



## Encadrement de thèse

---

### Promoteurs de thèse

Prof. Philippe Thonart  
Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)  
Université de Liège, Belgique

Prof. Michel Crine  
Laboratoire de Génie Chimique  
Université de Liège, Belgique

### Comité de thèse

Prof. Fabrice Franck	Université de Liège, Belgique
Prof. Albert Germain	Université de Liège, Belgique
Prof. Georges Heyen	Université de Liège, Belgique
Dr. Annick Wilmotte	Université de Liège, Belgique

### Jury de thèse

Madame et Messieurs les promoteurs et membres du comité de thèse

Prof. Patrick Gerin	Université Cathlique de Louvain, Belgique
Prof. Benoit Heinrich	Université de Liège, Belgique
Dr. Stéphanie Lambert	Université de Liège, Belgique
Dr. Serge Hiligsmann	Université de Liège, Belgique

©Université de Liège, 2012

Thèse réalisée au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Département des Sciences de la Vie, Service de Technologie Microbienne.

Les travaux présentés dans ce document ont reçu le soutien financier du FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS), par l'octroi d'une bourse d'aspirant de 2008 à 2012, et de la Fédération Wallonie-Bruxelles au travers du financement de l'ARC 07/12-04 Micro-H<sub>2</sub>.





**Université de Liège**  
**Faculté des Sciences Appliquées**  
**Centre Wallon de Biologie Industrielle**  
**Service de Technologie Microbienne**

**La production de biohydrogène par  
fermentation anaérobie :  
Voies d'optimisation et d'application  
du bioprocédé**

Année Académique 2012 – 2013

Dissertation présentée par

**Laurent BECKERS**

En vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences de l'Ingénieur



*Aujourd'hui se décide ce que sera le monde en 2050 et se prépare ce qu'il sera en 2100. Selon la façon dont nous agissons, nos enfants et nos petits-enfants habiteront un monde vivable ou traverseront un enfer en nous haïssant. Pour leur laisser une planète fréquentable, il nous faut prendre la peine de penser l'avenir, de comprendre d'où il vient et comment agir sur lui. C'est possible : l'Histoire obéit à des lois qui permettent de la prévoir et de l'orienter.*

*Jacques Attali, Une brève histoire de l'avenir, Paris, Ed. Fayard, 2006, p.9.*



# Abstract

---

The emergence of environmental and societal issues caused by the fossil fuels consumption and the simultaneous increase of the energetic needs will lead the society to evolve into a new energetic system. The creation of the hydrogen society could bring a suitable and sustainable solution since the production and use of hydrogen could be operated at higher yields than the fossil fuels economy and produce energy while generating only water vapour as co product. However, in order to get rid of the fossil fuels consumption, there is a need to diversify the hydrogen production processes and technology, currently still based on CO<sub>2</sub>—emitting technologies. The so-called “dark fermentation” process is based on strict of facultative anaerobic bacteria producing biohydrogen and soluble metabolites as a fermentation co product. These microorganisms consume organic substrates such as in wastewater to achieve their growth. The biohydrogen technology has been studied during several years in laboratory but still is not mature to be brought at an industrial scale. Indeed, there is first a need to improve the performances (such as the H<sub>2</sub> yields and production rates) to achieve the technical and economical requirements. This thesis investigates and discusses various possibilities in order to bring the biohydrogen production process to a larger scale.

The strain investigated in this work, *Clostridium butyricum*, can achieve high performances (in terms of hydrogen yields, about 1.9 to 2.2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> and production rates, about 50 to 110 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> in batch or sequencing-batch cultures) and is able to consume simple and more complex substrates. However, being a strict anaerobic strain, its uses in pure culture requires the achievement of strong anaerobic conditions using artificial and costly means. Moreover, even if the work in pure culture has some advantages at the laboratory scale, it is inappropriate to larger volumes of bioreactor. Therefore, mixed cultures were investigated in batch and sequencing-batch bioreactors, resulting in a decrease by about 30 to 50% of the yields (down to 1.2 to 1.7 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>). The mixed cultures reached however comparable or higher performances than the scientific literature confirming the interest of the approach suggested in this work.

However, the performances need to be further enhanced in order to make the process economically possible. Therefore, improvements of the yields and the rates were proposed. On the one hand, the yields were increased by 55 to 100% (up to 3.1 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) by improving the mass transfer conditions and, by the way, decreasing the dissolved hydrogen concentration in the liquid media. These considerations led to the design of a novel biodisc bioreactor working continuously and allowing the efficient hydrogen mass transfer. In mixed culture, the biodisc bioreactor reached high performances (H<sub>2</sub> yields of 2.4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> and H<sub>2</sub> rates of 600 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>), showing the interest of the original design and of the “mass transfer” approach achieved in this work. On the other hand, the addition in the culture medium of small quantities of metallic nanoparticles showed a catalytic-like effect by enhancing the hydrogen production rate by about 40 to 100%.

Ending this work, the general discussion evidences the advantages of the different techniques suggested in the work and compares them to the recent scientific literature. Furthermore, perspectives are given in terms of scientific outlooks, considering the economical, environmental and technical aspects, in order to bring the hydrogen production process at a large scale.

## Résumé

---

Avec l'arrivée des problèmes environnementaux engendrés par la consommation de ressources fossiles et par l'augmentation simultanée des besoins énergétiques, il sera bientôt nécessaire de bouleverser le modèle énergétique sur lequel la société actuelle repose. L'hydrogène apporte une solution durable et pratique, sa production et son utilisation pouvant se réaliser à haut rendement et sa combustion ne générant que de l'énergie et de l'eau comme sous-produits. Cependant, afin de s'affranchir de la consommation des combustibles fossiles, une diversification des moyens de production de l'hydrogène doit être envisagée. Le procédé de « dark fermentation » permet la production de biohydrogène en faisant intervenir des bactéries anaérobies. Ces dernières ont la possibilité de consommer les substrats carbonés de milieux aqueux, tels que les eaux usées, afin de produire de l'hydrogène et, parallèlement, de relarguer en solution divers métabolites solubles. Si cette technologie est étudiée depuis plusieurs années en laboratoire, elle n'est pas encore assez mature pour être portée à l'échelle industrielle. En effet, l'application à de plus grands volumes requiert l'amélioration des performances et la stabilisation du procédé sur le long terme. Ce travail de thèse propose donc plusieurs pistes d'études visant à permettre le *scaling-up* de la production de biohydrogène.

La souche principalement étudiée dans ce manuscrit, *Clostridium butyricum*, est particulièrement intéressante car elle permet d'atteindre de bonnes performances (rendements de conversion du glucose en hydrogène de 1.9 à 2.2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> et productivités de 50 à 110 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> en culture batch ou fed-batch) et consomme une large gamme de substrats. Cependant, étant anaérobie stricte, son utilisation en culture pure nécessite de créer l'anaérobiose par des moyens artificiels coûteux. Par ailleurs, s'il possède des avantages au niveau du laboratoire, le travail en culture pure est exclu à plus grande échelle. Dès lors, des cultures mixtes ont été étudiées en fermentations batch et en bioréacteurs alimentés de manière séquentielle. La formation de consortia a résulté en la diminution des rendements de l'ordre de 30 à 50% (à 1.2 à 1.7 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>), mais ont permis d'atteindre *in fine* des performances comparables, voire supérieures à la littérature scientifique.

Cependant, les rendements atteints, même s'ils sont satisfaisants, ne sont pas suffisants pour rendre le procédé économiquement viable. Des moyens d'amélioration des rendements et des productivités ont été proposés. D'une part, l'abaissement des concentrations en hydrogène dissout, réalisé par l'amélioration des conditions de transfert, ont permis d'augmenter de près de 55 à 100% les rendements (jusqu'à 3.1 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>). Cela a abouti au design d'un bioréacteur à biodisque fonctionnant en continu et permettant une amélioration du transfert d'hydrogène par rapport à un réacteur à cuve agitée classique. Les performances atteintes dans ce bioréacteur en cultures mixtes (2.4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> et 600 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) montrent l'intérêt de ce design original, mais surtout de l'approche axée sur le « transfert de matière » comme réalisé dans ce travail. D'autre part, l'ajout de nanoparticules métalliques agissant en collaboration avec les enzymes responsables de la production d'hydrogène ont montré un effet de type catalytique en accélérant la production d'hydrogène de l'ordre de 40 à 100%.

Ce travail se conclut par une discussion générale mettant en évidence les avantages des techniques utilisées au cours de ce travail de thèse en comparaison avec les études récentes publiées dans la littérature scientifique. En outre, des perspectives de recherches, reprenant les aspects techniques, économiques et environnementaux, sont données afin de permettre l'évolution et l'application à plus grande échelle de la production d'hydrogène par fermentation anaérobie.



## Remerciements

---

Le thésard qui achève sa thèse est un peu comme le marathonien qui aperçoit la ligne d'arrivée... heureux d'y arriver enfin, mais aussi comblé d'avoir accompli ce long chemin. Plus qu'une simple expérience professionnelle, cette thèse est un aboutissement, le fruit de quatre années de travail discipliné et consciencieux passées au CWBI. Chaque lecteur comprendra que c'est bien plus qu'un manuscrit plus ou moins long, car au cours de ces années, j'ai eu le plaisir de côtoyer de nombreuses personnes qui, professionnellement ou amicalement, m'ont apporté soutien, collaboration et inspiration. Sans elles, ce travail n'aurait pas été possible. Il y a donc lieu de dresser ici une liste plus ou moins exhaustive de remerciements. Il arrive toujours que quelques personnes soient oubliées... Alors, d'entrée de jeu, à tout lecteur qui se sentirait concerné, je tiens à vous remettre tous mes remerciements les plus profonds et vous assurer que ce travail est aussi un peu le vôtre.

J'adresse mes premières pensées au Professeur Philippe Thonart, promoteur de cette thèse, qui m'a donné le goût de la microbiologie et m'a ouvert les portes du CWBI. Ses conseils avisés, ses connaissances, ses encouragements et ses idées m'ont permis non seulement d'avancer et de passer au travers des étapes qui ont jalonné ces quatre années, mais aussi de progresser dans ma formation et dans ma méthode scientifique.

Je remercie également le FNRS, en la personne de sa secrétaire générale, Mme Véronique Halloin, pour la bourse d'aspirant FNRS qui m'a été octroyée, m'ouvrant la voie vers cette aventure exceptionnelle. Je tiens également à mentionner la Communauté Wallonie-Bruxelles qui a soutenu le projet MicroH<sub>2</sub> en la création de l'Action de Recherche Concertée ARC-07/12-04/.

Pour leurs encouragements et conseils avisés lors de nos réunions de présentation de résultats et de (ré-)orientation de la thèse, je tiens à remercier mon co-promoteur, Prof. Michel Crine, ainsi que les membres du comité de thèse, Dr. Annick Wilmotte, Prof. Fabrice Franck, Prof. Albert Germain et Prof. Georges Heyen. Je remercie également les membres du groupe MicroH<sub>2</sub>, Prof. Claire Remacle et Prof. Bernard Joris notamment.

J'adresse un remerciement tout particulier à Serge Hiligsmann (Dr. Ir.) qui m'a accompagné, conseillé et orienté tout au long de la thèse (et même un peu plus longtemps). Il a partagé sans compter son expérience, sa critique scientifique et son enthousiasme quotidien. Merci, Serge, pour ton précieux soutien et pour ces longues discussions aux quatre coins du laboratoire.

Ce début de parcours professionnel m'a permis de travailler avec des collègues passionnés et passionnants. Merci donc à Serge (à nouveau), mais aussi à Christopher, Julien et Magda, pour les conversations riches et les échanges de connaissances et d'idées qui font toute la richesse du doctorat. Cette thèse est aussi le fruit d'une collaboration et d'un travail d'équipe qui manque parfois lors d'un doctorat... Cela a donc rendu l'expérience plus riche encore. À tous, je vous souhaite un avenir aussi complet que les quatre années que nous avons passées ensemble.

Lieu de travail au quotidien, merci à tous les chercheurs, doctorants, docteurs et employés du CWBI, car ce fut vraiment un plaisir de travailler avec vous. Dans le désordre, je pense à notre chère Cécile, bien sûr, mais aussi à Bribi, Chi, Wissal, Alina, Dehlia, Manu, Jérémie, Florent, Thibaut, Franck, Fabian, Alaa, Rasool, Stacy, Slim, Fred, Rathnasiri, Igor, Xavier, Cédric, Laurent... et à ceux qui sont oubliés (parmi les étudiants et autres personnes de passage au CWBI et aussi à l'université... Sandra, Cha, Carlotti, Wis, Chris). J'espère que nous garderons encore longtemps les liens d'amitié qui se sont créés.

Mais, à côté du cadre professionnel, j'ai également eu la chance de recevoir autant de soutien et de marques d'affection de la part de ma famille et de mes amis. Sans les citer tous, je suis certain qu'ils se reconnaîtront, je souhaite juste adresser une pensée à mon grand père Jules et à ma Mamou, à qui ces pages sont, quelque part, un peu dédiées. Merci aussi à ceux qui ont relu ce travail et en ont corrigé l'orthographe ou y ont simplement porté de l'intérêt.

Enfin, je me devais de garder une place de choix pour Céline, dernière citée mais première en mon cœur. Ta patience et ta compréhension m'enrichissent et me comblent, ton soutien m'aide à avancer et ton sourire m'inspire. Quel bonheur d'avoir vécu ce travail à tes côtés et merci de m'avoir supporté tout au long de ces années, et pour longtemps encore, je le souhaite.

## Liste des publications

---

L'ensemble des publications est encodée dans le répertoire institutionnel de l'Université de Liège et disponible sur <http://orbi.ulg.ac.be>

Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures.

Beckers, L, Hiligsmann, S, Hamilton, C, Masset, J, & Thonart, P. (2010). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* [=BASE], 14(S2), 541-548.

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

Masset, J, Hiligsmann, S, Hamilton, C, Beckers, L, Franck, F, & Thonart, P. (2010). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(8), 3371-3378.

Optimisation of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode.

Hamilton, C, Hiligsmann, S, Beckers, L, Masset, J, Wilmotte, A, & Thonart, P. (2010). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 1089-1098.

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

Hiligsmann, S, Masset, J, Hamilton, C, Beckers, L, & Thonart, P. (2011). *Bioresource Technology*, 102, 3810-3818.

Effets de la pression partielle en hydrogène sur la production anaérobie de bioH<sub>2</sub> par une bactérie chimiotrophe du genre *Clostridium* dans un nouveau réacteur à cylindre horizontal rotatif.

Beckers, L, Hiligsmann, S, Hamilton, C, Masset, J. & Thonart, P. (2011). *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 101.

La production de biohydrogène à partir de substrats carbohydratés : état de l'art. Récents progrès en génie des procédés Hiligsmann, S, Beckers, L, Masset, J, Hamilton, C, & Thonart, P. (2011). (pp. 6). Récents Progrès en Génie des Procédés, 101. Paris, France: SFGP.

Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor.

Beckers, L, Hiligsmann, S, MAsset, J, Hamilton, C, & Thonart, P. (2012). Energy Procedia, 29, 34 - 41.

Calusinska, M. (2012). PhD Thesis : « Application of molecular tools to study the hydrogen production by the bacteria of the genus *Clostridium* », Université de Liège, Faculté des Sciences.

Hamilton, C. (2012). PhD Thesis : « Biohydrogen production by the *Citrobacter* and *Clostridium* genera : A metabolic and biomolecular perspective ». Université de Liège, Faculté des Sciences.

Hiligsmann, S. (2012). PhD Thesis : « Biohydrogen production from carbohydrate dark fermentation ». Université de Liège, Faculté des Sciences Appliquées.

# Table des matières

---

Encadrement de thèse .....	ii
Abstract .....	vii
Résumé .....	viii
Remerciements .....	ix
Liste des publications.....	xi
Table des matières.....	xiii
Liste des figures .....	xix
Liste des tableaux .....	xxiii
Liste des équations.....	xxv
Liste des abréviations, symboles et unités .....	xxvi
Avant-propos .....	xxviii
<b>1<sup>ère</sup> section - Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I – Revue bibliographique et état de l’art.....</b>	<b>3</b>
1. Contexte énergétique et environnemental.....	5
2. L’hydrogène : vision d’avenir .....	8
3. BioH <sub>2</sub> : L’hydrogène à partir de biomasse.....	13
4. La production d’H <sub>2</sub> par les microorganismes .....	16
4.1. Transfert d’électrons et hydrogénases.....	19
4.2. Biophotolyse .....	22
4.3. Photo-fermentation .....	24
4.4. Fermentation anaérobie .....	27
5. Voies d’amélioration du procédé de production de bioH <sub>2</sub> .....	36
5.1. Influence des paramètres et des milieux de culture .....	37
5.2. Conception du bioréacteur.....	43
5.3. Biologie moléculaire appliquée à la fermentation anaérobie ....	48
6. Objectifs de la thèse et structure du travail .....	51

**2<sup>ème</sup> section – Production d’hydrogène en cultures mixtes ..... 55**

**Chapitre II – Production d’hydrogène par fermentation anaérobie en cultures pures et cultures mixtes de *Clostridium butyricum* CWBI1009 et *Citrobacter freundii* CWBI952 ..... 57**

Préface .....	59
Abstract .....	61
1. Introduction .....	62
2. Material and methods .....	64
2.1. Microorganisms conservation and preculture media.....	64
2.2. Experimental procedures and culture media.....	64
2.3. Analytical methods.....	65
3. Results and discussion .....	67
3.1. Hydrogen production by <i>Citrobacter freundii</i> CWBI952 and <i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009 using five different substrates.....	67
3.2. Metabolites analysis for <i>C. freundii</i> and <i>Cl. butyricum</i> with different substrates.....	68
3.3. Batch fermentation with co-culture of <i>C. freundii</i> and <i>Cl. butyricum</i> on glucose and starch. ....	70
4. Conclusions.....	75
Commentaires complémentaires.....	76

**Chapitre III – Production d’hydrogène par fermentation anaérobie en cultures pures de *Clostridium butyricum* progressivement contaminées dans un réacteur séquencé à cuve agitée..... 77**

Préface .....	79
Abstract .....	81
1. Introduction .....	82
2. Material and methods .....	84
2.1. Microorganisms, culture media and reactors setup.....	84
2.2. Analytical methods.....	85
3. Results and discussion .....	87
3.1. Cumulative hydrogen production and long-term stability .....	87
3.2. Biomass analysis and development of external strains .....	91

3.3. Effects of the development of a mixed culture on H <sub>2</sub> production .	92
3.4. Fermentation profile of metabolites .....	96
4. Conclusions.....	99
Commentaires complémentaires.....	100

### **3<sup>ème</sup> section – Etude des paramètres de transfert massique ..... 101**

#### **Chapitre IV – Étude du lien entre les conditions de transfert massique, la concentration en hydrogène dissout et la production de biohydrogène en culture pure de *Clostridium butyricum* ..... 103**

Préface .....	105
Abstract .....	107
1. Introduction .....	108
2. Material and methods .....	113
2.1. Cultures and bioreactors set-up .....	113
2.2. Hydrogen production measurement .....	114
2.3. Analytical methods.....	114
2.4. k <sub>La</sub> measurements .....	115
3. Results .....	117
3.1. Biohydrogen production and dissolved H <sub>2</sub> concentration in BHP tests .....	117
3.2. 2.5 L Biohydrogen production and dissolved H <sub>2</sub> concentration in AnSBR .....	120
3.3. Metabolite production .....	123
3.4. K <sub>La</sub> measurements .....	127
4. General discussion .....	131
5. Conclusion .....	134
6. Supplementary material.....	135
Complément d'informations.....	137

#### **Chapitre V – Étude de la production d'hydrogène par fermentation anaérobie dans un nouveau réacteur anaérobie à biodisque (AnBdR) : régulation indirecte du pH et performance à long terme ..... 139**

Préface .....	141
---------------	-----

Abstract .....	143
1. Introduction .....	144
2. Materials and methods.....	147
2.1. Experimental procedures and culture conditions .....	147
2.2. Monitoring and analytical methods .....	148
2.3. Population analysis by PCR-DGGE and colonies isolation .....	149
3. Results .....	151
3.1. Start-up procedure and microbial re-growth after standby periods..	151
3.2. First long-term continuous production of hydrogen after the R2	154
3.3. Microbial population analysis.....	159
3.4. Hydrogen production after the third restart with controlled pH.	160
4. Discussion.....	164
5. Conclusion .....	168
6. Supplementary material.....	169
Complément d'informations.....	180

**Chapitre VI – Effets de la pression partielle en hydrogène sur la production anaérobie de bioH<sub>2</sub> par une bactérie chimiotrophe du genre *Clostridium* dans un nouveau réacteur à cylindre rotatif**

.....	181
Préface .....	183
Abstract .....	184
1. Introduction .....	185
2. Material and methods.....	187
3. Results and discussion .....	190
4. Conclusions.....	195
Informations complémentaires.....	196

**4<sup>ème</sup> section – Effets de catalyseurs métalliques.....** 197

**Chapitre VII – Effets de nanoparticules métalliques encapsulées dans un matrice de silice poreuse sur la production d'hydrogène par *Clostridium butyricum* .....** 199

Préface .....	201
Abstract .....	203



1. Introduction .....	204
2. Material and methods .....	207
2.1. Microorganism and culture medium.....	207
2.2. Preparation and characterization of encapsulated nanoparticles....	207
2.3. Fermentation set-up .....	209
2.4. Monitoring and analytical methods .....	210
3. Results and discussion .....	212
3.1. Effect of encapsulated nanoparticles in BHP tests .....	212
3.2. Effect of iron oxide nanoparticles in AnSBR .....	218
3.3. General discussion.....	223
4. Conclusions.....	226
Commentaires complémentaires.....	227

## **5<sup>ème</sup> section – Discussion générale, conclusions et perspectives**229

<b>Chapitre VIII – Discussion générale</b> .....	231
1. Synthèse des résultats de la thèse .....	234
1.1. Résultats pertinents sur les performances de production d'hydrogène.....	234
1.2. Améliorations proposées.....	237
1.2.1. Les cultures mixtes.....	237
1.2.2. L'auto inhibition de l'hydrogène.....	238
1.2.3. Interactions avec les particules solides et transfert d'électrons	239
2. Comparaison avec la littérature scientifique .....	241
2.1. Production phototrophe d'hydrogène .....	241
2.2. Dark fermentation (ou fermentation anaérobie).....	242
2.3. Discussion comparative .....	246
3. Couplage et intégration du procédé.....	248
3.1. Couplage avec la biométhanisation.....	250
3.2. Couplage avec la photo fermentation .....	251
3.3. Couplage avec les cellules bioélectriques .....	252
3.4. Autres pistes d'intégration de technologies .....	253
4. Potentiel industriel et faisabilité du procédé.....	254

4.1. Contexte d'application du bioprocédé .....	254
4.2. Potentiels et barrières économiques .....	255
4.3. La recherche fondamentale .....	257
<b>Chapitre IX – Conclusions et perspectives .....</b>	<b>259</b>
1. Conclusions.....	261
2. Perspectives.....	264
<b>Chapitre X – Bibliographie .....</b>	<b>269</b>
<b>A propos de l'auteur .....</b>	<b>291</b>

# Liste des figures

---

## 1<sup>ère</sup> section

### **Chapitre I**

Figure I - 1: Voies de production d'hydrogène industriellement. ....	14
Figure I - 2 : Voies de production microbiologique d'hydrogène .....	16
Figure I - 3 : Schémas de structure des hydrogénases .....	20
Figure I - 4 : Site actif d'une [FeFe]-hydrogénases de <i>C. pasteurianum</i> .....	21
Figure I - 5 : Schéma de l'hydrogénase Cpl de <i>C. pasteurianum</i> .....	21
Figure I - 6 : Schéma de structure d'une [MoFe]-nitrogénase.....	22
Figure I - 7 : Voies métaboliques de fermentation des microorganismes photo-hétérotrophes .....	25
Figure I - 8 : Voies de production d'hydrogène chez les bactéries du genre <i>Clostridium</i> et <i>Enterobacter</i> .....	32
Figure I - 9 : Production de méthane par digestion anaérobique.....	34
Figure I - 10 : Configurations de réacteurs anaérobies continus. ....	46
Figure I - 11 : Schéma de transfert de l'hydrogène.....	47

## 2<sup>ème</sup> section

### **Chapitre II**

Figure II - 1: Carbon mass balance for <i>C. butyricum</i> and <i>C. freundii</i> in 270 ml batch fermentation with different carbon sources .....	69
Figure II - 2 : Metabolites analysis in 270 ml batch pure and mixed culture of <i>C. freundii</i> and <i>Cl. butyricum</i> with glucose and starch substrates. ....	72
Figure II - 3 : Carbon mass balance in 270 ml batch pure and mixed culture of <i>C. freundii</i> and <i>Cl. butyricum</i> with glucose and starch .....	73

### **Chapitre III**

Figure III - 1 : Cumulative H <sub>2</sub> production and linear fit in the 2.3 L and 15 L anaerobic sequenced-batch reactors with glucose or starch .....	88
Figure III - 2 : (a) Mean hydrogen yields and (b) mean hydrogen production rates for each sequence in the AnSBR with glucose or starch substrate.....	93
Figure III - 3 : Metabolites production in the AnSBR with glucose or starch ..	97

### **3<sup>ème</sup> section**

#### **Chapitre IV**

Figure IV - 1 : Steps involved in the transfer of hydrogen from the production sites in bacteria to the gas phase of the bioreactor .....	111
Figure IV - 2 : Cumulative hydrogen production by <i>C. butyricum</i> in 200 mL BHP bottles carried out in under different mass transfer conditions .....	118
Figure IV - 3 : Evolution of the dissolved hydrogen concentration in the 200 mL BHP experiments in different mixing conditions.....	119
Figure IV - 4 : Cumulative hydrogen production and dissolved hydrogen concentration in four mixing and degassing conditions in 2.5 L AnSBR with <i>C. butyricum</i> .....	121
Figure IV - 5 : Metabolites analyses at 96hours of <i>C. butyricum</i> cultures in the four BHP experiments run at different mass transfer conditions.....	124
Figure IV - 6 : Metabolites concentration in the 2.5 L AnSBR separately run at four mixing state .....	126
Figure IV - 7 : Carbon mass balance in the 2.5 L AnSBR separately run at four mixing rates.....	127
Figure IV - 8 : Yields reached in BHP test and in the AnSBR (sequence in uncontrolled pH) at different mixing state.....	129
Supplementary figure IV - 9 : Decreasing exponential oxygen concentration and fitting curve measured in the BHP conditions.....	135
Supplementary figure IV - 10 : Decreasing exponential oxygen concentration and fitting curve measured in the 2.5L AnSBR. ....	136

#### **Chapitre V**

Figure V - 1 : Anaerobic BioDisc Reactor (AnBdR) set up .....	147
Figure V - 2 : Filling of the AnBdR during the first 24 hours of the restart phase without liquid removal .....	152
Figure V - 3 : Evolution of (A) the pH; (B) the production of hydrogen and (C) the concentration of glucose in the AnBdR during the three restarts .....	153
Figure V - 4 : AnBdR behaviour during 51 days of culture after R2.....	155
Figure V - 5 : Hydrogen yields and production rates achieved in the AnBdR according to the pH .....	156
Figure V - 6 : Evolution of the pH achieved in the AnBdR according to the concentration of glucose adjusted in the nutrient mediumt .....	157

Figure V - 7 : Metabolites concentration during the 51 days of the feeding period following R2 at various glucose concentrations.....	158
Figure V - 8 : AnBdR behaviour and performances during 29 days in the run after R3 with a constant glucose concentration fed in the bioreactor.....	161
Figure V - 9 : Metabolites profile in the AnBdR during the 29 days of culture after R3. ....	163
Supplementary Figure V - 10 : Concentration of the metabolites measured in the AnBdR during the run after R2 according to the glucose concentration adjusted in the nutrient medium.....	169
Supplementary Figure V - 11 : DGGE migrated gel of the sample taken at day 45 during the run after R2 .....	170

## **Chapitre VI**

Figure VI - 1 : Schematic setup of the anaerobic biodisc reactor .....	187
Figure VI - 2 : Schematic complete setup of the AnBdR .....	189
Figure VI - 3 : Yields and pH in the AnBdR during the 58 days of culture at three conditions of total pressure .....	190
Figure VI - 4 : Hydrogen production yields in the three conditions of total pressure .....	192
Figure VI - 5 : Concentrations of the metabolites during the 58 days of fermentation .....	193

## **4<sup>ème</sup> section**

## **Chapitre VII**

Figure VII - 1 : Cumulative volume of hydrogen production by the pure <i>C. butyricum</i> in BHP tests with $10^{-6}$ mol·L <sup>-1</sup> of encapsulated metallic NP .....	213
Figure VII - 2 : Investigation of hydrogen production by the pure <i>C. butyricum</i> in BHP tests with metallic NP .....	217
Figure VII - 3 : Yields and mean hydrogen production rates in 2.5 L AnSBR with <i>C. butyricum</i> with metallic NP .....	219
Figure VII - 4 : Evolution of the metabolites concentration during the investigation on the effect of Fe/SiO <sub>2</sub> NP in 2.5 L AnSBR .....	220
Figure VII - 5 : Application of the Gompertz model on the hydrogen production in the 2.5 L AnSBR with Fe/SiO <sub>2</sub> NP.....	223

**5<sup>ème</sup> section**

**Chapitre VIII**

Figure VIII - 1 : Modélisation de la production batch d'hydrogène par l'équation de Gompertz..... 236

Figure VIII - 2 : Système multi-étape visant une conversion énergétique maximale du substrat en hydrogène et méthane ou en électricité ..... 249

# Liste des tableaux

---

## **1<sup>ère</sup> section**

### **Chapitre I**

Tableau I - 1 : Avantages et inconvénients des procédés microbiologiques de production d'hydrogène ..... 18

## **2<sup>ème</sup> section**

### **Chapitre II**

Table II - 1 : Measured fermentation parameter in 270 mL batch culture with five different substrates during 48 hours. .... 67

Table II - 2: Hydrogen production and yields from glucose and starch fermentation in pure or mixed culture with *Cl. butyricum* and *C. freundii*..... 71

### **Chapitre III**

Table III - 1 : Operating parameters and overall hydrogen production performances for the 2.3 L and 15 L AnSBR ..... 89

Table III - 2 : Average hydrogen production rates and hydrogen production yields in pure culture of *Clostridium butyricum* CWBI1009 and after the development of a mixed culture ..... 95

Table III - 3 : Average metabolites mass balance (MB) in pure culture with *Clostridium butyricum* CWBI1009 and after the establishment of a mixed culture ..... 98

## **3<sup>ème</sup> section**

### **Chapitre IV**

Table IV - 1 : OD<sub>600</sub>, H<sub>2</sub> yields and Gompertz parameters of the hydrogen production in 2.5 L AnSBR performed with *C. butyricum* in the uncontrolled-pH and controlled-pH sequences ..... 122

Table IV - 2 : K<sub>L</sub>a measurement in water by dynamic gassing out method with dissolved oxygen or hydrogen measurement ..... 128

### **Chapitre V**

Table V - 1 : PCR analysis of the microbial population in the liquid sample of the AnBdR ..... 150

## **4<sup>ème</sup> section**

### **Chapitre VII**

Table VII - 1 : Characteristics of the catalyst samples.....	209
Table VII - 2 : Hydrogen yields and Gompertz coefficient for the BHP tests with NP.....	214
Table VII - 3 : Comparison of the metabolites and CO <sub>2</sub> mass balance with Fe/SiO <sub>2</sub> NP in the 2.5 L AnSBR .....	221

## **5<sup>ème</sup> section**

### **Chapitre VIII**

Tableau VIII - 1 : Synthèses des performances de production d'hydrogène obtenues dans les chapitres II à VII pour les cultures BHP. ....	234
Tableau VIII - 2 : Synthèses des performances de production d'hydrogène obtenues dans les chapitres II à VII pour cultures en bioréacteurs .....	235
Tableau VIII - 3 : Synthèse des performances de production des différentes technologies de production phototrophe d'hydrogène .....	241
Tableau VIII - 4 : Performances de production d'hydrogène en culture batch présentées dans la littérature scientifique .....	243
Tableau VIII - 5 : Performances de production d'hydrogène en bioréacteurs (semi-)continus en cultures mixtes mésophiles présentées dans la littérature scientifique .....	244



## Liste des équations

---

### 1<sup>ère</sup> section

#### Chapitre I

(I - 1) $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ .....	19
(I - 2) $\text{N}_2 + 8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- + 16 \text{ATP} \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16 \text{ADP} + 16 \text{P}_i$ .....	22
(I - 3) $8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- + 4 \text{ATP} \rightarrow \text{H}_2 + 4 \text{ADP} + 4 \text{P}_i$ .....	22
(I - 4) $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2$ .....	23
(I - 5) $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$ .....	24
(I - 6) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{H}_2 + 6 \text{CO}_2$ .....	24
(I - 7) $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2$ .....	26
(I - 8) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2$ .....	27
(I - 9) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ .....	28
(I - 10) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{CO}_2$ .....	28
(I - 11) $\text{glucose} + 2 \text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{pyruvate} + 2 \text{NADH} + 2 \text{H}^+$ .....	29
(I - 12) $2 \text{pyruvate} + 2 \text{CoA} \rightarrow 2 \text{formiate} + 2 \text{Ac-CoA}$ .....	29
(I - 13) $2 \text{formiate} + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2$ .....	29
(I - 14) $2 \text{Ac-CoA} + 2 \text{ADP} + 2 \text{P}_i \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ATP}$ .....	29
(I - 15) $2 \text{NADH} + 2 \text{Fd}_{(\text{ox})} \rightarrow 2 \text{NAD}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{Fd}_{(\text{red})}$ .....	29
(I - 16) $2 \text{Fd}_{(\text{red})} + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{Fd}_{(\text{ox})} + \text{H}_2$ .....	29
(I - 17) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2$ .....	31
(I - 18) $2 \text{pyruvate} + 2 \text{CoA} + 2 \text{Fd}_{(\text{ox})} \rightarrow 2 \text{Ac-CoA} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{Fd}_{(\text{ref})}$ .....	31
(I - 19) $C_i = \text{He} \cdot P_i$ .....	42
(I - 20) $Q = (k_{\text{L}\alpha} \cdot \text{He}) \cdot (P_G^\circ - P_G)$ .....	47

### 2<sup>ème</sup> section

#### Chapitre III

(III - 1) $\text{MB}_i = \Sigma(\text{N}_i \cdot \Delta C_i) / (\text{N}_G \cdot \Delta C_G)$ .....	86
---	----

### 3<sup>ème</sup> section

#### Chapitre IV

(IV - 1) $C_S = \text{He} \cdot P_G$ .....	110
(IV - 2) $Q = K_{\text{L}\alpha} \cdot \text{He} \cdot (P_G^\circ - P_G)$ .....	110
(IV - 3) $K_{\text{L}\alpha}(\text{O}_2) \cdot K_{\text{L}\alpha}(\text{H}_2)^{-1} = [D(\text{O}_2) \cdot D(\text{H}_2)^{-1}]^{1/2}$ .....	116
(IV - 4) $C = C_0 \cdot \exp(-K_{\text{L}\alpha} \cdot t)$ .....	116

## Liste des abréviations, symboles et unités

---

ADP ou ATP : Adénosine Di- (ou Tri-) Phosphate

AFBR : Bioréacteur anaérobie à lit fixé (pour *Anaerobic Fixed Bed Reactor*)

AGV : Acides Gras Volatils (ou encore VFA pour *Volatile Fatty Acids*)

AnBdR : Réacteur anaérobie à biodisque (pour *Anaerobic Biodisc Reactor*)

AnSBR : Bioréacteur anaérobie à cuve agitée alimentée de manière séquencée (pour *Anaerobic Sequencing-Batch Reactor*)

bioH<sub>2</sub> : Biohydrogène

BHP : Test biologique de potentiel d'hydrogène (pour *Biological Hydrogen Potential*)

C<sub>i</sub> : Concentration aqueuse d'un soluté i

DCO : Demande chimique en oxygène (ou COD pour *Chemical Oxygen Demand*)

CSTR : Réacteur continu à cuve agitée (pour *Continuously Stirred Tank Reactor*)

CWBI : Centre Wallon de Biologie Industrielle

DF : Dark Fermentation (ou fermentation anaérobie)

DGGE : Electrophorèse sur gel à gradient dénaturant (pour *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

EFT : Temps de fermentation (pour *Elapsed Fermentation Time*)

Fd<sub>ox</sub> ou Fd<sub>red</sub> : Ferrédoxine à l'état oxydé ou réduit

FHL : Formiate-hydrogène:lyase

GC-TCD : Chromatographie gazeuse à détecteur de conductivité thermique (pour *Gas Chromatography – Thermal Conductivity Detector*)

He : Xonstante de Henry

HPLC-RID : Chromatographie liquide à haute performance à détecteur d'indice de réfraction (pour *High Performances Liquid Chromatography – Refraction Index Detector*)

HPR : Productivité (ou taux de production) en hydrogène (pour *Hydrogen Production Rate*)

HRT : Temps de rétention hydraulique (pour *Hydraulic Retention Time*)

Hyd ou H<sub>2</sub>ase : Hydrogénase

K<sub>1a</sub> : Coefficient global de transfert massique

MB : Bilan massique (pour *Mass Balance*)

MEC : Cellule d'électrolyse microbiologique (pour *Microbial Electrolysis Cell*)

MFC : Pile à combustibel microbiologique (pour *Microbial Fuel Cell*)

NFOR : NADH-ferrédoxine:oxydoréductase

OLR : Taux d'alimentation du substrat organique (pour *Organic Loading Rate*)

PCA : Plaque de comptage microbiologique sur milieu gélosé (pour *Plate Count Agar*)

PFL : Pyruvate-formiate:lyase

PFOR : Pyruvate-ferrédoxine:oxydoréductase

P<sub>i</sub> : Pression partielle d'un gaz i en phase gazeuse

RT-qPCR : Réaction quantitative de polymérisation en chaîne par transcription réverse (pour *Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction*)

UASBr : Bioréacteur anaérobie à lit fluidisé (pour *Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor*)

ZEV : Véhicule à zéro émission (pour *Zero Emission Vehicle*)

## Avant-propos

---

Ce manuscrit de thèse est soumis à la Faculté des Sciences Appliquées de l'Université de Liège en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Ingénieur. Ce travail, ainsi que l'ensemble des résultats qu'il reprend, a été effectué au CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle) de l'Université de Liège, avec les Professeurs Philippe Thonart et Michel Crine, promoteurs de thèse. Ces travaux ont été financés durant quatre ans (2008 – 2012) par le FRS-FNRS via l'octroi d'une bourse d'Aspirant. Par ailleurs, ils ont été réalisés en parallèle avec la création et le développement du projet d'Action de Recherche Concertée MicroH2 (ARC-07/12-04) associant plusieurs laboratoires universitaires liégeois sur le sujet de la production d'hydrogène par les microorganismes.

