected from a full-scale anaerobic digester treating the activated sludge from a municipal wastewater treatment plant. The 20 l bioreactor was completely filled, stirred at 60 rpm and maintained at 55 °C and at a pH level around 7.3. The spent medium used for the experiments of anaerobic digestion was collected from a 20 l bioreactor that was inoculated with the pure *Clostridium butyricum* CWBI1009 strain and performed according to the SBR mode. It contained mainly acetate and butyrate and the *Clostridium* biomass. It was kept at 4°C without significant evolution regarding metabolite concentrations. Before addition in the digester the acids were neutralized at pH 7.3 with KOH 9N.

Monitoring and analytical methods

The composition of biogas was measured using a gas chromatographer fitted with a thermal conductivity detector as described elsewhere (Hamilton *et al.* 2010). Nitrogen was used as carrier gas for H₂ measurement and Helium for N₂, O₂, CH₄ and CO₂ measurements.

Culture samples were centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius Minisart). The glucose, ethanol, formate, acetate, propionate, butyrate, lactate and succinate were analyzed using a HPLC equipped with a differential refraction index detector as described formerly (Masset *et al.* 2010). The data for the glucose and metabolite concentrations were used to calculate the mass balance (MB) of the glucose conversion using the equation:

$$MB = \frac{\sum N_i \cdot \Delta C_i}{N_G \cdot \Delta C_G} \quad (5)$$

where N_i is the number of carbon atoms in a molecule of metabolite i ; ΔC_i is the concentration of metabolite i effectively produced (*i.e.* the difference between the final and initial concentrations for a given culture sequence); N_G is the number of carbon atoms in the glucose molecule (*i.e.* 6) and ΔC_G is the concentration of the glucose consumed during the culture sequence (Eq. 5)

Water or a KOH solution (9N in water) was used in replacement equipment (*i.e.* an inverted 5 l glass vessel for the 1st stage and a 55 l polycarbonate column for the 2nd stage, both with an inside diameter of about 18 cm) to monitor the biogas production of the batch and sequenced batch bioreactors.

3. Results and discussion

Investigation of H₂ production from glucose in sequenced batch reactor mode

The fermentative H₂ production by mixed culture was investigated in a 2.3 l bioreactor equipped with pH control and liquid replacement equipment to monitor the biogas production (as described in Materials and Methods). After running a culture in batch, a sequenced-batch reactor (SBR) mode was performed in the same bioreactor for 33 successive sequences according to the procedure used in former works to investigate H₂ production by a pure *Clostridium butyricum* strain (Masset *et al.*, 2010). The SBR mode enables to easily assess the substrate conversion yields and the limitations due to metabolites-inhibiting concentrations. Each sequence lasted for 24 hours, or 72 h when indicated, and was carried out with removal-addition of 40 % (900 ml) of the culture medium and addition of glucose up to the standard initial concentration *i.e.* 5 g/l glucose monohydrate (as described in Materials and Methods). Tests were conducted at two different pH levels *i.e.* 5.2 and 5.5 while keeping other operating conditions constant (stirring, temperature, pressure, etc.). A first series of experiments at pH 5.2±0.15 involved 16 sequences including the batch culture (1st sequence). A second series of 5 sequences was conducted at pH 5.5±0.15 to study the effect of pH on H₂ production yields and the metabolism of mixed cultures. Both sequences were carried out with water replacement equipment to monitor biogas production and H₂ content was measured by gas chromatography. Finally a third series of experiments was carried out with pH maintained at 5.2 and in sequences 28 to 31 with a 9N KOH - solution used in the replacement equipment. This allowed to directly monitor the biohydrogen production and to compare the results with the performances of a pure *Clostridium butyricum* strain (Masset *et al.* 2010). It is to mention that the sequences 2, 7, 12, 17, 22, 27 and 32 lasted for 72 h (*i.e.* during the week-end) with pH control but no temperature control. Moreover, no results were collected during seq. 7.

- *Results of the first series of 16 sequences at pH 5.2*

A biogas production of 2.5 l was achieved during the batch culture. It increased progressively in the 3 following sequences up to about 4 l of biogas and reasonably maintained at this level for the 11 following sequences. The H₂ production yields (1.34±0.2 mol H₂ / mol glucose) indicated in Fig. 5.1 were calculated taking into account the measured H₂ content and the glucose effective consumption, *i.e.* about 53±2 % and 95 % respectively for these 12 sequences. The Fig. 5.1 also shows the concentration of residual glucose and soluble metabolites measured at the end of each sequence. The major metabolites are butyrate (52.7±11.1 mM), formate (10.7±4.9 mM) and acetate (15.8±7.1 mM). Similar results for both H₂ yields and butyrate and acetate concentration in the culture medium were mentioned in the literature for experiments in small scale bioreactors with pure or mixed cultures containing spore-forming H₂-producing bacteria (Fang *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005; Wang and Wan 2009a; Chen *et al.* 2009; Masset *et al.* 2010). Ethanol (2.2±1 mM) and sometimes propionate (about 0.7 mM) were released at lower amounts than the other metabolites. Ethanol is usually produced either by facultative

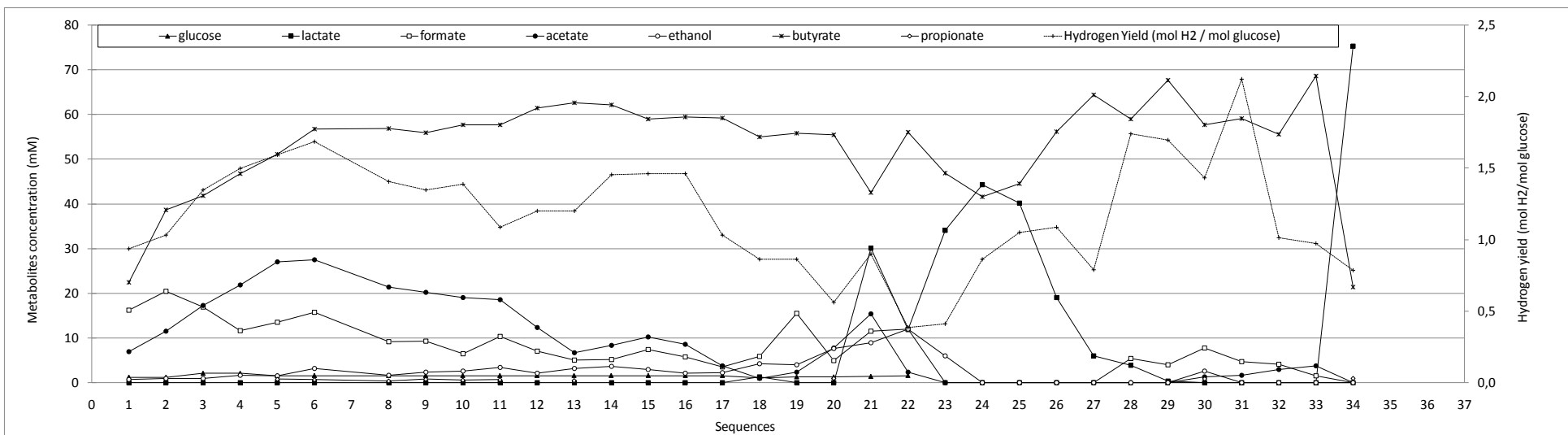


Fig. 5.1 : Metabolite analysis during different sequences for fermentative hydrogen production in a 2.3l sequenced batch bioreactor : Hydrogen production yield (mol H₂ / mol glucose), and final metabolites concentrations (mM)

Tab. 5.1 : Metabolites yields expressed as carbon converted (%) from glucose during different sequences for fermentative hydrogen production in a 2.3l sequenced batch bioreactor.

Sequence number	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16
Lactate	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Formate	9,0	6,2	3,0	1,2	3,8	4,5	2,3	0,7	3,7	0,7	0,6	1,3	2,5	0,9
Acetate	7,7	8,3	12,2	13,5	16,0	13,6	9,0	8,4	8,7	2,1	-0,2	5,1	6,0	3,2
Ethanol	0,8	0,7	0,5	1,3	0,6	2,6	1,6	1,4	2,1	0,2	2,2	2,1	0,9	0,5
propionate	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,4	0,9	0,2	0,6	-0,6	0,8	-0,5	0,0	0,0
Butyrate	50,2	56,9	45,1	51,6	54,0	61,8	52,7	57,8	55,6	63,7	61,8	59,5	53,0	58,0
Sum	67,7	72,1	60,8	67,6	75,7	82,8	66,5	68,6	70,8	66,1	65,3	67,5	62,3	62,6

Sequence number	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Lactate	0,0	2,1	-1,2	0,0	49,4	-8,2	42,8	40,5	24,7	-5,5	-7,5	0,9	-2,9	-0,4	0,0	0,0	0,0	121,0
Formate	0,2	2,1	6,7	-2,1	4,8	3,1	-3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	0,5	3,0	0,2	0,8	-0,4	-0,5
Acetate	-1,1	-1,2	2,0	7,0	12,1	-6,8	-1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	1,0	2,1	2,3	-2,3
Ethanol	1,2	3,2	1,7	5,8	5,1	7,7	-0,7	-3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	-1,6	0,0	0,0	0,0
propionate	0,0	0,0	0,0	1,6	-0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	-0,8	0,0	0,0	1,6
Butyrate	56,7	47,1	54,7	52,7	25,1	70,8	32,4	32,8	45,4	67,0	70,5	49,1	74,2	42,4	57,4	48,2	80,2	-36,4
Sum	57,0	53,3	64,0	65,2	95,6	66,6	69,5	69,7	70,1	61,5	63,0	52,9	71,9	50,6	56,2	51,1	82,2	83,4

anaerobic enterobacteriaceae, some of them being H₂ producers, or by Clostridium population during the stationary growth phase at pH levels below 6 (Hawkes *et al.* 2002; Kapdan and Kargi 2006; Hamilton *et al.* 2010). In our experiments, the enterobacteriaceae population would be in quite minority since no lactate, a frequent metabolite of these microorganisms (Oh *et al.* 2008), was detected during this series of experiments.