Cependant, à titre personnel, c'est l'urgence environnementale qui a orienté le parcours doctoral vers ce sujet de thèse. En effet, la situation mondiale n'est que peu enviable et est surtout en train de se diriger vers un mur de plus en plus insurmontable au fur et à mesure que les années passent et ce, sans que les comportements ne changent. Les pouvoirs politiques ne mettent pas assez de moyens pour renverser une situation qu'ils ne mesurent d'ailleurs pas à sa juste mesure. Et pourtant, tous les indicateurs montrent que le système énergétique actuel engendre des changements environnementaux majeurs, irréversibles et surtout aux conséquences encore largement imprévisibles et probablement non-mesurables sur la durée d'une vie humaine. Dès lors, le monde scientifique doit agir pour proposer des solutions durables, c'est-à-dire qu'il doit prendre en compte les composants à la fois environnementaux, économiques et sociaux. Mais pour espérer ne pas devoir subir les conséquences du mode de consommation actuel, il faudra faire plus qu'une simple diminution de la consommation de carbone fossile. Or, les dernières prévisions de l'Agence Internationale de l'Énergie prévoient une augmentation de 30 % de la consommation de pétrole d'ici à 2035. À terme, il ne faut pas se contenter de penser à la réduction de la consommation des ressources fossiles, mais il faut envisager de se tourner, en définitive, vers une société « zéro carbone ». Peu d'éléments du tableau périodique permettent

d'envisager cette solution. Et un seul est cité comme modèle : il s'agit de l'hydrogène.

Ainsi, ce travail se penche sur un des moyens de production renouvelable de l'hydrogène (ou encore biohydrogène) : la voie microbiologique. Plusieurs facteurs d'optimisation du bioprocédé ont été étudiés afin de faire avancer son application à une plus grande échelle. Ce manuscrit est constitué de cinq sections, à savoir, une introduction générale, trois sections abordant les résultats de recherches et, pour finir, une section de discussion générale reprenant également les conclusions et perspectives de ces travaux. Chacune des sections est sous-divisée en chapitres permettant la séparation des différents articles de recherches.

Une revue bibliographique est abordée dans la 1<sup>ère</sup> section de ce travail. La capacité de microorganismes à produire de l'hydrogène a été découverte à la fin des années 70' à partir de l'étude des populations de microorganismes anaérobies. Elle est aujourd'hui envisagée en couplage avec d'autres technologies de production de bioénergie, notamment dans le domaine du traitement des eaux usées industrielles. Depuis la découverte du biohydrogène microbiologique, de nombreux auteurs se sont penchés sur le sujet et ont permis de développer les techniques de fermentation permettant de comprendre et d'améliorer cette voie de production. Les différentes voies de production de biohydrogène ainsi que les voies microbiologiques sont passées en revue, de même que les moyens d'optimisation déjà mis en évidence. Cette section se conclut sur les objectifs du travail réalisé.

La partie consacrée aux résultats et sous-divisée en trois sections reprenant six articles de recherches publiés, soumis ou à soumettre dans divers journaux scientifiques. La première de ces parties de résultats (2<sup>ème</sup> section) est consacrée au passage de cultures pures en cultures mixtes. En effet, au CWBI, le travail en culture avec une seule souche a permis l'étude fondamentale des conditions de culture, mais ce mode de travail n'est cependant pas applicable à plus grande échelle. Cette section est composée de deux articles abordant successivement l'étude de consortia de souches anaérobies strictes et facultatives, et l'étude du fonctionnement à long terme de bioréacteurs inoculés en culture pure, dans lesquels ont été développés, par la suite, une

population microbienne mixte en vue d'étudier son influence sur la production d'hydrogène.

La seconde partie des résultats (3<sup>ème</sup> section) se penche sur l'étude du transfert massique liquide-gaz découlant des considérations à propos de l'effet inhibiteur de l'hydrogène sur sa propre production. Dans le premier article, l'étude est portée au niveau fondamental afin de montrer une relation entre l'hydrogène dissout, le transfert massique et les performances de production d'hydrogène. Dans les deuxième et troisième articles, ces théories sont appliquées à un bioréacteur original créé au sein du laboratoire, visant à améliorer les conditions de transfert massique. Ce bioréacteur a permis d'atteindre de très bonnes performances en comparaison avec les bioréacteurs classiques à cuves agitées, notamment au niveau des rendements de conversion du glucose en hydrogène. Son fonctionnement sur de longues périodes et en différentes conditions de pression totale est abordé dans ces chapitres.

La troisième partie des résultats (4<sup>ème</sup> section) vise, quant à elle, à améliorer les productivités par l'ajout, en très faible concentration, de nanoparticules métalliques. Si les effets de ces nanoparticules ont montré des améliorations au niveau des taux de production d'hydrogène, cette recherche ouvre de nombreuses perspectives de recherches afin de permettre la compréhension, au niveau fondamental, des interactions mises en œuvre entre les microorganismes et les nanoparticules. Plusieurs déductions et hypothèses sont mises en évidence, mais une meilleure compréhension de ces phénomènes pourrait également ouvrir la voie à de nouvelles applications faisant intervenir conjointement microorganismes et nanoparticules.

Ce manuscrit se clôture sur une synthèse des principaux résultats abordés dans les chapitres précédents et sur une discussion comparative avec la littérature scientifique ainsi que sur les possibilités d'application du bioprocédé à l'échelle industrielle. Quelques perspectives de recherches sont également avancées en guise de conclusion.

## **1<sup>ère</sup> section - Introduction**





# **Chapitre I – Revue bibliographique et état de l’art**



## **1. Contexte énergétique et environnemental**

---

Sur la planète Terre, on estime à plusieurs millions le nombre d’espèces biologiques qui y vivent ou survivent. Parmi cette multitude, l’homme compte, en ce début de XXI<sup>ème</sup> siècle, sept milliards d’individus. Il s’agit d’une population appelée à poursuivre une croissance démographique intense dans les prochaines décennies, atteignant probablement les neuf milliards à l’horizon 2050 (Okkerse et van Bekkum, 1999).

L’homme consomme, pour se nourrir, se chauffer, se déplacer, communiquer, créer, etc. Le mode de fonctionnement qu’il a adopté au cours du siècle passé a imposé à nos sociétés, mais surtout à la planète, un rythme d’activité qui est aujourd’hui arrivé à un point de non-retour. L’incidence des activités humaines sur notre environnement est et sera responsable de modifications majeures qu’il n’est d’ores et déjà plus possible d’éviter, tant à court qu’à long terme. La biodiversité, le climat, la santé humaine, l’approvisionnement en eau et en nourriture, la sécurité énergétique, tous ces éléments sont de près ou de loin liés à la consommation intense actuelle de ressources fossiles (Bernard Seguin et Soussana, 2008). En effet, pour satisfaire l’humanité, l’énergie est devenue l’élément crucial auquel le monde s’est attaché pour assurer sa croissance. Avec l’augmentation de la population et de ses besoins, la demande énergétique ne fait que croître et, dans le mode de fonctionnement actuel, accentuer les facteurs qui auront des effets aussi imprévisibles que dévastateurs (Wigley, 1985).

Le monde obtient actuellement près de 80% de son énergie à partir de combustibles fossiles non renouvelables (charbon, pétrole, gaz naturel, etc.) (Demirbas, 2007; Lior, 2010). Ces ressources sont certes abondantes, mais pas inépuisables. On prévoit, par exemple, le pic de production pétrolier entre 2015 et 2030. Mais surtout, l’utilisation de ces combustibles rejette d’importantes quantités de gaz dans l’atmosphère, dont les conséquences sont le réchauffement climatique (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, ozone, ...), les pollutions environnementales (SO<sub>x</sub>, ...) et les risques pour la santé humaine (CO, NO<sub>x</sub>, ...). Depuis quelques années, les attentions se sont focalisées sur le dioxyde de carbone, intimement associé à l’augmentation de l’effet de serre

qui engendre et engendrera des conséquences à l’échelle mondiale (Luo et Weng, 2011; Wigley, 2005).

Ainsi, il est essentiel d’agir, pour le présent comme pour l’avenir. Face à cette double nécessité, deux actions complémentaires sont réalisables : utiliser moins d’énergie en diminuant la consommation (par l’augmentation de l’efficacité énergétique, l’utilisation rationnelle des ressources, la conscientisation des populations, etc.) et remplacer les sources d’énergie fossile par des sources à l’incidence réduite, voire nulles, sur l’environnement (Lior, 2010; Searcy et Flynn, 2010).

Actuellement, les 20% d’énergie dont la source est non-fossile sont partagés entre l’énergie nucléaire et les énergies renouvelables et sont essentiellement dédiés à la production d’électricité. Bien que la première n’émette dans l’atmosphère aucun rejet polluant, son exploitation en centrale nucléaire souffre aujourd’hui d’une image écornée par les catastrophes qui jalonnent l’Histoire. Par ailleurs, le stockage des déchets nucléaires pose de sérieuses questions environnementales sur le très long terme. Dès lors, il apparaît que les énergies renouvelables (biomasse, solaire, éolien, géothermique ou hydraulique) sont appelées à prendre une place de plus en plus importante dans notre quotidien (Antoni *et al.*, 2007; Cherubini et Strømman, 2011; Luque *et al.*, 2008). Cependant, l’adoption d’un système libre de carbone implique une profonde mutation de la société, tant sur le plan sociétal que technologique et économique, et prendra du temps et de l’argent pour se mettre en place partout et pour tous. Récemment, l’attention accrue portée à la diversification des sources énergétiques, notamment pour la production d’électricité, a néanmoins permis d’entrevoir la généralisation de ces modes de production propres ou, à tout le moins, de conscientiser, sensibiliser et faire accepter ces technologies à l’ensemble de la population (Jegannathan *et al.*, 2009; Taibi *et al.*, 2012).

Le passage à un autre système de production et à une autre utilisation énergétique ne peut toutefois pas être dissocié de la question du transport et du stockage de cette énergie. Actuellement, les vecteurs énergétiques, qui permettent l’acheminement de l’énergie depuis son lieu de production jusqu’à l’utilisateur final, sont essentiellement répartis entre l’électricité et les

combustibles fossiles. Or, dans le cadre d’une société zéro carbone, le recours à ces derniers devra être minimisé. Il faut donc trouver et développer un vecteur énergétique qui puisse répondre aux demandes et besoins de la société actuelle, c'est-à-dire qui soit applicable tant pour le chauffage ou l’éclairage domestique que pour les moyens de transport ou les besoins de la production industrielle (Kothari *et al.*, 2010; Mazloomi et Gomes, 2012; Wonglimpiyarat, 2010).

Dans ce contexte, afin de parvenir à la fois à la production et au transport de l’énergie en minimisant les impacts sur l’environnement, l’hydrogène apparaît comme un candidat de choix répondant à tous les critères de sélection (Barreto *et al.*, 2003; Fukushima *et al.*, 2011). Abondant et universel, il est, par définition, exempt de carbone. Il peut être produit à partir de toutes les énergies renouvelables, mais aussi à partir des énergies fossiles, ce qui permettra d’effectuer la transition vers l’abandon de ces sources. À l’autre bout de la chaîne, il est utilisable tant pour la production de chaleur que d’électricité, à des fins domestiques, industrielles ou de transport. Entre sa production et son utilisation, il peut être employé pour stocker facilement de l’énergie en grande quantité. À ce titre, la société de demain devra être axée sur cet élément (Bockris, 2002; Jain, 2009; Moriarty et Honnery, 2009). Les défis restent nombreux, tant pour la diminution des coûts de production et d’utilisation que pour l’acceptation sociétale d’une technologie nouvelle encore considérée comme dangereuse ou peu fiable. La transition ne se fera pas du jour au lendemain, mais les intérêts conjoints des acteurs politiques, des grands groupes industriels et des scientifiques permettent de considérer l’arrivée de l’hydrogène comme très proche (Marban et Vales-Solis, 2007; Zidansek *et al.*, 2009).

## 2. L’hydrogène : vision d’avenir

---

L’hydrogène a été identifié en tant qu’élément en 1766 par Cavendish. Ce dernier a montré que le gaz issu de la réaction de l’acide chlorhydrique (HCl) avec du zinc pouvait s’enflammer et former de l’eau. En outre, cette découverte a mené, en 1788, à la découverte de la composition chimique de l’eau H<sub>2</sub>O. Par la suite, Lavoisier a nommé cet élément à partir des mots grecs *hydro* et *genes*, littéralement *formant de l’eau*. En 1800, l’électrolyse de l’eau produisant hydrogène et oxygène fut découverte par Nicholson et Carlisle. En 1889, Mond et Langer construisirent la première pile à combustible. Dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle, les inventeurs utilisèrent l’hydrogène pour alimenter les moteurs à combustion interne (1920) ou les systèmes de propulsion de fusées spatiales (1958). Les premières idées de la « société hydrogène » se développèrent dans les années 70, suggérant que son utilisation pourrait être avantageuse en comparaison aux produits pétroliers dont les prix explosaient suite au premier choc pétrolier de 1973 (Bockris, 2002). Depuis lors, plusieurs États consacrent une partie importante de leur budget R&D à l’hydrogène, dont les applications pratiques deviennent opérationnelles (voiture à piles à combustible par Daimler en 1994, production industrielle de piles à combustible par Ballard en 2000, etc.) (Demirbas, 2009). Aujourd’hui, les premiers véhicules commercialisés au grand public sont présents sur le marché (Allemagne, USA ou encore Japon dès 2015), en parallèle avec le développement du réseau de stations à hydrogène. Par ailleurs, plusieurs applications industrielles se sont développées, par exemple dans le domaine de la grande distribution (chariots élévateurs chez Walmart, Colruyt, etc.) (Barreto *et al.*, 2003).

La molécule d’hydrogène (H<sub>2</sub>) est constituée de deux atomes d’hydrogène formant une molécule apolaire pouvant être *ortho*- ou *para*- selon le spin des deux protons. C’est un gaz incolore, inodore et non toxique. Premier élément du tableau de Mendeleïev, l’hydrogène est la substance chimique la plus légère (2.016 g·mol<sup>-1</sup> pour le dihydrogène gazeux, densité gazeuse de 0.069). Il possède trois isotopes dont le premier (<sup>1</sup>H<sup>1</sup>) constitue 99.985% des occurrences naturelles. En condition normale de pression, il possède une

température de fusion de 14.1 K (-259.05 °C), une température d'ébullition de 15.5 K (-257.65 °C) et est très peu soluble dans l'eau (1.57 mg·L<sup>-1</sup>).

Il s'agit du plus abondant des éléments de l'univers, comptant près de 75% de la masse visible dans les galaxies et étoiles. Sur Terre, on ne retrouve l'hydrogène dans l'atmosphère qu'à l'état de trace (quelques ppm) sous sa forme moléculaire H<sub>2</sub>, mais il est présent dans les molécules d'eau, dans les molécules organiques (vivantes ou fossilisées) ainsi que dans bon nombre de composés minéraux. À ce titre, il est présent partout sur la planète mais, puisqu'il n'est pas disponible à l'état naturel, il doit être considéré comme un vecteur énergétique et non comme une source d'énergie (Jain, 2009; Mazloomi et Gomes, 2012). Une molécule d'hydrogène réagit avec deux molécules d'oxygène en une réaction exothermique (PCI 119 kJ·kg<sup>-1</sup> ; PCS 142 kJ·kg<sup>-1</sup>), qui peut également être contrôlée pour produire de l'électricité. En outre, le seul produit généré lors de cette réaction est une molécule d'eau. L'utilisation de l'énergie générée par cette combustion est dès lors extrêmement avantageuse en comparaison avec les combustibles fossiles, puisque non accompagnée de rejets gazeux polluants ou nocifs.

Actuellement, c'est principalement dans l'industrie chimique qu'est utilisé l'hydrogène en tant que réactif plutôt que comme vecteur énergétique (Andrews et Shabani, 2012). En effet, il est employé comme réactif principal lors de la synthèse d'ammoniac (production d'engrais), de méthanol, de carburants de synthèse (via le procédé Fischer-Tropsch, par exemple) ou d'eau oxygénée, mais aussi lors des opérations de raffinage pétrolier (hydrocracking et hydrotraitement, désulfuration, ...). Dans ce domaine, il faut noter que certaines opérations du raffinage produisent également de l'hydrogène comme sous-produit de réaction, dès lors réutilisé au sein même de l'unité (opération de cracking thermique ou catalytique, reformage catalytique, ...) (Demirbas, 2009). Au niveau mondial, l'ensemble de cette consommation représente un volume annuel de 630 milliards de Nm<sup>3</sup> (soit 8.2 EJ ou encore 56.8 millions de tonnes). Il faut ici se rendre compte que ce volume correspond à 1.7% de la consommation mondiale d'énergie primaire (chiffres 2009 : Association Française pour l'Hydrogène, [www.afh2.org](http://www.afh2.org)).

Néanmoins, l’utilisation de l’hydrogène comme vecteur énergétique est appelée à être fortement développée dans le futur, cela en parallèle avec une augmentation et une diversification des moyens de production (Crabtree et Dresselhaus, 2008; Marban et Vales-Solis, 2007; Mazloomi et Gomes, 2012). En effet, l’hydrogène est d’ores et déjà utilisable avec des technologies éprouvées, telles que les moteurs à combustion interne, qui pourraient constituer un moyen de transition pour la généralisation de son emploi. Par ailleurs, le développement des piles à combustible et surtout la diminution de leurs coûts de production permettent d’envisager leur commercialisation au grand public afin de produire de l’électricité (application stationnaires locales ou alimentation des véhicules en couplant une pile à combustible à un moteur électrique), de la chaleur ou de l’électricité en cogénération. L’utilisation de l’hydrogène serait également avantageuse dans les régions du monde où la part d’électricité renouvelable est supérieure à 15%, ce qui entraîne des problèmes d’approvisionnement en raison du côté variable de la production dépendant des conditions environnementales. L’utilisation de l’hydrogène y serait envisagé comme moyen de stockage par électrolyse lors de production excédentaire tandis que, à l’opposé, lorsque la demande serait supérieure à la production, il pourrait être reconverti en électricité (Yang, 2008). Outre son absence de rejets polluants, la pile à combustible présente des efficacités énergétiques nettement plus élevées que les moteurs à explosion, respectivement de l’ordre de 50 à 85% pour la pile à combustible (selon le type, la plage de température et le mode de fonctionnement de la pile à combustible utilisée) contre 20 à 30% pour un moteur à explosion et jusqu’à 40% dans une turbine (Dufour *et al.*, 2009; Hacatoglu *et al.*, 2012; Nowotny et Veziroglu, 2011).

Du point de vue de la sécurité, l’hydrogène est un gaz inflammable et explosif dans des gammes de concentration plus étendues que les combustibles usuels (limite d’inflammabilité et d’explosivité dans l’air, respectivement 4 – 75% et 13 – 65%). Les risques d’explosion lors de l’utilisation sont dès lors bien réels, mais sont maîtrisés dans les procédés actuellement mis sur le marché. Par ailleurs, le coefficient de diffusion de l’hydrogène dans l’air ( $0.61 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , soit près de quatre fois plus que le méthane), en plus de sa faible densité, fait que le gaz n’a pas tendance à former de poches explosives et se disperse



rapidement, sortant, de ce fait, des concentrations critiques (Andrews et Shabani, 2012).

L’obstacle principal à l’utilisation massive d’hydrogène, notamment pour les applications au transport routier, réside en sa faible énergie volumique. L’hydrogène a, en effet, une meilleure densité énergétique massique que les autres combustibles conventionnels (en  $\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), mais 1 g d’hydrogène occupe un volume gazeux de 11 L à pression atmosphérique. Or, l’espace de stockage est un point important dans la conception de véhicules routiers. Il faut dès lors utiliser le moyen de stockage le plus efficace (quantité d’hydrogène embarquée par volume mais aussi par masse de l’installation), afin de permettre une autonomie suffisante mais aussi une sécurité d’utilisation, un coût acceptable, une facilité et une rapidité de remplissage (Crabtree et Dresselhaus, 2008; Mazloomi et Gomes, 2012; Moriarty et Honnery, 2010). Les méthodes actuellement envisagées sont le stockage sous forme comprimée (350 ou 700bar et température ambiante), sous forme liquide (pression atmosphérique mais à faible température : 21 K) ou en association avec des composés solides. Les deux premières méthodes sont associées à de très grands coûts énergétiques de compression ou de liquéfaction (jusqu’à 40% du contenu énergétique de l’hydrogène peut être dépensé pour ces opérations). Les absorptions sur solide (complexes d’hydrures ou hydrures métalliques, physisorption, etc.) souffrent quant à elles d’une faible capacité d’adsorption et de problèmes de réversibilité. Actuellement, plusieurs villes européennes ont développé des transports en commun (bus) voyageant à l’hydrogène (Allemagne, Italie, France, etc.), un large espace de stockage étant disponible sur la toiture du véhicule. Les premiers véhicules tout public « zéro émission » (ZEV) commercialisés promettent une autonomie de près de 400 à 500 km selon le cycle de conduite (Hacatoglu *et al.*, 2012). Ainsi, se pose actuellement le dilemme dit de « l’œuf ou la poule » quant au développement de stations de recharge en hydrogène nécessaires au développement du parc automobile ZEV et vice et versa.

Tous ces développements technologiques font progresser la dissémination de l’utilisation de l’hydrogène à travers le monde. Cependant, même si l’utilisateur final peut revendiquer ne produire que de l’eau lors de l’utilisation

de son véhicule ZEV, il ne peut actuellement pas affirmer ne pas engendrer de rejet de CO<sub>2</sub> dans l’atmosphère (Dufour *et al.*, 2009; Gorenssek et Forsberg, 2009; Hacatoglu *et al.*, 2012). En effet, l’hydrogène n’étant qu’un vecteur énergétique, il faut prendre en compte la source de production, les étapes de production, de transport et de production des infrastructures pour évaluer les rejets totaux dans l’environnement. Or, actuellement, près de 95% de la production mondiale d’hydrogène est réalisée à partir des sources d’énergie fossile dans des procédés thermochimiques énergivores car menés à hautes pressions et hautes températures (Bartels *et al.*, 2010; Holladay *et al.*, 2009; Momirlan et Veziroglu, 2002; Pilavachi *et al.*, 2009). C’est le gaz naturel qui est principalement utilisé dans le procédé de reformage à la vapeur (48% de la production totale d’hydrogène), avant les liquides pétroliers (30%) par reformage catalytique ou oxydation et le charbon (18%) par gazéification. Les gaz obtenus sont un mélange d’hydrogène, de CO, de CO<sub>2</sub> et, parfois, de CH<sub>4</sub>. Ces gaz doivent dès lors être purifiés ultérieurement. À côté de ces sources fossiles, 4% de l’hydrogène mondial est produit par électrolyse de l’eau, qui peut être considéré comme renouvelable lorsque l’électricité est produite par l’énergie solaire, éolienne ou hydraulique (Kotay et Das, 2008). Plus récemment, de nombreuses recherches sont effectuées afin d’exploiter chimiquement ou biologiquement la biomasse comme source d’énergie renouvelable, dès lors sans « re-largage » de CO<sub>2</sub> dans l’atmosphère (Abbasi et Abbasi, 2011; Dufour *et al.*, 2012; Hallenbeck et Ghosh, 2009; Moriarty et Honnery, 2012).

### **3. BioH<sub>2</sub> : L’hydrogène à partir de biomasse**

---

À l’avenir, c’est une part croissante de la production d’énergie qui le sera à partir de biomasse et ce, avec l’accentuation de l’utilisation des énergies renouvelables. Le concept de biomasse se réfère à toutes les matières organiques biodégradables et non fossilisées originaires de plantes, d’animaux ou de microorganismes (Abbasi et Abbasi, 2010; Demirbas, 2009; Rittmann, 2008). La biomasse constitue une ressource énergétique attractive en raison de son aspect renouvelable, de la réduction des émissions de gaz à effet de serre ou de gaz nocifs et de son potentiel économique avantageux, cela notamment face à l’augmentation des prix des ressources fossiles. Il faut être conscient que la combustion, ou transformation, de la biomasse en un autre biocarburant entraîne un rejet de CO<sub>2</sub> dans l’atmosphère. Cependant, ce dernier n’est pas considéré comme gaz à effet de serre car il n’engendre pas d’apports nets dans la mesure où tout CO<sub>2</sub> organique a été antérieurement métabolisé lors de la photosynthèse (Dale et Ong, 2012; Mansilla *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2008).

Les procédés développés pour exploiter cette biomasse à des fins énergétiques sont actuellement tournés vers la production de biocarburants. Ils peuvent être thermochimiques ou microbiologiques comme, par exemple, la liquéfaction, la pyrolyse, la gazéification, l’hydrolyse et la fermentation. La combustion permet, quant à elle, la production directe de chaleur (et d’électricité dans le cas de la cogénération). Les biocarburants liquides les plus produits actuellement, principalement à destination du secteur automobile, sont le bioéthanol (94% de la production totale de biocarburants), le biodiesel et d’autres bio-alcools. Le biogaz est, quant à lui, un biocarburant constitué de méthane et de CO<sub>2</sub> obtenu par digestion anaérobie (Holzman, 2005).

Cependant, à côté de ces biocarburants applicables aux technologies actuelles, il faut dès à présent préparer la production d’hydrogène en plus grande quantité en plus de se tourner vers des sources d’énergies renouvelables. Dès lors, plusieurs méthodes pour produire de l’hydrogène à partir de biomasse se développent et seront appelées à coexister afin d’accroître et de diversifier les moyens et sources de production (Balat,

2009a; Nath et Das, 2004a). C’est le biohydrogène (bioH<sub>2</sub>), un vecteur énergétique produit à partir de sources renouvelables qui permet de minimiser voire d’annuler l’utilisation d’hydrocarbures, ou à tout le moins de se substituer à eux (Briguglio *et al.*, 2010). Un schéma d’ensemble des technologies productrices d’hydrogène à partir de sources renouvelables ou non est repris à la Figure 1.

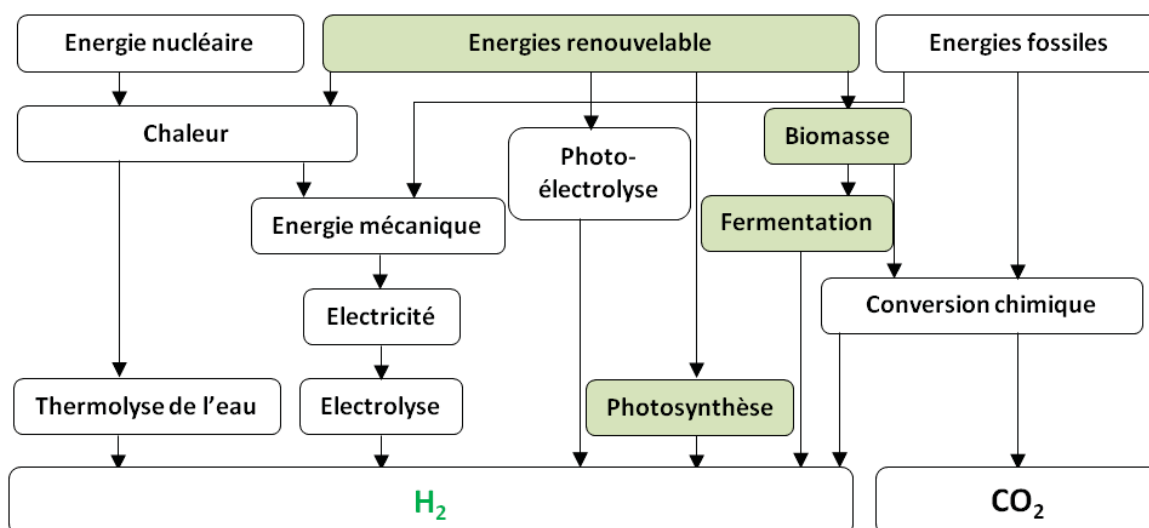


Figure I - 1: Voies de production d’hydrogène industriellement appliquées ou envisagées. Les voies indiquées en vert correspondent aux procédés microbiologiques étudiés dans ce travail.

Le biohydrogène peut être produit par des méthodes (thermo-) chimiques, biologiques, biochimiques ou bio-photo-catalytiques à partir de biomasse (Balat et Kirtay, 2010; Cetinkaya *et al.*, 2012). Actuellement, aucune de ces technologies n’a été portée au niveau industriel. La gazéification ou la pyrolyse ne sont toutefois énergétiquement rentables que pour de la biomasse relativement sèche (plus de 25% de matière sèche), puisque l’évaporation de l’eau à partir d’un matériau trop humide implique une importante perte d’énergie. Dès lors, ces procédés sont principalement envisagés à partir de bois ou de déchets agricoles secs (Kalinci *et al.*, 2009). D’importants développements scientifiques et technologiques sont attendus dans ce domaine afin d’améliorer les réacteurs, catalyseurs et conditions de réactions pour permettre l’application de ces procédés à plus grande échelle (Bičáková et Straka, 2012; Bocci *et al.*, 2011; Cohce *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2011; Levin et Chahine, 2010; Olivo *et al.*, 2011).

Ces premières voies intensives de valorisation énergétique en hydrogène ne permettent pas le traitement de la matière organique semi-solide ou en solution générée par les activités humaines. On évalue à plus de 1.5 kg la quantité de déchets organiques par habitant (500 g de déchets ménagers, 100 g de matière en suspension ou solution et 1 kg de matière liée à l’activité industrielle rapportée au nombre d’habitants). Ces déchets sont d’ordinaire collectés pour être traités sans valorisation énergétique (méthodes d’épuration biologique) ou, à défaut, rejetés dans l’environnement. Or, leur haute teneur organique fait qu’ils ont encore une valeur énergétique résiduelle, valorisable notamment par l’action de microorganismes. Ces derniers peuvent produire une large gamme de biocarburants selon le type et les conditions de culture (Antoni *et al.*, 2007; Ibrahim, 2012). Les procédés de fermentation anaérobie permettent la production d’un biogaz, dont les molécules CH<sub>4</sub> et H<sub>2</sub> peuvent être extraites et exploitées à des fins énergétiques. En sélectionnant les types de microorganismes entrant en action ou les conditions de déroulement du procédé, il est possible d’orienter l’activité des microorganismes vers la production exclusive d’hydrogène, permettant une production énergétique couplée à un traitement des matières organiques (Digman et Kim, 2008; Fernandes *et al.*, 2010; Levin *et al.*, 2004).

## 4. La production d’H<sub>2</sub> par les microorganismes

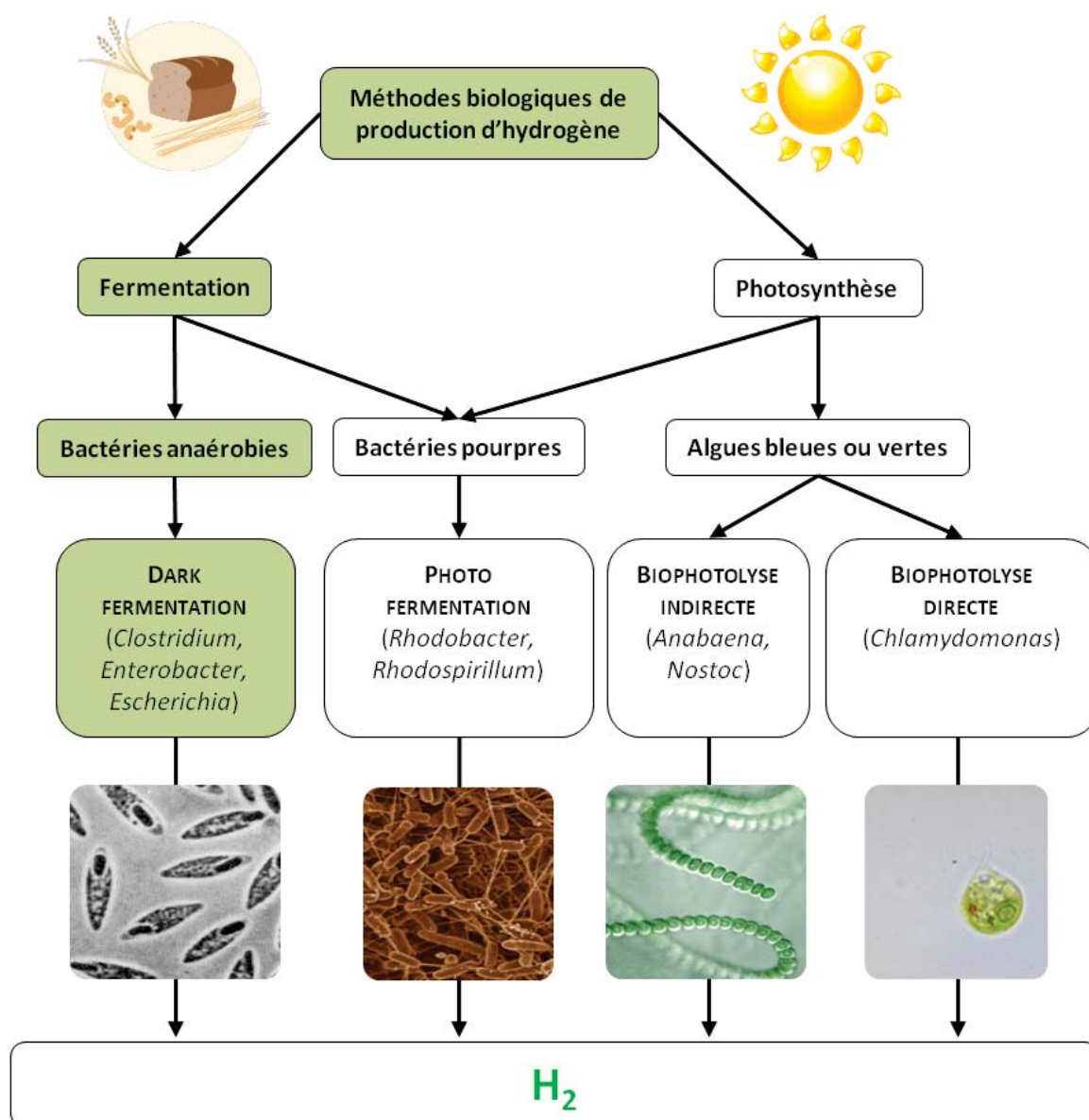


Figure I - 2 : Voies de production microbienne (fermentative ou photosynthétique) d’hydrogène et microorganismes couramment associés. La voie mise en évidence en vert représente celle étudiée dans ce travail.

On relève trois voies représentatives de la production d’hydrogène des microorganismes : la biophotolyse (par les algues vertes telles *Chlamydomonas* ou cyanobactéries telles *Anabaena* ou *Oscillatoria*), la photo-fermentation (par les bactéries pourpres telles *Rhodobacter* ou *Rhodospirillum*) et la fermentation anaérobie (par bactéries anaérobies telles les *Clostridies* ou *Enterobacteriaceae*) (Figure 2). Ces microorganismes

requièrent de l’énergie lumineuse (phototrophes), des substrats carbonés (chimiotrophes), ou les deux, pour croître, produire de l’hydrogène et se développer (Hallenbeck *et al.*, 2012; Nandi et Sengupta, 1998; Tsygankov, 2007).

Les avantages des uns et des autres microorganismes sont variés et parfois complémentaires. Les microorganismes phototrophes atteignent des rendements très intéressants mais des productivités très faibles (Das et Veziroglu, 2001; Eroglu et Melis, 2011). À l’inverse, les chimiotrophes ont de très bonnes productivités mais des rendements limités (Hallenbeck, 2005). L’association de différents microorganismes en un procédé à deux étapes est également un sujet d’étude ayant pour objectif d’accroître les performances de production d’hydrogène.

Les avantages et les limitations de chacun des procédés microbiologiques tels que développés de nos jours sont repris dans le Tableau 1. Actuellement, le développement de ces technologies est toujours au stade du laboratoire à petite et moyenne échelle (de quelques mL à quelques m<sup>3</sup>) (Berberoglu et Pilon, 2010; Cheng *et al.*, 2011a; Levin *et al.*, 2004). En effet, de nombreux phénomènes sont encore inexpliqués ou sujets à discussions (Das et Veziroglu, 2008; Hallenbeck et Benemann, 2002). Les applications pilotes et industrielles à plus grande échelle sont attendues pour le milieu du siècle, avec le développement du réseau et de l’utilisation de l’hydrogène et en association avec des étapes de traitement de déchets (eaux usées, déchets agricoles, etc.) (Hallenbeck *et al.*, 2012; Melis et Melnicki, 2006).

Tableau I - 1 : Avantages et inconvénients des procédés microbiologiques de production d’hydrogène. Les rendements lumineux sont estimés sur la conversion en hydrogène de l’énergie lumineuse apportée. Adapté de Hallenbeck *et al.* (2012) et Das et Veziroglu (2008).

<b>Procédé et organisme</b>	<b>Productivité</b> ( $\text{mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	<b>Rendements</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Biophotolyse directe ou indirecte</b> (Algues vertes, cyanobactéries)	2.5 – 13	< 0.1%	Substrat abondant et universel (eau + lumière) Indépendant de toute source de carbone Conversion d’énergie lumineuse dix fois meilleure que les végétaux Produits simples ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ )	Nécessite l’apport de beaucoup d’énergie lumineuse Nécessite de grandes surfaces d’exposition à la lumière Le rendement énergétique global reste très faible Grande sensibilité à l’oxygène coproduit lors de la photosynthèse Bioréacteurs complexes et coûteux
<b>Photo fermentation</b> (Bactéries pourpres)	0 – 83	< 1%	Production d’hydrogène complémentaire à la dark fermentation Conversion quasi-complète des substrats organiques Fixation de l’azote atmosphérique Utilisation et dégradation de la matière organique d’eaux usées	Faibles productivités et rendements énergétiques, nécessité de grandes surfaces d’exposition Effet inhibiteur de l’oxygène Faible efficacité des nitrogénases Bioréacteurs complexes et coûteux
<b>Dark fermentation</b> (Bactéries anaérobies strictes et facultatives)	10000 – 15000	33%	Très large gamme de substrats dégradés et métabolites valorisables Réacteurs connus et déjà en utilisation en digestion anaérobie Possibilité de fonctionner en conditions non-stériles Très bonnes productivités notamment dans les cultures immobilisées	Faible abattement du contenu organique et grand nombre de sous-produits Peu de reproductibilité entre les réacteurs de différentes configurations Sensibilité des hydrogénases à l’oxygène Limitation thermodynamiques avec l’augmentation des rendements



## 4.1. Transfert d’électrons et hydrogénases

D’une manière générale, la production biologique d’hydrogène est le résultat de l’action d’enzymes capables de réduire des protons libres dans le milieu de culture en hydrogène moléculaire. Ces enzymes incluent les familles des hydrogénases et nitrogénases (Frey, 2002; Kontur *et al.*, 2012; Mathews et Wang, 2009). Cependant, la production d’hydrogène n’est pas une fin en soi pour la bactérie. En effet, l’étape de réduction enzymatique des protons fait partie intégrante des procédés biochimiques mis en œuvre au sein de la cellule pour produire son énergie et croître. Le moteur énergétique des cellules réside en la rupture des liaisons chimiques énergétiques (dégradation en plusieurs étapes du glucose à la formation d’ATP et CO<sub>2</sub>) ou en l’excitation des électrons au sein des chloroplastes. C’est ensuite par l’intermédiaire d’un enchaînement de réactions d’oxydoréduction réalisées via des transporteurs intermédiaires (cofacteurs ou enzymes tels que les ferrédoxines, NAD(P)H, etc.), que les électrons sont transférés jusqu’aux enzymes terminales. Le métabolisme permet ainsi la production de molécules énergétiques, telles que l’ATP, afin d’assurer l’ensemble des mécanismes de croissance et de division cellulaire. Par ailleurs, il engendre le rejet de CO<sub>2</sub> et d’autres composés organiques en solution (Delaney *et al.*, 1984; Hatch et Finneran, 2008; Smith *et al.*, 2012; Trohalaki et Pachter, 2010). Il faut noter que d’autres protéines permettent le transport d’électrons, telles que les flavoprotéines ou les cytochromes, mais ces dernières ne sont d’ordinaire pas associées aux mécanismes aboutissant à la production d’hydrogène (Lovley, 2008a).

Afin d’obtenir des quantités significatives d’hydrogène produit par un microorganisme, il faut que la cellule ait optimisé chacune des étapes de son métabolisme pour pouvoir en tirer un avantage énergétique. Lorsque les conditions sont rencontrées, ce sont principalement les hydrogénases qui sont responsables de la réduction réversible finale des protons en hydrogène, selon l’équation 1 (Frey, 2002; Gogotov et Azova, 1976; Kim et Kim, 2011; Redwood *et al.*, 2008; Trohalaki et Pachter, 2010).

Réduction des protons dans les hydrogénases



Les hydrogénases (Hyd ou H<sub>2</sub>ase) sont classées selon les combinaisons qu’elles forment avec les ions métalliques et cofacteurs (Figure 3). On distingue ainsi les [NiFe]-hydrogénases, largement exprimées chez les bactéries et *Archaea*, les [FeFe]-hydrogénases, présentes chez les bactéries anaérobies strictes ou facultatives et les [Fe]-hydrogénases, présentes seulement chez certains organismes méthanogènes et *Archaea* (Heinekey, 2009; Vignais et Colbeau, 2004; Wu et Mandrand, 1993).

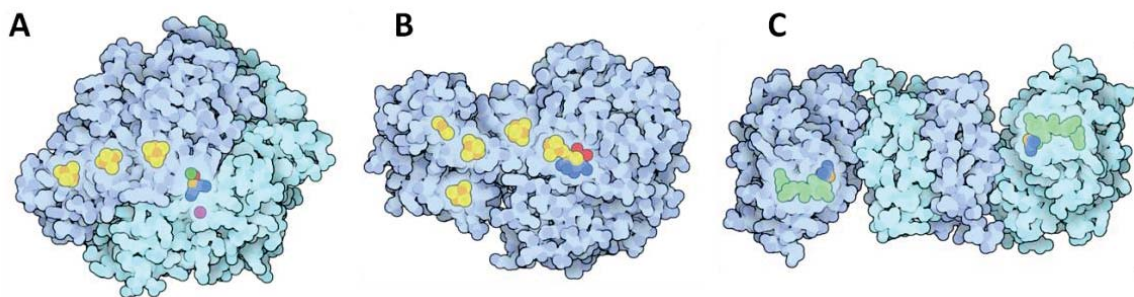


Figure 1 - 3 : Schémas de structure de [A] [NiFe], [B] [FeFe] et [C] [Fe]-hydrogénases. Adaptés depuis RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)).

Le mécanisme réactionnel consiste généralement en l’oxydation des transporteurs d’électrons à la surface de l’enzyme. Au sein de l’enzyme, les électrons évoluent ensuite vers les protons à l’autre bout pour réduire ces derniers. L’hydrogène moléculaire formé diffuse par la suite depuis le site actif au travers des canaux de diffusion de l’enzyme.

Une caractéristique importante des hydrogénases est leur inactivation en présence d’oxygène auquel elles sont extrêmement sensibles. Cette inactivation est réversible ou irréversible selon l’hydrogénase. En effet, dans la nature, l’oxygène est un meilleur accepteur d’électrons que les protons. Ce mécanisme permet donc à la cellule de privilégier le transfert d’électrons vers l’oxygène lorsque celui-ci est disponible afin d’en tirer un bénéfice énergétique plus important (Friedrich *et al.*, 2011).

De récentes recherches ont montré une très grande diversité des hydrogénases au sein des microorganismes producteurs d’hydrogène, notamment les [FeFe]-hydrogénases chez les bactéries anaérobies (Calusinska *et al.*, 2010). Dans ces hydrogénases, les sites actifs sont constitués de centres fer-souffre coordonnés par des ligands CO et CN et regroupés dans un cluster H du côté C-terminal de la protéine (Figure 4).

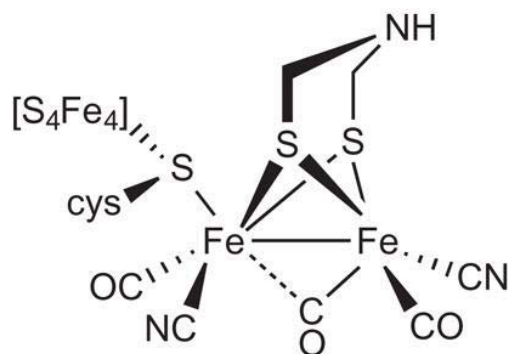


Figure I - 4 : Site actif d'une [FeFe]-hydrogénases de *C. pasteurianum*. Adapté depuis Camara et Rauchfuss (2012).

À l'autre bout, dans un cluster F, la présence de cystéines a été mise en évidence à différents endroits, homologues aux ferrédoxines bactériennes, favorisant probablement les interactions avec les partenaires redox et l'arrivée des électrons dans la protéine (Figure 5).

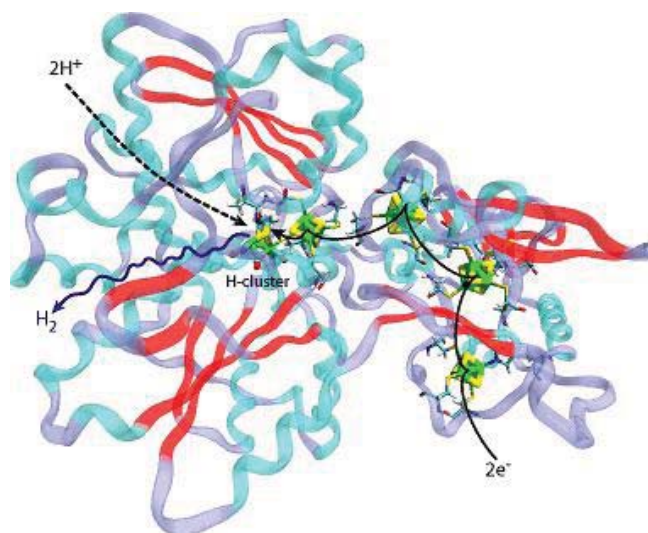


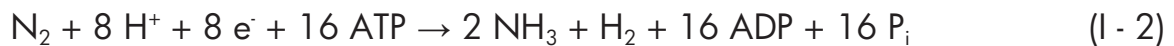
Figure I - 5 : Schéma de l'hydrogénase Cpl de *C. pasteurianum*. Les flèches représentent les voies de diffusion des électrons, des protons et de l'hydrogène moléculaire produit, vers et depuis le cluster H. Adapté depuis TCBG, [www.ks.uiuc.edu/research/hydrogenase](http://www.ks.uiuc.edu/research/hydrogenase).

Ces découvertes laissent penser que ces structures moléculaires très diversifiées jouent des rôles différents au sein de la cellule, permettant à celle-ci de réorienter rapidement les flux d'électrons lors de changements de conditions environnementales. (Calusinska *et al.*, 2011; Gogotov et Azova, 1976; Trohalaki et Pachter, 2010)

Un mécanisme de production d'hydrogène existe également chez les bactéries fixatrices d'azote qui convertissent ce dernier en ammoniac afin de

le combiner pour la formation d’acides aminés puis d’acides nucléiques et de protéines (Asada et Miyake, 1999; Hallenbeck, 1983; Khetkorn *et al.*, 2010). Cependant, ces réactions sont consommatrices d’énergie (ATP) pour la cellule et n’interviennent donc que lorsque celle-ci est en carence d’azote (équations 2 et 3). Outre la voie de fixation de l’azote, la nitrogénase catalyse également la réaction de conversion directe des protons en hydrogène, mais ce procédé est d’autant plus consommateur d’ATP et n’intervient donc que lorsque les conditions sont particulières (Asada et Miyake, 1999; Eroglu et Melis, 2011). Les nitrogénases utilisent plusieurs centres métalliques pour réaliser leurs réactions, notamment via des ions Mo et des cofacteurs Fe et S (Figure 6).

Mécanisme de production d’hydrogène par les nitrogénases :



En l’absence de  $\text{N}_2$  :

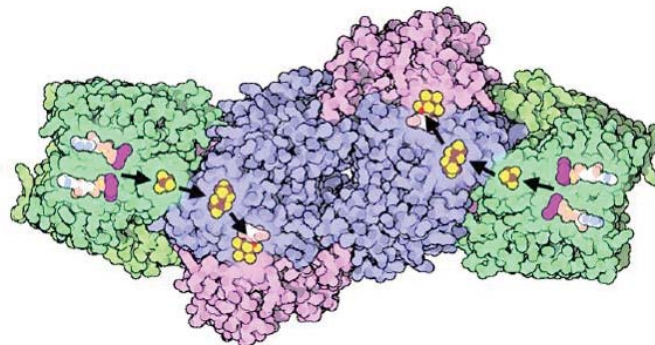


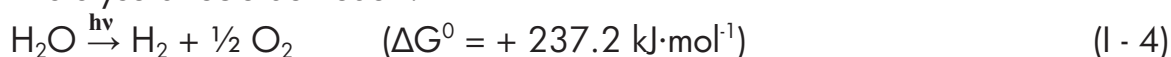
Figure I - 6 : Schéma de structure d’une [MoFe]-nitrogénase. Adapté depuis RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)).

## 4.2. Biophotolyse

Les microorganismes réalisant la biophotolyse sont des photo-autotrophes qui utilisent l’énergie lumineuse et leur système photosynthétique pour, *in fine*, dissocier les molécules d’eau en hydrogène et oxygène. Cette voie de production est attractive car elle ne nécessite comme substrat que de l’eau et de la lumière. On distingue deux mécanismes de production : la biophotolyse directe et la biophotolyse indirecte (Akkerman *et al.*, 2002).

La biophotolyse directe correspond à la conversion de l’eau en hydrogène et en oxygène par les algues vertes (dont *Chlamydomonas reinhardtii* est la souche la plus connue et étudiée) (Esquivel *et al.*, 2011; Ghysels et Franck, 2010; Vijayaraghavan *et al.*, 2009). En raison de l’énergie libre<sup>1</sup> positive de photolyse de l’eau (équation 4), l’apport de lumière est nécessaire et permet l’excitation des électrons de l’eau qui sont transportés par la chaîne photosynthétique vers les protons pour former l’hydrogène moléculaire et, au passage, permettre la formation d’ATP. Cette réaction est possible en l’absence d’accepteur d’électrons habituel (l’oxygène). Or, l’oxygène est un des éléments produits par l’algue lors de la photosynthèse par le photosystème II. Lorsque l’oxygène est supprimé du milieu, l’algue commence à synthétiser les enzymes responsables de la production d’hydrogène, notamment les [FeFe]-hydrogénases (Kruse et Hankamer, 2010; Oncel et Sukan, 2011). Cependant, ces enzymes sont extrêmement sensibles à toute trace d’oxygène et irréversiblement inactivées par celui-ci. La production d’oxygène doit donc être séparée de la production d’hydrogène. Ces conditions sont rencontrées lorsqu’on place la culture en privation de soufre, dans laquelle le PSII ne peut plus fonctionner normalement et libérer de l’oxygène dans le milieu. Ces conditions transitoires rendent néanmoins le procédé très sensible aux conditions du milieu et surtout ne permettent pas la production d’hydrogène sur de longues périodes et en grande quantité (Ghysels et Franck, 2010; Lecler *et al.*, 2011; Oncel et Sukan, 2011).

Photolyse directe de l’eau :



La biophotolyse indirecte est réalisée par les cyanobactéries (*Anabaena sp.*, *Spirulina sp.*, *Glozocapsa sp.*, *Nostoc sp.*, etc.) (Allahverdiyeva *et al.*, 2010; Asada et Miyake, 1999; Tiwari et Pandey, 2012). Les équations 5 et 6 illustrent comment ces microorganismes couplent indirectement, selon les conditions dans lesquelles elles sont, la photosynthèse (accumulation de sucres

---

<sup>1</sup>L’ensemble des énergies libres standards de réaction présentées dans ce chapitre sont calculées à 25 °C, pH 7 et aux concentrations de 1 M, à partir des énergies libres de formation et théories tirées de Amend et Shock (2001), Thauer *et al.* (1977) et Verhaart *et al.* (2010).

comme réserve énergétique) et la production d’hydrogène (rétablissement des équilibres des pools redox au sein de la bactérie).

Photolyse indirecte de l’eau en deux étapes :



Les organismes photosynthétiques réalisant la biophotolyse sont considérés comme intéressants car ils permettent la production d’hydrogène à partir d’un composé universel et presque gratuit : l’eau. Cependant, le problème principal qu’ils rencontrent est l’inhibition de la production d’hydrogène par l’oxygène alors que ce dernier est nécessaire à la croissance et à la survie des microorganismes. Les solutions envisagées résident en l’ingénierie métabolique afin, par exemple, de rendre les hydrogénases tolérantes à l’oxygène. En outre, les productivités de ces microorganismes restent très faibles, de l’ordre de quelques  $\text{mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{culture}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . L’utilisation des algues vertes est actuellement envisagée de manière préférentielle pour la production de biocarburants, en raison du haut rendement de production de biomasse qu’elles présentent en conditions optimales. (Akkerman *et al.*, 2002; Dasgupta *et al.*, 2010; Eroglu et Melis, 2011; McKinlay et Harwood, 2010).

### 4.3. Photo-fermentation

Le terme « fermentation » se réfère aux procédés biologiques consommant des composés organiques extracellulaires afin de produire de l’ATP (Hallenbeck et Ghosh, 2009; Keskin *et al.*, 2011). La première étape du métabolisme énergétique est la glycolyse dégradant le glucose en pyruvate qui est, par la suite, fermenté en divers composés. Durant la métabolisation, les microorganismes oxydent le substrat et transfèrent les électrons issus de cette oxydation vers un accepteur, d’ordinaire l’oxygène. Cependant, lorsque l’oxygène est absent du milieu, les électrons doivent être redirigés vers un autre accepteur afin de maintenir les équilibres d’oxydoréduction (notamment diminuer la proportion d’équivalents réduits produits au cours de la fermentation). La formation d’hydrogène est une conséquence du transfert d’électrons aux protons afin de rétablir cet équilibre interne et de permettre au

processus de fermentation de se poursuivre (Dasgupta *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2011).

Le procédé photo-fermentatif associe la consommation hétérotrophe d’une source organique à la photosynthèse pour réaliser la croissance de la cellule (Lazaro *et al.*, 2012; Seifert *et al.*, 2010). La photosynthèse est réalisée par les microorganismes photo-hétérotrophes tels que les bactéries pourpres *Rhodospseudomonas sp.* et *Rhodobacter sp.* (Bianchi *et al.*, 2010; Gilbert *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010). En conditions anaérobies, ces microorganismes consomment les sucres ou acides organiques et les convertissent en hydrogène et CO<sub>2</sub> selon le schéma illustré à la Figure 7.

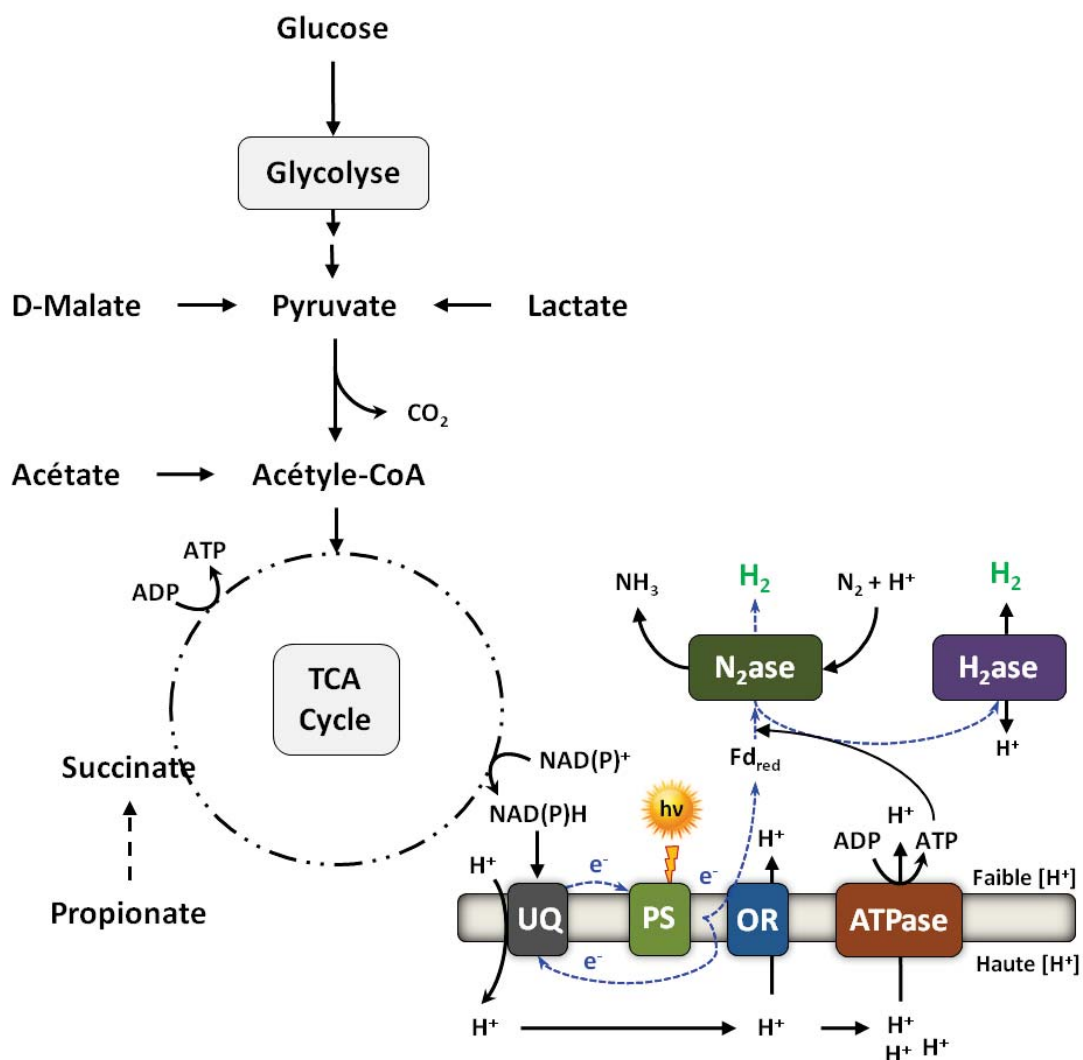


Figure I - 7 : Voies métaboliques de fermentation des microorganismes photo-hétérotrophes. Adapté de Oh *et al.* (2011).

Ces bactéries atteignent des rendements de conversion des substrats en hydrogène stœchiométriquement maximaux, avec 12 moles d’hydrogène par mole de glucose ou 4 moles d’hydrogène par mole d’acétate. L’apport d’énergie lumineuse est néanmoins requis au vu de l’énergie libre standard des réactions positives ou proches de zéro comme montré aux équations 6 et 7 à partir de glucose ou d’acétate (Eroglu et Melis, 2011; Hallenbeck et Ghosh, 2009).

Photo-fermentation de l’acétate :



En pratique, les rendements obtenus sont moins élevés en raison de la consommation d’hydrogène faite par certaines hydrogénases dont l’action est réversible. Ainsi, certains auteurs ont atteint des rendements de  $7 \text{ mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  ou de  $3.4 \text{ mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}_{\text{acétate}}^{-1}$ . De ce fait, l’acétate est souvent considéré comme un substrat idéal pour la photo-fermentation (Keskin *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012). Plusieurs moyens sont envisagés pour limiter cette re-consommation de l’hydrogène, tels que des voies biomoléculaires ou le design de photo-bioréacteurs permettant l’extraction rapide de l’hydrogène produit, maximisant, par la même occasion, la vitesse de production (Basak et Das, 2009; Berberoglu et Pilon, 2010; Gadhamshetty *et al.*, 2010; Gilbert *et al.*, 2011). Cependant, un des désavantages majeurs des moyens ainsi envisagés réside en une productivité qui reste limitée, de l’ordre de quelques dizaines de  $\text{mL}_{\text{H}_2}\cdot\text{L}_{\text{culture}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , surtout en comparaison avec la fermentation anaérobie (Dasgupta *et al.*, 2010; Eroglu et Melis, 2011). Enfin, les procédés de photo-fermentation sont fréquemment envisagés en association avec la fermentation anaérobie, en raison de la complémentarité des substrats utilisés. Les procédés de fermentation anaérobies pourraient dégrader les hexoses dans une première étape anaérobie et produire des acides gras volatils consommés, par la suite, par les phototrophes (Argun *et al.*, 2009a; Cheng *et al.*, 2011b; Patel *et al.*, 2012). Cependant, la conception des bioréacteurs fonctionnant soit en co-culture, soit en série, est un point crucial pour ces développements afin d’assurer une efficacité énergétique maximale.

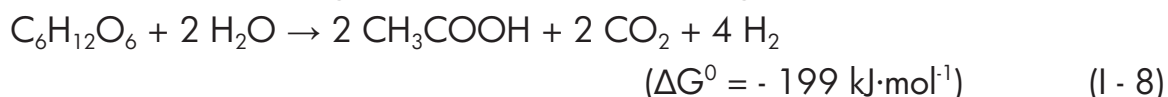


#### 4.4. Fermentation anaérobie

Les microorganismes réalisant la fermentation anaérobie utilisent uniquement les substrats organiques comme source d’énergie. À ce titre, ce type de fermentation est également appelé « dark fermentation » (DF), car pouvant se dérouler en l’absence de lumière. La DF permet la production d’hydrogène à partir d’une très grande variété de substrats avec des vitesses de production intéressantes en comparaison aux procédés phototrophes (Das et Veziroglu, 2001; Hallenbeck, 2009; Hawkes *et al.*, 2002). Ce type de fermentation est de ce fait envisagé pour combiner le traitement d’eaux usées et la valorisation énergétique de ces dernières (Angenent *et al.*, 2004).

La DF est réalisée dans des plages de températures méso- ou thermophiles, par des bactéries anaérobies facultatives (*Escherichia sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus sp.*, etc.) ou anaérobies strictes (*Clostridium sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Ethanolgenes sp.*, *Desulfovibrio sp.*, etc.) (Goud *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011). Les rendements stoechiométriques maximaux, avec quatre moles d’hydrogène par mole de glucose, sont atteints lorsque la souche produit de l’acétate (équation 8).

Dark fermentation du glucose en acétate et hydrogène :



La formation d’hydrogène est un moyen pour la bactérie d’écouler les électrons qui proviennent de l’oxydation du glucose par la réduction de protons. Lorsque les conditions ne sont pas avantageuses pour la formation d’hydrogène (excès d’équivalent réduit, déplacement de l’équilibre lors de la formation d’hydrogène, pH trop haut, etc.), d’autres composés issus du métabolisme peuvent être formés comme, par exemple, du lactate (équation 9), de l’éthanol (équation 10) ou d’autres acides et alcools. Ces voies sont néanmoins énergétiquement moins avantageuses pour la bactérie (générant moins d’ATP) mais lui permettent cependant de poursuivre la consommation du glucose lorsque la production d’hydrogène est bloquée. Par ailleurs, la production d’hydrogène est également un moyen pour la bactérie de limiter le stress acide en consommant les protons du milieu. La fermentation se déroulera donc préférentiellement à pH légèrement acide, ce qui favorisera

également l’équilibre de la réaction 1 (Kothari *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2010; Thauer *et al.*, 1977).

Dark fermentation du glucose sans production d’hydrogène



Les rendements de production atteints sont moins importants que pour la photo-fermentation, en raison des limitations thermodynamiques de conversion des substrats en hydrogène sans l’apport de l’énergie lumineuse. En effet, l’oxydation stœchiométrique du glucose peut, en théorie, produire 12 moles d’hydrogène par mole de glucose (équation 6). Cependant, la bactérie doit également en tirer de l’énergie pour sa croissance en assurant la production d’ATP au cours de la métabolisation. Les rendements maximaux de production sont dès lors limités à 33% de ce maximum, soit quatre moles d’hydrogène par mole de glucose (Hawkes *et al.*, 2007; Hiligsmann *et al.*, 2011; Hung *et al.*, 2011a). Le biogaz produit est un mélange d’H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> en proportions variables selon les conditions et les souches employées, généralement entre 50 et 70%.

#### **4.4.1. Dark fermentation par les *Enterobacteriaceae***

La famille des *Enterobacteriaceae* compte de nombreuses bactéries Gram négatives et facultatives anaérobies en forme de petits bâtonnets mobiles. On les retrouve communément dans les sols, les systèmes digestifs et les déchets organiques. L’hydrogène est produit par deux voies métaboliques (Cai *et al.*, 2011a). La première utilise le formiate, produit à partir du pyruvate issu de la glycolyse (équation 11) via la pyruvate-formiate:lyase (PFL) (équation 12). La formiate-hydrogène:lyase (FHL) permet *in fine* la décomposition du formiate en hydrogène et CO<sub>2</sub> (équation 13). Cette première voie de production produit deux moles d’hydrogène par mole de glucose. Lors de la production du formiate, est également formé de l’acétyle-CoA utilisé à des fins énergétiques de production de deux ATP lors de sa conversion en acétate (équation 13). La cellule se doit également de maintenir son équilibre NADH/NAD<sup>+</sup> afin de permettre au métabolisme de continuer la glycolyse. La ré-oxydation du

NADH peut être réalisée par l’intermédiaire de la NADH-ferrédoxine:oxydoréductase (NFOR) amenant à la formation d’une mole d’hydrogène supplémentaire par les hydrogénases (équations 15 et 16) (Do *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Redwood *et al.*, 2008). Cependant, cette voie est très rapidement inhibée par sa propre production d’hydrogène en raison des potentiels redox des composés oxydés et réduits en présence qui changent avec leur concentration. Aussi, cette voie s’avère-t-elle souvent peu efficace pour la formation d’hydrogène (Angenent *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2012). La régénération des NAD<sup>+</sup> est alors réalisée par la formation de produits réduits tels que le lactate ou l’éthanol, au détriment de la voie énergétiquement favorable qui est celle de la formation d’acétate. La bactérie réalise alors la fermentation dite d’acides mixtes. Il faut également noter que l’hydrogène peut être consommé par des hydrogénases (Ghosh et Hallenbeck, 2009; Hamilton *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2008a). L’ensemble de ces mécanismes est repris de manière simplifiée à la Figure 8.

Etape de glycolyse :



Conversion du pyruvate en formiate par la PFL :



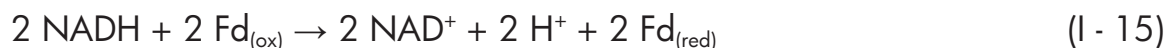
Dismutation du formiate par la FHL :



Conversion énergétique de l’acétyle-CoA en acétate :



Oxydation du NADH par la NFOR si  $p_{\text{H}_2} < 60 \text{ Pa}$  :



Oxydation de la ferrédoxine par les hydrogénases :



En raison de leur métabolisme, les *Enterobacteriaceae* atteignent des rendements qui sont moins élevés que les clostridies. Des cultures pures d’*Enterobacter sp.* et *Citrobacter sp.* ont produit, en conditions optimales, de l’ordre de 1.4 à 1.6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>. Certains auteurs ont obtenu des

rendements supérieurs à  $2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  en culture continue. Les souches d’*Escherichia Coli* sont souvent moins performantes ( $0.3$  à  $1 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) mais sont très étudiées, en raison des possibilités de modification génétique, afin d’orienter le métabolisme vers la production d’hydrogène. Les productivités qu’atteint cette famille sont, par contre, les meilleures de la fermentation anaérobie, à savoir jusqu’à  $600 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{culture}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Kothari *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012). Un autre avantage de ces souches est qu’elles sont anaérobies facultatives et peuvent donc consommer l’oxygène du milieu sans être inhibées dans leur croissance, même si, dans ces conditions, la production d’hydrogène est complètement stoppée.

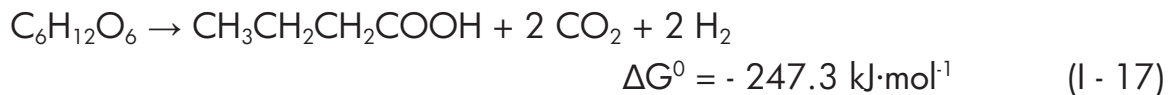
#### **4.4.2. Dark fermentation par les clostridies**

Les bactéries du genre *Clostridium* sont considérées par de nombreux chercheurs comme les meilleurs candidats pour la production d’hydrogène mésophile par dark fermentation. Il s’agit d’un genre très diversifié de bactéries Gram positives et anaérobies strictes. Elles forment de longs bâtonnets munis de flagelles péritriches ou des endospores ovales ou sphériques, souvent plus gros que dans leur état végétatif. Ces endospores peuvent résister à la chaleur (jusque  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ), à l’oxygène, aux conditions extrêmes de pH et peuvent rester dormantes et viables durant de très longues périodes (Douglas *et al.*, 1973; Hambleton et Rigby, 1970; Paredes *et al.*, 2005). Cela permet de les isoler aisément, d’une part, parce qu’elles ne croissent qu’en milieu strictement anaérobie et, d’autre part, parce qu’elles ne sont pas éliminées à la chaleur, contrairement à de nombreuses autres souches qui ne résisteront pas à de telles conditions. Les *Clostridium* sont des chimio-hétérotrophes produisant un mélange d’hydrogène, de  $\text{CO}_2$ , d’acides organiques et d’alcools (Tracy *et al.*, 2012). À ce titre, ils ont largement été étudiés au XX<sup>ème</sup> siècle pour la production d’acétone et de butanol en conditions acides et de carence permettant à certaines souches de réaliser la solvantogénèse dans les premiers procédés de fermentation qui ont été développés avant la fermentation éthanolique (Bramono *et al.*, 2011; Gheshlaghi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Aujourd’hui, le genre *Clostridium* est principalement étudié dans le cadre de la production d’hydrogène par fermentation anaérobie. Ces bactéries

permettent, selon la souche utilisée, la dégradation d’une très large gamme de substrats, y compris la cellulose. Théoriquement, elles peuvent atteindre le rendement maximal de conversion en hydrogène ( $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) lors de la production d’acétate (équation 8). Par ailleurs, elles peuvent également emprunter la fermentation butyrique menant à la production d’hydrogène atteignant néanmoins un rendement inférieur ( $2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ , équation 17). La fermentation d’acide mixte est également possible sans production d’hydrogène. Ces deux dernières voies permettent la régénération du  $\text{NAD}^+$  contrairement à la voie de l’acétate (Chen *et al.*, 2006; He *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007). En pratique, lorsque les conditions sont optimisées, on retrouve une fermentation mélangeant la production d’acétate et de butyrate, accompagnée d’hydrogène dont les rendements dépassent rarement les  $3 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ .

Dark fermentation du glucose en butyrate et hydrogène :



Il y a deux voies de transfert d’électrons depuis le substrat jusqu’à l’hydrogène chez les clostridies : la pyruvate-ferrédoxine:oxydoréductase (PFOR) et la NADH-ferrédoxine:oxidoréductase (NFOR). Ces deux voies impliquent l’action enzymatique des hydrogénases pour réaliser le transfert d’électrons transportés par les médiateurs redox (ferrédoxines et NADH par exemple). La PFOR catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et  $\text{CO}_2$  (équation 18) et le transfert des électrons aux ferrédoxines qui seront ensuite oxydées par les protons grâce aux hydrogénases (équation 16). Le mécanisme d’action de la NFOR est identique à celui présenté pour les *Enterobacteriaceae* (équation 15) et est également limité par la présence d’hydrogène dans le milieu (Liu *et al.*, 2011). L’ensemble des mécanismes de production d’hydrogène par fermentation anaérobie est repris à la Figure 8.

Décarboxylation du pyruvate par la PFOR :



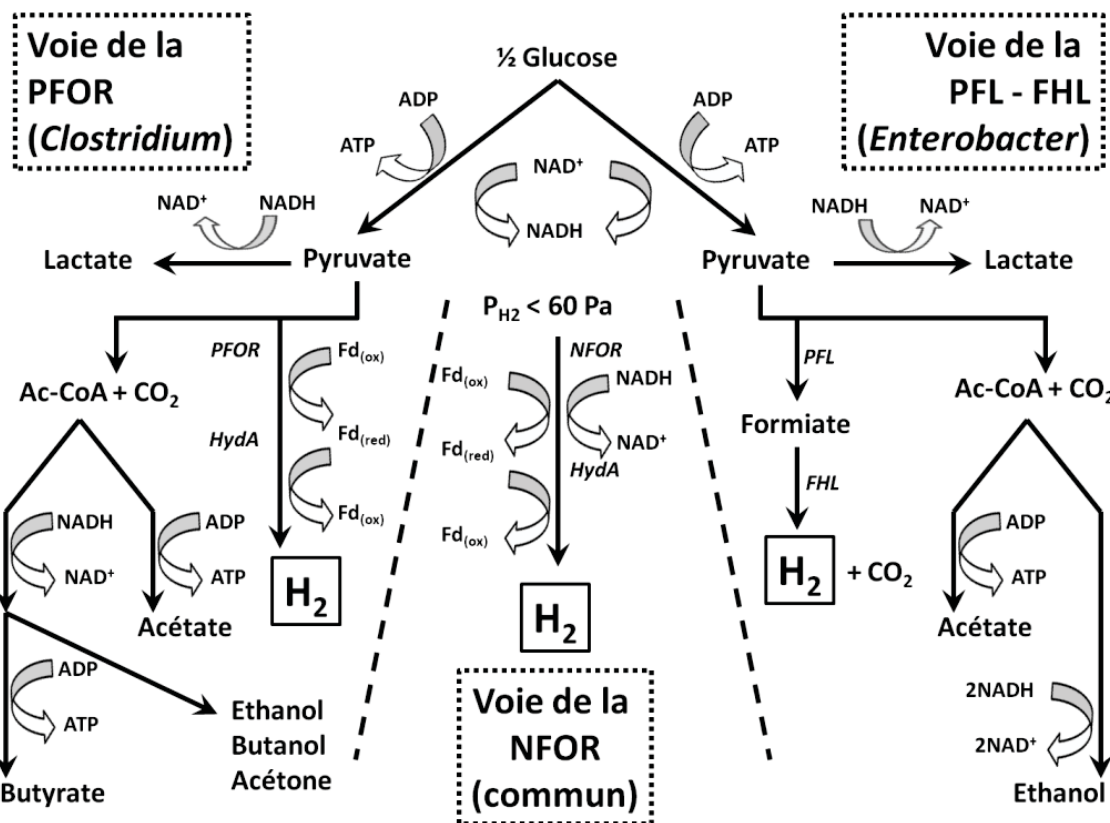


Figure I - 8 : Voies de production d’hydrogène chez les bactéries du genre *Clostridium* et *Enterobacter*. Les différentes enzymes annotées qui entrent en jeu : PFOR : pyruvate-ferrédoxine:oxydoréductase ; HydA : [FeFe]-hydrogénase ; NFOR : NADH-ferrédoxine:oxydoréductase ; PFL : pyruvate-formiate:lyase ; FHL : formiate-hydrogène:lyase. Adapté de Hallenbeck et Ghosh (2012) et Oh *et al.* (2011).

Les mécanismes métaboliques des souches du genre *Clostridium* permettent à ces dernières d’atteindre des rendements de production parmi les plus élevés, sans toutefois obtenir le rendement maximum, en raison du mélange de métabolites obtenus le plus souvent lors de la fermentation. Les cultures pures atteignent, en conditions optimales, 2.4 à 2.8 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> avec des souches telles que *C. butyricum* et *C. beijerinckii*. Certaines souches ont produit jusqu’à 3.26 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>. Cependant, ce genre est un peu plus lent pour produire l’hydrogène (jusqu’à 400 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sub>culture</sub><sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>). Il faut également noter que ces souches peuvent former des biofilms, ce qui permet d’utiliser ces souches immobilisées afin de concentrer la biomasse et d’augmenter les productivités dans des réacteurs conçus à cet effet (Cai *et al.*, 2011a; Kothari *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012).

#### **4.4.3. Dark fermentation et digestion anaérobie**

Les processus de production d’hydrogène par dark fermentation sont menés par des microorganismes issus de milieux anaérobies. En effet, la production d’hydrogène prend place lorsque les conditions d’anaérobiose sont rencontrées, c’est-à-dire lorsque les protons deviennent des accepteurs d’électrons avantageux pour l’oxydation des substrats carbohydratés. Ces milieux se créent naturellement lors de la digestion de matières biodégradables où l’apport en oxygène ou en air frais est limité. On rencontre ces conditions dans des milieux tels que les sédiments, les systèmes digestifs et déjections animaliers, les eaux usées, les composts, etc. Au cours de la biodégradation, une multitude de microorganismes réalisent les différentes étapes de la digestion, se développent et coexistent en symbiose. Parmi ceux-ci, on retrouve les microorganismes producteurs d’hydrogène (Thauer *et al.*, 2010).

On distingue quatre étapes caractéristiques prenant place successivement dans la digestion anaérobie : l’hydrolyse, l’acidogénèse, l’acétogénèse et la méthanogénèse (Figure 9). Chacune de ces étapes permet la fragmentation des composés organiques complexes en composés plus simples qui serviront de substrat à d’autres microorganismes. Ainsi, l’hydrolyse permet la solubilisation des macromolécules (cellulose, amidon, protéines et matières grasses) qui seront consommées par les acidogènes. Cette étape regroupe une grande diversité de microorganismes produisant des acides gras volatils (AGV) et de l’hydrogène. Les AGV seront, par la suite, décomposés en acides acétiques, en hydrogène et en CO<sub>2</sub> par les acétogènes qui produisent à leur tour un substrat idéal pour les méthanogènes. Ces derniers sont responsables de la production gazeuse de méthane (biogaz énergétiquement valorisable bien que présentant à l’état de traces des composés soufrés, CO, etc.) (Appels *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2011). Ces différents processus peuvent prendre cours à différents moments ou différents endroits, voyant ainsi se succéder les croissances des populations adaptées aux conditions du milieu (Kim *et al.*, 2009).