The pattern of metabolite concentrations measured in seq. 1 to 11 and seq. 12 to 16 seems relatively different. This suggests that the metabolism or the microbial populations have changed after a relative stabilization in seq. 8 to 11 while the H₂ yields were not significantly affected. Indeed, as shown in Tab. 5.1 and also observed in former SBR experimentations with a pure *Clostridium* strain (Masset *et al.* 2010), the glucose conversion into formate decreases from a maximum (9% of the initial glucose carbon content) achieved during the batch culture to a few percents after some culture sequences. By contrast, in the experiments reported here, after an acetate production peak (15 %) observed in seq. 5 to 6 simultaneously to the H₂ production peak, the amount of glucose converted to acetate declined too whereas it increased with the pure strain as for butyrate.

- *Results of the sequences 17 to 21 at pH 5.5*

The results (Fig. 5.1) achieved in similar conditions at pH 5.2 and 5.5 highlight an obvious decrease of about 40 % of the H₂ production yield when increasing the pH to 5.5. This trend is consistent to the results of other authors (Fang and Liu 2002; Chen *et al.* 2009). However, regarding the metabolites yields, no global trend may be evidenced. Indeed, in our experiments (seq 17 to 19), glucose conversion to both formate and lactate increases when pH raises from 5.2 to 5.5 whereas butyrate and acetate production decreases (Tab. 5.1). By contrast Chen *et al.* (2009) and Fang and Liu (2002) observed respectively either an increase of butyrate and acetate concentrations or a decrease of butyrate and an increase of acetate.

It is to mention that seq. 20 was not carried out successively to seq. 19 but after a delay of two weeks. It seems that it did not affect the H₂ yields. However significant differences were recorded for the metabolites concentrations measured at the end of the following sequences (seq. 21 to 25). Indeed, lactate production increased drastically up to concentrations higher than 30 mM. Wang *et al.* (2008) also reported such high concentrations of lactate with a pure *Clostridium butyricum* strain producing hydrogen at a yield of 0.6 mol H₂/mol glucose.

- *Results of the third series of 13 sequences at pH 5.2*

The third series of experiments was carried out again at pH 5.2 and in the sequences 28 to 31 a KOH solution was used in the replacement equipment to absorb carbon dioxide from the biogas produced and assess directly the hydrogen production. The consequences of the metabolic pathway shift (stated in section 3.1.2.) to high lactate production are noticed until the end of seq. 27 : lactate and butyrate are the sole metabolites produced in seq. 23 to 25 from the total initial amount of glucose (Tab. 5.1). In the two following sequences lactate is even consumed with a possible contribution to hydrogen production (Li and Fang 2007). After that period, a similar pattern of metabolite concentrations than in seq. 13 to 16 is recovered. However, the acetate concentration is quite lower.

During the experiments with direct measurement of the H₂ cumulative production yields of 1.75±0.3 mol H₂/mol glucose were achieved. They are at the same level or a few higher than the highest yields obtained in the first series of experiments at pH 5.2. This suggests that the H₂ content measured by gas chromatography would be sharply underestimated, probably due to the operating conditions that are not quite identical for calibration and measurement of sampled gas (*i.e.* the 500 µl calibration gas are sampled from a 150 ml serum bottle regularly filled at atmospheric pressure with gas mixture from a 50 l pressurized container (B50 size from Air Liquide) and biogas is sampled directly from the bioreactor headspace through the septum). However, the H₂ yields achieved in the experiments reported here are lower than those (2.3 mol H₂/mol glucose) obtained in the same SBR operating conditions with the pure *Clostridium butyricum* CWBI1009 strain (Masset *et al.* 2010). However, with this strain a significant amount (about 18 %) of the substrate initial carbon content was converted in acetate that is involved in the *Clostridium* metabolic pathway to the highest hydrogen production (Eq. 1). Moreover, about

70 % of the carbon mass balance was recovered in the soluble metabolites whereas in our experiments the sum varies between 50 and 72 % as mentioned in Tab. 5.1 for seq. 28 to 31. The rest of carbon would be converted in carbon dioxide and biomass. It should be noted that the H₂ yields achieved in the seq. 32 and 33 are similar to those of seq. 24 and 25 (*i.e.* before the series with KOH replacement equipment). Nevertheless, the hydrogen production yields of the first series of experiments were not attained in the third series. Furthermore, high lactate production are recorded again in seq. 34 probably indicating a kind of unstability in the microbial ecology.

Investigation of CH₄ production from the soluble metabolites of H₂-producing dark fermentation

This section presents the results of the experiments carried out in a 20 l anaerobic digester in order to assess the feasibility of converting the metabolites from a bioreactor producing H₂ into methane. Aiming for relevant investigations, the culture medium from a stable dark fermentation (as described in section 2.2.) was preferred to the spent medium from the former SBR producing hydrogen in which the metabolite concentrations were relatively unstable (as stated in section 3.1.). A first series of 3 sequences was carried out with removal-addition of 1.5, 2 and 2 liters of metabolites mixture. As shown in Fig. 5.2, they allowed producing 2.4, 2.5 and 3.0 liters of biogas respectively. The duration of the active period when biogas production was effective decreased progressively from seq. 1 to seq. 3. Therefore the production rate increased up to a maximum of 2.7 l/d (Fig. 5.2).

A second series of 14 sequences was carried out with removal-addition of 4 liters of spent medium from the first anaerobic digestion stage. Different period of time were considered for the successive sequences in order to assess the resistance of the methanogenic microflora to loading shocks. The Fig. 5.2 shows the cumulative biogas production for this series that started after the first series (22 days duration). The profile is relatively linear suggesting a mean biogas production rate of about 0.83 l/d. By comparison, the production rate during the active period of each sequence varied between 1 and 3 l/d. A mean methane content of about 60 % was measured in the biogas. Therefore the methane yields were calculated for each sequence (Fig. 5.3). They are relatively similar for the first 10 sequences at about 100 ml CH₄/g COD (initially fed in the first stage) and increase in the following sequences to a mean 170 ml CH₄/g COD. These results are promising even if they are lower than those reported in the literature (Hafez *et al.* 2010; Xie *et al.* 2010) and if large yields variations are recorded probably due to non regular loading.

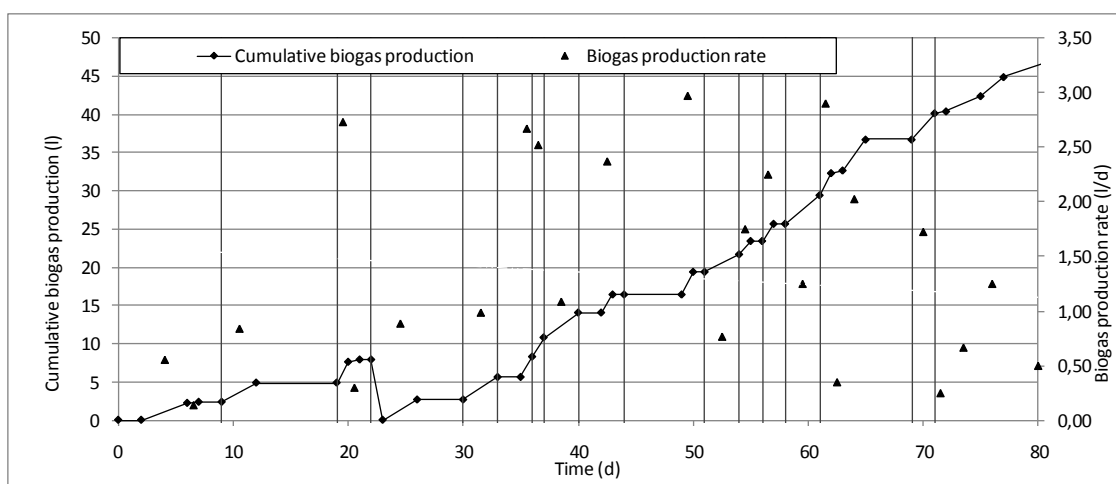


Fig. 5.2 : Cumulative biogas production (l) and biogas production rate (l/d) in a 20 l anaerobic digester fed with spent medium from fermentative hydrogen production. The vertical lines indicate the removal-addition of spent medium (starting a new sequence).

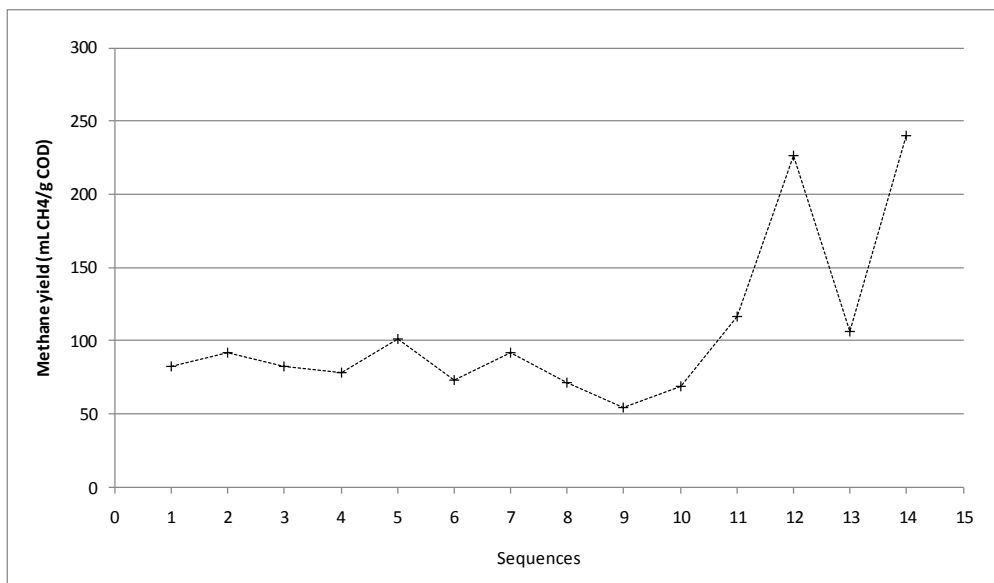


Fig. 5.3 : Methane production yields (ml CH₄ / g COD initially loaded in the first stage) for different sequences in a 20 l anaerobic digester fed with 4 liters of spent medium from fermentative hydrogen production (2nd series of experiments).