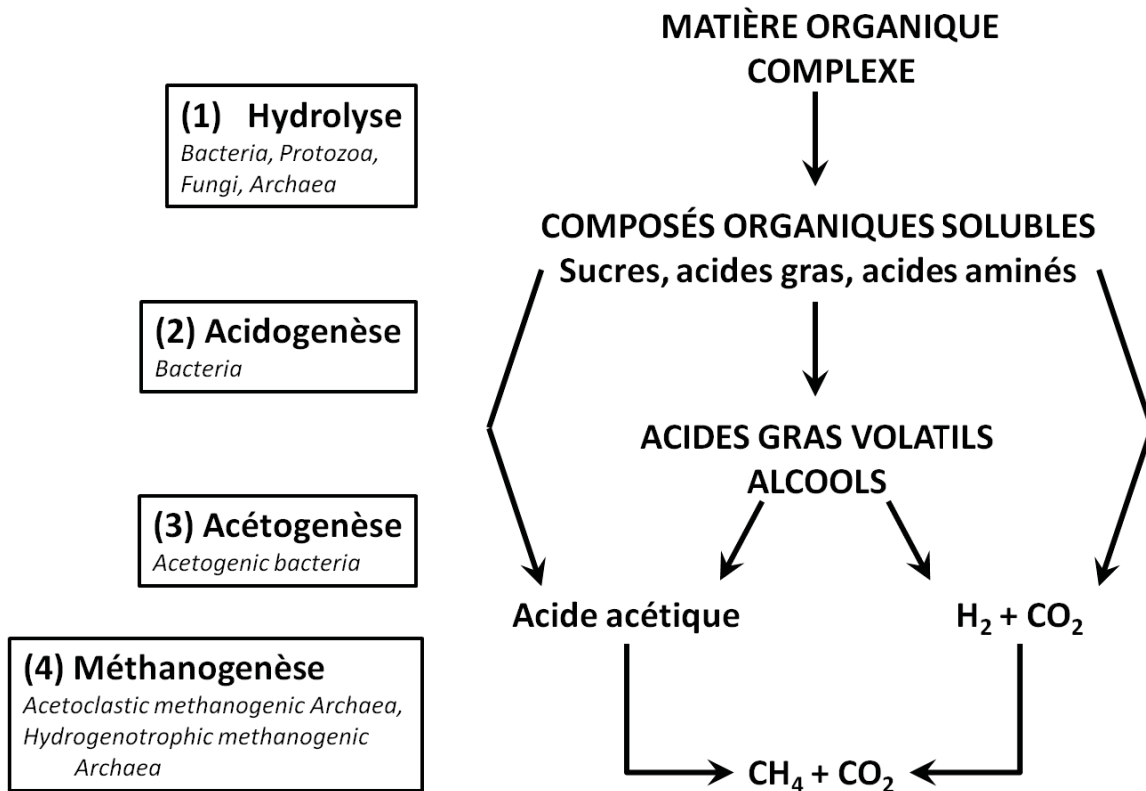


Figure I - 9 : Production de méthane par digestion anaérobie. (1) Etape lente d’hydrolyse des polymères organiques (polysaccharides, lipides et protéines) et monomères (glucose, xylose) et oligomères (sucres, acides gras, courts peptides et acides aminés). Suivi par (2) la fermentation bactérienne anaérobie acidogène associée avec la production d’acides gras volatils, d’hydrogène et de CO<sub>2</sub>. (3) Formation d’acétate par les bactéries acétogènes et homo-acétogènes. (4) Dégradation de l’acétate et formation de méthane par décarboxylation ou réduction du CO<sub>2</sub> par les *Achaea* méthanogènes. Adapté de Angenent *et al.* (2004)

C’est parmi les microorganismes réalisant l’acidogénèse et l’acétogénèse qu’ont été isolées les bactéries productrices d’hydrogène. Ces deux étapes se déroulent dans des conditions acides, d’autant plus que leur activité a tendance à libérer des acides organiques dans le milieu (pH entre 4.5 et 6.5) (Fang *et al.*, 2002; Gadhamshetty *et al.*, 2009). La production d’hydrogène à partir de cultures mixtes formées par ces microorganismes est possible selon les conditions dans lesquelles la fermentation se déroule. Des prétraitements sont également envisagés afin d’éliminer les communautés non sporulantes consommatrices d’hydrogène. Cependant, les performances atteintes dans les cultures mixtes sont souvent moindres qu’en culture pure, dans la mesure où certains microorganismes consomment les substrats sans produire de l’hydrogène. Les rendements atteints sont ainsi de l’ordre de 1.7 à 1.9



$\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  dans des conditions optimales (Davila-Vazquez *et al.*, 2008; Kothari *et al.*, 2012).

Dans le cadre de la valorisation énergétique de déchets organiques, seuls les organismes fermentatifs présentent un intérêt puisqu’ils sont capables de consommer les composés carbonés pour croître et coproduire de l’hydrogène (Chong *et al.*, 2009b). Par ce biais, ils contribuent à l’abattement de la DCO dans les eaux usées rejetées dans l’environnement (Angenent *et al.*, 2004; Cheong et Hansen, 2006; Fakhru'l-Razi *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010). Cependant, la production anaérobie d’hydrogène ne représente pas réellement un moyen complet d’épuration ou de réduction des déchets. En effet, seulement 40% (en condition idéale) de l’énergie du substrat est convertie en hydrogène et la majorité du carbone se retrouve en solution sous forme d’acides organiques (Kothari *et al.*, 2012). Dès lors, la plupart des auteurs proposent de combiner la production d’hydrogène par fermentation anaérobie aux procédés de biométhanisation ou de photo-fermentation. La voie méthanogène semble toutefois plus intéressante car similaire sur le plan technique et par ailleurs énergétiquement complémentaire. Cette conception permettrait à chaque étape du traitement d’être optimisée indépendamment afin d’améliorer les performances énergétiques et cinétiques de l’ensemble du procédé (Cheng *et al.*, 2010; Giordano *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011b).

## 5. Voies d’amélioration du procédé de production de bioH<sub>2</sub>

---

La production de biohydrogène par les microorganismes est un sujet largement étudié dans le cadre de la diversification de la production énergétique pour le futur. En effet, la production de ce biocarburant pourrait être associée au traitement des déchets organiques en solution et permettre une valorisation énergétique. Dans ce cadre, la dark fermentation est un procédé très intéressant car atteignant des rendements qui, quoique limités, permettent d’assurer l’autonomie énergétique du procédé et d’atteindre de bonnes capacités de production. Cependant, de nombreux facteurs doivent encore être améliorés afin de pouvoir rendre le procédé compétitif par rapport, notamment, aux procédés aérobies ou de biométhanisation. L’association des procédés constitue également une voie envisagée afin de coupler les avantages de chaque étape (Das et Veziroglu, 2001; Hawkes *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2004).

À moyen terme, l’objectif des recherches est d’améliorer les performances de production, en termes de rendement essentiellement, car actuellement limité à environ 60% du maximum théorique de  $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ . Pour ce faire, de nombreux facteurs ainsi que leurs influences respectives sont étudiés, tels que les paramètres de culture, la sélection de la communauté bactérienne produisant l’hydrogène, le design du bioréacteur répondant aux exigences d’une production industrielle, l’intégration du procédé, etc. *In fine*, il faudra arriver à appliquer le procédé à plus grande échelle afin d’envisager des essais « grandeur nature », de vérifier la stabilité de la production dans le temps, la capacité de traitement, les rendements sur de longues périodes d’essai. Cependant, ce scale-up se heurte aujourd’hui à la non-présence de l’hydrogène dans nos sociétés, rendant les produits de production difficilement utilisables ou commercialisables.

À long terme, le développement d’outils biomoléculaires rendront possible l’amélioration des rendements et des productivités. Cependant, ces objectifs demandent encore d’importantes avancées, notamment au niveau de l’étude fondamentale des métabolismes microbiens.

## **5.1. Influence des paramètres et des milieux de culture**

Afin d’optimiser la production anaérobie d’hydrogène, plusieurs paramètres ont été étudiés. Le processus commence par la sélection de la souche ou de la communauté de microorganismes qui produiront l’hydrogène. Les conditions de culture, les substrats, la configuration de la fermentation et, enfin, la présence d’inhibiteurs vont orienter le métabolisme microbien vers les voies associées ou non à la production d’hydrogène (Hawkes *et al.*, 2007; Nath et Das, 2004b; Sinha et Pandey, 2011). Les études réalisées dans ces domaines visent donc à identifier le moyen d’ajuster ces paramètres, seuls ou ensemble, pour maximiser la production d’hydrogène.

### **5.1.1. Sélection des microorganismes**

La production anaérobie d’hydrogène, étudiée en laboratoire, peut être réalisée à partir de cultures pures, de consortia artificiels ou de cultures mixtes (Davila-Vazquez *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2012; Valdez-Vazquez et Poggi-Varaldo, 2009). Les souches du genre *Clostridium* montrent les meilleures performances en termes de rendements. Elles dégradent de nombreux substrats simples ou complexes et résistent très bien aux conditions extrêmes de pH et de température (Cai *et al.*, 2011b; Chin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2011). Cependant, elles sont incapables de croître en présence d’oxygène et, *a fortiori*, de consommer ce dernier. Le dégazage du milieu, l’ajout d’agents oxydoréducteurs ou d’autres souches consommatrices d’oxygène sont des solutions utilisées (Hung *et al.*, 2011b; Seppälä *et al.*, 2011).

La sélection de plusieurs souches très efficaces et leur association en un consortium artificiel permet d’envisager la dégradation d’une plus large gamme de substrats qu’avec une seule souche, mais implique l’étude d’une dynamique de population afin d’observer si une des souches prend le dessus sur une autre dans la culture (Hsiao *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Maintinguer *et al.*, 2008). Le travail avec des cultures microbiologiquement bien définies permet généralement d’obtenir des performances élevées, dans la mesure où les microorganismes consommateurs d’hydrogène ou n’en produisant pas sont absents. Par ailleurs, ces microorganismes permettent la stricte comparaison de conditions de culture différentes avec le même

microorganisme. Cependant, ils sont tout à fait inadaptés pour une application à moyenne ou grande échelle en raison des précautions de stérilité requises, impossibles à tenir sur de grands volumes, mais aussi à cause des spécificités du milieu qui peuvent les rendre trop coûteux.

Aussi, des cultures mixtes sont envisagées d’ordinaire à partir de boues issues de milieux anaérobies, en favorisant la croissance des microorganismes producteurs d’hydrogène. Des prétraitements (chaleur, pH ou traitements chimiques) peuvent être appliqués afin de sélectionner les organismes sporulants tels les *Clostridium* producteurs d’hydrogène. Par ailleurs, une fois la production d’hydrogène en route, il faut éviter le retour des organismes consommant l’hydrogène, en maintenant des conditions de pH et d’anaérobiose ou d’alimentation du milieu (temps de réduction hydraulique notamment) mieux adaptées pour la production d’hydrogène afin de favoriser les bactéries d’intérêt. Les rendements atteints sont néanmoins souvent moins élevés qu’en culture pure (Akutsu *et al.*, 2009; Baghchehsaraee *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2002; Hu et Chen, 2007; Hung *et al.*, 2011b; Lin *et al.*, 2011).

### **5.1.2. La température**

La fermentation anaérobie peut être conduite dans des plages de températures mésophiles (25 – 40 °C), thermophiles (40 – 65 °C), extrêmes thermophiles (65 – 80 °C) ou hyper thermophiles (> 80 °C) (Cakir *et al.*, 2010; Sinha et Pandey, 2011). En raison de l’énergie nécessaire pour chauffer les substrats alimentés et maintenir la température au sein des réacteurs, la plupart des expériences sont menées entre 30 et 55 °C (Infantes *et al.*, 2011; Wang et Wan, 2008). Ces plages de températures permettent d’envisager des procédés qui seraient au moins énergétiquement indépendants.

L’augmentation de la température favorise thermodynamiquement la production d’hydrogène et permet d’atteindre des rendements plus élevés, approchant des rendements maximaux. Par ailleurs, le travail à plus haute température limite la prolifération de microorganismes tels que les méthanogènes consommateurs d’hydrogène (Gilroyed *et al.*, 2008). Ces procédés pourraient notamment avoir un intérêt si les eaux traitées étaient déjà à haute température comme celles provenant de l’industrie agro-

alimentaire. Cependant, les vitesses de production d’hydrogène sont fortement réduites dans les domaines thermophiles, ce qui réduit les capacités de traitement ou de production des installations envisagées (Lin *et al.*, 2008).

### **5.1.3. Le pH**

Le pH a un effet important sur les processus enzymatiques des microorganismes. En effet, les enzymes sont actives dans une gamme de pH spécifique dans laquelle elles exercent leur activité maximale. À ce titre, c’est un des facteurs clés qui oriente le métabolisme vers la production d’hydrogène et permet le bon fonctionnement des enzymes impliquées, hydrogénases en tête (Cai *et al.*, 2011a). Les valeurs optimales de pH pour la production d’hydrogène sont souvent établies entre 5 et 7 selon le type de microorganisme et le substrat carbone utilisés (Cai *et al.*, 2010; Fang et Liu, 2002). La plupart des bactéries mésophiles produisent l’hydrogène à des pH acides, entre 5.0 et 6.0, tandis que les thermophiles le font entre 6.5 et 7.5. Cependant, le pH optimal de production d’hydrogène peut être très différent du pH optimal pour la croissance de la souche (Chen *et al.*, 2005). En effet, pour *C. butyricum*, par exemple, il est respectivement de 5.2 et de 6.5. La voie de production d’hydrogène est probablement favorisée à plus faible pH car elle permet de limiter la chute du pH par la consommation des protons. Sans ce mécanisme et la production de métabolites acides, le pH deviendrait fortement inhibiteur pour la croissance de la bactérie (Mu *et al.*, 2006; Ruggeri *et al.*, 2009).

Dès lors, les cultures peuvent être envisagées en deux étapes : la première est envisagée depuis un pH proche de 7 et évoluant à un pH libre (décroissant) afin de permettre à la population bactérienne de se développer suffisamment, sans pour autant viser la performance de production d’hydrogène. Une fois que le pH arrive à la valeur optimale de production d’hydrogène, la seconde étape consiste en la régulation du pH par ajout d’une base (NH<sub>3</sub>, KOH ou NaOH) afin de produire l’hydrogène dans les conditions optimales (Masset *et al.*, 2010).

Le contrôle du pH est également un moyen pour limiter la prolifération d’organismes méthanogènes dans la culture. En effet, ces derniers se développent préférentiellement dans des conditions neutres ou légèrement

basiques. Le maintien d’un pH acide permet dès lors de limiter leur croissance au profit des producteurs d’hydrogène (Song *et al.*, 2011).

#### **5.1.4. Le substrat carbone**

Les substrats simples monomériques ou dimériques (glucose, saccharose, etc.) sont les plus utilisés dans la littérature (Chen et Lin, 2003). Plusieurs autres sucres ont également été envisagés tels que le xylose, le lactose, le maltose, etc. (Ghosh et Hallenbeck, 2009; Lin et Cheng, 2006; Mangayil *et al.*, 2011). Par ailleurs, les organismes réalisant la photo-fermentation peuvent également consommer des acides gras volatils, principalement l’acétate, mais aussi le lactate, le propionate, etc.

Des substances plus complexes ont également été étudiées pour servir de substrat, éventuellement après une étape de prétraitement (hydrolyse) nécessaire pour certaines souches (Lay *et al.*, 2012). En effet, selon les complexes enzymatiques qu’elles possèdent ou non, les souches ont la possibilité, le cas échéant, d’effectuer la dégradation de l’amidon non soluble. Ainsi, un nombre important de *Clostridium* produit des amylases (par exemple, *Clostridium butyricum*, *beijerinckii*, *acetobutylicum*, etc.) (Whelan et Nasr, 1951). À défaut, il est également possible d’associer ces souches à une souche hydrolytique telle que *Caldimomas*. La même approche est applicable aux composés cellulosiques (Desvaux, 2005). Cependant, les cellulases présentes chez certains microorganismes (*Clostridium cellulolyticum*, *cellulovorans*, *thermocellum*, etc.) montrent une activité optimale à 45°C, tandis que la température optimale de production d’hydrogène est de 35°C. Dès lors, la voie enzymatique est d’ordinaire envisagée et réalisée en deux opérations successives : l’hydrolyse enzymatique suivie de la fermentation productrice d’hydrogène (Jensen *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

Ces substrats peuvent être associés afin de simuler le contenu organique d’eaux usées pour tester la production potentielle d’hydrogène. Par ailleurs, le traitement des matières ou eaux usées brutes constitue également un large sujet d’étude afin d’identifier les meilleures conditions pour une production optimale d’hydrogène ainsi que l’influence de substances inhibitrices (lipides, sels, métaux lourds, etc.) (Kapdan et Kargi, 2006). De nombreuses études présentent des résultats de production de biohydrogène à partir de résidus de

fruits ou de végétaux (palmier, raisin, etc.), animaliers (poulet, bouse de vache, lisier, etc.) ou eaux usées industrielles et urbaines (Lay *et al.*, 1999; Lew *et al.*, 2009; Magnusson *et al.*, 2008; Mohan, 2008).

### **5.1.5. Le milieu de culture**

Outre la source de carbone, la présence d’une source azotée et d’oligoéléments est nécessaire afin de permettre la croissance de la bactérie et la production d’hydrogène. L’azote est requis pour la réplication cellulaire, la maintenance et le métabolisme, ainsi que pour la production des enzymes. La littérature indique que les souches acidogènes comme les souches du genre *Clostridium* et les *Enterobacteriaceae* ont la capacité d’utiliser les sources organiques d’azote (protéines, peptides et acides aminés libres) mais aussi l’ammoniac minéral. Dès lors, outre les sources azotées purifiées utilisées en laboratoire (peptone de caséine, extrait de levure, ...), les sources riches en substrats telles que les lisiers et résidus agricoles peuvent être utilisées à moindre frais (Argun *et al.*, 2008a; Hafner, 2007; Hamilton *et al.*, 2010; Salerno *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Cependant, il faut préciser que la production d’hydrogène n’est pas équivalente aux procédés de nitrification/dénitrification et ne permet dès lors pas l’élimination de l’azote du milieu.

Certains éléments métalliques sont également requis en trace afin d’être utilisés comme cofacteurs enzymatiques, dans les processus de transport d’électrons ou les hydrogénases, par exemple. Parmi ces éléments (Fe, Mg, Ni, etc.), le fer est particulièrement important à très faible concentration, car il entre dans la composition des hydrogénases et des ferrédoxines, mais il devient cependant inhibiteur à trop haute concentration (Chong *et al.*, 2009a; Eroglu *et al.*, 2011; Karadag et Puhakka, 2010; Sinha et Pandey, 2011).

Enfin, en cas de culture à pH libre ou non contrôlé, le milieu peut être additionné d’un tampon pH qui limitera la chute du pH lors de la production d’acides organiques au cours de la fermentation. Le choix du tampon se fera en fonction du  $pK_a$  du couple acide-base et du pH auquel la culture doit être adaptée. À ce titre, les phosphates sont particulièrement adaptés et pourraient aussi tenir un rôle métabolique important (Chen *et al.*, 2005; He *et al.*, 2004).

### **5.1.6. L’hydrogène**

Au regard des équations équilibrées qui aboutissent à la formation d’hydrogène par les hydrogénases, il apparaît que cette production est inhibée par son propre produit (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2007b). Lors de la fermentation, l’hydrogène est produit sous forme dissoute dans le milieu et transporté dans celui-ci. Or, il est très peu soluble et aura donc tendance à être transféré, plus ou moins rapidement selon les conditions de mélange, du milieu vers la phase gazeuse où il pourra être récolté et utilisé à des fins énergétiques (pile à combustible, cogénération, etc.).

À l’équilibre, la relation entre la concentration d’un gaz en phase gazeuse (pression partielle  $p_i$ ) et sa concentration sous forme dissoute ( $C_i$ ) est donnée par la loi de Henry, par l’intermédiaire de la constante de Henry ( $H_e$ ) qui caractérise la solubilité d’un gaz dans un liquide (équation 19). Cette constante vaut  $7.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$  à 25°C. Dans, les milieux riches en éléments organiques (AGV, sucres, alcools), ces substances peuvent influencer la solubilité de l’hydrogène.

Loi de Henry :

$$C_i = H_e \cdot P_i \quad (I - 19)$$

L’influence principale de l’hydrogène dissout est exercée sur la voie de la NFOR qui est intimement liée à la proportion relative NADH/NAD<sup>+</sup>. Ainsi, au-delà de 60 Pa d’hydrogène dissout à l’équilibre, cette voie de production devient fortement inhibée et désavantageuse. Les autres voies de production souffrent également de l’augmentation de l’hydrogène dissout, mais dans une moindre mesure (Clark *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2006; Kraemer et Bagley, 2007; Nath et Das, 2004b).

Cet effet est d’autant plus marqué que la production d’hydrogène dissout dans le milieu doit être accompagnée par un transfert liquide-gaz suffisant afin de maintenir les équilibres et satisfaire à la loi de Henry. Dans le cas contraire, une accumulation de l’hydrogène en solution peut survenir pour sursaturer le milieu (Pauss *et al.*, 1990). L’étude du transfert de l’hydrogène requiert donc une attention particulière lors du design du bioréacteur utilisé (Arslan *et al.*, 2012).



### **5.1.7. Les substances inhibitrices**

L’oxygène est, bien entendu, le premier des éléments inhibant la production d’hydrogène. Sa présence dans le milieu peut être limitée par l’introduction d’anaérobies facultatives qui vont consommer en priorité l’oxygène et permettre aux anaérobies strictes de produire l’hydrogène efficacement. L’ajout de cystéine est également intéressant comme consommateur de l’oxygène (Yuan *et al.*, 2008).

Les acides organiques produits en solution peuvent également avoir un effet inhibiteur à haute concentration, outre l’abaissement du pH. En effet, leur présence influence les équilibres métaboliques. Cependant, un taux de dilution du milieu approprié et un ajustement des concentrations des substrats alimentés dans les réacteurs permettent de limiter la quantité de substrats dans le milieu et de limiter facilement ces influences inhibitrices (Arslan *et al.*, 2012; Baghchehsaraee *et al.*, 2009; Castro-Villalobos *et al.*, 2012; Infantes *et al.*, 2011; Khanal *et al.*, 2004).

Les métaux lourds deviennent toxiques pour les bactéries à des concentrations relativement faibles, de l’ordre de quelques dizaines de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . La toxicité des métaux peut être classée dans l’ordre décroissant  $\text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr}$  (Devi *et al.*, 2010; Li et Fang, 2007b; Lin et Shei, 2008). Les sulfates peuvent également être des éléments inhibiteurs de la production d’hydrogène (Chen *et al.*, 2008a).

## **5.2. Conception du bioréacteur**

Les bioréacteurs utilisés pour la production d’hydrogène peuvent être classés selon les conditions hydrodynamiques et d’enrichissement bactérien qui y sont appliquées. On distinguera essentiellement les cuves agitées des bioréacteurs à biomasse fixée (Jung *et al.*, 2011). Les premiers bioréacteurs sont simples d’utilisation et peuvent être alimentés de différentes manières (batch, fed-batch ou continu), mais les performances et capacités de traitement y sont limitées en raison notamment du risque de lessivage de la biomasse. Les seconds sont plus élaborés et difficiles de fonctionnement en raison de la formation de zones mortes inhomogènes, mais ils permettent une maximisation des capacités de traitement grâce au découplage des temps de rétention

hydraulique et solide (Hafez *et al.*, 2009; Obazu *et al.*, 2012; Show *et al.*, 2008).

### **5.2.1. Mode d’alimentation et HRT**

Les cultures batch (discontinues) sont largement répandues afin de mesurer le BHP (pour *Biological Hydrogen Potential*), notamment en petits volumes (quelques dizaines ou centaines de mL). Elles permettent de tester et de comparer de nombreuses conditions en peu de temps. Cependant, le pH n’y est pas nécessairement régulé et rend de ce fait indispensable l’utilisation d’un tampon (Hiligsmann *et al.*, 2011). Dès lors, en plus grand volume de bioréacteur, l’alimentation en fed-batch (ou AnSBR pour *Anaerobic Sequenced-Batch Reactor*) permet d’envisager une étape de retrait/ajout de milieu usagé/frais afin de continuer la production d’hydrogène et d’étudier, par exemple, le changement de condition d’une séquence à l’autre, l’évolution microbiologique ou encore le maintien de la production d’hydrogène sur le moyen ou long terme. L’utilisation de réacteurs plus sophistiqués peut également être envisagée, permettant ainsi différentes configurations, agitations, régulations pH, etc. Par ailleurs, la fréquence et le volume des étapes de retraits/ajouts permettent une première approche de l’effet du temps de rétention hydraulique (HRT), paramètre essentiel dans les cultures continues afin de définir les capacités de traitement en relation avec l’efficacité de la production d’hydrogène (Arooj *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Cheong *et al.*, 2007).

Du point de vue de l’évolution vers une plus grande échelle, l’alimentation en continu est très avantageuse puisqu’elle permet d’éviter les étapes de retrait/ajout de milieu et d’augmenter les capacités de traitements. Cependant, les réacteurs classiques à cuves agitées (CSTR pour *Continuously Stirred Tank Reactor*) souffrent rapidement de problèmes de lessivage de la biomasse qui peine à se maintenir dans la cuve (Chang *et al.*, 2008b; Chu *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010). Dès lors, des moyens d’immobilisation de la biomasse sont envisagés, soit par la mise en place de géométries tout à fait différentes, soit par l’introduction, dans la cuve agitée, de supports favorisant la formation de biofilms, tels que des billes poreuses (Barros *et al.*, 2010; Yokoi *et al.*, 1997). Par ailleurs, lorsque les conditions sont adaptées (pas

d’agitation trop importante), certaines souches comme les *Clostridium* peuvent former des agglomérats (flocs) pouvant être retenus plus facilement dans le réacteur. Les réacteurs parfaitement agités ont l’avantage d’être faciles à opérer puisque les paramètres de culture sont bien maîtrisés en raison de l’homogénéité du milieu (Aceves-Lara *et al.*, 2010; Babu *et al.*, 2009).

L’alimentation en continu a également l’avantage de limiter le risque de prolifération d’organismes méthanogènes, ceux-ci ayant une croissance moins rapide que les acidogènes et ayant donc tendance à être lessivés en premier du bioréacteur. Par ailleurs, l’alimentation en continu a un effet de dilution qui permet d’éviter les chocs de changements de milieu (en conditions stationnaires) et d’éviter les inhibitions dues aux hautes concentrations en métabolites (Wang *et al.*, 2010).

### **5.2.2. Immobilisation de la biomasse**

Pour atteindre de hautes capacités de traitement et de vitesse de production d’hydrogène, le taux de dilution doit être augmenté, réduisant le HRT et pouvant mener au lessivage de la biomasse. Dès lors, d’autres types de bioréacteurs que le CSTR ont été utilisés afin de concentrer la biomasse dans le réacteur et, de ce fait, découpler le temps de rétention hydraulique et le temps de rétention de la biomasse.

Un premier moyen permettant ce découplage est l’utilisation du CSTR avec une membrane permettant de retenir la biomasse. Ce type de procédé est néanmoins limité dans la concentration cellulaire par des phénomènes de colonisation de la membrane ayant tendance à colmater celle-ci.

On distingue ensuite les bioréacteurs à culture suspendue formant des agglomérats microbiologiques qui peuvent se maintenir plus longtemps dans les bioréacteurs selon la configuration mise en place. C’est le cas dans les bioréacteurs à lit fixe ou lit fluidisé (respectivement AFBR pour *Anaerobic Fixed-Bed Reactor* ou UASBr pour *Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor*) dont le flux liquide met en suspension la biomasse (Figure 10). Ces bioréacteurs ont été largement étudiés dans le cadre de la méthanisation. Les concentrations cellulaires peuvent atteindre plusieurs dizaines de  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ils atteignent de très bonnes performances de production d’hydrogène mais

souffrent d’un manque d’homogénéité qui engendre le risque de développement de zones mortes et de plusieurs populations microbiennes, dont les microorganismes consommateurs d’hydrogène (Castello *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2002; Gavala *et al.*, 2006; Obazu *et al.*, 2012). Ces géométries permettent néanmoins d’installer aisément des supports permettant le développement de biofilms afin de pouvoir encore augmenter les taux de dilution. Cependant, les écoulements hydrodynamiques des liquides ne sont toujours pas parfaitement maîtrisés au sein de ces bioréacteurs (Fritsch *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2003).

Enfin, des conceptions plus originales de bioréacteurs à lits arrosés existent, permettant une maximisation de l’aire interfaciale et l’amélioration du transfert de l’hydrogène en même temps qu’une fixation de la biomasse (Ahn *et al.*, 2005; Arriaga *et al.*, 2011).

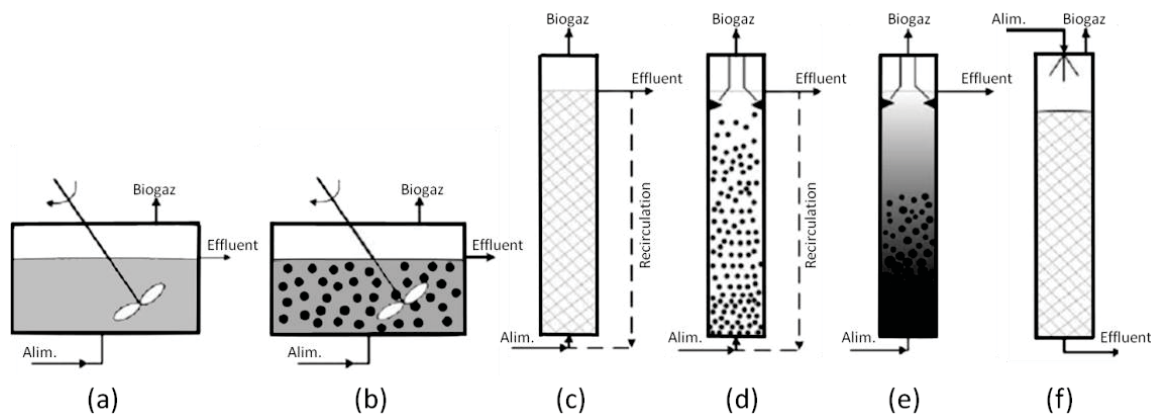


Figure I - 10 : Différentes configurations de réacteurs anaérobies continus. (a) : réacteur continu à cuve parfaitement mélangée (CSTR) ; (b) : réacteur continu à cuve parfaitement mélangée et support d’immobilisation, (c) : réacteur vertical à lit fixe (UAFB) ; (d) et (e) : réacteur à lit fluidisé (UASBr), avec ou sans recirculation ; (f) : réacteur à lit arrosé.

### 5.2.3. Transfert d’hydrogène

L’hydrogène étant un gaz très peu soluble, sa concentration dissoute est très faible à l’équilibre défini par la loi de Henry. Cependant, lorsque les conditions de mélange du milieu ne sont pas suffisamment importantes, il peut s’accumuler dans la phase liquide et sursaturer le milieu de près de 20 à 30 fois la concentration d’équilibre (Kraemer et Bagley, 2006; Pauss *et al.*, 1990). Cette sursaturation inhibe la production d’hydrogène et amène la bactérie à modifier les voies métaboliques qu’elle utilise. Un objectif de la

conception de bioréacteur sera donc d’améliorer la manière dont le gaz est naturellement transféré depuis la phase liquide vers la phase gazeuse.

Le transfert liquide-gaz peut être schématisé selon la Figure 11, présentant les concentrations ou pressions partielles au sein du liquide et à proximité de l’interface liquide-gaz. Les lois issues du génie chimique identifient la principale résistance au transfert du côté liquide ( $P_i \approx P_G$ ), aboutissant à l’équation 20 dans laquelle on retrouve la constante de Henry (He), un coefficient de transfert liquide du côté liquide ( $k_L a$ ) et les pressions partielles en hydrogène dans le gaz ( $P_G$ ) et dans le liquide ( $P_G^\circ$ , pression partielle équivalente à la concentration liquide à l’équilibre, calculée par l’intermédiaire de l’équation de Henry (19)).

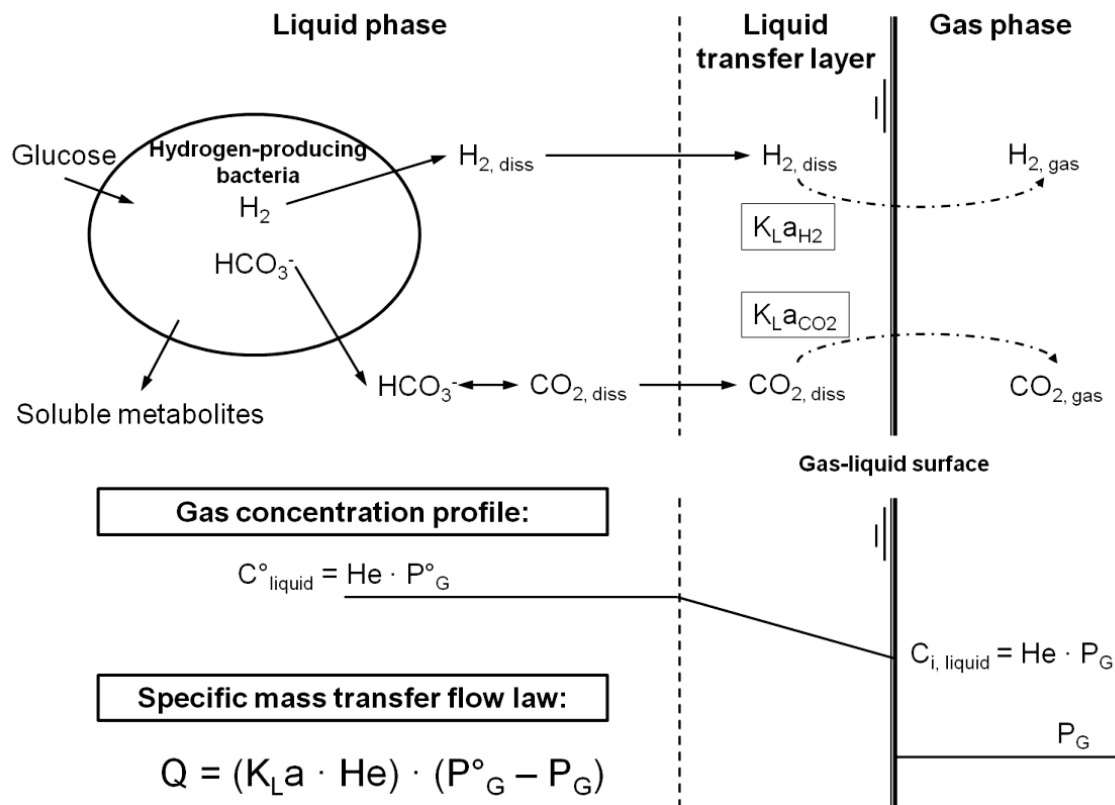


Figure I - 11 : Schéma de transfert de l’hydrogène produit en solution par la bactérie vers la phase gazeuse au travers de la couche de transfert du côté liquide, dans laquelle la concentration en hydrogène dissout évolue, depuis la concentration du liquide jusqu’à la concentration d’interface, à l’équilibre avec la pression partielle par l’intermédiaire de la loi de Henry.

Transfert de gaz depuis la phase liquide vers la phase gazeuse :

$$Q = (k_L a \cdot He) \cdot (P_G^\circ - P_G) \quad (I - 20)$$

Dès lors, un moyen efficace pour éviter les sursaturations et la concentration en hydrogène dissout est d’augmenter le  $k_La$  (Mandal *et al.*, 2006). Ce paramètre dépend des conditions de mélange du milieu et de la surface spécifique à l’interface gaz-liquide. Plusieurs méthodes ont été envisagées comme, par exemple, l’augmentation de l’agitation, ce qui est facilement réalisé dans les réacteurs à cuves agitées (Clark *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Kraemer et Bagley, 2007). Plusieurs auteurs ont également étudié l’influence d’un dégazage avec un gaz inerte mais, bien que cette méthode améliore la production d’hydrogène, l’hydrogène extrait est fortement dilué dans le gaz inerte, ce qui limite son utilisation à des fins énergétiques par la suite (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012; Massanet-Nicolau *et al.*, 2010; Mizuno *et al.*, 2000; Nath et Das, 2004b). Dès lors, l’utilisation de réacteurs à grande surface d’échange, maximisant l’interface liquide-gaz, a été quelque peu étudiée récemment (Arriaga *et al.*, 2011).

#### **5.2.4. Gestion du procédé sur le long terme**

La possibilité de produire de l’hydrogène sur de longues périodes est un point incontournable pour envisager le scale-up du procédé à l’échelle industrielle. Par ailleurs, il faut pouvoir assurer les performances, notamment au regard du risque de développement de communautés de microorganismes qui les réduisent (Koskinen *et al.*, 2007; Vatsala *et al.*, 2008). Il faut également pouvoir maintenir à moindre frais l’anaérobiose dans le milieu. Pour ce faire, l’utilisation de souches anaérobies facultatives peut être d’un grand secours (Yokoi *et al.*, 1998).

À défaut, des stratégies de redémarrage rapide du bioréacteur peuvent être envisagées par enrichissement des microorganismes producteurs d’hydrogène, soit par traitement de la biomasse (chaleur, acide ou base, chimique, etc.) soit par ajout d’un inoculum de culture pure (Baghchehsaraee *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010).

### **5.3. Biologie moléculaire appliquée à la fermentation anaérobie**

L’utilisation d’outils de biologie moléculaire dans le domaine de la dark fermentation permet d’entrevoir une meilleure compréhension des mécanismes

biochimiques mis en jeu dans la cellule pour la production d’hydrogène. Récemment, de nombreux progrès ont été réalisés dans l’information disponible au niveau du contenu génomique des souches productrices. Le développement d’outils moléculaires et d’ingénierie métabolique permettent d’envisager l’amélioration, les productivités et rendements de la production d’hydrogène (Abo-Hashesh *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2011).

Afin de pouvoir suivre et analyser les microorganismes présents dans les cultures mixtes ou consortia synthétiques, les outils qualitatifs, tels que la DGGE (pour *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), permettent la caractérisation aisée des microorganismes en présence. Leur distribution dans l’espace des souches. Par ailleurs, le développement de méthodes quantitatives peut-être aidée de techniques de coloration tel que la FISH. Enfin, les analyses quantitatives, telles que la qPCR et RT-qPCR, sont utilisées en ciblant l’expression d’enzymes spécifiques, particulièrement les hydrogénases qui jouent un rôle dans la production d’hydrogène (Calusinska *et al.*, 2009; Tolvanen *et al.*, 2008).

En outre, une attention particulière est portée à l’ingénierie métabolique afin de pouvoir orienter directement le métabolisme vers la production d’hydrogène plutôt que vers les voies défavorables. Cependant, au vu de la diversité des voies métaboliques associées aux différents microorganismes, ces méthodes s’avèrent souvent très spécifiques mais apportent néanmoins d’importantes informations quant aux mécanismes de fermentation. Ainsi, la surexpression d’enzymes natives et/ou la redirection des flux de carbone et d’électrons éliminant les voies métaboliques compétitives à la production d’hydrogène (formation de lactate, d’éthanol, etc.) ont été investiguées (Mathews et Wang, 2009; Morimoto *et al.*, 2005). La possibilité d’incorporer, dans un microorganisme, des voies métaboliques non natives est aussi une piste envisagée, notamment autour de la souche *E. Coli* qui est, de loin, une des plus étudiées et des mieux connues dans ce domaine. Enfin, certains auteurs envisagent la modification génétique d’hydrogénases rendant ces dernières tolérantes et compatibles avec la présence d’oxygène, notamment dans le cadre de la biophotolyse (Akhtar et Jones, 2008; Barton *et al.*, 2010; Mertens et Liese, 2004).