4. Conclusions

In this paper the performances of the first stage of an anaerobic digestion process operated in optimum conditions for H₂ production were compared using a mixed culture or a pure *Clostridium butyricum* strain.

1. The hydrogen yields achieved in a 2.3 l sequenced-batch bioreactor were of about 1.75 and 2.3 mol H₂/mol glucose respectively.
2. A decrease of about 40 % of the H₂ production yields was recorded when increasing the pH from 5.2 to 5.5. These results are consistent to other works.
3. The major metabolites of glucose fermentation were in the decreasing order of concentration in culture medium butyrate, acetate and formate at a lower concentration. This suggests a predominance of *Clostridium* strains in the microflora.
4. A relative instability of the population or metabolism of the mixed culture was evidenced which affects severely the H₂ yields. Therefore, an efficient control of the different operating parameters would be required when using mixed cultures in the first stage of anaerobic digestion.

The investigations carried out in a second 20 l digester focused on the performances of the second stage of an anaerobic digestion process.

5. The results confirm the feasibility to produce methane from the soluble metabolites produced in the first stage with a methane yield of about 170 ml/g COD initially fed in the first stage.

Globally the initial COD contained in glucose was converted to produce from 200 to 260 ml H₂/g COD and 170 ml CH₄/g COD.

References

- Antonopoulou, G., Stamatelatu, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., and Lyberatos, G. (2008) Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47, 5227-5233.

- Bartacek, J., Zabranska, J., and Lens, P. N. L. (2007) Developments and constraints in fermentative hydrogen production, *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofor* 1, 201-214.
- Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., and Wilmolte, A. (2010) The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective, *Microbiology* 156, 1575-1588.
- Cervantes, F. J., Spyros, G., and Van Haandel, A. C. (2006) Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters, In *Integrated environmental technology series*, p 345, IWA publishing, London (UK).
- Chen, W.-H., Sung, S., and Chen, S.-Y. (2009) Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects, *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 227-234.
- Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S., and Chang, J. S. (2005) Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge, *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 1063-1070.
- Cooney, M., Maynard, N., Cannizzaro, C., and Benemann, J. (2007) Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures, *Bioresour. Technol.* 98, 2641-2651.
- Das, D., and Veziroglu, T. N. (2008) Advances in biological hydrogen production processes, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6046-6057.
- De Lemos Chernicharo, C. A. (2007) Anaerobic reactors, In *Biological wastewater treatment series*, p 174, IWA publishing, London (UK).
- Ding, H. B., and Wang, J. Y. (2008) Responses of the methanogenic reactor to different effluent fractions of fermentative hydrogen production in a phase-separated anaerobic digestion system, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6993-7005.
- Fang, H. H. P., and Liu, H. (2002) Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Bioresour. Technol.* 82, 87-93.
- Hafez, H., Nakhla, G., and El Nagggar, H. (2010) An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment, *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 5010-5014.
- Hamilton, C., Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmolte, A., and Thonart, P. (2010) Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semi-continuous operating mode, *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 1089-1098.
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., and Hussy, I. (2002) Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation, *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1339-1347.
- Kapdan, I. K., and Kargi, F. (2006) Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569-582.
- Kim, J. K., Nhat, L., Chun, Y. N., and Kim, S. W. (2008) Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13, 499-504.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A. I., Hawkes, F. R., Premier, G. C., and Hawkes, D. L. (2007) Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously, *Biotechnol. Bioeng.* 97, 759-770.
- Lens, P., Hamelers, B., Hoitink, H., and Bidlingmaier, W. (2004) Resource recovery and reuse in organic solid waste management, In *Integrated environmental technology series*, p 516, IWA publishing, London (UK).
- Levin, D. B., Zhu, H. G., Beland, M., Cicek, N., and Holbein, B. E. (2007) Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada, *Bioresour. Technol.* 98, 654-660.
- Li, C. L., and Fang, H. H. P. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 1-39.
- Ljunggren, M., and Zacchi, G. (2010) Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane, *Bioresour. Technol.* 101, 7780-7788.
- Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., and Thonart, P. (2010) Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009, *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 3371-3378.
- Mohan, S. V., Mohanakrishna, G., and Sarma, P. N. (2008) Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 2156-2166.
- Oh, Y. K., Kim, H. J., Park, S., Kim, M. S., and Ryu, D. D. Y. (2008) Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1471-1482.
- Park, M. J., Jo, J. H., Park, D., Lee, D. S., and Park, J. M. (2010) Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses, *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 6194-6202.
- Trzcinski, A. P., and Stuckey, D.C. (2009) Continuous treatment of the organic fraction of municipal solid waste in an anaerobic two-stage membrane process with liquid recycle, *Water Res.* 43, 2449-2462.
- Verstraete, W., Van de Caveye, P., and Diamantis, V. (2009) Maximum use of resources present in domestic "used water", *Bioresour. Technol.* 100, 5537-5545.
- Wang, J., and Wan, W. (2009) Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 235-244.

RESULTATS: chapitre 2.5. Etude du procédé de digestion anaérobie en deux étages

- Wang, J. L., and Wan, W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 799-811.
- Wang, J. L., and Wan, W. (2009) Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 3313-3323.
- Wang, X. Y., Jin, B., and Mulcahy, D. (2008) Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 4998-5005.
- Xie, B., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., and Cen, K. (2008) Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency, *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 5006-5011.

3 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

Discussion générale

Les travaux de la thèse ont contribué à l'étude et à l'optimisation du procédé biologique de production de biohydrogène par les bactéries fermentaires. Ce procédé appelé « dark fermentation » (DF) a pour but de précéder le procédé classique de digestion anaérobie (DA) de matières carbohydratées issues des résidus agricoles, des industries agro-alimentaires et autres activités socio-économiques. Le premier chapitre de la discussion fait une synthèse générale des principaux résultats obtenus au terme des expérimentations et décrit les perspectives de concrétisation technologique en bioréacteur. Un second chapitre de la discussion générale aborde les aspects économiques liés à l'investissement et aux coûts de fonctionnement d'une installation en deux étages en comparaison avec une DA classique. Dans le troisième chapitre, les perspectives d'intégration du procédé dans les procédés industriels cibles générant des déchets organiques sont évaluées ainsi que les atouts potentiels de la DF associée à la DA en lien avec le concept d'écologie industrielle en plein essor. Finalement, un quatrième chapitre se penche sur les avantages socio-économiques et environnementaux (analyse du cycle de vie) du procédé de digestion anaérobie globale de matières organiques. Des comparaisons sont établies par rapport aux autres choix technologiques potentiels de traitement et valorisation énergétique de la matière première organique : incinération, production de bioéthanol, compostage, etc.

1. Synthèse des résultats pertinents de la thèse

La Fig. III.1 synthétise les meilleurs résultats et principaux avancements engrangés sur la DF au travers des expérimentations qui ont porté sur :

- a. la sélection des souches : par rapport à un **panel de 19 souches et populations mixtes** des plus performantes selon la littérature, la souche *Clostridium butyricum* **CWBI1009 (C. but.)** s'est montrée très intéressante. Ses performances en termes de productivité et rendement de conversion du substrat en H₂ sont parmi les plus élevées. Un rendement de 113 mL d'hydrogène produit par gramme de glucose consommé (0,9 mol H₂/mol glucose) a été atteint lors de cultures en microcosmes/bioréacteurs de 250 mL dans des **conditions standardisées et relativement larges et contraignantes** (pour être en adéquation avec une application potentielle à l'échelle industrielle). Il est supérieur aux rendements obtenus avec des bactéries anaérobies facultatives mais inférieur aux 125 mL H₂/g produits par *C. pasteurianum*. Ces autres souches particulièrement intéressantes ne sont cependant pas capables de fermenter des substrats complexes tels que l'amidon. Ces performances ont été **confirmées lors de cultures en bioréacteurs de 2,3 L au pH optimum** de production d'H₂ pour les microorganismes retenus : deux souches pures anaérobie facultative (*Citrobacter freundii* CWBI952, *Cit.fr.*) ou stricte (*C. but.*) et une culture mixte issue d'un biométhaniseur UASB et traitée thermiquement (80°C pendant 30 minutes) pour isoler des bactéries hyper-productrices d'H₂. La souche *C. but.* atteint un **rendement de 211 mL H₂/g, 80% supérieur à celui de la culture mixte**, et une productivité par heure et unité de volume de 116 mL H₂/L.h. Ces performances sont respectivement **près de 3 et 4 fois plus élevées que celles de la souche Cit.fr.** De plus, la souche *C. but.* peut exploiter de nombreux substrats mono-/di-hydratés et l'**amidon**, substrats susceptibles d'être rencontrés dans beaucoup d'eaux usées des industries agro-alimentaires et résidus semi-solides (contenant plus de 30 % environ d'eau) ;