## **6. Objectifs de la thèse et structure du travail**

---

La production d’hydrogène par fermentation anaérobie est un sujet d’investigation riche et vaste. Il est étudié par de nombreux scientifiques depuis le début des années 90 ainsi que le montre la riche revue bibliographique réalisée jusqu’ici.

À terme, la technologie est très certainement assurée de jouer un rôle dans la structure énergétique du futur. Cependant, elle n’a pas encore atteint une maturité suffisante pour pouvoir être dès à présent protégée à l’échelle industrielle. Les plans de structures énergétiques dressés par l’UE ou le DOE (USA) prévoient l’émergence du biohydrogène à l’horizon 2030 (pour le photo-hydrogène) et à l’horizon 2050 pour le biohydrogène par dark fermentation.

En effet, si la technologie était applicable en condénant les connaissances théoriques et pratiques développées jusqu’à présent (ce qui sera, d’un point de vue économique et environnemental, probablement le cas avant 2050), la structure énergétique n’est pas encore apte à intégrer les procédés alternatifs de production d’hydrogène. La première étape est donc invariablement la construction de la société hydrogène, qui ne pourra s’établir que par le développement simultané des moyens de production, d’un réseau de distribution et de la demande créée par les utilisateurs (par exemple, via les piles à combustibles pour la cogénération ou le secteur des transports). Cela impliquera également une sensibilisation à l’utilisation de l’hydrogène qui reste considéré, dans la conscience collective, comme un gaz trop dangereux.

Dès lors qu’une structure sera prête à recevoir toute production d’hydrogène et à en diversifier la source ou à permettre une délocalisation des lieux de production afin de les rendre plus proches des utilisateurs, alors la production de biohydrogène sera réellement envisageable. Cependant, elle ne pourra l’être qu’à la condition d’améliorer les performances de production d’hydrogène actuellement atteintes à l’échelle du laboratoire, c’est-à-dire, *in fine*, de rendre le procédé économiquement viable. Cette thèse s’inscrit dans cette démarche en proposant des pistes d’amélioration et d’optimisation de la production d’hydrogène.

Au CWBI, la production d’hydrogène par voie microbiologique a été approchée depuis le début des années 2000 et les travaux ont permis, entre autres, de sélectionner des souches anaérobies strictes et facultatives productrices d’hydrogène, de définir la composition des milieux riches dont la source de carbone est le substrat limitant, de caractériser les performances de production dans différentes conditions et de mettre au point les méthodes de mesures rapides (cultures batch en petit volume) ou (semi-) continues (cultures fed-batch ou continues en bioréacteurs). Ces études ont été réalisées en phase avec les avancements de la littérature scientifiques. Ce travail de thèse s’inscrit dans la continuité des travaux réalisés antérieurement au CWBI afin d’avancer, du point de vue microbiologique, vers l’application pratique de la production d’hydrogène à plus grande échelle. En outre, ce travail a été mené en parallèle avec les thèses de Serge Hiligsmann (2012), Christopher Hamilton (2012), Magdalena Calusinska (2012) et Julien Masset (en cours), ainsi qu’en association avec les laboratoires universitaires du CIP (Prof. Bernard Joris), LPBP (Prof. Fabrice Franck), LAG (Prof. Claire Remacle) dans le cadre de l’Action de Recherche Concertée nommée MicroH<sub>2</sub> et financée par la Communauté Wallonie-Bruxelles (ARC-07/12-04).

L’objectif de ce travail est de proposer des pistes afin de faire évoluer le procédé de production d’hydrogène par fermentation anaérobie vers une plus grande échelle. Pour ce faire, le procédé a été envisagé dans son ensemble sur base des techniques acquises antérieurement au laboratoire. Outre l’amélioration des rendements de production et des productivités, d’autres axes de recherche, tels que la diversification des substrats, la réduction des coûts des milieux liquides, le passage en cultures mixtes plutôt qu’en monocultures, la compréhension fondamentale de l’influence de l’agitation et du transfert gazeux, le design de bioréacteurs originaux et la compréhension de leurs performances ont été étudiés. Ces thèmes de recherches seront regroupés dans les trois sections suivantes :

- Parmi les paramètres conditionnant l’application de la fermentation anaérobie à plus grande échelle, la diversification des substrats, la réduction des coûts du milieu et le travail en culture mixte seront abordés dans un premier temps (dans la section 2 de cette thèse). Le chapitre II abordera la production d’hydrogène à partir de plusieurs

substrats par une souche anaérobie stricte et facultative, en cultures pures et en co-cultures. Le chapitre III se penchera sur le passage d’une culture pure de la souche *Clostridium butyricum* à une culture mixte contaminée par des microorganismes non-producteurs d’hydrogène afin d’observer l’évolution des performances en bioréacteurs menée sur plusieurs semaines.

- Ensuite, la 3<sup>ème</sup> section se penchera sur l’étude du transfert massique de l’hydrogène et sur les moyens d’augmenter ce transfert afin de limiter la concentration en hydrogène dissout et d’observer les effets sur les performances de production. Dans le chapitre IV, une étude fondamentale permettra de confirmer ce modèle et de quantifier l’augmentation des performances. Ensuite, ce modèle sera appliqué à un réacteur au design original, appelé réacteur anaérobie à biodisque (AnBdR), dans les chapitres V et VI. Les performances de production à moyen et long terme seront notamment suivies.
- La dernière partie des résultats (4<sup>ème</sup> section) portera sur l’interaction mise en évidence entre des particules métalliques et les bactéries productrices d’hydrogène afin d’améliorer la cinétique de production d’hydrogène (chapitre VII).

Ces résultats, qui vont être développés et discutés dans les prochains chapitres, seront ensuite synthétisés et comparés aux développements proposés dans la littérature scientifique. Plusieurs propositions d’intégration du bioprocédé seront réalisées afin de suggérer des perspectives de recherches futures qui permettront à l’aboutissement d’une production d’hydrogène à grande échelle. Ces développements feront l’objet de la 5<sup>ème</sup> section du manuscrit.



## **2<sup>ème</sup> section – Production d'hydrogène en cultures mixtes**



**Chapitre II – Production d’hydrogène par fermentation anaérobie en cultures pures et cultures mixtes de *Clostridium butyricum* CWBI1009 et *Citrobacter freundii* CWBI952**





# **Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures**

Laurent Beckers <sup>°</sup>, Serge Hiligsmann <sup>°</sup>, Christopher Hamilton <sup>°</sup>, Julien Masset <sup>°</sup>, Philippe Thonart <sup>°</sup>

Article publié dans *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* (2010), **14**(S2), 541 - 548.

<sup>°</sup> Walloon Centre of Industrial Biology, Bd du Rectorat, 29, B.40 – P.70 B-4000 Liège, BELGIUM;

## **Préface**

---

Parmi les souches permettant d'atteindre à la fois de bons rendements et de bonnes productivités dans les gammes de température mésophile, les bactéries du genre *Clostridium* sont les plus souvent citées dans la littérature. En particulier, la souche *Clostridium butyricum* CWBI1009, étudiée au cours de ces travaux de thèse, s'est avérée être particulièrement performante et intéressante. En effet, elle produit l'hydrogène à de hautes productivités, de bons rendements et elle se conserve aisément en raison de ses capacités de sporulation (Masset *et al.*, 2010). Cependant, elle est extrêmement sensible à l'oxygène qui empêche sa croissance et elle est, par ailleurs, incapable de le consommer afin de créer elle-même les conditions d'anaérobioses nécessaires pour la production d'hydrogène. Dès lors, l'ajout de L-cystéine est rendu nécessaire afin d'assurer ces conditions dans le milieu.

Afin d'envisager la production d'hydrogène à plus large échelle, il faut envisager à la fois la maximisation des performances de production d'hydrogène et la limitation des coûts de production, en utilisant un milieu peu cher. Dans le milieu MDT, couramment utilisé au CWBI pour les fermentations anaérobies, on peut distinguer les composés coûteux tels que la source d'azote (peptone de caséine et extrait de levure), la source de carbone

(glucose monohydrate), la cystéine et, dans une moindre mesure, les sels formant le tampon pH. Les trois premiers composés constituent donc le principal facteur de coût des milieux MDT.

L'utilisation de différentes sources d'azote moins coûteuses (azote minéral plutôt qu'organique) a été l'objet du travail de thèse mené au CWBI par Hamilton (2012). Ce travail a démontré que, d'une part, la forte réduction de concentration en peptone de caséine menait à de meilleures performances, et, d'autre part, que l'utilisation d'azote minéral (ammoniacal) était envisageable. Dès lors, l'utilisation de la source d'azote ne sera pas abordée dans ce chapitre.

La source de carbone étant également la principale source d'énergie pour la bactérie, lui permettant de croître et de produire de l'hydrogène, elle est nécessaire dans le milieu. Cependant, l'utilisation de sources de carbone à faible coût, voire à coût négatif (comme lorsque les sucres constituent un déchet à épurer des eaux usées), est une des voies permettant d'envisager la production de biohydrogène à grande échelle. Dans cette optique, ce chapitre se penchera sur les capacités des souches productrices d'hydrogène à utiliser d'autres sources de carbones que le glucose. À terme, l'objectif serait d'envisager la création d'une eau usée synthétique afin d'en tester les performances pour, finalement, aboutir à l'utilisation d'eaux usées industrielles, dont les compositions peuvent fortement varier selon les activités de l'industrie.

Enfin, la cystéine représente un coût important (de l'ordre de 0.5€ par litre de milieu à 0.5 g·L<sup>-1</sup>), ce qui, à grande échelle, représente un montant inacceptable. Cependant, la consommation de l'oxygène résiduel du milieu est nécessaire afin de garantir la croissance de *Clostridium butyricum*. Dès lors, plutôt que l'utilisation de cystéine, l'emploi de souches consommatrices d'oxygène est envisagé dans ce chapitre. Le choix s'est naturellement porté vers une souche productrice d'hydrogène anaérobie facultative, telle que *Citrobacter freundii*, qui, bien que moins performante que *Clostridium butyricum*, avait déjà été cultivée au laboratoire. L'emploi des deux souches en consortium a été envisagé afin d'approcher la viabilité des deux souches et les performances de production d'hydrogène atteintes.

## Abstract

---

This paper investigates the biohydrogen production by two mesophilic strains, a strict anaerobe (*Clostridium butyricum* CWBI1009) and a facultative anaerobe (*Citrobacter freundii* CWBI952). They were cultured in pure and mixed cultures in serum bottles with five different carbon sources. The hydrogen yields of pure *C. freundii* cultures ranged from 0.09 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> (with sucrose) to 0.24 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> (with glucose). Higher yields were obtained by the pure cultures of *Cl. butyricum* ranging from 0.44 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> (with sucrose) to 0.69 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> (with lactose). This strain also fermented starch whereas *C. freundii* did not. However, it consumed the other substrates faster and produced hydrogen earlier than *Cl. butyricum*. This ability has been used to promote the growth conditions of *Cl. butyricum* in co-culture with *C. freundii*, since *Cl. butyricum* is extremely sensitive to the presence of oxygen which strongly inhibits H<sub>2</sub> production. This approach could avoid the addition of any expensive reducing agents in the culture media such as L-cysteine since *C. freundii* consumes the residual oxygen. Thereafter, co-cultures with glucose and starch were investigated: hydrogen yields decreased from 0.53 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> for pure *Cl. butyricum* cultures to 0.38 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> for mixed culture with glucose but slightly increased with starch (respectively 0.69 and 0.73 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup>). After 48 hours of fermentation, metabolites analysis confirmed with microbial observation, revealed that the cell concentration of *C. freundii* dramatically decrease or was strongly inhibited by the development of *Cl. butyricum*.

### Keywords:

Biohydrogen; *Clostridium butyricum*; *Citrobacter freundii*; mixed culture; biochemical hydrogen potential; batch; substrate

## 1. Introduction

---

Hydrogen (H<sub>2</sub>), whether burned or used directly in a fuel cell, is a very promising clean energy vector for the decrease of our environmental impact since its utilization generates only water vapor. Nevertheless, H<sub>2</sub> is still mainly produced by steam reforming of methane, a process releasing large amount of fossil CO<sub>2</sub> in the atmosphere. In the last few years, there has been an increasing interest to find new H<sub>2</sub> production processes with almost no carbon emission (Balat, 2009b; Holladay *et al.*, 2009; Moriarty et Honnery, 2009). One of the most promising and investigated prospects is the biological production of hydrogen through the degradation of a large spectrum of carbon sources by anaerobic bacteria in a process called “dark fermentation” (Das, 2009; Das et Veziroglu, 2001; Hallenbeck, 2009; Levin *et al.*, 2004; Nath et Das, 2004a).

The best described mesophilic strains are, on the one hand, strict anaerobic bacteria from the genus *Clostridium* that have the potential to reach high experimental hydrogen yields (about two moles of hydrogen per mole of hexose consumed). And on the other hand, facultative anaerobes such as *Enterobacteriaceae* that present lower experimental yields ( $\sim 1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ ) but can achieve higher production rates (Hallenbeck et Benemann, 2002; Hawkes *et al.*, 2002; Kotay et Das, 2008). The main purpose to enhance fermentative hydrogen production is to improve hydrogen yields for an efficient energy recovery from the substrate. The two species investigated in this work, *Clostridium butyricum* CWBI1009 (Masset *et al.*, 2010) and *Citrobacter freundii* CWBI952 (Hamilton *et al.*, 2010), have a maximum theoretical hydrogen yield of 4 and 2  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  respectively depending on the metabolic pathway followed for the fermentation of the carbon source (Kraemer et Bagley, 2007; Nandi et Sengupta, 1998; Nath et Das, 2004b; Oh *et al.*, 2008a).

Clostridia are however extremely sensitive to the presence of oxygen which strongly inhibits H<sub>2</sub> evolving enzymes (Heinekey, 2009). This can be avoided with the addition of an expensive reducing agent such as L-cysteine. However, the use of such an agent is not suitable for a large-scale cost effective biohydrogen production process (Das et Veziroglu, 2008; Yuan *et al.*, 2008).

Hydrogen may evolve through the fermentation processes of simple carbohydrates such as glucose, sucrose, lactose and maltose or more complex ones such as starch or even cellulose (Davila-Vazquez *et al.*, 2008; Magnusson *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 1995). Only a few studies have investigated the hydrogen production with these different substrates on pure cultures in comparison with co-cultures (Chen *et al.*, 2008c; Nath *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008; Yokoi *et al.*, 1995). This is why this work compares the hydrogen and major metabolites production (*i.e.* acetate, butyrate, formate, lactate, ethanol and succinate) in pure *C. freundii* and *Cl. butyricum* cultures with five different substrates. These experiments were carried out in serum bottles batch cultures based on the biochemical hydrogen potential (BHP) test procedure described by Lin *et al.* (2007).

Furthermore, a co-culture of *C. freundii* and *Cl. butyricum* in the same BHP culture may enhance hydrogen production. Such a culture wouldn't require the addition of any reducing agents since *C. freundii* consumes oxygen and provides the anaerobic conditions required for *Cl. butyricum* growth. This has already been shown in a mixed culture of *Enterobacter sp.* and *Cl. butyricum* growing on starch (Yokoi *et al.*, 2002; Yokoi *et al.*, 1998). However, little is known about this consortium on other substrates. In this work, co-cultures were monitored on glucose and also on starch for comparison. They are discussed in comparison with the results found in the literature.

## 2. Material and methods

---

### 2.1. Microorganisms conservation and preculture media

The two species cultured in this work, *i.e.* *Citrobacter freundii* CWBI952 and *Clostridium butyricum* CWBI1009 were previously isolated and characterized in our laboratory (Hamilton *et al.*, 2010; Masset *et al.*, 2010). For the conservation of the strains, 1 ml of a previous 25 ml of culture, hermetically stoppered and incubated at 30 °C, was transferred weekly to a fresh tube filled with sterile MD medium. The MD medium contained per liter of deionized water: glucose monohydrate (5 g), casein peptone (5 g), yeast extract (0.5 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 g) and L-cysteine hydrochloride (0.5 g). 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).

### 2.2. Experimental procedures and culture media

The BHP (Biochemical Hydrogen Potential) tests were carried out in 270 ml sterile glass serum bottles filled with 200 ml of MD medium and different carbon sources in order to determine the hydrogen production potential of the strains. The sterile carbon source (*i.e.* glucose monohydrate, maltose, sucrose, lactose or starch in solution in deionized water) were prepared and added separately at a final concentration of  $4.3 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{l}^{-1}$  to prevent the Maillard reactions between carbohydrates and amino acids. The same approach was followed with L-cysteine hydrochloride to a final concentration of  $0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . The effective final substrate concentration was measured by HPLC. Differences between the initial concentrations of the carbon sources ranged from 3.9 to  $4.8 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{l}^{-1}$ , due to hydration of the compounds. After the preparation of the MD medium and adjustment of the pH to 7.3 the bottles were sterilized. The carbon source and L-cysteine solution were then added before inoculation of the medium with 5 ml of a fresh preculture tube (incubated for 48 hours) for the pure strains cultures and with 3 ml of each strain for the mixed cultures. The bottles were then capped with a butyl stopper as described by Lin *et al.* (2007) and flushed with nitrogen gas to remove the remaining oxygen in the

bottle gas phase. The bottles were then incubated at  $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  with an orbital stirring at 150 rpm. Each BHP test was conducted in triplicate for the standard deviation estimations.

### **2.3. Analytical methods**

The cell concentration of *C. freundii* was determined by consecutive dilutions in peptoned water. A 100  $\mu\text{l}$  sample of the three final dilutions was spread on PCA Petri dishes before incubation at  $30^{\circ}\text{C}$  for 18 to 24 hours. This method was also used to confirm the absence of other microorganisms than *C. freundii*. The PCA (Plate Count Agar) medium, contained per liter of deionized water: glucose monohydrate (1 g), casein peptone (5 g), yeast extract (2.5 g), agar (15 g). The cell concentration of *Cl. butyricum* or of the mixed culture were 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. The absence of aerobic contaminants was verified by spreading 100  $\mu\text{l}$  of the culture on PCA medium plates and incubating for 48 hours at  $30^{\circ}\text{C}$ . The absence of bacterial growth confirmed the absence of aerobic contaminants.

The volume of biogas produced was measured with a sterile syringe and needle introduced through the previously sterilized septum. 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  $90^{\circ}$ ,  $110^{\circ}$  and  $55^{\circ}\text{C}$  respectively. Nitrogen was used as the carrier gas in the column at a flow rate of  $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

The liquid samples harvested during or at the end of the fermentations (ca. from 48 to 96 hours) were centrifuged at 13000 g for 10 min. The obtained supernatants were then filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane (Minisart Sartorius) and analyzed by HPLC. The HPLC analysis was carried out using an Agilent 1100 series (HP Chemstation software) with a Supelcogel C-610H column preceded by a Supelguard H pre-column (oven temperature  $40^{\circ}\text{C}$ ), 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (in milliQ water) as the isocratic mobile phase at a flow

ate of  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  and a differential refraction index detector (RID, heated at  $35^\circ\text{C}$ ). The method lasted for 35 min at a maximum pressure of 60 bars. The concentrations of the compounds in the samples are determined in comparison with standard samples analyzed for the establishment of calibration curves. The data for the glucose (or any other carbon source) and metabolite concentrations were used to calculate the mass balance (MB) of the glucose conversion using the equation:

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

Where  $N_i$  is the number of carbon atoms in a molecule of metabolite  $i$ ;  $\Delta C_i$  is the concentration of metabolite  $i$  effectively produced (*i.e.* the difference between the final and initial concentrations);  $N_G$  is the number of carbon atoms in the substrate molecule (*i.e.* 6) and  $\Delta C_G$  is the concentration of the glucose consumed (Eq.(1)).



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 and *Clostridium butyricum* CWBI1009 using five different substrates.

The investigation of hydrogen and metabolites production with five different substrates (glucose, maltose, sucrose, lactose and starch) was first carried out with pure cultures of *Citrobacter freundii* CWBI952 and *Clostridium butyricum* CWBI1009 in 270 ml batch serum bottles. Cell concentrations in the serum bottles at the beginning of the fermentation were of  $4.3 \cdot 10^{+07}$  and  $1.2 \cdot 10^{+07}$  CFU·ml<sup>-1</sup> respectively. The hydrogen production performances were compared in terms of hydrogen yields allowing a firm basis for a comparison of the two strains. The cumulative volumes of hydrogen produced and the hydrogen yields are reported in the Table 1 along with the substrate conversion ratios and the final cell concentrations (48 hours after inoculation),

Table II - 1 : Substrate conversion ratio, final hydrogen production, hydrogen yield and cell concentration in 270 ml batch culture with five different substrates during 48 hours.

		Substrate conversion ratio	Hydrogen production (ml)	Hydrogen yield (mol <sub>H<sub>2</sub></sub> ·mol <sub>hexose</sub> <sup>-1</sup> )	Final cell concentration (CFU·ml <sup>-1</sup> )
<i>Citrobacter freundii</i> CWBI952	Glucose	98.2%	46.1±5.7	0.24±0.03	1.0·10 <sup>+09</sup>
	Maltose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Sucrose	92.5%	19±2.8	0.10±0.02	1.3·10 <sup>+09</sup>
	Lactose	99.4%	35.3±7.2	0.18±0.04	5.4·10 <sup>+08</sup>
	Starch	0	0	N.D. (0)	3.3·10 <sup>+08</sup>
<i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009	Glucose	89.3%	95.9±2.0	0.58±0.01	2.6·10 <sup>+08</sup>
	Maltose	97.2%	100.8±2.0	0.51±0.01	2.6·10 <sup>+08</sup>
	Sucrose	99.1%	98.3±0.5	0.52±0.00	2.2·10 <sup>+08</sup>
	Lactose	93.3%	123.9±2.0	0.69±0.00	1.4·10 <sup>+08</sup>
	Starch	85.6%	79.1±2.1	0.49±0.02	2.1·10 <sup>+08</sup>

N.D.: Not determined

These results clearly show that better performances were obtained with *Cl. butyricum* compared to *C. freundii* which produced hydrogen less efficiently. With starch *C. freundii* produced no hydrogen. This had already been reported in the literature and is due to its lack of functional amylases (Kotay et

Das, 2009). Although no hydrogen was produced by *C. freundii*, biomass increased to  $3.3 \cdot 10^{+08}$  CFU·ml<sup>-1</sup> probably due to the consumption of other less accessible carbon sources in the media, i.e. casein peptone and yeast extract. By contrast *Cl. butyricum* is able to produce hydrogen by degrading starch.

For every substrate investigated, higher hydrogen yields were obtained with *Cl. butyricum*. In addition, hydrogen was more abundant in the biogas produced by *Cl. butyricum* compared to *C. freundii* (on average 70% vs 62% respectively, data not reported here).

The differences in the performances of the two strains are due to the different metabolic pathways followed (Oh *et al.*, 2008b; Ying et Yang, 2004). *Enterobacteriaceae* produce hydrogen via the decomposition of formate up to a maximum yield of  $2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$ . Whereas Clostridia follows the mixed acid fermentation and provides a maximum yield that is twice as high when producing acetate and butyrate. However, the yields obtained in this investigation, ranging from 0.1 to 0.24 and 0.49 to 0.69  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  for *C. freundii* and *Cl. butyricum* respectively, are lower than those published in several studies ( $0.88 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  for *C. freundii* (Hamilton *et al.*, 2010) and  $1.69 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  for *Cl. butyricum* (Masset *et al.*, 2010). This difference can be explained by the absence of pH regulation in the serum bottle experiments. During the fermentation of the carbon sources, acid metabolites were produced leading to a rapid decrease in pH (set at 7.3 at the beginning). Since no buffer such as  $\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$  was used in the media the pH of the cultures rapidly dropped to levels lower than the optimal pH for hydrogen production (5.9 and 5.2 for *C. freundii* and *Cl. butyricum* respectively) thereby reducing the final yield reached. In addition the final pH levels were much lower (ranging from 4.13 to 4.67) inducing a strong inhibitory effect, not only on the hydrogen production but also on substrate consumption.

### **3.2. Metabolites analysis for *C. freundii* and *Cl. butyricum* with different substrates.**

The main soluble metabolites (ethanol, lactate, acetate, succinate and formate for *C. freundii* and butyrate, lactate, acetate, formate and ethanol for *Cl.*

*butyricum*) were analyzed by HPLC at the end of the culture (48 hours). The carbon mass balance for these metabolites is indicated in the Figure 1 in terms of the percentage of substrate's carbon content converted. Due to the difference in the metabolic pathways involved, butyrate is only produced by *Cl. butyricum* and succinate only by *C. freundii*. In addition more of the carbon source is converted to ethanol by *C. freundii* (ten times more than with *Cl. butyricum*).

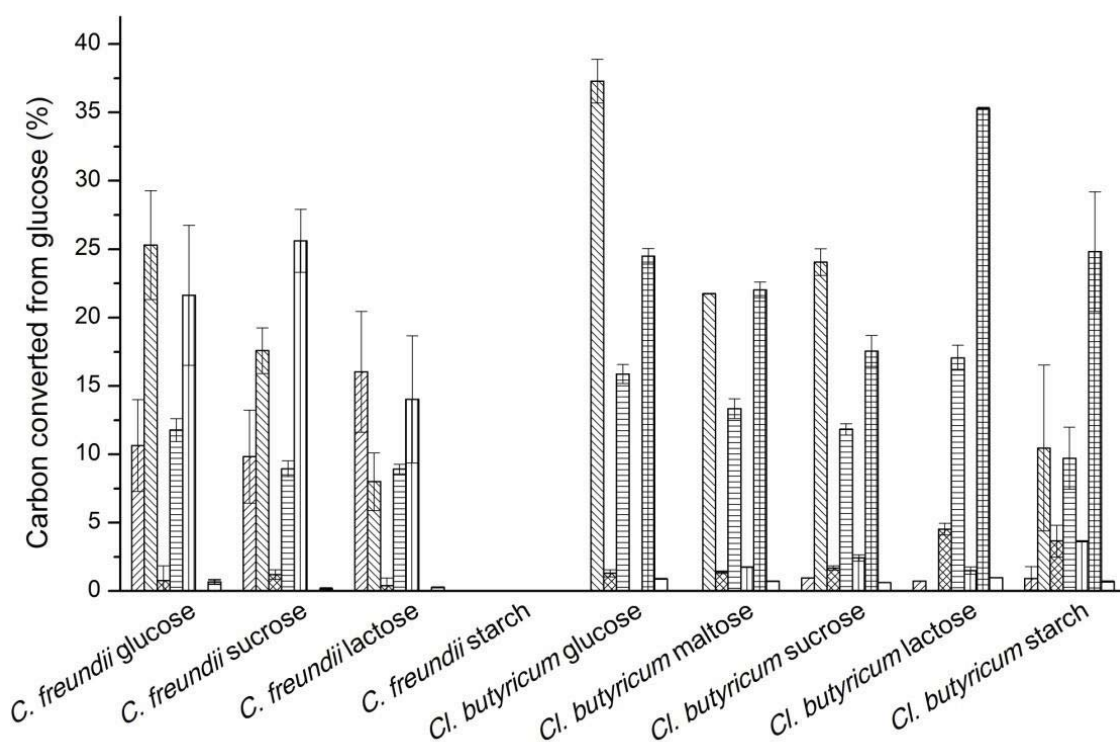


Figure II - 1: Carbon mass balance for *C. butyricum* and *C. freundii* in 270 ml batch fermentation with different carbon sources, expressed in percentage of carbon converted from the consumed carbon source ( // // // succinate; \ \ \ \ lactate; x x x x formate; = = = = acetate; | | | | ethanol; + + + + butyrate; □ carbon dioxide).

With the *C. freundii* cultures, only small amounts of formate were detected indicating that only a little more hydrogen, enhancing the yields by about 20%, could have been produced through the activity of the Formate Hydrogen Lyase (FHL) enzymatic complex decomposing formate in hydrogen (Kim *et al.*, 2008). Other metabolites, mainly ethanol and lactate accounting for about 20% of the glucose converted, are of less interest in this context since they do not lead to the production of hydrogen. When the cultures were maintained in optimal conditions, these metabolites were still produced in similar amounts.

This indicates that very little or no adaptation in *C. freundii*'s metabolic pathway occurs in response to these conditions (Hamilton *et al.*, 2010).

With Clostridia's metabolic pathway, only acetate and butyrate lead to the coproduction of hydrogen, accounting for 15.9% and 24.5% respectively of the glucose converted. In a previous work, regulated batch cultures at the optimal pH for hydrogen production were carried out with *Cl. butyricum* and these two metabolites accounted for 12.7% and 40.3% respectively with a yield of  $1.69 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  (Masset *et al.*, 2010). The lower conversion rate of carbohydrate into acetate and butyrate shown here explains the low hydrogen yields obtained in the serum bottles cultures. Therefore, it can be assumed that *Cl. butyricum* adapts its metabolism to produce more favorable metabolites and hydrogen when growing under optimal pH conditions. The synthesis of lactate is not accompanied by hydrogen production. In this study, no lactate was produced from lactose by *Cl. butyricum*. This observation may be linked to the higher hydrogen yields reached compared to other substrates (Table 1) and to the higher conversion rate of the carbon source into butyrate (35.3% with lactose and 24.5% with glucose). By contrast, a considerable amount of lactate was produced from the other carbohydrates (e.g. 37.3% of the initial glucose). *Cl. butyricum* also synthesizes formate accounting for 2 to 3% of the substrate. This metabolite could be used in a co-culture of the two species to potentially produce more hydrogen via *C. freundii*'s metabolism. Yokoi has already investigated this topic, reporting that such a mixed culture produced hydrogen efficiently and without the need to add an expensive reducing agent (Yokoi *et al.*, 1998).

### **3.3. Batch fermentation with co-culture of *C. freundii* and *Cl. butyricum* on glucose and starch.**

Mixed cultures of *Cl. butyricum* and *C. freundii* were cultured in 270 ml serum bottles with glucose or starch. Pure cultures were carried out in the same conditions for comparison. L-cysteine was added in each culture according to the media description in materials and methods. The results of these experiments are reported in Table 2 indicating the hydrogen production

measured after 24 hours of culture and at the end of the fermentation (96 hours on glucose and 48 hours on starch) and hydrogen yields.

Table II - 2: Hydrogen production and yields from glucose and starch fermentation in pure or mixed culture with *Cl. butyricum* and *C. freundii*. *C. freundii* is not tested in pure culture on starch because it doesn't degrade starch. The yields are calculated at the end of the fermentation.

		Cumulative hydrogen production (ml)		Hydrogen yield ( $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$ )
		24h	End of fermentation	
Glucose	Pure <i>C. freundii</i>	38.4 ± 1.2	40.3 ± 5.4	0.25 ± 0.03
	Pure <i>Cl. butyricum</i>	0	99.6 ± 8.8	0.53 ± 0.04
	Mixed <i>C. freundii</i> and <i>Cl. butyricum</i>	54.4 ± 2	62.6 ± 2.7	0.38 ± 0.02
Starch	Pure <i>C. freundii</i>	N.D.	N.D.	N.D.
	Pure <i>Cl. butyricum</i>	N.D.	92 ± 5.7	0.69 ± 0.04
	Mixed <i>C. freundii</i> and <i>Cl. butyricum</i>	44 ± 1.4	96.5 ± 0.7	0.73 ± 0.01

N.D.: Not determined

The results of these experiments with starch are in accordance with the results obtained by Yokoi: a sustainable hydrogen production, in terms of hydrogen production and yield, is possible with starch (Yokoi *et al.*, 2002). In our cultures *C. freundii* seemed to survive and, as reported by Yokoi, was subsequently able to re-establish viable growth condition for *Cl. butyricum* in case of oxygen contamination in the culture media. The results presented in the Table 2 suggest that *C. freundii* establishes anaerobic conditions and allows production of hydrogen to begin earlier than in a pure *Cl. butyricum* culture (54 ml were already produced 24 hours after inoculation).

To our knowledge such a sustainable consortium with a simple sugar such as glucose has not yet been studied. During the first 24 hours of fermentation no hydrogen was produced by *Cl. butyricum* while *C. freundii* had already provided more than 95% of its total hydrogen production. The sustainable influence of *C. freundii* in the mixed culture with glucose allowed the production of hydrogen to begin earlier than with the pure *Cl. butyricum* culture. However, the use of a mixed culture in batch fermentation decreased the final hydrogen yield from 0.53 to 0.39  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  by comparison between the mixed culture and the pure *Cl. butyricum* culture.

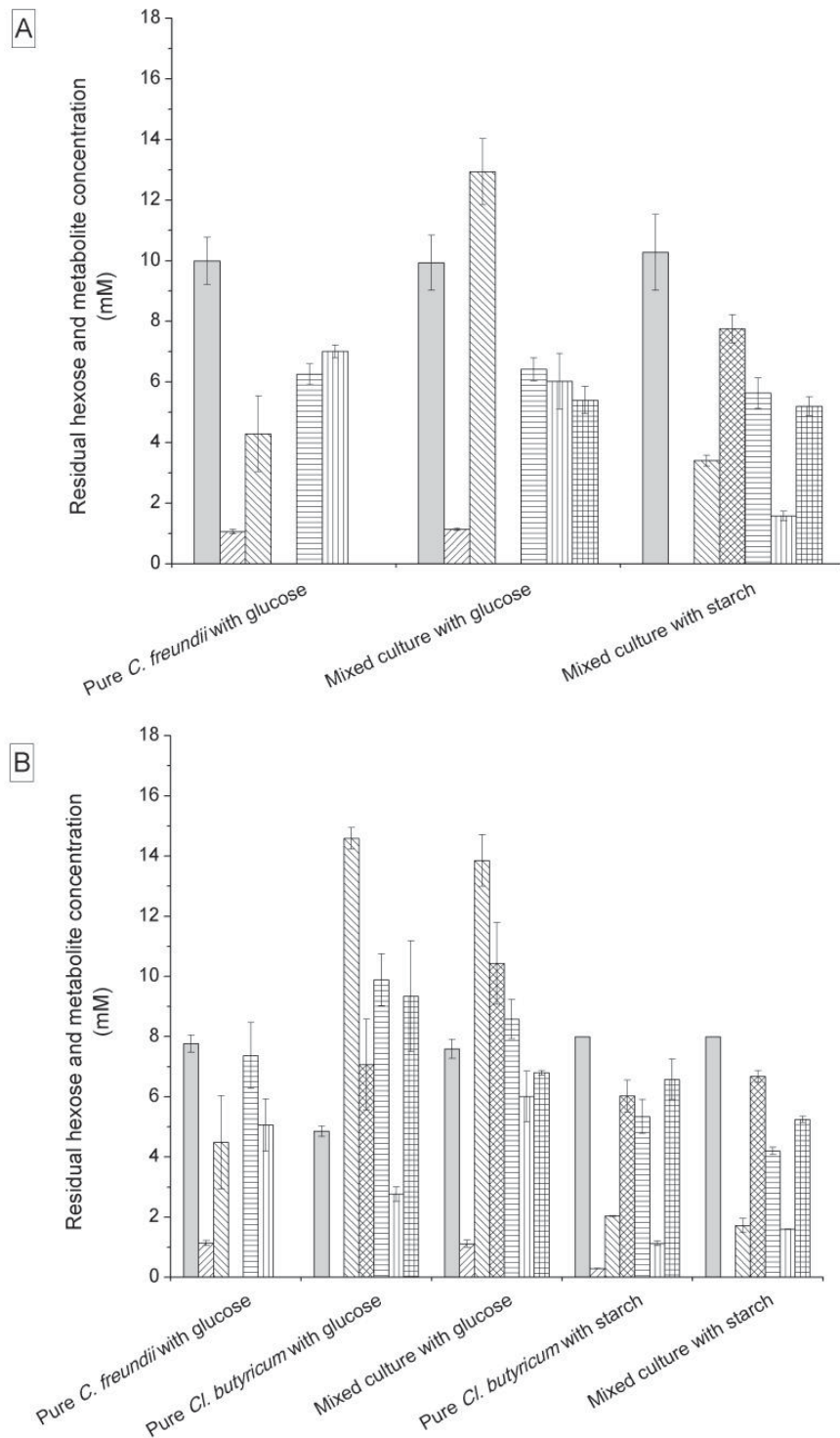


Figure II - 2 : Metabolites analysis in 270 ml batch pure and mixed culture of *C. freundii* and *Cl. butyricum* with glucose and starch substrates, expressed in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (■ residual hexose; // succinate; \ lactate; XXXX formate; === acetate; |||| ethanol; ##### butyrate). (A) Analysis 24 hours after inoculation (pure *C. butyricum* cultures are not analyzed since hydrogen was not yet produced). (B) Analysis at the end of the fermentations.

Tests on PCA media, carried out 24 hours after inoculation, did not show any aerobic bacterial development indicating that *C. freundii* did not survive or that the cell concentration had dramatically decreased. This suggests that the strain enhanced the initiation of hydrogen production, but was then rapidly overgrown or strongly inhibited by *Cl. butyricum*.

This is confirmed by the results presented in Figures 2 and 3 depicting the analysis of metabolites and carbon mass balance. They show that lactate and butyrate are the main metabolites from the degradation of glucose and starch. These two metabolites are commonly found in *Cl. butyricum* culture supernatants. However, the presence of succinate indicates that *C. freundii* grew at the beginning of the fermentation.

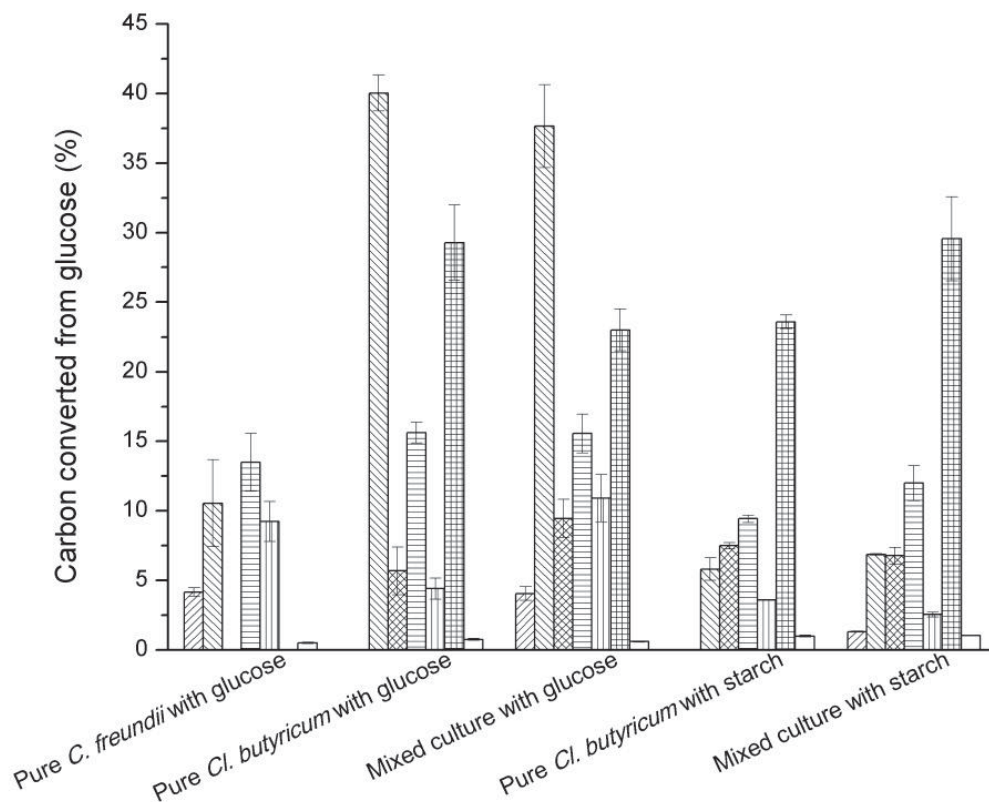


Figure II - 3 : Carbon mass balance in 270 ml batch pure and mixed culture of *C. freundii* and *Cl. butyricum* with glucose and starch, expressed in percentage of carbon converted from the consumed carbon source ( // // // succinate; \ \ \ \ lactate; XXXX formate; ——— acetate; | | | | ethanol; + + + + butyrate; □ carbon dioxide).