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

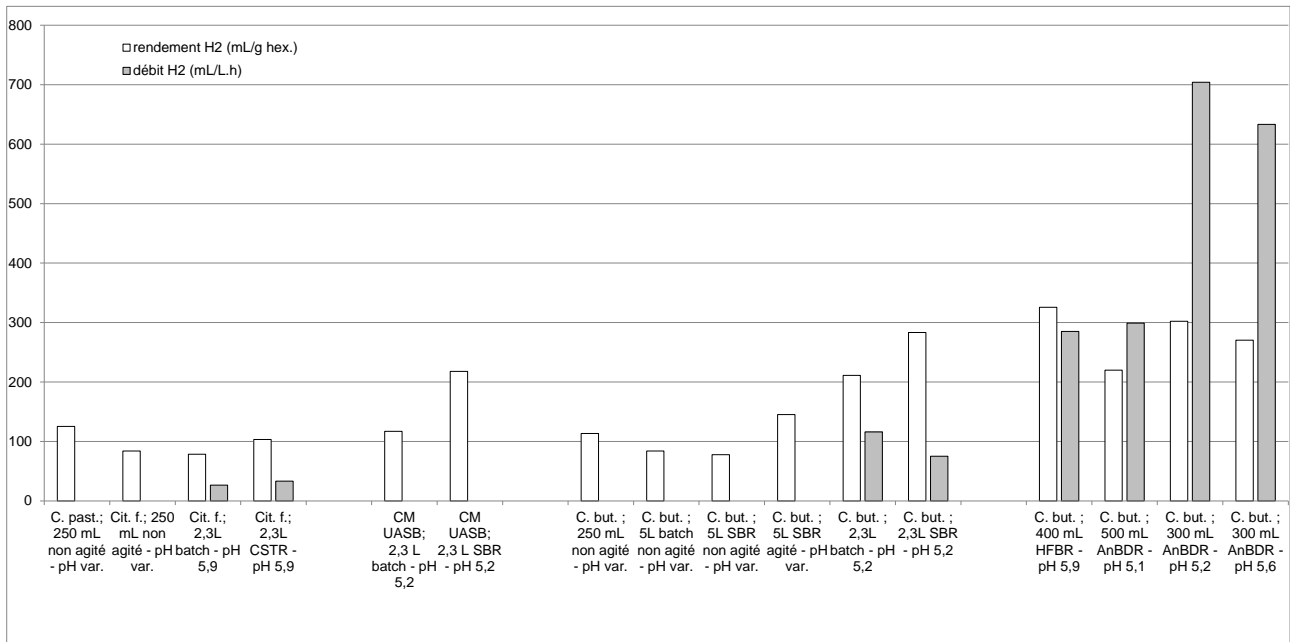


Fig. III.1 : Synthèse des résultats les plus pertinents issus des expérimentations : rendement (mL/g d'hexose consommé) et productivité par litre de milieu de culture (mL/L.h pour les cultures à pH fixe) atteints par les souches *Clostridium pasteurianum* (C. past.); *Citrobacter freundii* CWBI952 (Cit. f.); *Clostridium butyricum* CWBI1009 (C. but.) et la culture mixte issue d'un bioréacteur UASB après traitement thermique (CM UASB) lors de cultures à pH variable (var.) ou fixe en bioréacteurs de différentes tailles (250 mL à 5 L) et de différents types : batch (non-) agité, séquentiel (SBR), horizontal à lit fixe (HFBR) et biodisque anaérobie (AnBDR).

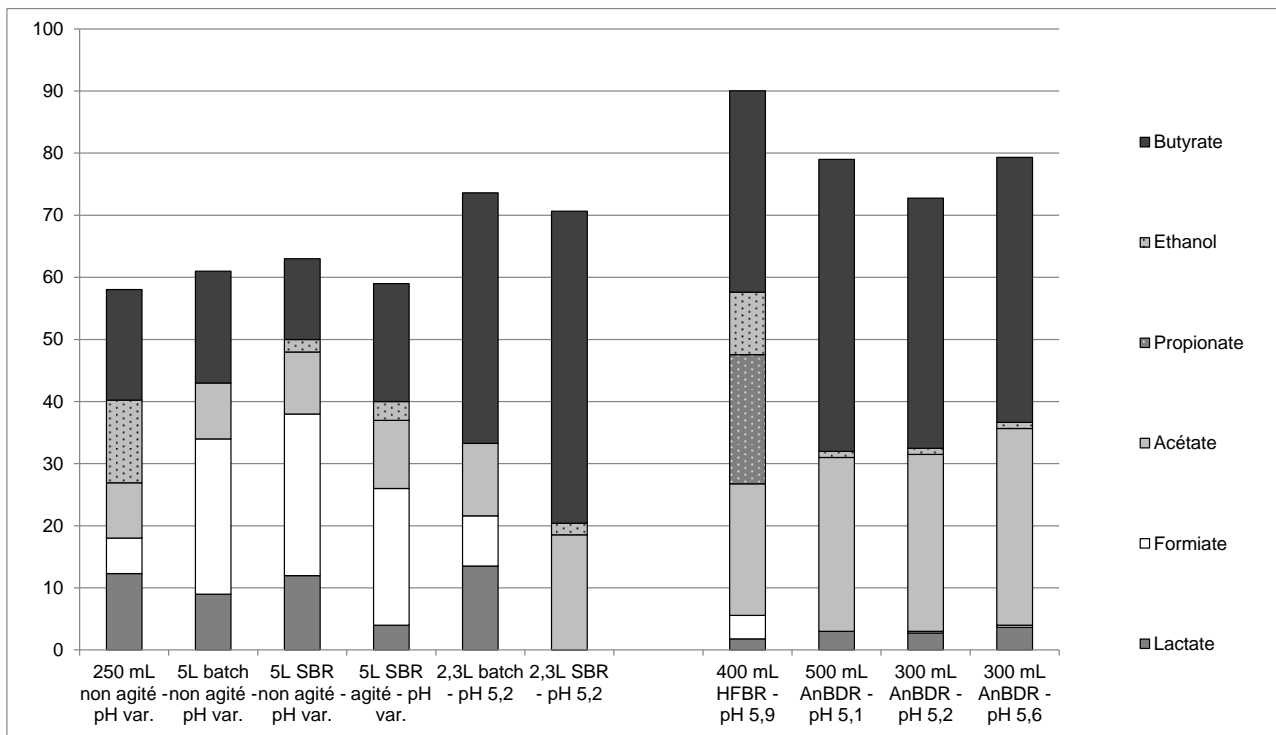


Fig. III.2 : Bilan de matière carboné relatif à la fermentation du glucose par *Clostridium butyricum* CWBI1009 lors de cultures à pH variable (var.) ou fixe en bioréacteurs de différentes tailles (250 mL à 5 L) et de différents types : batch (non-) agité, séquentiel (SBR), horizontal à lit fixe (HFBR) et biodisque anaérobie (AnBDR).

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

- b. l'étude et l'amélioration des conditions de culture des souches pures retenues *C. but.* et *Cit. fr.* : l'étude de la production d' H_2 en fonction du pH et la détermination du pH optimum (5,2 et 5,9 respectivement) a conduit à des rendements jusqu'à trois fois plus élevés par rapport aux performances enregistrées au pH optimum pour la croissance (voisin de 7). Ces résultats ont permis de confirmer, et à plusieurs autres reprises, **l'intérêt recherché par les bactéries en produisant de l' H_2 : c'est-à-dire d'éliminer les protons issus des voies métaboliques acidogènes**. Les travaux et les optimisations réalisées en **bioréacteur séquentiel (SBR)** ont permis de démontrer la faisabilité d'un **procédé en culture pure, simple et stable dans le temps** ne nécessitant pas, comme suspecté par beaucoup pour les souches anaérobies strictes, d'ajouts récurrents de substances réductrices ou autres moyens pour maintenir l'anaérobiose. De plus, les conditions menant à la sporulation (carence en substrat à pH supérieur à 5) ou à la reprise de l'activité biologique après **sporulation** et arrêt du bioréacteur durant plusieurs semaines sont parfaitement maîtrisées.

Dans le cas de *Cit. fr.* ces travaux et ceux en bioréacteur continu (CSTR) ont mis en évidence le rôle crucial sur la production d' H_2 de la **concentration en fer** dans le milieu. Dans les conditions optimales de culture (notamment à pH 5,9 ; à un taux de dilution de $0,012\ h^{-1}$ et en présence de $0,03\ g/L$ de $FeSO_4$), le rendement et la productivité peuvent être améliorés de 10 à 20 % en bioréacteur continu.

Dans le cas de *C. but.* des séquences avec **renouvellement de minimum 40 % du milieu de culture** conduisent à une diminution limitée (30 %) de la vitesse de production d' H_2 mais à un rendement de conversion du substrat en H_2 35% plus élevé (**283 mL H_2/g glucose**) et stable comparativement à ce qui a pu être observé pour la culture mixte (CM UASB) dans les mêmes conditions réactionnelles. Cela résulte de 3 facteurs qui ont pu être maîtrisés après détermination de ces conditions expérimentales:

- **l'absence d'inhibition** par manque de **nutriments** (même si les apports en molécules organiques azotées nécessaires au métabolisme, à savoir de la peptone de caséine à $3\ g/L$ et de l'extrait de levure à $0,3\ g/L$, ont été réduits de près d'un facteur 2 par rapport au milieu de base) ;
 - l'absence d'excès de métabolites de type **acides gras volatils** (souvent inhibiteurs des procédés de biodégradation) ;
 - **l'orientation du métabolisme** des bactéries vers les voies presque exclusivement associées à la production d' H_2 , c'est-à-dire les voies excréant l'acétate ou le butyrate (métabolites solubles majoritaires repris sur la Fig. III.2 colonnes 6 ; 8 ; 9 et 10 pour les cultures de *C. but.*) ;
- c. l'étude de bioréacteurs à forte rétention cellulaire : elle a confirmé l'impact crucial des propriétés de transfert gazeux au sein du milieu de culture sur les performances du bioréacteur. Cet impact que l'on associe à l'effet de la pression partielle en H_2 sur la voie métabolique la plus efficace de production d'acétate et d' H_2 est déjà décelable lorsqu'une **agitation du milieu** est mise en œuvre puisque des **rendements plus élevés** en H_2 ($145\ mL\ H_2/g$ contre $78\ mL\ H_2/g$ en absence d'agitation), en butyrate et dans une moindre mesure en acétate sont obtenus (Fig. III.2 colonnes 3 et 4). Des conditions plus favorables pour **l'évacuation de l'hydrogène gazeux** ont été provoquées dans les bioréacteurs horizontal et à biodisque. Des **rendements** plus élevés en H_2 , **dépassant les $300\ mL\ H_2/g$ glucose**, y sont atteints par rapport aux bioréacteurs de 2,3 et 5 L mais surtout une **proportion plus élevée d'acétate** par rapport au butyrate (Fig. III.2, ratio carboné de l'ordre de 7/10 dans le HFBR et AnBDR) contre 3,7/10 pour le bioréacteur de 2,3L) **signifiant davantage de prédominance de la voie métabolique associée à une faible pression partielle en H_2** . Ces conditions permettent dès lors d'augmenter la charge organique dans le bioréacteur jusqu'à des valeurs de plusieurs $g/L.h$ avec des productivités dépassant les **$700\ mL\ H_2/L.h$** . De

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

telles **performances à charge élevée** n'ont pu être atteintes dans le bioréacteur horizontal probablement du fait de l'absence d'un niveau suffisant de mélange et de la présence d'autres microorganismes consommant le substrat sans produire d'H₂.

L'ensemble de **ces résultats confirme l'intérêt, pour la production d'H₂ à grande échelle**, d'un bioréacteur alliant à la fois **immobilisation cellulaire et transfert gazeux très performant**. Le premier facteur doit permettre, au départ de conditions favorables conduisant à la formation de floccs ou biofilms de la souche *C. but.*, de maintenir sur le long terme une population élevée de ces microorganismes au sein du bioréacteur. Les propriétés de transfert gazeux optimal doivent permettre d'envisager des charges organiques élevées tout en maintenant des performances maximales. Il en va de la **compacité du bioréacteur**. Avantagement aussi dans ce sens, l'immobilisation des cellules de *C. but.* permet également d'envisager des **moyens simples, rapides et peu coûteux d'intervention en cas d'infections importantes** : moyens profitant de la faculté de ces microorganismes de sporuler pour résister à des traitements chimiques et/ou thermiques. Par rapport à ces critères 3 types de bioréacteurs adéquats peuvent être avancés :

- le bioréacteur à lit fluidisé (à cellules immobilisées sur support ou sous forme de granules comme dans l'UASB) ou à haut coefficient de turbulence ;
- le biodisque à faible volume liquide tel qu'expérimenté de façon originale dans le chapitre 2.4 ;
- le lit fixe arrosé.

La première proposition est de loin la plus énergivore. La seconde, moins énergivore, ne sera probablement pas la plus compacte ni la plus facile à mettre en œuvre en présence de substrats peu solubles tels que l'amidon ou en cas de nécessité de traitement efficace de la microflore immobilisée. **Le lit fixe arrosé semble le plus approprié** au vu de ces différents critères. De plus, bien que cette proposition n'ait pas été testée dans ce travail, elle n'est pas fondamentalement différente de la seconde dans sa conception hydrodynamique relative (écoulement des liquides par rapport au biofilm). Par conséquent les résultats ne devraient pas être très différents si des moyens appropriés pour la répartition homogène du substrat sur le support sont mis en œuvre. Des essais dans ce type de bioréacteur font partie des perspectives envisageables à la suite de nos travaux. Ils permettront d'affiner les plus récentes estimations technico-économiques sur le procédé de DA en deux étages réalisées par Ljunggren et Zacchi (2010).

2. Aspects économiques

Les **simulations économiques les plus pertinentes à l'heure actuelle par rapport au procédé** (Ljunggren and Zacchi 2010) sont appliquées sur le logiciel Aspen Plus à des **résidus de l'industrie de la pomme de terre** : pelures riches en amidon obtenues par râpage à la vapeur. Les **coûts liés à l'investissement** et aux principaux frais de **fonctionnement** sont pris en compte pour différents procédés de production d'H₂ (mésophiles ou thermophiles) et différents éléments du procédé en amont et aval : prétraitement des matières premières, DA pour dégrader les métabolites produits et traitement du biogaz pour produire un gaz riche utilisable comme carburant pour des véhicules. Les résultats de simulation considèrent une installation d'une puissance énergétique installée totale de **2 MW**. Une telle installation pourrait être installée en aval d'une industrie agro-alimentaire de bonne taille ou d'un ensemble de plus petites entreprises générant de l'ordre de **40 tonnes de matière sèche biodégradable par jour**. La Fig. III.3 reprend les résultats associés au procédé de production d'H₂ le plus représentatif par rapport à nos objectifs et travaux ainsi que ceux associés au cas de référence c'est-à-dire la DA classique en un seul étage.

Soulignons d'emblée que le coût de prétraitement est pour une bonne part lié aux enzymes alpha-amylases et gluco-amylases nécessaires pour saccharifier l'amidon de la matière

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

première. Un prétraitement approfondi de ce type de matière première tel que considéré par les auteurs n'est pas nécessaire pour la DA classique ni pour le procédé de DF tel que nous l'avons étudié avec des *Clostridium* capables de dégrader l'amidon. En outre, des tests (non publiés) l'ont démontré à partir du même type de matières premières. Ces coûts de traitement n'ont cependant pas été retirés de la Fig. III.3 car, en fonction des matières premières, des prétraitements hydrolytiques partiels ou spécifiques pourraient se révéler opportuns. De plus, les coûts de prétraitement estimés pour les simulations prennent également en compte les autres coûts de préparation des matières tels que la séparation des matières en suspension non digérées (cellulose, ...), une opération nécessaire avant le réacteur UASB choisi par les auteurs pour réaliser la DA avec un temps de séjour de deux jours. Ce choix technologique n'est probablement pas le moins coûteux ni le plus polyvalent mais, quoi qu'il en soit, une étape de préparation similaire aurait de toute façon dû être considérée au terme du procédé global. Ces **coûts de prétraitement** sont évalués à près de 30 Euros par Mégawatt.heure d'énergie totale produite.

Par rapport au procédé de référence de DA en un seul étage, 50% de coûts supplémentaires seraient liés au procédé en deux étages (125 €/MWh produit pour la DA en deux étages contre 83 €/MWh pour le procédé en un seul étage). Aucun gain n'est envisageable en optant pour un procédé thermophile de DF. Par contre, un gain de 20% peut être atteint en doublant la concentration en substrat. Une économie d'échelle substantielle, de l'ordre de 15 à 20%, est également possible en passant à 4 voire 8 MW de puissance installée totale. Toutefois il s'agit là d'installations qui ne respectent plus une proportion raisonnable par rapport aux procédés ciblés pour le traitement de leurs résidus. Les coûts supplémentaires dont il est question sont associés principalement au volume réactionnel total, plus que doublé par rapport au cas de base (2000 m³) et à l'ajout de produits chimiques spécifiques pour la DF tels que le molybdate

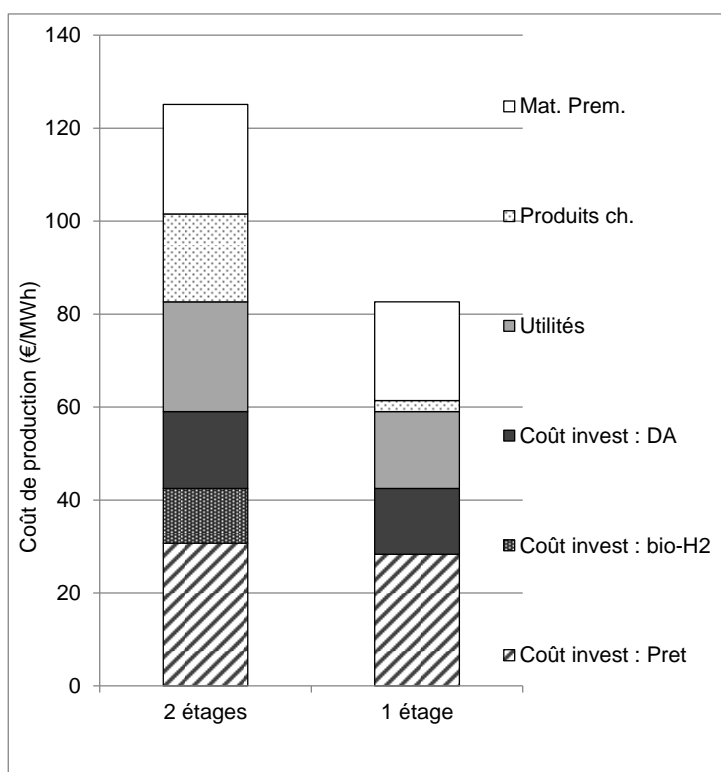


Fig. III.3 : Ventilation des principaux coûts de production liés à la DA en un seul ou deux étages de résidus de l'industrie de la pomme de terre : coûts liés à l'achat des matières premières (Mat. Prem.), des produits chimiques (Produits ch.), aux différents fluides (Utilités) et aux investissements pour les opérations de prétraitement (Pret.) des matières, pour le premier étage produisant le biohydrogène (bio-H₂) et le second étage finissant la DA méthanogène (DA)..

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

et le chlorure d'ammonium, du cobalt, du nickel (au total 89% du montant du poste considéré et représentant près de 20 €/MWh). Nos travaux n'ont toutefois pas eu à considérer ce type de produits spécifiques. Notons aussi que Ljunggren et Zacchi (2010) considéraient également d'autres coûts pour les deux bioréacteurs en extraits de levure, etc. qui sont généralement compensés par des **apports en nutriments équivalents via les autres substrats en codigestion équilibrée**.

Le cas des **besoins en peptides** pour la réalisation de la DF doit toutefois attirer notre attention. Les travaux de C. Hamilton pour déterminer les acides aminés essentiels impliqués dans le métabolisme de production d' H_2 devraient cependant apporter de nouveaux éclairages sur le rôle et les apports appropriés en azote dans le procédé. Au niveau industriel, le choix de déchets ou résidus organiques riches en ces composés pourra être réalisé, avec éventuellement une hydrolyse spécifique pour libérer certains peptides. Il s'agit là d'affinements du procédé qui ne devraient pas apporter de coûts supplémentaires vu que le reste de ces intrants sera digéré dans le deuxième étage de DA tout à fait robuste et polyvalent.