The data obtained on starch degradation confirm that the metabolites (high butyrate and low ethanol concentrations) seemed to correspond to the fermentation performed by *Cl. butyricum* and that *C. freundii* was strongly inhibited under these conditions.

The production of succinate and the high amount of ethanol detected in the supernatants of the glucose media indicates that *C. freundii* was active at the beginning of the fermentation and grew faster than *Cl. butyricum* consuming part of the glucose. This would explain the decrease in the final hydrogen yields (see Table 2). As *C. freundii* was not found in the media at the end of the fermentation, it had by then been overgrown by *Cl. butyricum*. Inhibition of *C. freundii* growth may be a limiting factor if a sudden infiltration of oxygen occurs in the absence of a reducing agent, since the strictly anaerobic strain *Cl. butyricum* may then start to sporulate.



## 4. Conclusions

---

Our work highlights the fact that mixed cultures of *Citrobacter freundii* CWBI952 and *Clostridium butyricum* CWBI1009 can efficiently maintain the production of hydrogen at acceptable yields compared to pure cultures of *Cl. butyricum*. Moreover, it could consume efficiently many different carbon sources efficiently since *Cl. butyricum* was able to degrade simple carbohydrates or even starch. However the survival of *C. freundii* in competition with *Cl. butyricum* was compromised since it was overgrown especially with the glucose substrate. Further work will be done to find other facultative aerobic strains which are able to enhance anaerobic conditions in the culture media without being overgrown by *Cl. butyricum* and without decreasing the hydrogen yield.

## **Commentaires complémentaires**

---

L'étude de la dégradation d'eaux usées synthétiques et industrielles serait un vaste sujet à investiguer. L'objectif de réduction des coûts du milieu étant le centre des recherches à mener dans le futur qui, outre pour étudier le potentiel de production d'hydrogène, devront être mises en œuvre sur des cultures à moyenne et à longue durée. En effet, l'étude de la production d'hydrogène en culture (semi-)continue implique la maîtrise de plusieurs facteurs nécessaires au maintien de performances satisfaisantes : conservation des conditions anaérobies, si possible sans utilisation de cystéine, maintien des populations bactériennes productrices d'hydrogène et suppression des populations consommatrices, concentration de la biomasse afin d'éviter un lessivage et contrôle du pH.

Par ailleurs, afin d'envisager le procédé dans son ensemble, il sera nécessaire de définir les conditions idéales pour permettre le démarrage rapide et efficace de la production d'hydrogène ou, le cas échéant, le redémarrage de bioréacteurs ayant été perturbés dans leur production.

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que l'association des deux souches productrices d'hydrogène complémentaires permettent de démarrer la production d'hydrogène plus rapidement, mais en assumant une perte de rendement de production. L'étude devra être étendue à des réacteurs produisant de l'hydrogène sur une longue durée comme cela sera envisagé dans d'autres chapitres (III, V et VI notamment).

**Chapitre VI – Effets de la pression partielle en hydrogène sur la production anaérobie de bioH<sub>2</sub> par une bactérie chimiotrophe du genre *Clostridium* dans un nouveau réacteur à cylindre rotatif**



# Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor

Laurent Beckers <sup>°</sup>, Serge Hiligsmann <sup>°</sup>, Julien Masset <sup>°</sup>, Christopher Hamilton <sup>°</sup>,  
Philippe Thonart <sup>°</sup>

Article publié dans Energy Procedia (2012), **29**, 34 - 41

<sup>°</sup>CWBI – University of Liège, Bd du Rectorat 29 B.40 – P.70, B-4000 Liège, Belgium

## Préface

---

Ce chapitre constitue la suite logique du chapitre V. Il étudie, dans les conditions optimales d'alimentation du bioréacteur à biodisque (AnBdR), l'influence de la pression totale (directement liée à la pression partielle en hydrogène) sur les performances de production. Ces manipulations font directement suite à celles réalisées dans le chapitre précédent.

Appliquant le modèle de transfert d'hydrogène, cette manipulation revient à modifier le potentiel de transfert (la différence entre la pression partielle et la pression à l'équilibre avec la concentration en hydrogène dissout). De ce fait, le transfert d'hydrogène s'en retrouve modifié. L'influence de ces variations sur la production d'hydrogène (rendements) et sur les métabolites sera observée.

## Abstract

---

In order to produce fermentative biohydrogen at high yields and production rates, efficient bioreactors have to be designed. A new reactor called anaerobic biodisc reactor allowed the production of biohydrogen from glucose with the selected *Clostridium* sp. strain at high yields ( $2.49 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) and production rates ( $598 \text{ ml}_{\text{H}_2} \cdot \text{m}_{\text{medium}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). The bacteria were fixed on a rotating support enabling efficient gas transfer from the liquid to the phase. It allowed the metabolism of the bacteria to produce more hydrogen. Moreover, an increase of the total pressure 0.18 bar lowered the yields of 19.5% while a decrease of 0.11 bar increased the yields of 7%. Our work concludes on the importance of providing good liquid to gas transfers in the biohydrogen-producing reactors.

Keywords:

Biohydrogen, dark fermentation, *Clostridium*,  $\text{H}_2$  partial pressure, bioreactor

## 1. Introduction

---

Hydrogen is widely considered as a key chemical element that will have to play an important role in the energetic system of the near future. Many recent researches and developments for the production of green hydrogen look into the biological hydrogen production (Hallenbeck et Benemann, 2002) and its use in processes for the treatment of wastewater rich in carbohydrates, as the food-industry wastewaters (Das, 2009). Some chemotrophic microorganisms of the genus *Clostridium* can consume many different sources of carbon in strict anaerobic conditions to grow and produce hydrogen as well as other soluble metabolites released in the media. These bacteria are often found in hydrogen-producing sludge and can achieve high hydrogen production rates (HPR) and good yields in optimized conditions (Lin *et al.*, 2007). Moreover, they show many advantages, as the large range of substrate that they are able to degrade and their spore-forming ability.

However, to date, the maximum theoretical yield of four mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> was never reached at a laboratory or pilot scale. Indeed, all the mechanisms involved in the biohydrogen production are not fully understood. These need to be investigated in detail in order to design a large scale industrial application for an efficient production of hydrogen (Das, 2009).

Among the several culture parameters that are usual reported in the scientific literature, the inhibition created by the hydrogen produced by the bacteria on its own gaseous production is one of the most cited, known as the “hydrogen partial pressure” effect (Das et Veziroglu, 2001; Levin *et al.*, 2004). Many authors have discussed the influences and inhibitions caused by the hydrogen on the enzymes leading to the production of hydrogen through the reduction of protons in molecular hydrogen (Angenent *et al.*, 2004; Hawkes *et al.*, 2002). Some have shown the positive effects of degassing the media with gases in order to decrease partial pressures of the different gases produced (Kraemer et Bagley, 2008; Mizuno *et al.*, 2000).

However, the concentration of hydrogen dissolved in the liquid medium is the only parameter directly influencing the metabolism of the bacteria and the biochemical or enzymatic mechanisms involved (Pauss *et al.*, 1990). H<sub>2</sub>

partial pressure and liquid concentration are theoretically linked at equilibrium by the Henry's law. However, low soluble gases may encounter mass transfer limitations, especially in anaerobic sludge and complex media. It can lead to a non-equilibrated system for which the Henry's law is not relevant anymore (Masset *et al.*, 2010). Therefore, the so-called hydrogen partial pressure should not be considered as the parameter to study and rather be cited as the concentration of hydrogen dissolved in the liquid phase.

To our knowledge, no direct link has been established between the concentration of hydrogen dissolved and the performances achieved in the cultures. Lowering the concentration of the dissolved hydrogen should be one of the key factors for the enhancement of the H<sub>2</sub> production by fermentative microorganisms. This can be achieved by enhancing the liquid-to-gas mass transfer (Pauss *et al.*, 1990).

Indeed,  $Q$ , the mass flow transferred through a specific gas-liquid interface expressed by unit of time and by volume of liquid is given by the equation (1) depending on the global mass transfer coefficient  $k_L a$  (which is linked to the mixing condition of the media and the g-l interfacial area) and on the potential of transfer  $P_G - P_G^\circ$  (linked to the gas partial pressure and the liquid concentration of gas dissolved at the equilibrium). The Henry constant ( $He$ ) depends only on the nature of the gas considered (Treybal, 1980) .

$$Q = K_L a \cdot He \cdot (P_G^\circ - P_G) \quad (VI - 1)$$

In this study, a novel continuous bioreactor called anaerobic horizontally rotating cylinder bioreactor (or anaerobic biodisc reactor, ABR) was investigated with a *Clostridium butyricum* strain. By its original design, it greatly enhances the specific liquid-to-gas transfer surface, theoretically leading to higher  $k_L a$  values. Moreover, the potential of transfer  $P_G - P_G^\circ$  in the equation (1) was studied by applying different total pressure to the bioreactor. The hydrogen production performances are discussed in comparison with other hydrogen-producing bioreactors.



## 2. Material and methods

The anaerobic biodisc reactor (ABR, fig. 1.a.) investigated in this paper was composed of 2.3 L glass vessel (Bibby Quickfit JRV2L, UK) with double envelope for temperature regulation at 30°C and a stainless-steel lid with septum, shaft, pH probe (465-35-SC-P-K9/320, Mettler Toledo), gas filters (Sartorius Midisart 0.2  $\mu\text{m}$ ) and silicone tubes for gas outlet and medium removal or addition. The shaft was equipped with a tubular-rotating support (3RPM; fig. 2.b.) to enable biofilm growth and immobilization on the surface. The support was constituted of a cylindrical rigid polypropylene structure of 20x9 cm around which fibreglass is fixed of 5mm thick. The last layer protecting the decomposition of the fibreglass was a polypropylene grid of 1 mm<sup>2</sup> meshes. Finally, a sieve-blade was fixed in order of homogenization of the media settling at the bottom of the bioreactor with the rotation of the cylinder.

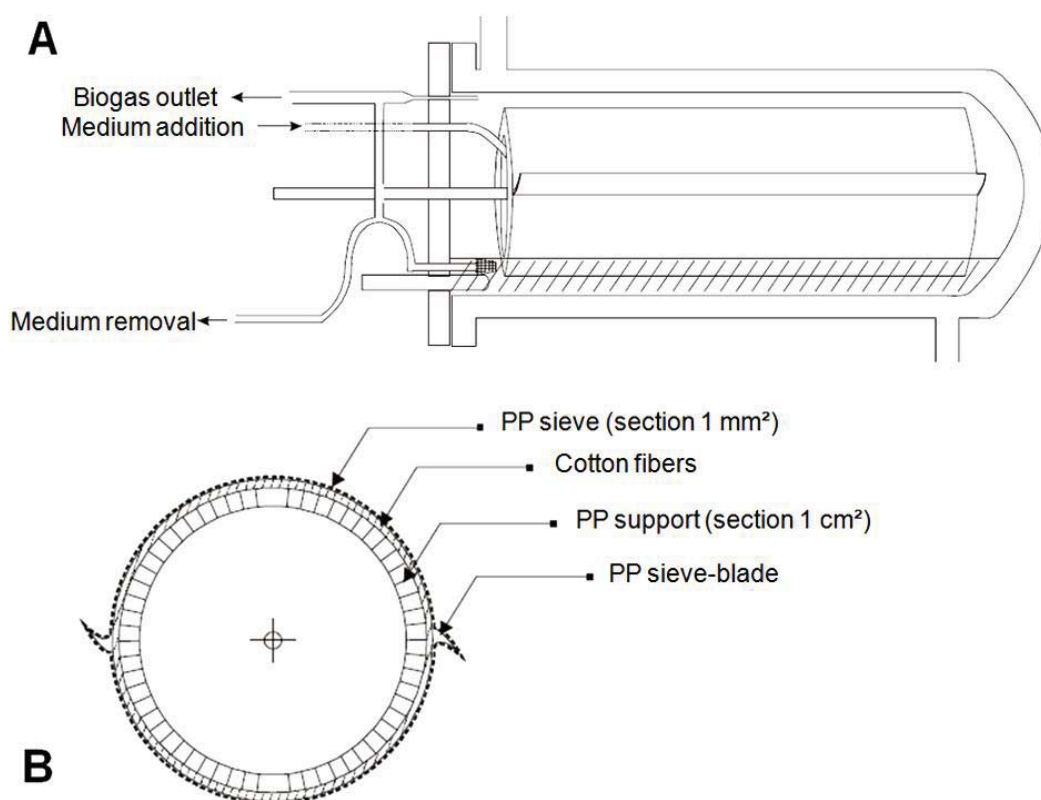


Figure VI - 1 : Schematic setup of the anaerobic biodisc reactor (a) cross-section view; (b) section view

The “MDT” feeding medium was described by Hiligsmann *et al.* (2011) and adjusted at a concentration of  $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of glucose and at a pH of 8.5 by the addition of NaOH 1N. The medium was fed at the centre of the cylinder at a flow rate of  $80 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ . The nutrients were pumped from the nutrients feed vessel to the bioreactor using a peristaltic pump. No direct pH regulation was set on the bioreactor. Liquid samples taken from the sampling port were analyzed according to the HPLC-RID method described by Beckers *et al.* (2010) for measuring the concentration of the liquid metabolites.

The exhaust was placed at the overflow level to maintain the required liquid volume inside the bioreactor (varying from 0.3 to 1.5 L). The medium was then collected in a 10 L vessel acidified by  $\text{H}_3\text{PO}_4$  at a pH below 3 to inhibit microbial activity. In order to prevent impact of liquid pumping on the gas measurement, the biogas flowed through a foam-collecting vessel and the other vessels for nutrients and spent medium before being measured in a gas-flow meter (Ritter, D). All the vessels and connections are schematically presented in the Figure 2.

The gas produced was collected after the gas-flow meter through a  $0.2 \mu\text{m}$  filter to a water column for complementary volumetric hydrogen measurements by water displacement system. The column was a 1.75 m high one with an internal volume of 38 L and was hermetically closed. Atmospheric pressure productions were enabled by connecting the gas arrival at the top of the column and adjusting the water exhaust at the same level of the liquid in the column. Under-pressure conditions were enabled by letting the exhaust of water at the floor level therefore placing the system under a lower total pressure of 0.82 bar. On the contrary, overpressure was enabled in the bioreactor by connecting the gas arrival at the bottom of the column therefore creating a column of 1.75m high of overpressure (+0.11bar). The composition of the biogas collected was analyzed in a GC-TCD apparatus following the method described by Hamilton *et al.* (2010).

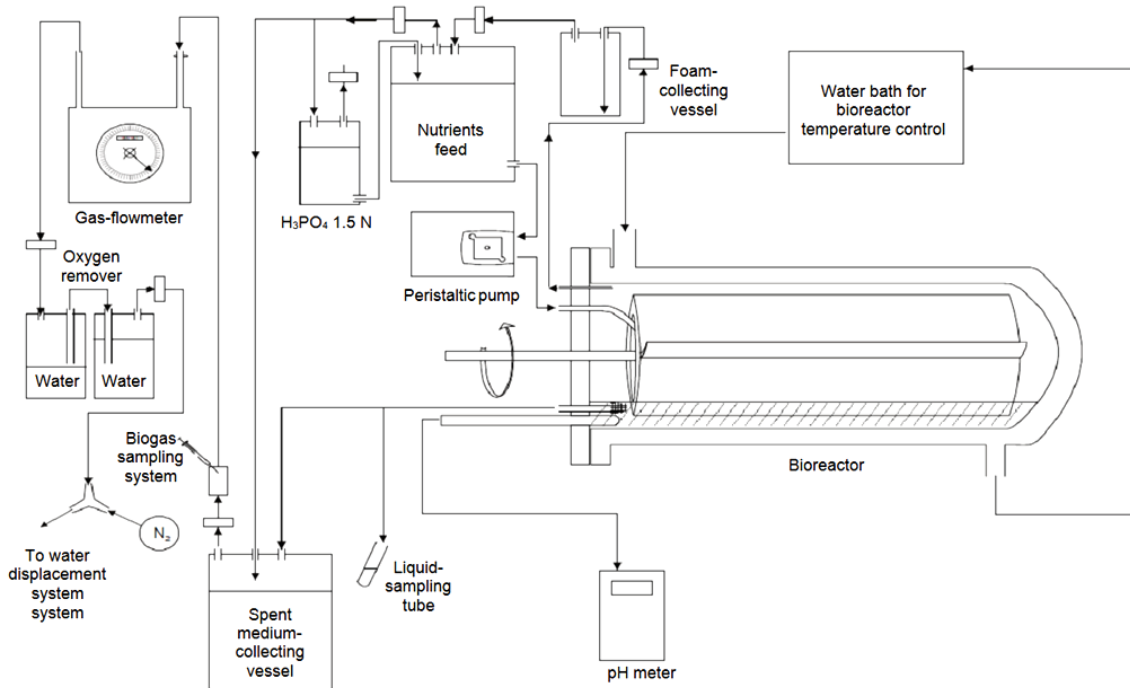


Figure VI - 2 : Schematic complete setup of the anaerobic biodisc bioreactor

The ABR was sterilely inoculated by a *Clostridium butyricum* CWBI1009 strain isolated and characterized previously by Masset *et al.* (2010). After the inoculation, a contamination by ambient strains occurred in the ABR. It was observed on PCA purity check as described formerly by Beckers *et al.* (2010). However, previous experiment showed that the bioreactor was still producing hydrogen. It was therefore used without new sterilization and/or *Clostridium butyricum* inoculation.

### 3. Results and discussion

The production of hydrogen was recorded during 58 days and was kept stable in the anaerobic biodisc reactor (ABR). Over the period of investigation, a total volume of 260 L of biogas was collected. GC analyses showed that H<sub>2</sub> content reached a mean value of 65% ± 2% whereas CO<sub>2</sub> was at 35% ± 2% and no methane was detected. The biomass rapidly grew on the cylindrical support and kept a white uniform aspect. The stagnant media at the bottom of the vessel was maintained between 300 and 350 mL. The dry matter measured on the exhaust liquid reached a mean value of 1.25 ± 0.16 g<sub>DM</sub>.L<sup>-1</sup>, the redox potential was always measured below -150 mV ensuring anaerobic conditions in the ABR. The pH slightly varied but was maintained between 4.9 and 5.3, near optimal condition for H<sub>2</sub> production of *C. butyricum* (Masset *et al.*, 2010).

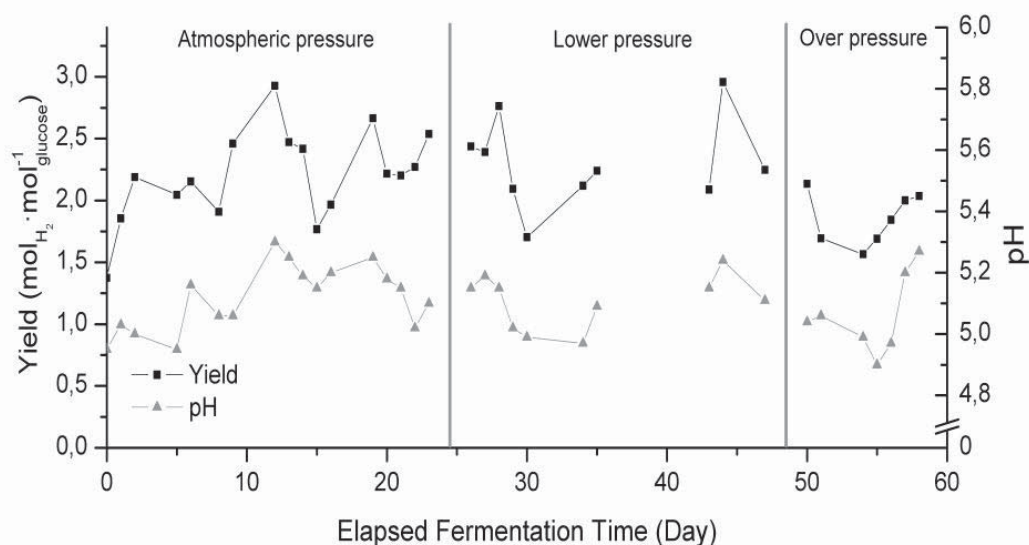


Figure VI - 3 : Yields and pH in the ABR during the 58 days of culture. The three total pressures applied, *i.e.* atmospheric, lower and over pressure, are related to pressures of respectively 1, 0.89 and 1.18 bar.

Hydrogen production yields are estimated based on the volumes of hydrogen produced and the amount of glucose consumed in the ABR and expressed in moles of hydrogen per mole of glucose. Rapidly after the beginning of this study, they reached value over 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub> · mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> and then seemed to follow

the trend of the pH curve in the bioreactor (Figure 3). The control of the pH was maintained as near as possible near the optimal value (*i.e.* 5.2). When the pH was optimal between 5.2 and 5.3, the yields reached higher value than those observed in the STR showed by these latter authors (between 2.5 and 2.9 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> VS 1.9 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> in the STR). Even at lower pH, the ABR performed higher yields. The H<sub>2</sub> production rates (HPR) followed similar trends than the yields, varying between 133 and 211 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·h<sup>-1</sup> (data not shown). However, considering the low liquid volume of the ABR (0.3 L), the specific HPR expressed per volume of liquid reached 705 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, a value five time higher than the maximum specific HPR reached in the STR of Masset et al (2010).

A natural mixed culture was grown in the ABR, with the development of facultative contaminants. Unusual metabolites for pure *C. butyricum* cultures were found in solution as discussed later. It indicates that the contaminants were consuming glucose without any hydrogen production. Nevertheless, the contamination did not disable the production of hydrogen which was still very efficient. Indeed, the yields are relatively high in comparison with the results presented in other studies. Common value for the yields of H<sub>2</sub> production with mixed culture are usually bellow 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> in classical bioreactors. For example, Mizuno *et al.* (2000) reached 1.43 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>, Zhang *et al.* (2006) obtained 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> and Van Ginkel et Logan (2005) 1.7 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>, in lab-scale AnSBR or UASB systems. The HPR reached with the ABR are lower than the best rates described in the literature. HPR are greatly affected by the condition of the production of H<sub>2</sub>, linked with the glucose loading rate and the method used for concentrating the biomass in the bioreactor. Therefore, fixed biomass bioreactors reach higher HPR than in the ABR. For example, Chang *et al.* (2002) showed a maximum HPR of 1.3 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) and Zhang *et al.* (2007) of 2.36 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. However, in these papers, the gain of HPR is made regardless the yields that are lower than in the ABR for similar hydraulic retention time and for a higher glucose loading rate. It can be concluded that an interesting compromise between good production yields and reasonable HPR is reached in the normal conditions of the ABR. It also shows the efficiency of the original design for the fixation of the biomass and the effect of the efficient liquid-to-gas H<sub>2</sub> mass transfer. In

order to prove that, considering the equation (1), a better mass transfer enhances the performances in the ABR, three conditions of total pressure were applied as shown in the Figure 1, therefore varying the potential of transfer " $P_G - P_G^\circ$ ". The first period, at atmospheric pressure, was followed by a period in lower pressure (-0.11bar) and by a period of over pressure (+0.18bar). However, the three periods were strongly affected by the variation of the pH as discussed earlier. In order to distinguish the influence of the three conditions of total pressure, the yields reached in the different moments of the fermentation were grouped within pH range of 0.1 unit (Figure 4).

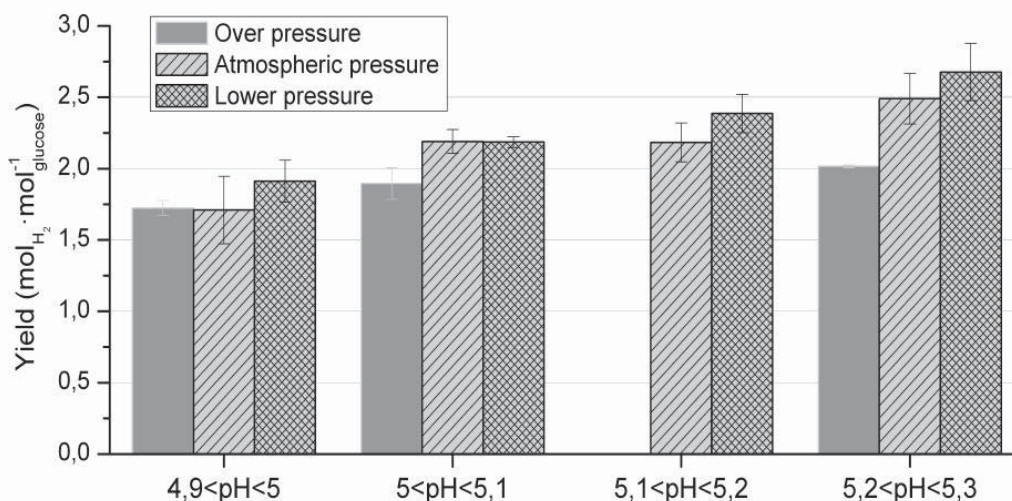


Figure VI - 4 : Hydrogen production yields in the three conditions of total pressure (-11bar of under pressure, atmospheric pressure and +0.18bar of over pressure) grouped in 0.1 pH range

When the pH is set between 5.2 and 5.3, the ABR performed the best values for each condition of total pressure. It confirms the pH is one of the first parameter to be controlled for the improvement of the yields. The total pressure in the bioreactor also influenced the yields. A lower pressure trend to increase the yields for every pH considered. When the pressure was lowered from 1.18 bar to 1 bar and to 0.89 bar, the yields increased respectively at 2.18, 2.38 and 2.67 mol<sub>H<sub>2</sub></sub> · mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>. Similarly, the HPR were improved with the decrease of the total pressure from 142 mL<sub>H<sub>2</sub></sub> · h<sup>-1</sup> to 191 mL<sub>H<sub>2</sub></sub> · h<sup>-1</sup>, corresponding to an increase of 34%. This significant improvement may be explained by the improvement of the mass transfer conditions of the hydrogen.

Pauss *et al.* (1990) demonstrated in anaerobic digestion media that the mass transfer limitation is a parameter even more significant with low soluble gas. Especially for culture producing only hydrogen, lowering the hydrogen dissolved in the media allows the bacteria to follow metabolic pathways leading to more efficient hydrogen production and to reach higher yields.

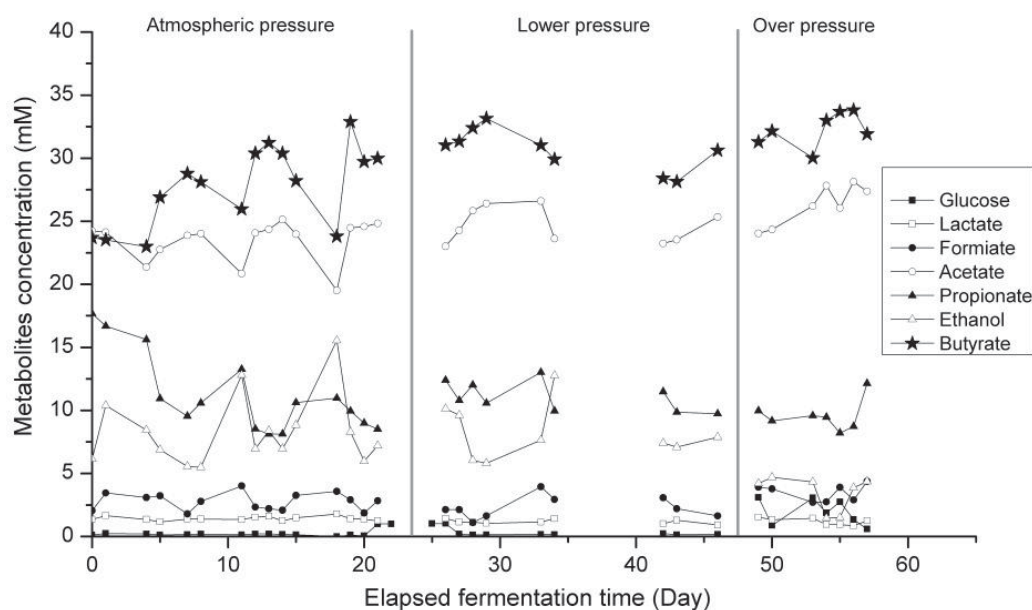


Figure VI - 5 : Concentrations of the metabolites analyzed by HPLC-RID during the 58 days of fermentation. The three total pressures applied, *i.e.* atmospheric, lower and over pressure, are related to pressures of respectively 1, 0.89 and 1.18 bar.

The metabolic analyses showed in the Figure 5 present close profiles of metabolites whatever the total pressure condition of the ABR. The major metabolites are butyrate and acetate, both being volatile fatty acids usually associated with the hydrogen production in the metabolism of *C. butyricum* (Cai *et al.*, 2011a). Other metabolites such as propionate and ethanol aren't usually found in these conditions of temperature and pH at these levels of concentration (Masset *et al.*, 2010). They may be linked with the growth of other strains and show evidence for their activity in the bioreactor. Therefore, since the contaminants are consuming glucose and releasing metabolites not associated with the H<sub>2</sub> production, the performances could be increase by the control of the contamination in order to remove it from the ABR. Nevertheless, the levels of the unusual metabolites were maintained stable during the

investigations meaning that, in this case, the contamination seemed to evolve in a co-culture with the hydrogen-producing strain *C. butyricum*. Further bimolecular analyses have to be done on the natural consortium formed to determine the different species involved. Finally, the quantification of the glucose concentration showed that it was totally consumed during the period of work at atmospheric and lower pressure (*i.e.* better period for hydrogen production performances). On the contrary, when the ABR was placed in over pressure, the residual glucose concentration in the ABR increased between 1.3 and 3.2 mM. It indicates the inhibition that creates the hydrogen dissolved in the liquid on the activity of the bacteria, preventing it to consume the totality of the glucose fed in the ABR.



## 4. Conclusions

---

The novel anaerobic biodisc reactor working with a *Clostridium butyricum* strain allows the efficient production of hydrogen. Although contaminants were detected in the bioreactor, stable performances were recorded. The hydrogen yields and the production rates were higher than in previous experiments with the pure strain. The original design of the ABR provides important advantages for higher H<sub>2</sub> production performances. The cylindrical support allowed the fixation of the biomass and the rotating structure leads to an efficient mass transfer of hydrogen. Three different conditions of total pressure were applied and evidenced the relation between the H<sub>2</sub> production performances and the dissolved concentration of hydrogen. This latter parameter should be considered for its influence on the production of hydrogen rather than the gaseous partial pressure.

## **Informations complémentaires**

---

Les manipulations réalisées dans ce chapitre sur l'AnBdR ajoutent une pierre à l'édifice de la théorie du transfert gazeux développée dans cette section. Les résultats vont également dans le sens des recherches montrées dans la littérature scientifique, approchant l'effet des modifications des pressions partielles gazeuses, soit en éliminant l'hydrogène (dilution dans un gaz inerte), soit en diminuant la pression totale. Dans les deux cas, les conclusions sont similaires à celles tirées ici et montrent une amélioration des rendements avec la diminution des pressions partielles.

Ces méthodes d'amélioration des rendements ne sont néanmoins pas sans coût, si l'on envisage ces méthodes sur des bioréacteurs de grands volumes. D'une part, ces méthodes impliquent une dépense énergétique, soit pour envoyer des gaz inertes et surtout sans oxygène dans un réacteur, soit pour générer une dépression permettant d'augmenter les rendements. D'autre part, la récupération de l'hydrogène pose également question, dans la mesure où il devrait soit être séparé du gaz inerte, soit remis à pression atmosphérique, voire comprimé. Ces questions dépendent évidemment des structures dans lesquelles la production d'hydrogène par fermentation anaérobie serait injectée et selon son utilisation finale (pile à combustible, cogénération en turbine ou moteur à explosion). Dans le cadre de ce travail, ces éléments n'ont pas été pris en compte et expliquent également pourquoi la technologie n'est pas suffisamment mature pour être portée à grande échelle.

## **4<sup>ème</sup> section – Effets de catalyseurs métalliques**



**Chapitre VII – Effets de nanoparticules métalliques encapsulées dans un matrice de silice poreuse sur la production d'hydrogène par *Clostridium butyricum***



# **Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum***

Laurent Beckers <sup>a</sup>, Serge Hiligsmann <sup>a</sup>, Stéphanie D. Lambert <sup>b</sup>, Benoît Heinrichs <sup>b</sup>, Philippe Thonart <sup>a</sup>

*Article soumis dans Bioresource Technology (le 13 octobre 2012) et en révision avant acceptation depuis le 25 novembre 2012.*

<sup>a</sup> Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Département des Sciences de la Vie, B40, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium.

<sup>b</sup> Laboratoire de Génie Chimique, B6a, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium.

## **Préface**

---

Les réactions biochimiques prenant place dans le métabolisme bactérien de production d'hydrogène font toutes intervenir les hydrogénases afin de combiner protons et électrons pour produire de l'hydrogène moléculaire. Comme cela a été étudié dans les travaux des thèses de Christopher Hamilton(2012) et de Magdalena Calusinska (2012), ces enzymes sont régulées par les bactéries du genre *Clostridium*, selon les conditions du milieu, adaptant de ce fait la production d'hydrogène. Dans leurs conclusions, la mise en évidence des mécanismes réactionnels fait intervenir les hydrogénases en lien avec une production d'hydrogène plus ou moins importante. Cela laisse penser que cette dernière étape pourrait être l'étape lente et équilibrée de la chaîne de réactions chimiques menant à la production d'hydrogène.

Du point de vue de la chimie, les enzymes (dont les hydrogénases font partie) peuvent être assimilées à des sites catalytiques extrêmement performants car très sélectifs et permettant d'augmenter considérablement les vitesses de réaction, en relation avec les chaînes de transport des réactifs coordonnés au sein de la cellule. Or, dans le domaine de la chimie, la catalyse approche ce

même type de réaction accélérée avec les matériaux et les sites actifs minéraux (le plus souvent métalliques) finement dispersés sur un support très poreux et de grande surface spécifique. Dans ce cadre, les catalyseurs et nanoparticules jouent un rôle primordial dans les procédés industriels couramment utilisés.

Au vu de la similarité de certains mécanismes de transfert d'électrons qui sont observés entre les hydrogénases et les catalyseurs métalliques supportés, les possibilités d'interactions entre la cellule et une particule solide ont été étudiées avec des nanoparticules encapsulées, en collaboration avec le LGC de l'Université de Liège. En effet, de telles interactions entre des particules solides et des microorganismes ont déjà été mises en évidence dans le cadre de la production d'hydrogène ou du transfert électronique (dans les piles à combustibles microbiologiques, où des souches du genre *Clostridium* ont fréquemment été mises en exergue). Au cœur de ces mécanismes, il y a le transfert de l'électron provenant de l'oxydation du glucose vers un accepteur final (tel que le proton).

Dans ce cadre, plusieurs nanoparticules de différentes natures, mises en forme et en différentes concentrations, ont été testées en cultures avec *Clostridium butyricum*. Les résultats significatifs des essais menés sont présentés dans ce chapitre et discutés en relation avec la littérature scientifique.



## Abstract

---

This paper investigated the enhancement effect of nanometre-sized metallic (Pd, Ag and Cu) or metallic oxide (Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>) nanoparticles on fermentative hydrogen production from glucose by a *Clostridium butyricum* strain. These nanoparticles (NP) of about 2-3 nm were encapsulated in porous silica (SiO<sub>2</sub>) and were added at very low concentration (10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>) in batch hydrogen production test. The cultures containing iron oxide NP produced 38% more hydrogen with a higher maximum H<sub>2</sub> production rate (HPR) of 58% than those without NP or with silica particles only. The iron oxide NP were used in a 2.5 L sequencing-batch reactor and showed no significant effect on the yields (established at 2.2 mol<sub>hydrogen</sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) but an improvement of the HPR (+113%, reaching a maximum HPR of 86 mL<sub>hydrogen</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>). These results suggest an improvement of the electron transfers trough some combinations between enzymatic activity and inorganic materials.

### Keywords:

Biohydrogen; dark fermentation; *Clostridium butyricum*; encapsulated nanoparticles; sol-gel process.

### Highlights

- Encapsulated nanoparticles (NP) were tested for biohydrogen production improvement.
- Pd, Ag, Fe and Cu NP were added in *Clostridium butyricum* BHP tests.
- Fe NP showed an improvement of the hydrogen volume and rate of production.
- In pH controlled AnSBR, Fe NP showed +113% of hydrogen production rates.
- NP addition had no effect on the yields and metabolic pathway.

## 1. Introduction

---

In the upcoming years, the population living on our planet will increase and they will have to be provided with enough energy, materials and food. Currently, our society is based on the utilization of fossil fuels as a primary energetic source leading the world to environmental, human health and macro-economic issues (Zidansek *et al.*, 2009). The development of alternative and green energy sources is therefore regarded as a major answer aiming to lower the impact of the human industrial activity on the earth. In this context, it is believed that hydrogen will be used extensively in the future as an energetic vector to achieve a less polluting and economically more advantageous society than the current fossil fuel-based economy (Marban et Vales-Solis, 2007). Indeed, its reaction with oxygen, which produces energy and only water as a side-product, can be performed in electrochemical or combustion processes without any generation of greenhouse gases. However, currently, hydrogen is almost exclusively produced from traditional non-renewable fossil fuels in intensive chemical processes, running at elevated pressures and temperatures and releasing CO<sub>2</sub> in the atmosphere (Holladay *et al.*, 2009).

The green hydrogen produced by microorganisms provides alternative routes for renewable energy production (Kothari *et al.*, 2012). Among the several microorganisms that can convert various carbohydrate sources in hydrogen and metabolites in solution, the anaerobic fermentative bacteria have been studied during the past few years (Davila-Vazquez *et al.*, 2008; Hallenbeck, 2009). In these microorganisms, the electrons resulting from the oxidation of the substrate are transferred to protons in order to form molecular hydrogen through the action of enzymes called hydrogenases. Among the anaerobic bacteria producing hydrogen, *Clostridium* strains are frequently characterised in highly efficient sludge for hydrogen production in mesophilic range of temperatures (Lee *et al.*, 2011; Wang et Wan, 2009a). To date, the anaerobic biohydrogen process is still experimented at laboratory or small pilot scale only (Das, 2009). To make the process viable, improvements of the bioactivity of hydrogen-producing microorganisms as well as high substrate conversion yields are needed to meet economic requirements. Key factors for

optimal hydrogen production such as pH, temperature, strain selection, microorganisms cell density, concentration of substrate and metabolites have been well studied to improve the kinetics and the yields (Davila-Vazquez *et al.*, 2008; Wang et Wan, 2009a). However, further efforts and new routes have to be found to use these microorganisms more efficiently in a stable process.

Recently, the nanoscience has been involved in number of usual products and processes since the nanomaterials bring new chemical and physical properties. Indeed, due to their size between 1 and 100 nm, the nanomaterials exhibit a very large specific surface area and quantum effects start to predominate (Dinesh *et al.*, 2012). The interest in the biological field is still increasing with practical application in many different domains since nanoparticles (NP) have recently showed interactions with microorganisms even at very low concentration. On the one hand, some NP exhibit antimicrobial activity by close contact with the microorganisms leading to membrane disruption, also raising environmental concerns about their dissemination in the nature (Neal, 2008). On the other hand, some microorganisms may take advantages of NP especially in anaerobic environment, by transferring more efficiently electrons to acceptors. Intra- or extra-cellular NP may be produced by the reduction of metal ions for the biosynthesis of nanomaterials with different chemical composition or morphologies (Korbekandi *et al.*, 2009). Electron transfer can also occur through membrane c-type cytochromes or nanowires to electron acceptors such as polluting chemical compounds (for soil remediation applications (Jagadevan *et al.*, 2012)), electrodes (for current generation in microbial fuel cells (Lovley, 2008b)) or through interspecies electron transfer (Kato *et al.*, 2012). In all these application fields, the NP have recently shown some advantages through their capacity to react rapidly with the electron donors leading therefore to kinetic improvement and, through their action as biocatalysts, to the enhancements of the microorganisms activity (Xu *et al.*, 2012).

In a previous work, only gold NP at very low concentration ( $10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup>) were tested to observe effects on the biohydrogen production. An enhancement of the performances of about 56% was achieved (Zhang et Shen, 2007). The

authors concluded that gold NP would operate as “electron sinks” due to their affinity for electrons, which allows to further reduce protons to hydrogen. They acted in parallel on hydrogenases that naturally achieve this reaction in the metabolism of the cell. Other metal are known to interact with microorganisms in environmental conditions. Ag and Cu are often cited as metal having interaction with the bacteria for their antimicrobial activity (Bagchi *et al.*, 2012; Sotiriou et Pratsinis, 2010). Pd is a metal involved usually for its strong interactions with molecular hydrogen in chemical processes (Klavsyuk *et al.*, 2011). Finally, iron is known to be an important element as a cofactor for hydrogenases or for its role in environmental processes (Grieger *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2012).

In this work, the effect of nanoparticles (NP) of about 2-3 nm of three metals (Pd, Ag, Cu) and one iron (Fe) oxide was investigated with pure *Clostridium butyricum* cultures. These NP were encapsulated in a porous silica (SiO<sub>2</sub>) matrix. The SiO<sub>2</sub> matrix without NP was also tested in the same conditions. To synthesize the catalyst (NP + SiO<sub>2</sub> = catalyst), a one-step sol-gel process was applied to obtain NP finely dispersed in the porosity of a silica matrix (Heinrichs *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2004). In such catalysts, in order to reach active sites, reactants must first diffuse through large pores located between aggregates of SiO<sub>2</sub> particles and then through smaller pores between those elementary particles inside the aggregates. Finally, they diffuse through micropores inside the silica particles. It was shown that there are no limitations of mass transfer at each of the three levels (Heinrichs *et al.*, 2001).

These NP were experimented in Biochemical Hydrogen Potential (BHP) tests. The most efficient conditions were further investigated in a stirred 2.3 L Anaerobic Sequenced-Batch Reactor (AnSBR). The production of hydrogen and metabolites was monitored in the cultures and the Gompertz model was applied on the volumetric production curves.

## 2. Material and methods

---

### 2.1. Microorganism and culture medium

The strain used as hydrogen-producing microorganism was *Clostridium butyricum* CWBI1009 (denoted *C. butyricum*) and was previously isolated and identified by the authors (Masset *et al.*, 2010). It was conserved by sterile monthly transfer of 1 mL from previous pure culture in a hermetically sealed 25 mL tubes containing “MDT” medium and incubated at 30°C. The MDT culture medium contained, per litre of deionized water: glucose monohydrate (5 g), casein peptone (5 g), yeast extract (0.5 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5.1 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g) and L-cysteine hydrochloride (0.5 g). The MDT culture medium was used in biochemical hydrogen potential (BHP) batch serum bottles test and in 2.5L stirred tank reactor driven in anaerobic sequenced-batch mode (AnSBR).

For the preparation of fresh inoculum, the transfer in new MDT tubes was repeated twice a week before being used in the culture vessel. Purity tests were performed by spreading 100 µL of culture on sterile PCA (Plate Count Agar) Petri dishes before incubation at 30°C for 24 to 48 hours. The PCA medium contained glucose monohydrate (1 g), casein peptone (5 g), yeast extract (2.5 g) and agar (15 g) per litre of deionized water. The absence of bacterial growth after incubation for 48 h incubation confirmed the absence of any facultative anaerobic contaminants.

### 2.2. Preparation and characterization of encapsulated nanoparticles

Four metallic salts (Pd, Ag, Cu and Fe) have been used for preparing the nanoparticles (NP). To encapsulate these NP inside a porous silica matrix, the cogelation method was used as described by Lambert *et al.* (Lambert *et al.*, 2004) and by Heinrichs *et al.* (Heinrichs, 2008). The samples are denoted Pd/SiO<sub>2</sub>, Ag/SiO<sub>2</sub>, Cu/SiO<sub>2</sub> and Fe/SiO<sub>2</sub> cogel (Table 1). The cogelation method allows doping an inorganic matrix with cations, in one step at the molecular scale. The process is based on the simultaneous hydrolysis and condensation of two alkoxy-silanes: an SiO<sub>2</sub> network-forming reagent such as

tetraethoxysilane (TEOS, Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>) and an alkoxy-silane-functionalized ligand of the type (RO)<sub>3</sub>Si-X-L, in which the ligand L, able to form a complex L<sub>n</sub>M with a cation of a metal M (M = Pd, Ag, Cu, Fe etc.), is connected to the hydrolysable alkoxide group (RO)<sub>3</sub>Si- via an inert and hydrolytically stable spacer X. The concomitant hydrolysis and condensation of such molecules, *i.e.* their cogelation, results in materials in which the catalytic metal cation is anchored to the silica matrix.

In Table 1, a second Fe/SiO<sub>2</sub> sample, called Fe/SiO<sub>2</sub> dissol, is presented. This sample was prepared by the dissolution method (Heinrichs, 2008), which consists of dissolving the iron salt in the initial homogenous solution of silica gel precursor. Moreover, the porous silica matrix without NP, denoted SiO<sub>2</sub>, was also synthesized by the sol-gel process (Lambert, 2004) to check if SiO<sub>2</sub> plays a significant role for the biohydrogen production.

All these samples were calcined under air (550°C for Fe/SiO<sub>2</sub> dissol and Fe/SiO<sub>2</sub> cogel, 400°C for the other samples) to remove organic moieties. After the calcination step, Pd/SiO<sub>2</sub>, Ag/SiO<sub>2</sub> and Cu/SiO<sub>2</sub> were reduced under H<sub>2</sub> to obtain metallic NP (Lambert, 2004).

The samples were characterized (textural analysis, electron microscopy, X-ray diffraction) by using the methods described by Lambert *et al.* (2004) and Heinrichs *et al.* (2008). For the clarity of this work, NP is defined as metallic or metallic oxide nanoparticles highly dispersed inside the silica matrix, whereas catalyst is used to define the combination between NP and silica.

Concentrated suspensions in water of these samples were prepared in 50 mL bottles by finely pounding (at micrometre-size) and weighting some catalysts. Based on the mass suspended in the bottles, the metallic mass loading in the catalyst and the metal atomic weight (Table 1), a defined volume of homogenized suspension was transferred in the culture medium prior to sterilization in order to reach a final concentration of 10<sup>-6</sup> mol<sub>metal</sub>·L<sup>-1</sup>. Therefore, all the tests had the same NP concentration, but the total mass of catalyst (*i.e.* NP + SiO<sub>2</sub>) differed from one test to the others, because the metallic mass loading differs between the investigated catalysts. An equivalent mass of SiO<sub>2</sub> was added in the corresponding test without NP.

Table VII - 1 : Characteristics of the catalyst samples: preparation method, metal loading in catalyst; catalyst mass and volume of suspension used in the MDT medium to reach the final metallic concentration of 10<sup>-6</sup> mol<sub>metal</sub>·L<sup>-1</sup>

NP denotation	Reference sample	Reduction of the sample	Metallic mass content	Mass of catalyst added in 50mL of water concentrated suspension preparation (g)	Volume of concentrated NP suspension added in 1 L of MDT medium (mL)
SiO <sub>2</sub>	X3 (Lambert et al., 2004)	No	-	0.2034	1.25
Pd/SiO <sub>2</sub>	Pd3.1 (Lambert et al., 2004)	Yes	3.12%	0.0645	2.5
Ag/SiO <sub>2</sub>	Ag1.5 (Lambert et al., 2004)	Yes	1.54%	0.0506	6.25
Fe/SiO <sub>2</sub> dissol	Fe/SiO <sub>2</sub> -D (Heinrichs et al., 2008)	No	1.65%	0.1354	1.25
Fe/SiO <sub>2</sub> cogel	Fe/SiO <sub>2</sub> -C(E) (Heinrichs et al., 2008)	No	1.65%	0.1354	1.25
Cu/SiO <sub>2</sub>	Cu0.1 (Lambert et al., 2004)	Yes	0.12%	0.2059	12.5

### 2.3. Fermentation set-up

The BHP tests were carried out in 270 mL bottles with 200 mL of MDT medium adjusted at pH 7.6 with NaOH 5N as formerly described by Hamilton *et al.* (2010). Suspended catalysts were added in the bottles to reach the wished metallic concentration prior to sterilization. The bottles were inoculated with 3 mL of inoculum before being capped tightly with a sterile rubber septum, flushed with sterile nitrogen and incubated at a temperature of 30 °C. The data for the BHP test are representative results of independent experiments run in triplicates.

The experiments in AnSBR were done in a 2.5 L laboratory-scale tank bioreactor (Biolafite manufacture) composed of a double envelope and of a stainless steel lid equipped with a butyl septum, a pH probe (Mettler Toledo),

shaft with blades, 0.20  $\mu\text{m}$  gas filters (Midisart, Sartorius) and different tubes for gas inlet, gas outlet, medium removal or addition. The reactor contained 2.5 L of MDT medium, except L-cysteine and glucose in order to prevent Maillard reactions, before being sterilized. After cooling down, 1 L of media was removed and the L-cysteine and the glucose, sterilized separately in solution of respectively 25 and 500 mL, were added sterilely in the reactor under nitrogen gas to reach MDT concentration. Inoculum (500 mL) cultured in 1 L bottle was then added in the bioreactor. Automatic addition of sterile KOH 3 N was used to control the pH, the temperature maintained at 30°C and the bioreactor was stirred at 100 rpm. Sequenced-batch operations were carried out by removing 40% (1 L) of the wasted liquid media under nitrogen overpressure. The reactor was refilled up to 2.5 L with sterile MDT medium containing 12.5 g of glucose (*i.e.* in order to obtain a concentration of 5 g·L<sup>-1</sup> in the bioreactor).

## **2.4. Monitoring and analytical methods**

The biogas produced in the BHP tests was collected daily during 96 hours by sterile syringe and needle pierced through the butyl septum. Injections of the collected biogas in a 9N KOH measurement system for CO<sub>2</sub> sequestration allowed the determination of hydrogen content and volumetric hydrogen production by gas balance as already described by the authors (Hiligsmann *et al.*, 2011).

The 2.5L AnSBR was connected to a flow meter (TG05/5, Ritter) for continuous measurement of the biogas produced. The composition of the biogas was measured (or confirmed for the BHP tests) by a gas chromatography system (HP 8950 SeriesII) equipped with TCD detector, using nitrogen or helium as carrier gas (respectively for hydrogen and for nitrogen/methane/carbon dioxide detection) as fully described elsewhere (Hamilton *et al.*, 2010). Furthermore, the Gompertz model with the adjustment of three parameters (lag phase duration, maximum hydrogen production rate and maximum total hydrogen produced) was applied to the volumetric hydrogen production data following the method described by Wang et Wan (2009b).



The liquid culture samples were centrifuged at 13000 rpm for 3 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate filter (Sartorius Minisart). The glucose, lactate, formate, acetate, propionate, ethanol and butyrate were analyzed using a HPLC (Agilent 1100) equipped with a differential refraction index detector as described formerly by Masset *et al.* (2010). The concentrations measured in the culture medium were used to evaluate the carbon mass balance (MB) of glucose conversion in the soluble metabolites using the method of calculation reported by the authors (Beckers *et al.*, 2010).

### 3. Results and discussion

---

#### 3.1. Effect of encapsulated nanoparticles in BHP tests

##### 3.1.1. *Biological Hydrogen Potential*

The production of hydrogen in *Clostridium butyricum* cultures supplemented with various encapsulated NP was investigated in BHP test (batch serum bottles of 200mL of liquid volume) (Hiligsmann *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2007). Four different elements were tested in triplicates series of bottles. The NP of 2-3 nm of diameter are encapsulated in a porous silica structure (Heinrichs *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2004). The NP concentration was adjusted at 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> in the culture medium (Table 1). As a reference for the BHP test, a series was done without any catalyst supplementation (MDT medium only). Moreover, in order to assess the effect of the metallic (Pd, Ag or Cu) or metallic oxide (Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>) active site on the production of hydrogen rather than the silica structure, a negative control with porous SiO<sub>2</sub> particles without NP was achieved.

The volume of biogas was measured every 24 hours during four days after the inoculation. The daily volumetric hydrogen production, determined according to the description of the BHP tests in the section 2.3, was reported on the Figure 1. The hydrogen production profiles and total production were in line with previous BHP test with the *C. butyricum* strain (Hiligsmann *et al.*, 2011). A sigmoid profile was observed, indicating a lag phase followed by exponential growth and simultaneous production of hydrogen. Indeed, when growing, the release of soluble metabolites in the medium decreased the pH down to inhibiting level. It resulted in lower hydrogen production after three days, near the end of the culture.

Considering the influence of the addition of NP, no inhibiting effect was evidenced for all the NP tested since the production of hydrogen was not lowered in comparison with the reference BHP test. It is known that silver and copper behave as antimicrobial elements since they destruct the membrane cells by close contact between the microorganism and the NP (Bagchi *et al.*,

2012; Sotiriou et Pratsinis, 2010). However, they may not exert any antimicrobial activity in this case because NP are encapsulated inside the porous silica matrix (Neal, 2008). By contrast, some NP showed positive influence since the addition of iron and copper induced a significant increase of the total hydrogen produced in comparison with the reference. Moreover, different profiles are evidenced on the cumulated curves (Table 2 and Figure 1).

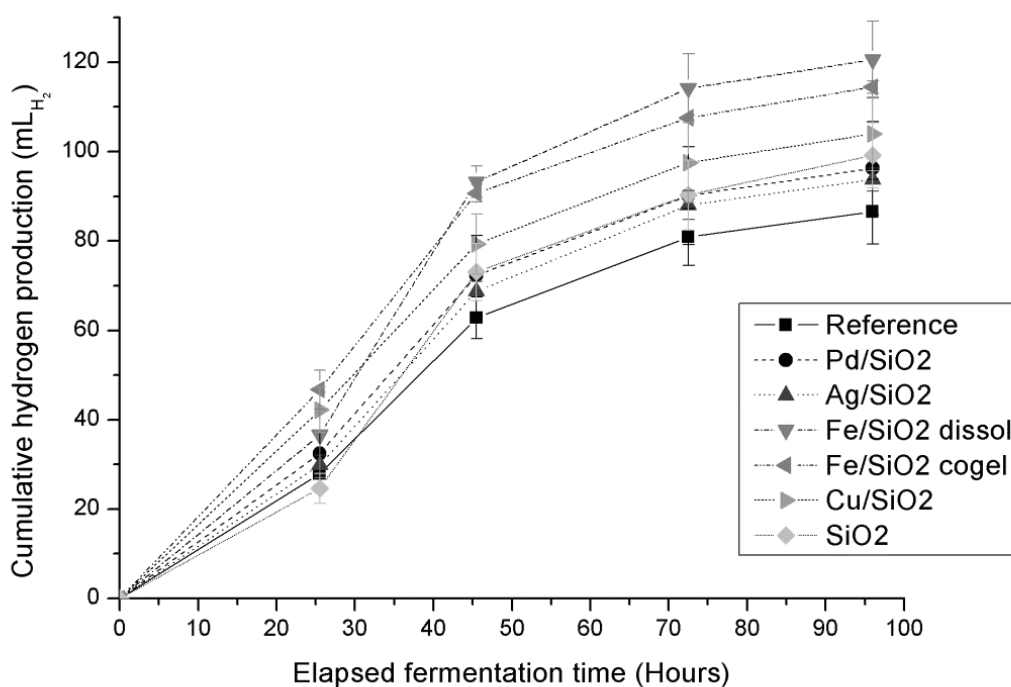


Figure VII - 1 : Cumulative volume of hydrogen production by the pure *C. butyricum* in BHP tests with  $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> of encapsulated metallic NP. The volumes of hydrogen are calculated at atmospheric pressure and 30°C. The standard deviation bars are calculated on the triplicate experiments made for each condition.

Both series with Fe/SiO<sub>2</sub> (synthesised by dissolution or cogelation method) and Cu/SiO<sub>2</sub> samples reached respectively  $120 \pm 5$  and  $104 \pm 8$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>, whereas the reference without catalyst added produced  $87 \pm 7$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>. The iron oxide NP had the most important positive impact on the H<sub>2</sub> production suggesting that they may have an interaction with the bacteria and its metabolism in a way allowing a more efficient hydrogen production. Furthermore, since SiO<sub>2</sub> sample without NP did not show any significant

effect, it can be concluded that only the central metallic or metallic oxide active site would play a role in the improvement of the hydrogen production.

### 3.1.2. *Hydrogen production rates and yields*

The Gompertz model was applied to the cumulative hydrogen production curves resulting in the coefficients detailed in the Table 2. It confirmed that maximum cumulative productions of hydrogen were achieved for the iron oxide NP, with an increase of 34% in comparison with the reference. Moreover, the maximum hydrogen production rates (HPR) were 58 % higher with the Fe/SiO<sub>2</sub> samples. These results indicate that the effect of the NP seems to be more important for the kinetic of the H<sub>2</sub> production than for the total volume produced. By contrast, no difference was observed for the lag phase that was between 7 and 14 hours for all the tests.

Table VII - 2 : Hydrogen yields and Gompertz coefficient adjusted on the profiles of volumetric hydrogen production curves for the BHP tests with NP. Standard deviations are calculated on the triplicates experiments made for each condition. All the R<sup>2</sup> for the Gompertz model were higher than 0.999.

	Yields (mol <sub>H<sub>2</sub></sub> ·mol <sub>glucose</sub> <sup>-1</sup> )	Gompertz model		
		Lag phase duration (h)	Maximum H <sub>2</sub> production rate (mL <sub>H<sub>2</sub></sub> ·h <sup>-1</sup> )	Total hydrogen production (mL <sub>H<sub>2</sub></sub> )
Reference	0.92 ± 0.08	11.2 ± 1.6	1.97 ± 0.24	86.7 ± 7
Pd/SiO <sub>2</sub>	0.97 ± 0.09	11.5 ± 0.8	2.33 ± 0.22	95.8 ± 8.5
Ag/SiO <sub>2</sub>	0.97 ± 0.02	11.8 ± 1.8	2.21 ± 0.17	93.8 ± 2.8
Fe/SiO <sub>2</sub> dissol	1.08 ± 0.06	11.6 ± 4.2	3.49 ± 0.31	119.4 ± 5.8
Fe/SiO <sub>2</sub> cogel	1.05 ± 0.01	9.1 ± 1.9	2.85 ± 0.15	113.3 ± 1.3
Cu/SiO <sub>2</sub>	1.01 ± 0.08	8.3 ± 2.1	2.4 ± 0.6	103.9 ± 7.9
SiO <sub>2</sub>	0.96 ± 0.02	12.8 ± 3.1	2.13 ± 0.7	97.3 ± 2.7

Regarding the hydrogen production yields, based on the total hydrogen production and the substrate consumed (Table 2), no significant difference was evidenced for the different conditions investigated (respectively 1.08 ± 0.06, 0.96 ± 0.02 and 0.92 ± 0.04 mol<sub>hydrogen</sub>/mol<sub>glucose</sub> for the Fe/SiO<sub>2</sub> samples, reference without NP and with SiO<sub>2</sub> only). The yields reached in the BHP tests are relatively low since the pH was not controlled (decreasing from the initial pH set at 7.6 down to 4.7 ± 0.1 at the end of the experiments). Therefore, it leads to a large fluctuation in the metabolic activity because the

cultures are only at the optimal pH for H<sub>2</sub> production during a short time (Hilgsmann *et al.*, 2011; Khanal *et al.*, 2004). It explains why the yields are lower than in a bioreactor with pH controlled (Lin *et al.*, 2007; Wang et Wan, 2009a). Indeed, in anaerobic sequenced-batch reactors (AnSBR) with the pH set at optimal value of 5.2, *C. butyricum* may produce hydrogen more efficiently. As an example, Masset *et al.* (2010). reached maximum yields of 2.3 mol<sub>hydrogen</sub>/mol<sub>glucose</sub> in similar conditions.

Moreover, the pH may evolve differently in the different series of BHP tests and reach the inhibiting pH level at a different fermentation time, depending on the behaviour of the strain in each condition. When the pH becomes lower, the production of hydrogen is a way for the bacteria to limit the further drop by the reduction of acidic proton into molecular hydrogen (Das, 2009). Therefore, the more the bacteria are producing hydrogen and limiting the drop of pH, the more it can consume glucose to continue its growth. In our results, more glucose was consumed for the production of hydrogen with Fe/SiO<sub>2</sub> samples (Figure 2). Therefore, the gain of hydrogen production was at least partially due to the increase of glucose consumption. Meanwhile, the yields were slightly increased of 12%, half of the increase performed for the volume of H<sub>2</sub>.

### **3.1.3. Soluble metabolites distribution**

Metabolites analysis (Figure 2) can be related to the low yields of BHP experiments since formate, lactate and ethanol were found in solution and are not related to metabolic pathways linked with the production of hydrogen. However, butyrate and acetate were respectively the second and the third major metabolites produced. They are related with stoichiometric hydrogen yields of respectively 2 and 4 mol<sub>hydrogen</sub>/mol<sub>glucose</sub>. The metabolites profiles are in accordance with previous studies of *C. butyricum* cultured in batch experiment and free pH (Hilgsmann *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2007). The carbon mass balance (Figure 2) showed that the glucose was mostly converted in butyrate (around 40%), then in formate and lactate (respectively around 15 and 13.5%). In order to improve the production of hydrogen and direct the metabolism of the microorganisms toward the butyrate and acetate

production, the pH should be controlled in continuous or semi-continuous fermentation.

The introduction in the media of the NP did not modify the metabolites profile. More glucose was consumed with Fe/SiO<sub>2</sub>, Cu/SiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> samples and less lactate was produced than in the reference triplicate. The same observation can be made for the carbon mass balance (Figure 2B), with a lower conversion of glucose in formate and lactate of respectively less than 14 and 10% with Fe/SiO<sub>2</sub> samples. The changes in the metabolites profiles and carbon mass balance are of the same order than the yields, between 10 and 15%. The values reached in the conditions were however close to the standard deviations obtained with the triplicates. Therefore, it can't be concluded that the NP lead to significant changes in the metabolic pathways followed by the bacteria but rather on the production rate of hydrogen.

All the results for the BHP tests underlined that an interaction may exists between the bacteria and the iron oxide NP and have an effect on the production of biohydrogen. However, in these experiments, since the pH is evolving along the culture, it is hard to establish if the NP influenced more the fermentation pathway followed by the bacteria (yields and metabolites) or the kinetic of production of hydrogen. Therefore, Fe/SiO<sub>2</sub> samples were used in AnSBR in order to observe the effects in pH-controlled conditions.

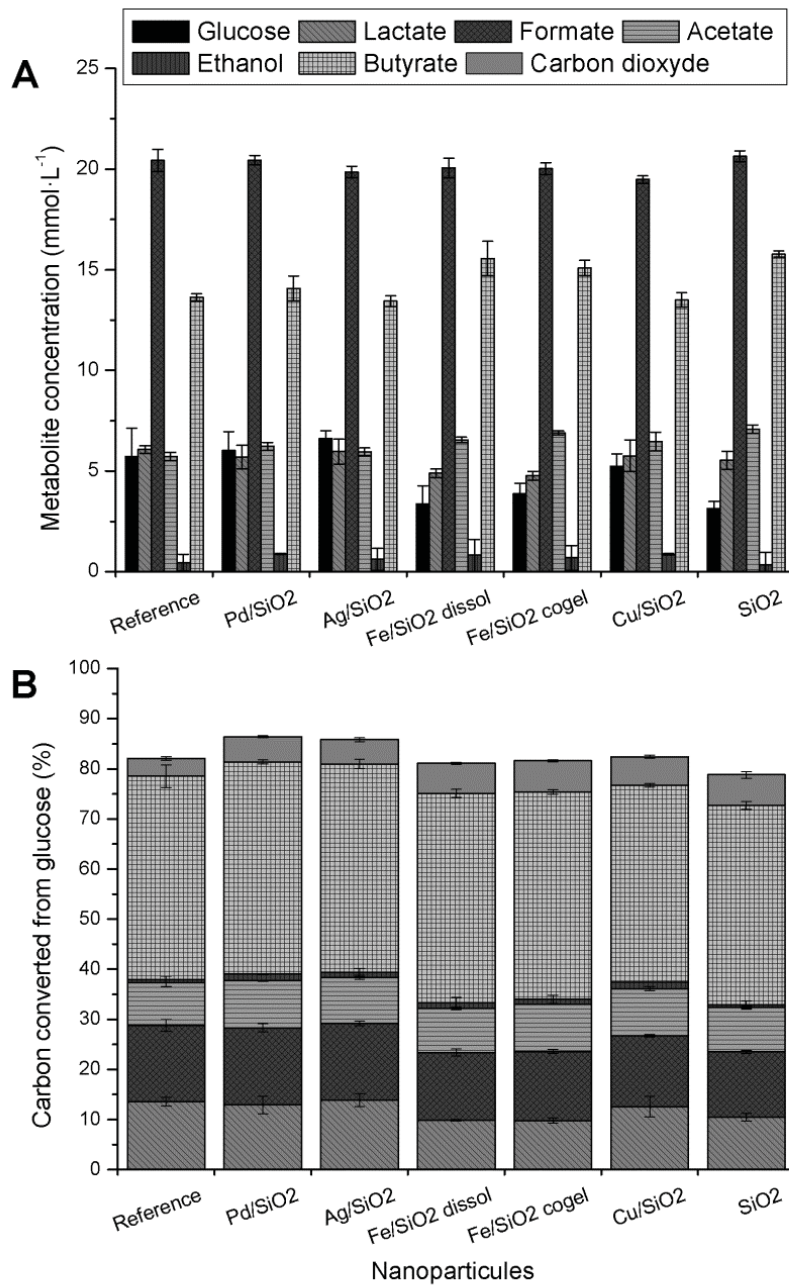


Figure VII - 2 : Investigation of hydrogen production by the pure *C. butyricum* in BHP tests with metallic NP. (A) Metabolites analysis (mmol·L<sup>-1</sup>) at the end of the fermentation (96h). (B) Carbon mass balance (%). The standard deviation bars are calculated on the triplicate experiments made for each condition.

## 3.2. Effect of iron oxide nanoparticles in AnSBR

### 3.2.1. Hydrogen production in the sequences without NP

An AnSBR was run over 14 sequences during 38 days in a 2.5 L tank reactor at a controlled pH of  $5.2 \pm 0.1$  (*i.e.* the optimal pH for hydrogen production from glucose by *C. butyricum* (Masset *et al.*, 2010)). The sequenced-batch operations were carried out by the sterile removals of the used medium (40% of working volume *i.e.* 1 L) and sterile additions of fresh media to reach  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of glucose. The first batch culture (F0) was followed by 6 sequences operated in classical condition *i.e.* without NP (from F1 to F6). It allowed the establishment of stationary conditions for the production of hydrogen and the concentration of metabolites. The effect of Fe/SiO<sub>2</sub> (dissol and cogel) catalyst was investigated in the further sequences with addition at a NP concentration equal to  $10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  at the sequence F7 and F9.

The cumulated 15 sequences produced a total of 47.85 L of hydrogen in 39 days and between 3 and 3.3 L for each sequence. The hydrogen concentration in the biogas was measured at  $54.8 \pm 2.8\%$ . Since the first batch sequence (F0) was performed at free pH (decreasing from 7.6 down to 5.2 and then regulated), it produced only 1.7 L of hydrogen. This illustrates the importance of the pH regulation and the difference between the BHP experiment and the sequences in controlled pH. By controlling the pH, the hydrogen production yields were improved from 1.2 to  $2.2 \pm 0.1\text{ mol}_{\text{hydrogen}}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  respectively for F0 and the following sequences (Figure 3). These performances are consistent with the results reported in similar conditions by Masset *et al.* (2010) However, the F0 sequence was important for growing the strain at higher pH with only 0.5 L of inoculum added whereas the next sequences began with 1.5L of rich culture medium (60% of it being kept in the bioreactor).



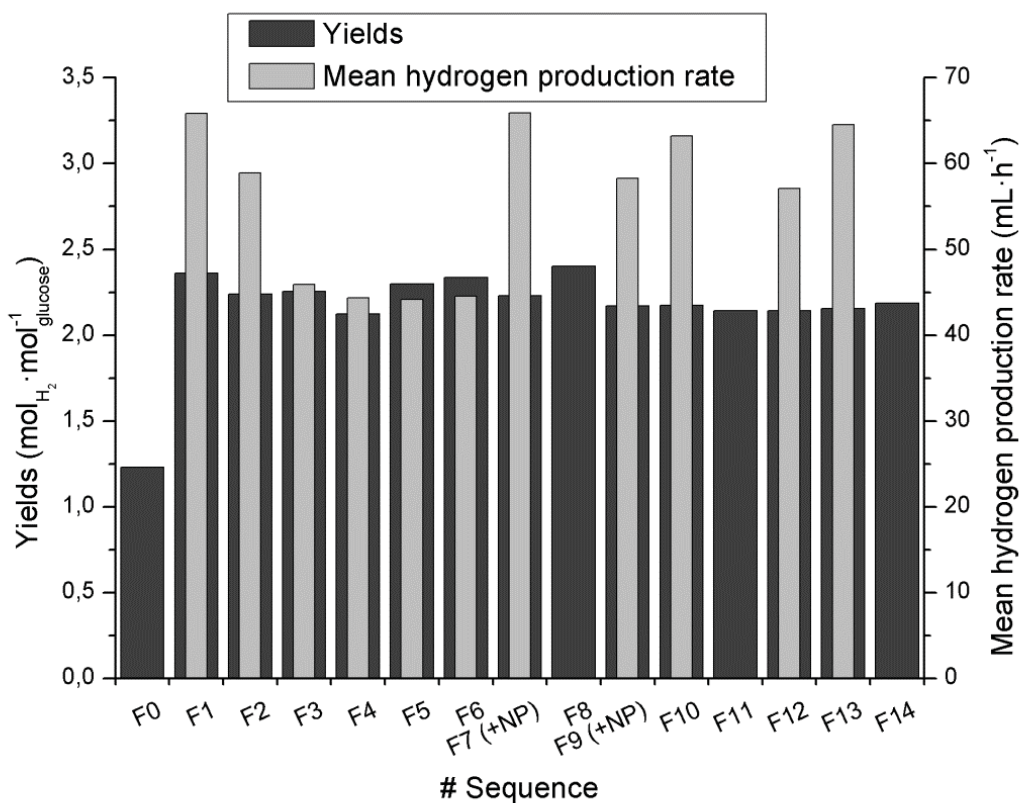


Figure VII - 3 : Yields and mean hydrogen production rates in 2.5 L AnSBR with *C. butyricum* and investigation on the effect of the addition of metallic NP. The Fe/SiO<sub>2</sub> NP were added at the sequence 7 and 9. HPR produced calculated at atmospheric pressure and 30°C.

In the successive sequences without NP, the yields did not show any significant difference. By contrast, the mean HPR showed an evolution. The mean HPR is estimated as the ratio between the volume of hydrogen produced and the total time of hydrogen production of the sequence. It should be noted that they were not calculated for F8, F11 and F14 since the elapsed production time for these sequences was overestimated. Figure 3 shows that it reached 65.8 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·h<sup>-1</sup> for F1 and then decreased with the establishment of equivalent conditions at the beginning of the sequences until F3. Indeed, considering the metabolites profiles on Figure 4, the stationary conditions were reached at F3 after an increase concentration of butyrate and acetate, whereas unfavourable metabolites as formate, lactate and, in a lower extent, ethanol decreased below 7 mmol·L<sup>-1</sup>. A similar evolution of the metabolites profiles have already been discussed elsewhere and showed comparable metabolites repartition and concentrations (Masset *et al.*, 2010). Moreover,

from F0 to F2, the total concentration of the metabolites was still at a low level and allowed the hydrogen production to occur rapidly without an important inhibition. On the contrary, when stationary conditions were met without NP (from F3 to F7), higher total concentration of butyrate and acetate slowed down the hydrogen production that established the mean HPR at  $44.7 \pm 0.8 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{h}^{-1}$  (Khanal *et al.*, 2004; Wang et Wan, 2009a).

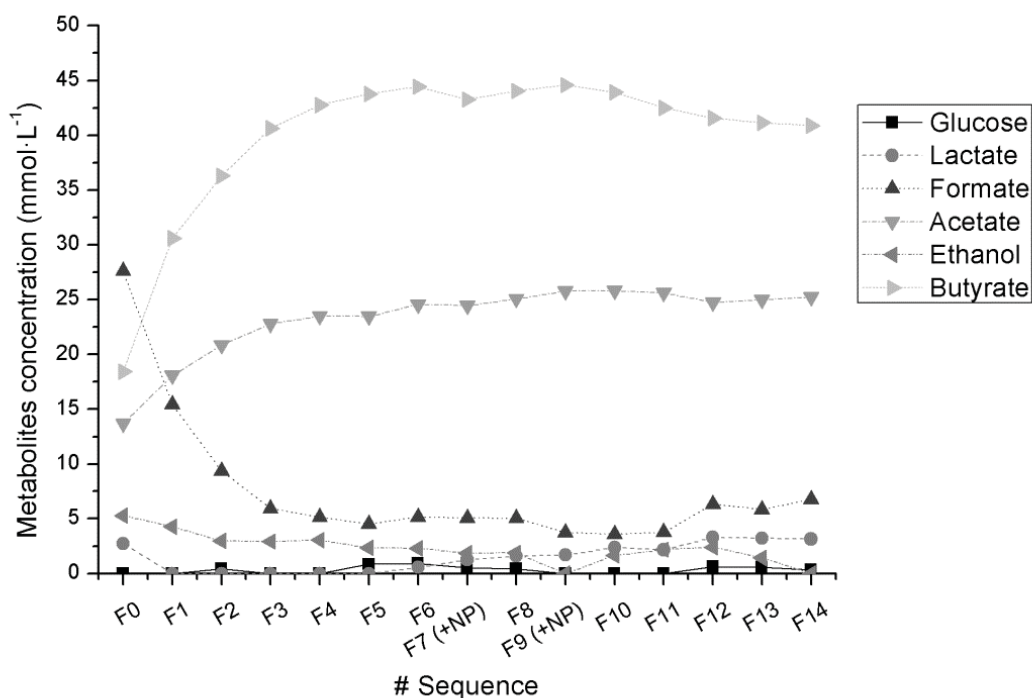


Figure VII - 4 : Evolution of the metabolites concentration during the investigation on the effect of Fe/SiO<sub>2</sub> NP added at the sequence 7 and 9 in the 2.5 L AnSBR on the production of hydrogen by *C. butyricum*.

The carbon mass balance also exhibit that no significant changes occurred, since the bacteria followed slightly the same metabolic pathways in the sequenced-batch mode (Table 3). The variations of concentration of the metabolites are then rather a consequence of the removal/addition operation than a change in the metabolic activity taken by the strain during its fermentation. Therefore, the batch sequence F0 and the two following sequences at controlled pH (F1 and F2) have to be considered as transition sequences. On the sequences from F3 to F6, a stable production of hydrogen was observed without NP.

Table VII - 3 : Comparison of the metabolites and CO<sub>2</sub> mass balance of the successive sequences without and with Fe/SiO<sub>2</sub> NP in the 2.5 L AnSBR. The NP were added at the sequences F7 and F9. Negative values correspond to a consumption of the metabolite.

	Carbon converted from glucose (%)					
	Lactate	Formate	Acetate	Ethanol	Butyrate	CO <sub>2</sub>
F1	-3.9	-0.8	13.4	1.1	55.7	26.2
F2	0	0.2	14	0.5	49.2	24.9
F3	0	0.2	14.3	0.5	51.2	25
F4	0	1.1	13.1	0.5	48.8	23.6
F5	0	0.6	13	0.42	47.7	25.6
F6	1.2	1.5	14.7	1.4	48.6	25.9
F7	2.1	1.4	14.2	1	43.9	24.7
F8	1.9	1.5	14	1.5	46.5	26.7
F9	1	0.5	14.4	2.2	44.8	24.1
F10	2.4	0.9	13.8	1.6	42.7	24.1
F11	1.5	2.4	14.1	1.5	42.9	23.8
F12	4	1.5	13.6	0.1	42.5	23.8
F13	2.8	4.0	14.5	1.1	45.7	23.9
F14	2.6	2.8	14.6	2.6	42.8	24.3
Mean value without NP (F3 – F6)	0.3 ± 0.6	0.8 ± 0.6	13.8 ± 0.8	0.5 ± 0.1	49.1 ± 1.5	25 ± 1
Mean value with NP (F7 – F14)	2.7 ± 1	2.7 ± 1	14.2 ± 0.5	1.3 ± 1	43.5 ± 1.5	23.9 ± 0.2

### **3.2.2. Hydrogen production in the sequences with NP addition**

At sequence F7 and F9, Fe/SiO<sub>2</sub> sample was added, each time at a final NP concentration 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>. The sequences after the addition of NP decreased the concentration of NP with the dilution step caused by the sequenced-batch operation.