D'autres réductions de coût substantielles peuvent être envisagées grâce aux avancements atteints au terme de nos travaux, notamment par le fait que les **productivités et rendements obtenus dans le biodisque avec la souche *C. but.* sont respectivement 3.8 et 1.5 fois supérieurs à ceux considérés par Ljunggren et Zacchi (2010)**. Une réduction importante des investissements en volume réactionnel devrait s'en dégager. D'autant plus si des choix technologiques de bioréacteur simple et peu énergivore tels que proposés au point 1 sont privilégiés.

3. Vers une gestion intégrée des fluides énergétiques et des déchets

Les aspects économiques abordés dans le point précédent laissent envisager des **coûts de production énergétique pour le procédé en deux étages** de l'ordre de 100 €/MWh. Ils se rapprochent avantageusement de **80 €/MWh en cas d'intégration dans une industrie agro-alimentaire, par exemple, traitant ses déchets en tant que matière première pour l'alimentation du bioréacteur de DF** vu le coût y associé d'environ 20€/MWh (Fig. 3). Le **surcoût, soit 20 à 30% comparativement au procédé en un seul étage**, n'est pas négligeable mais Ljunggren et Zacchi (2010) n'ont pas pris en compte certains **avantages** liés au procédé en deux phases :

- a. leurs simulations considèrent une production énergétique globale inchangée (0.4 MW et 1.6 MW de puissance associée à la production d' H_2 et CH_4 , respectivement) par rapport au cas de référence. Or certains auteurs (Guwy et al. 2011), mentionnent des **gains énergétiques potentiels de 10 à 30%** par rapport à la DA classique, voire davantage dans le cas du traitement de la fraction organique des déchets ménagers ou assimilés (Escamilla-Alvarado et al. 2012);
- b. avec les rendements atteints lors de nos expérimentations, c'est même près d'un **tiers de la puissance totale** qui pourrait être liée à la production d' H_2 ;
- c. bien que ce soit difficile à quantifier économiquement à petite comme à grande échelle, la DA en deux étages est reconnue pour ses potentialités de « **protéger** » la **phase méthanogène** contre les chocs de charge organique, en volume et en composition. Sachant que les risques proviennent surtout des acides gras volatiles et que ceux-ci sont majoritairement liés à la dégradation des **matières carbohydratées**, leur « pré-digestion » dans un bioréacteur séparé ne peut qu'être favorable. Un complément en matières azotées résiduelles ciblées est cependant à considérer pour permettre le métabolisme de production d' H_2 ;
- d. le biogaz produit dans le premier étage a certains avantages sur le plan

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

- environnemental : absence de production de **gaz à effet de serre** lors de la conversion énergétique de l'H₂ ;
- énergétique : potentialité d'utilisation dans une **pile à combustible** avec des rendements plus élevés par rapport aux moteurs à explosion ;
- sécurité : l'H₂ est plus léger que l'air et a des **propriétés de diffusion** plus rapide que le CH₄ (en cas de fuite du réservoir) ;
- chimique : l'H₂ est plus **facile à séparer** du CO₂ que le CH₄ et le biogaz contient moins ou pas de molécules sulfurées malodorantes et toxiques que le biogaz de DA classique.

Dans ce sens et à court terme, des applications potentielles pour le biohydrogène tels que l'alimentation de piles à combustible ou de moteurs à explosion nécessitant à la fois une **puissance élevée** et une **implantation/utilisation « indoor »** sont à privilégier dans les entreprises ciblées (ayant des matières carbohydratées à traiter) ou environnantes (pour éviter des coûts de transport souvent onéreux). Ces applications concernent par exemple des engins élévateurs, convoyeurs ou groupes électrogènes dans des entrepôts ou usines de production et associés à une utilisation relativement continue ou totalement discontinuée mais relativement planifiable. En effet, afin de ne concevoir qu'un stockage minimum du gaz et vu la **réactivité élevée de l'acidogénèse** au sein du bioréacteur de DH et sa relative **indépendance** par rapport au second étage, il est possible d'envisager l'**alimentation en matières premières du premier bioréacteur quelques minutes à quelques heures seulement avant le besoin énergétique à satisfaire**. Les effluents sont alors stockés aisément en vue de l'alimentation du second digesteur à la demande. L'intérêt est non seulement une souplesse d'utilisation de moteurs thermiques puissants dans des lieux fermés (en substitution par exemple à des batteries électriques dont le temps de charge est non négligeable par rapport au remplissage d'un réservoir) mais c'est aussi la possibilité de réduire les coûts d'investissement de certaines installations électriques en les dimensionnant en fonction de la puissance de consommation moyenne plutôt qu'en fonction des **pics de puissance**. Le besoin de pic peut alors être satisfait par une association moteur électrique-pile à H₂ ou un moteur à gaz alimenté par le bio-H₂, éventuellement purifié en fonction du niveau de ventilation environnementale (le niveau d'émission de CO₂ étant plus faible intrinsèquement par rapport aux carburants hydrocarbonés partant d'un biogaz de DF à 70 % d'H₂). De plus, les calories développées par ces moteurs ne sont pas complètement perdues car diffusées ou utilisées en interne ou « indoor ».

Par conséquent, il s'agit là d'utilisations et de **développements niches pour l'instant mais réalistes et ambitieux** car ils ne demandent pas, en aval du procédé biotechnologique, de développement technologique important, tout au plus une stratégie d'intégration énergétique non limitée à l'entreprise concernée. Ces développements ne sont pas utopistes non plus car ils s'inscrivent dans le sens d'une **intégration approfondie au niveau énergétique et des matières, y compris les déchets, au sein des entreprises** manufacturières et de services d'une même zone. Ce concept de zoning éco-industriel évolue de plus en plus dans les pays industrialisés occidentaux en vue de maintenir la compétitivité des industries existantes et d'éviter les délocalisations. Il se base sur une **symbiose industrielle, mimant les écosystèmes naturels**, dans lesquels les déchets de l'un sont la matière première de l'autre, etc. L'exemple le plus souvent cité et associé à ce concept s'est progressivement développé dans les années '70 à '90 au Danemark entre les sociétés extractives et (bio-)chimiques telles que Gyproc et Novo Nordisk de la région de Kalundborg (Brings Jacobsen 2002; van Koppen and Mol 2002). Par la suite, et très souvent sous l'impulsion de managers qui ont une profonde connaissance personnelle réciproque et de leurs procédés respectifs, d'autres initiatives ont vu le jour dans de nombreux pays (France, GB, Canada, USA, ...) intégrant de plus en plus également les activités liées à la gestion intégrée des effluents de matières organiques (épuration conjointe d'effluents très complémentaires d'industries différentes par exemple). En Région wallonne ce concept se répand aussi et des projets concrets sont à l'étude suite au premier appel du Plan Marshall dans ce sens de septembre 2010 (<http://ecozoning.wallonie.be>).

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

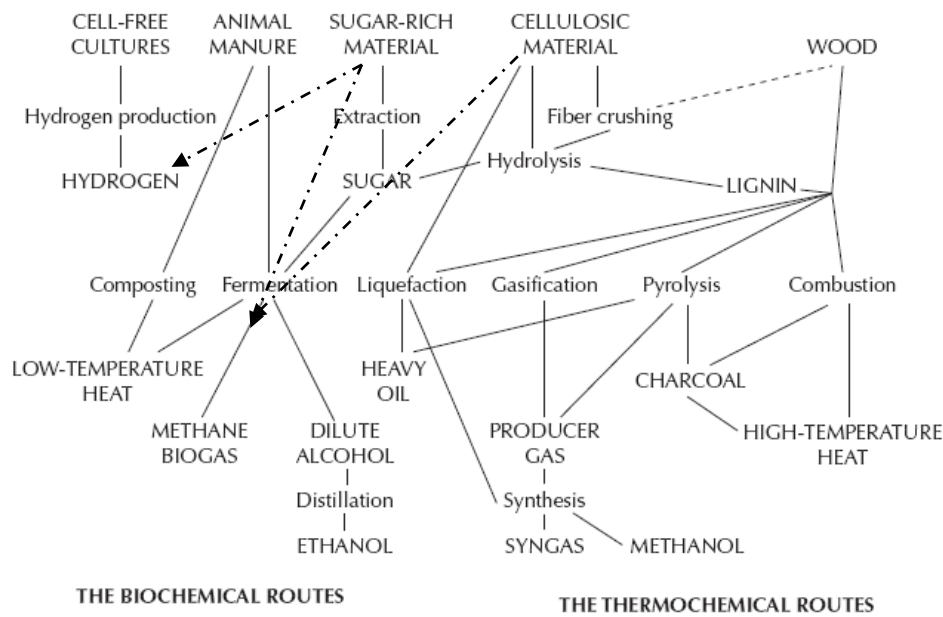


Fig. III.4 : Différentes voies technologiques de valorisation énergétique des biomasses (d'après Sorensen, 2011) : les flèches en trait discontinu sont des pistes également envisageables mais non considérées par Sorensen.

4. Choix technologiques polyvalents et durables

Les développements de l'écologie industrielle se doivent aussi d'étudier et de sélectionner les technologies les plus soutenables notamment via l'analyse socio-économique des procédés et du cycle de vie des matières. Dans cette optique, **le procédé de DA au sens large (DF+DA) de matières organiques doit être comparé aux différents procédés concurrents tant en fonction des matières premières que de l'utilisation des produits finis**. Ces concurrents industriels existant sont des procédés thermochimiques tels que l'incinération et la gazéification ou biologiques tels que le compostage ou la fermentation éthanolique (Fig. III.4, (Fruergaard and Astrup 2011; McKendry 2002a; Sørensen 2011)). Une vaste étude en Suède (Sundqvist 2002; Sundqvist 2004) a par exemple montré que, pour les matières organiques ou l'ensemble des déchets ménagers et assimilés, **la DA associée à la cogénération d'une part et l'incinération d'autre part étaient les technologies les plus concurrentielles par rapport au compostage ou à la gestion en CET** (choix le plus pénalisant même en cas de gestion efficace du biogaz mais toutefois pris en compte pour la pertinence de la comparaison). Ces résultats sont confirmés par d'autres études (Belboom et al. 2011; Fruergaard and Astrup 2011). L'étude de Sundqvist (2002 ; 2004) est basée sur

- des déchets déjà triés sélectivement à la base (pour recycler les papiers, verres et métaux notamment)
- la situation de trois villes d'importance différente : comptant une population de 10 000 ; 200 000 et, pour la capitale, 500 000 habitants
- les paramètres environnementaux (réchauffement climatique, eutrophisation, ...), énergétiques (consommation d'énergie primaire épargnée) et économiques (investissements, coût environnemental, transport, etc.)

Les avantages, chiffres à l'appui, avancés pour l'incinération sont l'approche technologique simple et globalisante permettant de valoriser énergétiquement et directement les matières combustibles non fermentescibles (plastiques et lignine) avec des coûts maîtrisés sur le

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

traitement efficace des effluents. L'inconvénient majeur de l'incinération est le non-retour de matières à la terre. Ce qui n'est pas le cas pour la DA puisque les **matières résiduelles solides et liquides peuvent, lorsque le tri à la base est de qualité, être ramenées au sol comme fertilisant et agent texturant** avec un apport minimum de 5 tonnes par hectare par an nécessaire pour éviter d'appauvrir le sol progressivement (Hogg 2004). De ce fait, **la DA a les avantages mais pas l'intégralité des inconvénients du compostage** liés à l'acidification et l'eutrophisation potentielle et partielle du milieu naturel et à la consommation d'énergie primaire.

C'est lorsqu'elle est associée à une cogénération valorisant le biogaz que l'impact de la DA est le plus faible sur la **production de gaz à effet de serre (10 à 15 % de moins que l'incinération)** et sur la consommation d'énergie primaire de substitution (3 à 7 % plus avantageux). L'alternative via le traitement du méthane (« gas upgrading ») pour une utilisation comme carburant dans des véhicules à moteur est moins avantageuse du fait du contrôle moins efficace des émissions de NOx. Signalons cependant que (Djomo and Blumberga 2011) mentionnent **50 % de réduction des gaz à effets de serre pour des moteurs à bioH₂** par rapport au diesel ou l'hydrogène issu du reformage du méthane ; leur ACV prenant en considération toute la filière depuis la production jusqu'à la consommation du carburant gazeux épuré et comprimé à 450 bar.

Ces avantages de la DA ont un **coût total (financier et environnemental) de 10 à 18% supérieur**, respectivement pour les grandes et plus petites installations, **par rapport aux coûts de l'incinération**. Notons que ces différences de coût s'estompent en fonction de la teneur en humidité des déchets vu que la quantité d'eau représente un manque à gagner énergétique affecté à son évaporation. Ce même parallèle peut être tiré entre la gazéification et la DF pour produire de l'H₂. De ce fait, les matières contenant moins de 20 à 30 % d'humidité seront préférablement valorisées par des procédés thermo-chimiques (incinération ou gazéification). **Pour les matières contenant plus de 50% d'eau voire plus de 20 à 30 % suivant les cas et opportunités, les traitements par fermentation seront privilégiés** (McKendry 2002a; McKendry 2002b). De plus, des **installations de DA de quelques MW sont concevables voire préférables** en ce qui concerne l'impact du transport des matières alors que les installations thermo-chimiques devront profiter des effets d'échelle et se positionner pour des puissances de près d'une dizaine voire plusieurs dizaines de MW. En complément, les travaux de Ruggeri et Tommasi (Ruggeri et al. 2011; Ruggeri et al. 2010; Tommasi 2010; Tommasi et al. 2012) mentionnent pour la DF+DA des **retours énergétiques sur investissement** énergétique (EROEI : énergie utile totale produite sur la vie de l'installation rapportée à la quantité d'énergie dépensée) **variant de 15 à 45, relativement plus durables que ceux des installations photovoltaïques** (EROEI de 3 à 9) **et de certaines éoliennes** (EROEI de 5 à 80) mais du même ordre de grandeur que les installations hydroélectriques de taille modeste (EROEI de 30 à 70).

Dans le contexte des transports, la DA ou DF+DA associée à un traitement « d'upgrading » du biogaz se trouve en compétition avec le bioéthanol. Ce marché supporte jusqu'à présent des coûts d'approvisionnement énergétique supérieurs à ceux considérés pour les applications stationnaires. Des surcoûts relatifs à des prétraitements des matières premières ne sont donc pas prohibitifs ou à proscrire a priori. La production de méthane et/ou hydrogène peut donc être envisagée à partir de matières (hémi-) cellulosiques comme pour le bioéthanol de seconde génération. **La polyvalence de la DA est cependant plus élevée.** Elle peut exploiter des **matières grasses et protéiques** au même titre que les **carbohydrates** et ce, sans limitation liée à la nature de ces matières sauf au niveau du temps nécessaire pour la biodégradation (d'autant plus important que les matières sont complexes). **La fermentation éthanolique par contre est limitée aux carbohydrates simples** (Chandra et al. 2012; Didden et al. 2008) et nécessite des précautions pour maîtriser l'écologie microbienne en favorisant le développement et l'activité des levures. Par conséquent, les procédés de production de bioéthanol ne sont bien souvent rentables que pour des installations de taille importante et n'impliquant par la même que des coûts de transport ayant peu d'impact sur la rentabilité globale du procédé. C'est le cas dans les circonstances actuelles mais les coûts de transport pourraient s'accroître drastiquement dans les décennies à venir. De plus, les résidus de ces procédés (appelés vinasses) ont encore une valeur importante qui nécessite de

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

leur trouver un marché intéressant pour ne pas grever les coûts de production. Ce type de marché cible et porteur est le secteur de l'alimentation animale, presque exclusivement, pour les vinasses des procédés de production de bioéthanol de première génération. Il n'est pas accessible **pour les vinasses des procédés de 2^e génération**. A défaut, la **DA est la technologie alternative par excellence**.

En outre, le procédé de production du bioéthanol, par rapport à la DA, ne peut prétendre tirer plus que 10% de potentiel énergétique supplémentaire de certains déchets agricoles tels qu'issus de la canne à sucre ou la paille de riz. Dans le cas des déchets de la culture du maïs et et du froment, il serait même défavorable énergétiquement (Chandra et al. 2012). A cela il faut ajouter l'impact économique des coûts élevés pour les prétraitements obligatoires et pour les opérations d'extraction de l'éthanol du milieu de culture, particulièrement énergivores, comparativement à **l'extraction spontanée du biogaz lors de la DF+DA**. Selon les données de Chandra et al (2002), le **rapport entre énergie produite et énergie consommée pour la production du carburant** ne serait que de 3,4 à 3,7 pour la filière bioéthanol de 2^e génération (chiffres optimistes par rapport à ceux de Groode (2008) et McKendry (2002a)) contre **plus de 20 pour la filière DA**.

Notons que le traitement du méthane pour en faire un carburant gazeux de qualité («gas upgrading») n'est pas le seul procédé envisageable pour produire un biocarburant en aval d'une DA. **Le CH₄ peut aussi être transformé en méthanol** par voie chimique catalytique. Le méthanol est une matière première pour de nombreux procédés chimiques mais il est aussi un carburant **équivalent au bioéthanol** (Ruiz-Altisent 1994; Sørensen 2011). Dans ce cas, un avantage énergétique peut potentiellement être atteint par rapport à la production de bioéthanol : rapport entre énergie produite et énergie consommée de l'ordre de 3,9 pour le méthanol à partir de CH₄ et CO₂ (Patel et al. 2010; Sørensen 2011).

A plus long terme, la DA au sens large a aussi toutes ses chances comme technologie de soutien en aval de la filière des biorcarburants de 3^e génération. La biomasse algale est des plus prometteuses et des moins controversées (Brennan and Owende 2010). Un premier avantage est la potentialité de croissance toute l'année sur des zones non cultivables, même chargées en sel et/ou irriguées par des eaux usées. Un second atout des algues est leur richesse en lipides (20 à 50 % du poids sec) facilement extractibles par voie mécanique par exemple en vue d'une transestérification en biodiesel avec des rendements énergétiques par hectare de culture dix fois supérieurs à ceux du colza (Brennan and Owende 2010). En fin de process, les résidus riches en carbohydrates (jusqu'à 37% d'amidon pour *Chlorella vulgaris*) sont une biomasse de choix pour la DF+DA.

De par ces différentes potentialités évoquées, et par nature, le CH₄ et l'H₂ sont à la frontière entre la biologie et la chimie. Ajoutons encore que l'H₂ peut être utilisé dans de nombreux procédés d'hydrogénation et que le CH₄ est aussi un substrat pour certains microorganismes méthanotrophes des genres *Methylosinus* et *Methylocystis* (Wendlandt et al. 2001; Zhang et al. 2008). Ils sont capables, comme d'autres bactéries des genres *Ralstonia* et *Pseudomonas* de **synthétiser des bio-polyesters de type polyhydroxyalcanoates** tels que le polyhydroxybutyrate (Chanprateep 2010; Lee 1996; Lemos et al. 2004; Wen et al. 2010; Wendlandt et al. 2001; Zhang et al. 2008)). Une ACV intéressante de ces matériaux biopolymères a été réalisée récemment en comparaison aux classiques polyéthylène et polypropylène issus des produits pétroliers (Harding et al. 2007). Elle montre que les besoins en eau et énergie pour les procédés biologiques sont à optimiser.

En définitive, c'est donc une place centrale et essentielle, entre chimie et biologie, que ces deux molécules gazeuses H₂ et CH₄ occupent ou pourraient occuper davantage dans les activités socio-économiques et respectueuses de l'environnement. La filière de la digestion anaérobie est donc la filière à privilégier pour sa **robustesse**, sa **polyvalence** pour les matières premières (dont les déchets de toute nature, solides et liquides), ses capacités de **digestion approfondie** avec ou sans prétraitement (seul le facteur temps a un impact important sur le rendement de conversion énergétique) et pour sa **flexibilité pour des**

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

installations de petite taille ou grande taille (de quelques centaines de kW à plusieurs MW). A propos de ce critère, il faut signaler qu'un gain considérable ne peut pas nécessairement être attendu par l'effet d'échelle pour compenser les coûts de transport des matières. Cependant, et on en revient au concept éco-industriel, un intérêt pourrait se manifester en vue d'associer des installations de grande taille à des procédés rentables de transformation du biogaz en aval. De grandes installations de DF+DA pourraient être construites autour de gisements importants de matières organiques et à la fois entourées par des surfaces agricoles suffisantes ou des industries ayant un haut intérêt pour des eaux usées plus ou moins épurées. L'industrie est en effet le second plus gros consommateur d'eau dans le monde (25% du gisement) après les secteurs associés à l'agriculture. Certaines industries n'ont cependant pas nécessairement besoins d'eaux pures mais peuvent se contenter d'eaux issues d'un processus d'épuration, comme c'est le cas par exemple pour 50 % des eaux sortant de la station d'épuration de Los Angeles (Lazarova 2002; van Os and Stanghellini 2002).

Références

- Belboom S, Renzoni R, Digneffe J-M, Leonard A. 2011. Evolution de l'impact environnemental lié à la gestion des déchets ménagers en Belgique (Liège) durant les trente dernières années. *Récents Progrès en Génie des Procédés* 101.
- Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2):557-577.
- Brings Jacobsen N. 2002. The industrial symbiosis in Kalundborg, Denmark - industrial networking and cleaner industrial production. In: Lens P, Hulshoff Pol L, Wilderer P, Asano T, editors. *Water Recycling and Resource Recovery in Industry Analysis, Technologies and Implementation*. London: IWA. p 339-358.
- Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T. 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(3):1462-1476.
- Chanprateep S. 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110(6):621-632.
- Didderen I, Destain J, Thonart P, editors. 2008. *Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Gembloux: Les presses agronomiques de Gembloux. 129 p.
- Djomo SN, Blumberga D. 2011. Comparative life cycle assessment of three biohydrogen pathways. *Bioresource Technology* 102(3):2684-2694.
- Escamilla-Alvarado C, Rios-Leal E, Ponce-Noyola MT, Poggi-Varaldo HM. 2012. Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic-methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *Process Biochemistry* (in press).
- Fruergaard T, Astrup T. 2011. Optimal utilization of waste-to-energy in an LCA perspective. *Waste Management* 31(3):572-582.
- Groode TA. 2008. *Biomass to Ethanol: Potential Production and Environmental Impacts*. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology. 186 p.
- Guwy AJ, Dinsdale RM, Kim JR, Massanet-Nicolau J, Premier G. 2011. Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource Technology* 102(18):8534-8542.
- Harding KG, Dennis JS, von Blottnitz H, Harrison STL. 2007. Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- β -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology* 130(1):57-66.
- Hogg D. 2004. Costs and benefits of bioprocesses in waste management. In: Lens P, Hamelers B, Hoitink H, Bidlingmaier W, editors. *Resource Recovery and Reuse in Organic Solid Waste Management*. London: IWA. p 95-121.
- Lazarova V. 2002. Potentials of biotechnology in water and resource cycle management. In: Lens P, Hulshoff Pol L, Wilderer P, Asano T, editors. *Water Recycling and Resource Recovery in Industry Analysis, Technologies and Implementation*. London: IWA. p 339-358.
- Lee SY. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49(1):1-14.
- Lemos PC, Serafim LS, Ramos AM, Reis MAM. 2004. Bioplastics from waste materials. In: Lens P, Hamelers B, Hoitink H, Bidlingmaier W, editors. *Resource Recovery and Reuse in Organic Solid Waste Management*. London: IWA. p 423-440.
- Ljunggren M, Zacchi G. 2010. Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane. *Bioresource Technology* 101(20):7780-7788.
- McKendry P. 2002a. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresource Technology* 83(1):47-54.

DISCUSSION GENERALE : intégration du procédé dans le contexte socio-économique général

- McKendry P. 2002b. Energy production from biomass (part 3): gasification technologies. *Bioresource Technology* 83(1):55-63.
- Patel B, Hildebrandt D, Glasser D. 2010. An overall thermodynamic view of processes: Comparison of fuel producing processes. *Chemical Engineering Research and Design* 88(7):844-860.
- Ruggeri B, Sanfilippo S, Tommasi T, Fino D. 2011. Process energy sustainability evaluation through a LCA approach. *Chemical Engineering Transactions* 25:629-634.
- Ruggeri B, Tommasi T, Sassi G. 2010. Energy balance of dark anaerobic fermentation as a tool for sustainability analysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(19):10202-10211.
- Ruiz-Altisent M. 1994. Biofuels : application of biologically derived products as fuels or additives in combustion engines. Brussels: European Commission. Directorate-General XII. Science, Research and Development. Report nr 0959-6526. 185 p.
- Sørensen B. 2011. Chapter 4 - The Energy Conversion Processes. *Renewable Energy (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press. p 337-531.
- Sundqvist J-O. 2002. Material and nutrient recycling and energy recovery from solid waste: systems perspective. In: Lens P, Hulshoff Pol L, Wilderer P, Asano T, editors. *Water Recycling and Resource Recovery in Industry Analysis, Technologies and Implementation*. London: IWA. p 524-544.
- Sundqvist J-O. 2004. System analysis of organic-waste management schemes-experiences of the ORWARE model. In: Lens P, Hamelers B, Hoitink H, Bidlingmaier W, editors. *Resource Recovery and Reuse in Organic Solid Waste Management*. London: IWA. p 45-70.
- Tommasi T. 2010. Experimental evaluation of design bioreactor parameters for dark bioH₂ production using organic wastes. Torino: Politecnico di Torino. 195 p.
- Tommasi T, Ruggeri B, Sanfilippo S. 2012. Energy valorisation of residues of dark anaerobic production of Hydrogen. *Journal of Cleaner Production (in press)*.
- van Koppen K, Mol APJ. 2002. Ecological modernization of industrial ecosystems. In: Lens P, Hulshoff Pol L, Wilderer P, Asano T, editors. *Water Recycling and Resource Recovery in Industry Analysis, Technologies and Implementation*. London: IWA. p 132-157.
- van Os EA, Stanghellini C. 2002. Water reuse in greenhouse horticulture. In: Lens P, Hulshoff Pol L, Wilderer P, Asano T, editors. *Water Recycling and Resource Recovery in Industry Analysis, Technologies and Implementation*. London: IWA. p 654-663.
- Wen Q, Chen Z, Tian T, Chen W. 2010. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences* 22(10):1602-1607.
- Wendlandt KD, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U. 2001. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology* 86(2):127-133.
- Zhang Y, Xin J, Chen L, Song H, Xia C. 2008. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *Journal of Natural Gas Chemistry* 17(1):103-109.

<http://ecozone.wallonie.be> (consulté le 15/3/2012)

Conclusions

Les travaux menés dans le cadre de la thèse s'inscrivent dans un contexte énergétique mondial en profonde mutation : volatilité des prix pétroliers, difficultés croissantes de trouver de nouveaux gisements, prise de conscience des importantes nuisances liées aux gaz à effet de serre et volonté de réduire drastiquement les pollutions afin de vivre dans un environnement plus sain.

Pour faire face à ces nouveaux défis de taille et ainsi produire des énergies vertes avec une certaine indépendance énergétique, la technologie de digestion anaérobie en deux étapes a des atouts majeurs. A partir de matières organiques biodégradables et grâce à l'intervention de microorganismes spécifiques bien connus, elle produit de façon indépendante mais synergique un biogaz riche en H_2 et un autre riche en CH_4 . Ce procédé biotechnologique est d'autant plus intéressant lorsque les substrats utilisés sont des sous-produits, des eaux usées ou des déchets agroalimentaires car il permet de coupler leur épuration avec la production d'une énergie verte à coût réduit.

Bien que les deux gaz soient complémentaires dans leur utilisation en aval, l' H_2 a de multiples avantages liés à sa densité énergétique, sa polyvalence et sa nature non polluante quel que soit le mode utilisé pour la conversion en énergie mécanique, thermique ou électrique.

Dans ce travail, plusieurs facteurs d'optimisation de la production de biohydrogène ont été étudiés pour améliorer le premier étage du procédé de digestion anaérobie. Ils ont porté sur la microbiologie, la biochimie et la physiologie : sélection des souches, influence du pH, du substrat, ...

Des bioréacteurs originaux et peu énergivores ont été développés pour permettre d'atteindre des rendements et productivités élevés en H_2 dépassant les 300 mL d' H_2 produits par gramme de glucose consommé et 700 mL d' H_2 par heure et par litre de volume liquide au sein du bioréacteur. Ces résultats sont respectivement 3 et 10 fois plus élevés que la moyenne des résultats initiaux.

Finalement, les derniers travaux et la discussion générale ont permis de confirmer la position centrale et tout à fait intéressante et imposante de la digestion anaérobie en deux étapes dans le panel des technologies capables à la fois de traiter/valoriser des matières organiques agricoles et/ou résiduaire et de produire de l'énergie ou vecteurs énergétiques pour des utilisations stationnaires ou mobiles. Les aspects techniques, économiques et environnementaux ont été considérés.