The results show that the addition of iron oxide NP improved the mean HPR, from 44.7 ± 0.8 to 61.8 ± 3.9 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·h<sup>-1</sup>, whereas the yields remained the same at 2.2 ± 0.1 mol<sub>hydrogen</sub>/mol<sub>glucose</sub>. (Figure 3). Therefore, it is concluded that the addition of NP have a kinetic effect rather than a metabolic effect on the production of hydrogen. It played a role in the rate of hydrogen formation rather than on the metabolites pathways followed by the bacteria, as already underlined in the BHP tests. Indeed, the metabolic profiles and carbon mass

balance did not show any significant differences between the sequences without and with NP (Table 3). In both case, butyrate and acetate were the major metabolites, respectively at mean values of 10.2 and 18.3 mmol·L<sup>-1</sup> produced during the sequences. The other metabolites found at lower concentration were lactate, formate and ethanol, at respectively 0.5, 1.8 and 0.4 mmol·L<sup>-1</sup>. These values are in accordance with previous studies in similar conditions (Masset *et al.*, 2010). At optimal pH conditions, the metabolic pathway was clearly oriented toward the production of hydrogen allowing higher yields. This is shown with more than 42% of the carbon consumed converted in butyrate and 13% in acetate.

The second addition of NP did not result in a further increase of hydrogen production rate. However, for the sequences F10 to F14, the mean HPR was maintained at a higher level than without NP, even with the successive dilutions by the removal-addition of medium leading to a concentration of NP ten times less at F14 than F9. It is suggested that the NP were not metabolised by the bacteria but rather played a role of active catalytic site involved in the production of hydrogen. It is known that the hydrogen-producing bacteria need iron as a cofactor for hydrogenases synthesis (Chong *et al.*, 2009a; Karadag et Puhakka, 2010; Lee *et al.*, 2001). These authors evaluated the minimal iron requirement for the bacterial growth at 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>, but showed that the production of hydrogen could be enhanced by 5 to 10 times by increasing these concentration of a hundred to a thousand time. In comparison, the amount of iron added in the NP form is very low. On the one hand, a very low amount of iron was added with the NP and diluted with successive sequences. On the other hand, external iron ions were added as trace elements in the compounds contained in the fresh replacement solution, estimated at 2·10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> (Abelovska *et al.*, 2007). The total amount of iron oxide NP added at F9 represent only 7% of the external iron source concentration available in the nutrient medium. Therefore, it is more likely that the bacteria should consume the free ions in the medium and used the stable iron oxide NP encapsulated inside the porous silica matrix in another purpose to enhance the production of hydrogen. Moreover, it has been shown that free iron supplemented in the media had a clear effect on the rates rather than on the yields as it is observed in this study (Hamilton *et al.*, 2010).

A Gompertz modelling on the production of hydrogen was performed for each sequence with at least three volumetric data points (Figure 6). It confirmed the observation about the mean HPR. The maximum HPR reached a stable value after F3 in relation with the stabilization of the AnSBR. The mean values without NP from F3 to F6 reached a maximum HPR of  $98.9 \pm 9.6 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{h}^{-1}$ . The increase of the rate brought by the addition of NP is confirmed with a maximum HPR from F7 to F14 of  $214.5 \pm 33.9 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{h}^{-1}$ . By contrast, the maximum volume of hydrogen estimated by the Gompertz model slightly decreased from  $3.35 \pm 0.11$  to  $3.15 \pm 0.22 \text{ L}_{\text{H}_2}$  per sequence. As it was concluded from the mean H<sub>2</sub> rates, the effect of the NP was not lowered with the successive dilution after F9.

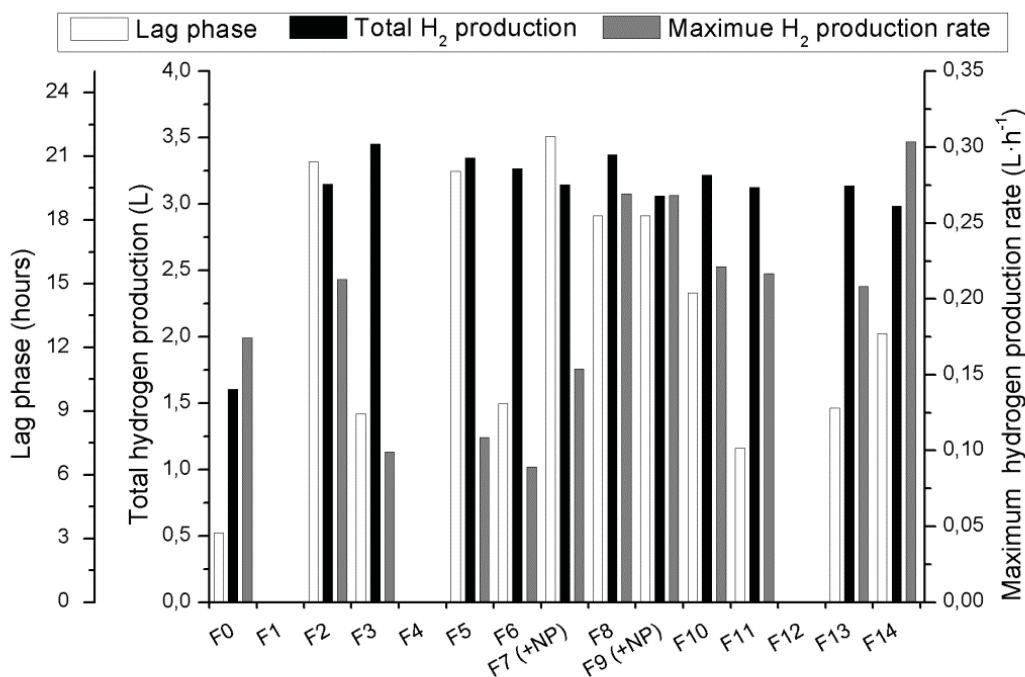


Figure VII - 5 : Application of the Gompertz model on the hydrogen production in the 2.5 L AnSBR with Fe/SiO<sub>2</sub> NP. (A) Gompertz coefficients adjusted for each sequence with at least three values measured and (B) mean Gompertz coefficients for the sequences without NP (F3 to F6) and with NP (F7 to F14).

### 3.3. General discussion

The effects of zero-valent gold NP were demonstrated on fermentative bioH<sub>2</sub> production by Zhang et Shen (2007) at a concentration of  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  : The more the size of NP decreases, the more the H<sub>2</sub> production increases. The

concentration of gold NP used by these authors ( $10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup>) was a hundred fold less than the concentration used in this work. In comparison with this work, 9 sequenced-batch operations after F9 should be achieved to reach the same concentration. Furthermore, the nature of NP in Fe/SiO<sub>2</sub> samples used in this study have been determined as mainly non-reduced iron oxide Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Heinrichs *et al.*, 2008). Therefore, considering the low concentration of NP and their ferric oxide state, it is suggested that the enhancement of the production of hydrogen with Fe/SiO<sub>2</sub> catalysts is related to a catalytic activity working in parallel with the enzymes involved in electron transfer as the hydrogenases, c-cytochromes or/and with extracellular electron mediators. Indeed, the immobilized iron oxide active sites could be used by the bacteria for oxidation/reduction chemical reaction (considering the redox couple Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>) to help the bacteria transferring faster its electrons without consuming or metabolising the iron as when it is added to the medium in a dissolved form. However, considering the small size of the iron oxide NP (around 3 nm), the surface effect is greatly enhanced and may improve the ability of the NP to react with electrons transported from mediators and transfer it efficiently to electron acceptor or eventually protons. *C. butyricum* is known to have c-type cytochromes on the outer cell surface that can transfer electron out of the cell (Park *et al.*, 2001). Interaction and electron transfers of *Clostridium* strains to metallic element have already been supposed in microbial fuel cells (MFC) where clostridia strains have often been isolated and identified (Lovley, 2008b; Park *et al.*, 2001). The NP would act as a chemical catalyst and may add efficiency in the biochemical hydrogen production process usually mediated only by enzymes in the cells for the production of hydrogen through the reduction of protons.

This mechanism supposes an efficient diffusion of the mediating-molecules allowed by the porous structure of the encapsulating-silica as demonstrated in the catalyst characterization by the authors (Heinrichs *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2004). Indeed, the pore size range being equal from two to several hundred nanometres, the pores would connect the outer medium of the silica matrix to the central iron oxide active site. It reinforces the assumption of mediated process since the bacteria should not come directly in contact with

the iron and therefore should use a redox intermediate to transport the electron from the cell surface to the active metallic oxide surface.

The precise role of iron oxide NP, their mechanism of action and their potential influence on the enzymatic activity will have to be investigated and confirmed in further work and will focus on links with hydrogenases activity and electron transfer mechanisms. The hypothesis of partial NP dissolution in the liquid medium has not been ruled out and attention should be brought to this subject in future studies. Indeed, if partial dissolution occurred, its proportion will have to be measured. However, no lowering effect was observed with successive dissolution in the AnSBR experiment, therefore limiting the hypothesis of NP dissolution. This work also opens the way to researches about combined catalytic and biological treatment for the bioremediation of soil pollution with substances such as aromatic or chlorinated compounds, since mechanism of electron transfer are highly important in such processes.

## 4. Conclusions

---

This study leads to a successful improvement of the biohydrogen production process by *C. butyricum* combined with encapsulated iron oxide NP added at very low amount ( $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>). Interactions with NP have been assumed since an enhancement of the HPR has been achieved. The production rates were improved by 38 and 113% in the batch or AnSBR mode respectively. By contrast, no significant change in the metabolic pathways was observed, regarding the yields or soluble metabolites distribution. The addition of the NP would improve the hydrogen production made by the bacteria through catalytic mechanism involving extra-cellular mediated-molecules.



## Commentaires complémentaires

---

Comme le montrent les résultats présentés dans cet article, des interactions semblent exister entre les bactéries et les particules solides. L'hypothèse développée ici présume que ces interactions sont en relation avec les transferts d'électrons depuis le métabolisme microbologique vers l'accepteur final afin de produire plus rapidement de l'hydrogène.

Cette théorie mérite néanmoins d'être approfondie et validée dans l'avenir. Par ailleurs, elle ouvre un vaste champ de recherches dont quelques thèmes sont dès à présent suivis par plusieurs chercheurs au CWBI (dans le cadre de leur thèse en cours, Alaa Eddin AlAhmed, Thibaut Masy et Wissal Wanoussa).

D'une part, la nature des interactions devra être étudiée et confirmée : la détection des éventuels intermédiaires transporteurs d'électrons, des protéines de surface ou cytochromes permettant ce transfert, etc. D'autre part, l'action catalytique de la nanoparticule pourra être approfondie : seuil minimum d'activité catalytique, mécanismes et modèles cinétiques, effets de la synthèse du catalyseur, pro ou antimicrobien.

Par ailleurs, cette recherche ouvre la voie à de nouvelles applications dans des domaines différents, allant de l'application à la production de biohydrogène. En effet, la combinaison de ces effets avec le procédé de méthanogenèse pourrait être envisagée. Par ailleurs, des applications seraient imaginables avec les procédés de bio-remédiation des sols. En effet, ces procédés font également appel à des mécanismes de transfert d'électrons facilités par des microorganismes qui consomment les molécules très polluantes (PCBs, composés (poly-)aromatiques, ...) et les dégradent en composés moins nocifs. Dans cet esprit, le transfert d'électrons amélioré par des nanoparticules, utilisées de surcroît en très faibles quantités, pourrait s'avérer extrêmement intéressant.



**5<sup>ème</sup> section – Discussion générale,  
conclusions et perspectives**



## **Chapitre VIII – Discussion générale**



Les résultats présentés dans les chapitres précédents font état de recherches visant une meilleure compréhension et une optimisation du procédé de production d'hydrogène par des bactéries anaérobies. Cette section de discussion générale permettra de rassembler les résultats des différents chapitres et d'effectuer, par la suite, une comparaison critique de ceux-ci par rapport aux recherches récentes menées par d'autres équipes à travers le monde.

Le premier sous-chapitre de cette section fera la synthèse des résultats présentés précédemment ainsi qu'un résumé des voies d'amélioration qui ont été abordées et proposées. Le second sous-chapitre rassemblera les performances publiées dans la littérature scientifique afin de pouvoir les comparer de manière critique à celles qui ont été obtenues au cours de ces travaux. Ceci permettra d'ouvrir la discussion sur les avancées réalisées et la manière avec laquelle il faudrait poursuivre la recherche pour implémenter la technologie de production d'hydrogène par microorganismes comme moyen à part entière de production, tant au point de vue économique que pratique. Le couplage avec d'autres procédés de production d'énergie, basé sur l'utilisation de microorganismes, sera ainsi exploré.

## 1. Synthèse des résultats de la thèse

### 1.1. Résultats pertinents sur les performances de production d'hydrogène

Les Tableaux 1 et 2 reprennent les principaux résultats présentés dans ce travail, en termes de performances de production d'hydrogène, c'est-à-dire en termes de rendements et de productivités. Ils sont classés selon le type de culture réalisée (batch ou (semi-) continue).

Tableau VIII - 1 : Synthèses des performances de production d'hydrogène obtenues dans les chapitres II à VII pour les cultures BHP (bouteille batch de 200 mL).

Condition	Rendement ( $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$ )	Productivité maximum ( $\text{mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Remarque	Chapitre de référence
<i>C. freundii</i>	0.25	-	Milieu MD (glucose)	II(3.3)
<i>C. butyricum</i>	0.53	-		
Mixed culture	0.38	-		
Sans agitation, sans NP	0.92 - 1.16	2.0 – 3.3	Milieu MDT ;	IV(3.1) – VII(3.1)
Agité	1.62	4.7 – 5.1	<i>C. butyricum</i>	IV(3.1)
Avec NP	1.08	3.5		VII(3.1)

Les performances obtenues en tests BHP (Tableau 1) permettent d'ores et déjà de faire plusieurs constatations importantes. L'utilisation d'un milieu MD, exempt de tampon phosphate, donne des performances nettement moins élevées que le milieu MDT (tamponné), soulignant l'importance du pH lors de la production d'hydrogène. En effet, lors de la fermentation anaérobie, la production d'AGV fait rapidement chuter le pH, à moins que celui-ci ne soit tamponné. Sans ce tampon phosphate ( $\text{pK}_a = 7.21$ ), les conditions deviennent très rapidement inhibitrices et empêchent d'atteindre des rendements satisfaisants. Ainsi, les valeurs atteintes dans le chapitre II(3.3) sont très modérées et en-deçà des valeurs de la littérature tel que cela sera montré par après. Au contraire, en milieu MDT, les rendements sont satisfaisants pour des cultures pures à pH libre. En outre, les améliorations apportées sur l'agitation des milieux ou l'apport de nanoparticules (NP) permettent, selon le moyen d'action, d'augmenter significativement soit les



rendements, soit les productivités. Ces tests BHP ne permettent pas d'obtenir des performances très élevées en raison du mode de production batch et de l'évolution du pH au cours de la culture, mais sont efficaces pour essayer et comparer de nombreuses conditions de milieux ou de cultures permettant de déterminer les facteurs montrant le plus d'influence sur la production d'hydrogène. Ces premiers tests BHP ont alors été prolongés dans des cultures à pH contrôlé, en réacteurs (semi-) continus.

Tableau VIII - 2 : Synthèses des performances de production d'hydrogène obtenues dans les chapitres II à VII pour cultures en bioréacteurs (AnSBR 2.3, 2.5 et 15 L et AnBdR)

Condition	Rendement ( $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$ )	Productivité spécifique ( $\text{mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Remarque	Chapitre de référence
AnSBR 2.3 L glucose	2.67	55 <sup>a</sup>	Culture pure	III(3.3)
AnSBR 2.3 L amidon	2.58	57 <sup>a</sup>		
AnSBR 2.3L glucose	1.19	28 <sup>a</sup>	Culture mixte	
AnSBR 2.3 amidon	1.17	33 <sup>a</sup>		
AnSBR 15 L glucose	1.73	32 <sup>a</sup>		
AnSBR 2.5 L 0 RPM	1.58	56 <sup>b</sup>	Culture pure, séquence à pH fixe	IV(3.2)
AnSBR 2.5 L 400RPM + dégazage N <sub>2</sub>	3.09	111 <sup>b</sup>		
AnBdR continu, P <sub>atm</sub>	2.18 – 2.48	526 – 596		V(3.4) – VI(3)
AnBdR, dépression	2.38 – 2.67	570 – 636	Culture mixte	VI(3)
AnBdR, surpression	1.79 – 1.89	433 – 473		
AnSBR 2.5 L sans NP	1.88 – 2.2	40 – 106 <sup>b</sup>	Culture pure, 400 RPM	IV(3.2) – VII(3.2)
AnSBR 2.5 L avec NP	2.2	88 <sup>b</sup>		

<sup>a</sup> Productivité spécifique moyenne calculée sur le temps total de la séquence

<sup>b</sup> Productivité maximum ajustée par le modèle de Gompertz

En bioréacteurs à pH contrôlé (Tableau II), deux mécanismes d'alimentation ont été expérimentés. L'AnSBR (alimentation batch séquencée) a permis d'observer l'effet de nombreux paramètres mais reste globalement limitant pour la productivité en hydrogène. En effet, dans ce mode de fonctionnement, il faut attendre la fin de la production d'hydrogène pour effectuer une étape de retrait-ajout de milieu permettant le redémarrage de la production. Ces interruptions sont évitées lors du fonctionnement continu, comme cela a été réalisé dans l'AnBdR (réacteur à biodisque). Les très bonnes performances obtenues sont notamment permises grâce à la fixation de la biomasse, évitant de ce fait le lessivage des microorganismes hors du bioréacteur et permettant

ainsi un net abaissement du temps de rétention liquide. Ce bioréacteur présente des productivités spécifiques très élevées en comparaison avec les réacteurs de 2.3, 2.5 et 15 L, grâce au faible volume liquide qu'il contient en permanence (300mL). Cependant, si on ramène la productivité au volume total du bioréacteur (2.3 L), les valeurs données dans le tableau sont multipliées par un facteur 0.13, ce qui donne des productivités spécifiques de l'ordre de  $70 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . On obtient dans ce cas les mêmes gammes de valeurs que les productivités maximales estimées par le modèle de Gompertz en AnSBR. En effet, dans les AnSBR, la production d'hydrogène suit une sigmoïde présentant une phase de latence, une production croissante de manière exponentielle et, enfin, un ralentissement de la production due à la limitation en substrats, modélisée par l'équation de Gompertz (Figure 1). Le paramètre de productivité maximale correspond à la tangente au point d'inflexion de la courbe, représentant la productivité que l'on pourrait espérer obtenir en fonctionnement continu.

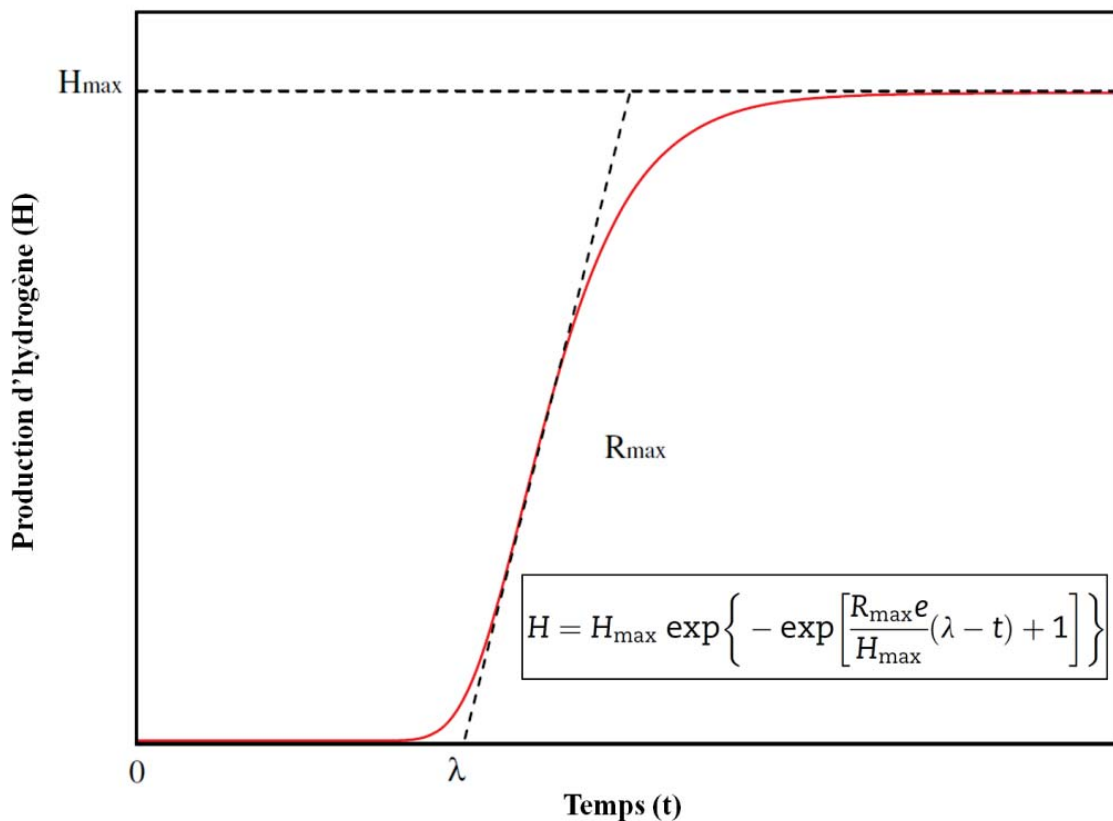


Figure VIII - 1 : Modélisation de la production batch d'hydrogène par l'équation de Gompertz, adapté d'après Wang et Wan (2009b).

Les cultures en bioréacteurs ont permis de se rendre compte de l'influence d'une culture pure par rapport à une culture mixte, cette dernière étant désavantagée puisqu'une partie de la source de carbone est consommée par les autres microorganismes sans production d'hydrogène. D'une manière générale, cette culture mixte a été associée à la perte de rendement et à l'apparition de métabolites non liés à la production d'hydrogène (hauts niveaux de lactate, formiate, éthanol, apparition de propionate). Au contraire, en culture pure, les bactéries productrices d'hydrogène, *C. butyricum* notamment, favorisent la production de butyrate et d'acétate lorsque les conditions permettent d'atteindre des rendements plus élevés. C'est notamment le cas pour les conditions fortement agitées et dégazées.

## **1.2. Améliorations proposées**

Rassemblées dans les 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> sections, les améliorations proposées et apportées au cours de ces travaux de thèse, dans le but de faire avancer les connaissances du procédé de production d'hydrogène par fermentation anaérobie vers des applications à plus grande échelle sont réparties en trois catégories. Ce travail est parti des connaissances et de l'expérience déjà acquises au sein du laboratoire, comme montré dans les travaux de thèse et travaux de fin d'études présentés par le passé. Ainsi, la sélection de souches performantes, l'optimisation du milieu de fermentation et des méthodes de conservation des souches, les méthodes de production en culture batch ou en bioréacteur et la détermination des paramètres importants à suivre et étudier sont des matières qui ont été considérées comme acquises au départ de ces travaux de thèse.

### **1.2.1. Les cultures mixtes**

Abordés dans la 2<sup>ème</sup> section, ces travaux ont permis d'observer le comportement de la production d'hydrogène en culture « mixte », c'est-à-dire en quittant le modèle de monoculture tel que cela avait été le plus souvent réalisé au CWBI. En effet, si le travail en culture pure permet une stricte comparaison des résultats en raison de l'invariabilité de la population microbienne étudiée, elle demande des précautions importantes de maintien des conditions stériles qui sont impraticables dès que l'on s'éloigne de très

petits volumes de production. Cela est d'autant plus vrai lors du passage en culture (semi-) continue à moyenne ou longue durée.

Les deux articles ont montré que ce passage en culture mixte a mené à la perte de rendements (de l'ordre de -30 à -50%), due au développement d'une population mixte consommant le glucose pour produire des métabolites non-liés à la production d'hydrogène. Les performances atteintes sont toutefois comparables, *\_sinon meilleures\_*, aux cultures mixtes obtenues à partir de sélections d'organismes sporulants (voir chapitre 1-5.1.1). Cependant, l'approche consistant à partir d'une culture pure de la souche performante *C. butyricum* mène à deux conclusions essentielles. D'une part, la production d'hydrogène se poursuit malgré le développement des autres microorganismes, cela signifiant que la souche est résistante et difficilement supplantée en culture mixte. D'autre part, grâce aux capacités de sporulation de la souche, ces recherches ouvrent la voie à l'utilisation de cette bactérie comme « starter d'hydrogène ». En effet, la production de *C. butyricum* en bioréacteurs, dans le but de créer une haute concentration cellulaire, se prête particulièrement bien à une application industrielle permettant le conditionnement de la souche sous forme sporulée afin d'être utilisée comme moyen de promotion pour le démarrage de la production d'hydrogène en condition anaérobie.

### **1.2.2. L'auto inhibition de l'hydrogène**

La 3<sup>ème</sup> section a permis une avancée essentielle tant au niveau fondamental que pratique. En effet, dans un premier temps, il a été montré que l'effet de l'hydrogène sur sa propre condition est lié à sa concentration sous forme dissoute (et non directement à la pression partielle en phase gazeuse comme cela est trop souvent affirmé dans la littérature), laquelle peut être diminuée en améliorant les conditions de transfert massique. Cette information est essentielle en ce sens qu'elle permet la compréhension des limitations de rendements atteints dans les systèmes à biomasse fixée, mais cela sera discuté par la suite. Cette étude montre également que l'hydrogène est un des paramètres essentiels à contrôler afin d'augmenter les rendements et d'orienter les voies métaboliques vers la production d'hydrogène. Le facteur de sursaturation du milieu a également été approché et devra être étudié plus

en profondeur afin de déterminer les moyens pour éviter les sursaturations locales dans le milieu.

Cela a également abouti aux études réalisées sur le réacteur à biodisque (AnBdR), permettant à la fois la fixation de la biomasse et le transfert efficace de l'hydrogène, en vue d'obtenir une augmentation des rendements et des productivités. Le comportement de ce réacteur ad'abord dû être maîtrisé, notamment au niveau du pH et de la population mixte qui s'y est développée, pour pouvoir, par la suite, en mesurer les performances en conditions « normales ». Cela a confirmé que son design avait un intérêt pour augmenter les performances par rapport aux bioréacteurs à cuves agitées, déjà bien maîtrisés au sein du laboratoire (rendements de l'ordre de  $1.7 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$  à  $2.5 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$ ), tout en améliorant les productivités. Par la suite, la pression totale ayant une influence sur le transfert massique de l'hydrogène a été modifiée et a montré l'effet escompté par le modèle de l'hydrogène dissout.

L'ensemble de cette section permet une généralisation et une uniformisation des phénomènes décrits par de nombreux auteurs. Cela est discuté en détails dans les différents articles, la littérature scientifique regorgeant d'exemples de modification des conditions d'agitation, de dégazage du milieu liquide ou de modification de la phase gazeuse menant à un changement au niveau du transfert massique et se traduisant par une meilleure ou moins bonne production d'hydrogène. Par le travail réalisé ici, tous ces articles peuvent être expliqués, ce qui, implicitement, valide la théorie développée sur le transfert massique et l'effet de l'hydrogène dissout. À l'avenir, cela devrait mener à l'application de cette théorie dans la conception des bioréacteurs, en tenant néanmoins compte des facteurs de coût de conception et de fabrication qui ne doivent pas être excessifs, au risque de rendre infaisable le procédé à grande échelle.

### **1.2.3. Interactions avec les particules solides et transfert d'électrons**

Cette 4<sup>ème</sup> section est peut-être celle qui présente les résultats d'expériences sans apporter de preuves au niveau fondamental. Et pourtant, de par son

originalité, elle ouvre le plus large champ de recherches proposé par ce travail. L'idée originale revient à comparer l'action des hydrogénases à celle des catalyseurs métalliques, tous deux permettant le transfert des électrons plus rapidement. Par ailleurs, les interactions entre des cellules bactériennes et des supports solides conducteurs d'électrons sont possibles et largement décrites dans la littérature scientifique dédiée à l'étude des piles à combustible microbiologique (MFC pour *Microbial Fuel Cells*). Partant de cette base de connaissances, une interaction entre *C. butyricum* a été montrée comme permettant l'accélération de la production d'hydrogène, bien que le mécanisme d'action n'ait pas été élucidé. Cette interaction montre, d'une part, que la bactérie est capable d'utiliser le catalyseur ajouté en très faible quantité, sans le consommer, pour accélérer sa production d'hydrogène et, d'autre part, que l'importance de cette accélération dépend de la nature du métal utilisé. Un sujet de recherche fondamental est dès lors ouvert pour comprendre par quel biais la bactérie arrive à profiter de l'ajout de ces particules dans le milieu liquide. Par ailleurs, outre une possible application pour la production d'hydrogène, dont l'intérêt économique devra être évalué et confirmé, cette recherche ouvre la voie à de nombreuses applications en rapport avec la microbiologie et même avec la synthèse des catalyseurs.

## 2. Comparaison avec la littérature scientifique

Afin d'être discutés de manière critique, les résultats de ce travail vont être comparés aux publications récentes et significatives de la littérature scientifique. Pour comparer ces recherches, les rendements sont ramenés en  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  et les productivités spécifiques en  $\text{L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{réact}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Bien sûr, les performances publiées parcourent un large éventail de technologies ainsi que l'a montré la première section de ce manuscrit. Ces performances seront donc classées selon le mode d'alimentation, le type de réacteur, les microorganismes et les substrats utilisés (Lin *et al.*, 2012).

### 2.1. Production phototrophe d'hydrogène

Selon le type de microorganismes utilisés, les procédés phototrophes réalisent la biophotolyse ou la photo fermentation, la seconde étant la seule qui nécessite l'apport de substrats en solution (Tableau 3).

Tableau VIII - 3 : Synthèse des performances de production des différentes technologies de production phototrophe d'hydrogène. Adapté d'après les revues de Chen *et al.* (2011), Dasgupta *et al.* (2010) et Eroglu et Melis (2011)

Organismes	Substrat carbone	Rendement (% du rendement maximal stœchiométrique)	Productivité ( $\text{mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Commentaire
Algues vertes ( <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , etc.)	Acétate, $\text{CO}_2$	-	0.6 – 5.8	Conditions de privation de soufre
Cyanobactéries ( <i>Anabaena</i> , <i>Spirulina</i> , etc.)	$\text{CO}_2$	-	4 - 20	Mutants génétiques
Photo fermentation ( <i>Rhodobacter sp.</i> , <i>Rhodospseudomonas sp.</i> , etc.)	Glucose, acétate, malate, lactate et autres AGV	20 – 75%	5 – 25.2  15.9 – 43.8 3.3 – 20 16 – 180	Etude sur les sources de carbone et de nutriment en trace Cellules immobilisées Bioréacteur à géométrie optimisée <sup>a</sup> Cultures continues <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Géométries de bioréacteurs envisagées : à flottation, tubulaire vertical ou annulaire, panneau vertical, plat à plan incliné, etc.

De nombreux paramètres varient entre les différentes études. Par ailleurs, ces recherches abordent souvent l'influence de modifications génétiques (sélections de mutants) permettant d'approcher au plus près la compréhension des mécanismes biomoléculaires et des chaînes de transport d'électrons permettant à la souche de maintenir sa croissance et de produire de l'hydrogène le plus efficacement possible. Cependant, cela a déjà été avancé précédemment, si les rendements de conversion des substrats sont largement supérieurs à la fermentation anaérobie, les productivités restent très limitées, même en fonctionnement continu, et impliquent l'utilisation de géométries de bioréacteurs parfois très complexes et difficilement transposables à grande échelle. Par ailleurs, ces cultures demandent un apport d'énergie lumineuse souvent d'origine électrique, impliquant également une dépense énergétique supplémentaire (rendement de conversion lumineuse < 1%). Enfin, il faut noter l'intolérance à l'oxygène, généralement produit par le métabolisme, de la plupart des microorganismes non-modifiés, nécessitant alors l'utilisation de moyens artificiels (privation de soufre, par exemple) pour produire l'hydrogène.

Cependant, l'étude et l'évolution de ces technologies ne sont certes pas dénuées d'intérêt. Elles sont intéressantes, d'une part, pour une meilleure compréhension fondamentale des mécanismes de production d'hydrogène utilisés par ces microorganismes et, d'autre part, dans la perspective de compléter d'autres biotechnologies énergétiques. Ainsi, les sous-produits solubles des fermentations anaérobies peuvent être alimentés dans une photoculture ou, *a contrario*, la production de biomasse phototrophe peut servir de substrat à la fermentation anaérobie, tel que cela sera discuté plus tard.

## **2.2. Dark fermentation (ou fermentation anaérobie)**

La fermentation anaérobie permet d'envisager la consommation d'une très large variété de substrats dans des conditions parfois très différentes d'une étude à l'autre. En effet, comme introduit dans la 1<sup>ère</sup> section, les gammes de pH et de température, les microorganismes et la manière de les sélectionner, mais aussi les géométries et la configuration de bioréacteurs permettent d'atteindre un très grand éventail de performances. Cependant, d'une



manière générale, les auteurs concilient difficilement une amélioration simultanée des rendements et les productivités des bioréacteurs. Dans la synthèse présentée ici, les performances seront classées selon le type d'alimentation (batch ou semi- continue), les microorganismes (cultures pures ou mixtes) et les substrats (sources de carbone artificielles et sucres simples ou provenant d'effluents industriels). Il faut également noter que les productivités étant influencées par la concentration des substrats (en culture batch) ou le taux d'alimentation organique (OLR) peuvent donc varier énormément d'une culture à l'autre. Néanmoins, l'analyse des performances atteintes dans la littérature scientifique permet de dessiner les grandes tendances de la production d'hydrogène par fermentation anaérobie et de les comparer aux résultats présentés au cours de ce travail.

Tableau VIII - 4 : Performances de production d'hydrogène en culture batch présentées dans la littérature scientifique, adaptés d'après les revues de Davila-Vazquez *et al.* (2008) ; Lee *et al.* (2011) ; (Li et Fang, 2007a) et Show *et al.* (2012).

<b>Organismes</b>	<b>Substrat</b>	<b>Rendement (<math>\text{mol}_{\text{H}_2} \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}</math>)</b>	<b>Productivité (<math>\text{mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}</math>)</b>
Anaérobie facultative ( <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , etc.)	Glucose, saccharose, maltose, amidon hydrolysé,	1.2 – 2.7	90 – 660
Anaérobies strictes ( <i>Clostridium sp.</i> , etc.)	Glucose, saccharose, xylose, amidon,	1.1 – 2.3	60 - 660
Thermophiles ( <i>Thermotoga sp.</i> , <i>Caldicellulosiruptor sp.</i> , etc.)	Glucose, saccharose, amidon	2 – 3.84	120 - 350
Boues anaérobiques adaptées (choc de température ou pH, etc.)	Glucose, saccharose, molasses, déchets de papeterie, eaux usées, etc.	0.8 – 1.7	192 - 480

Les cultures batch présentées dans le Tableau 4 illustrent les meilleurs résultats obtenus par les auteurs dans des conditions parfois bien particulières : contrôle du pH, retrait du biogaz en permanence, agitation du milieu. Par ailleurs, les hautes productivités sont le reflet de concentrations en substrats plus élevées que celles utilisées dans ce travail (de l'ordre de minimum  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glucose contre les  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  utilisés dans le milieu MDT). En détaillant les articles présentant ces résultats, de bonnes productivités dans les fermentations batch ne sont pas associées à de hauts rendements et vice

versa. Comme cela a déjà été abordé dans l'introduction, les cultures batch sont principalement utilisées pour effectuer des séries de tests d'influences de paramètres de cultures de manière rapide et efficace. Elles ne sont en aucun cas destinées à être portées à grande échelle en raison de leur caractère trop peu pratique pour leur mise en œuvre. Dès lors, c'est en observant les cultures (semi-) continues que sont approchées les conditions réelles de production d'hydrogène transposables à de plus grands volumes.

Tableau VIII - 5 : Performances de production d'hydrogène en bioréacteurs (semi-)continus en cultures mixtes mésophiles présentées dans la littérature scientifique, adaptés d'après les revues de Davila-Vazquez *et al.* (2008) ; Hawkes *et al.* (2007); Jung *et al.* (2011) et Li et Fang (2007a).

<b>Bioréacteur</b>	<b>Substrat</b>	<b>Rendements (mol<sub>H2</sub>mol<sub>hexose</sub>)</b>	<b>Productivité (mL<sub>H2</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)</b>
AnSBR *	Glucose, saccharose, amidon, eaux usées	1.05 – 1.75	20 - 400
CSTR* (HRT : 6 – 20 h)	Glucose, saccharose, xylose, amidon, eaux usées	0.32 – 2.24	50 - 3200
AnMBR* (HRT : 1 – 10 h)	Glucose, fructose, saccharose	1.27 – 1.71	370 - 2750
UASB* (HRT : 0.25 – 60 h)	Glucose, saccharose, amidon, déchets agro-industriels	0.75 – 2.47	100 - 7300
AFBR* (HRT : 0.125 – 9 h)	Glucose, saccharose	1.5 – 2.79	125 - 7600

\* AnSBR : Anaerobic Sequenced-Batch Reactor ; CSTR : Continuous Stirred Tank Reactor ; AnMBR : Anaerobic Membrane BioReactor ; UASB : Upflow Anaerobic Sludge Bioreactor ; AFBR : Anaerobic Fixed-Bed Reactor ; HRT : Hydraulic Retention Time.

Les cultures continues sont, sauf exception, étudiées avec des cultures mixtes provenant de boues anaérobies (soit depuis des installations de méthanisations ou des boues issues de sols) dont la population a été adaptée par traitement (chimique ou température) ou par sélection (en appliquant des temps de rétentions hydrauliques, ou HRT, très faibles). Le maintien d'une culture pure dans ce type de bioréacteur se heurte rapidement à des limitations pratiques qui sont dues aux conditions d'étanchéité et aux précautions d'utilisations trop importantes qu'il faut utiliser dans ce but.

Les bioréacteurs les mieux connus et maîtrisés, car déjà largement utilisés dans les procédés de digestion anaérobie notamment, tels que les UASB ou les CSTR, sont étudiés avec des substrats qui sont assimilés à des déchets

industriels (résidus de la fabrication de l'huile de palme, élevage de volailles, porcs ou bovins, eaux usées de brasserie, etc.). Pour les autres, des substrats synthétiques sont alimentés, parfois pour mimer le contenu des substrats industriels sur lesquels porte l'étude.

Les premiers paramètres d'étude mis en avant par les auteurs sont, outre la configuration géométrique du bioréacteur, le HRT, définissant ainsi la capacité optimale de traitement du système. Un temps de rétention optimal est défini, permettant le maintien de la biomasse dans le bioréacteur et la maximisation simultanée des rendements et des productivités. Cela fait d'ailleurs souvent l'objet d'un compromis, dans la mesure où les bioréacteurs atteignant de très hautes productivités doivent souvent se satisfaire d'un rendement moyen à relativement faible. Par ailleurs, le maintien de la biomasse dans le bioréacteur est rendu plus aisé pour de faibles HRT lorsque celle-ci est fixée et que, de ce fait, le temps de rétention liquide est découplé du temps de rétention solide.

Pour les CSTR, les temps de rétentions hydrauliques généralement atteints sont assez élevés (de l'ordre de 10 à 20 h) mais sont, néanmoins, plus faibles que les digesteurs anaérobies, en raison du taux de croissance des bactéries productrices d'hydrogène plus élevé. La formation de floccs ou agglomérats (tels que cela se produit naturellement dans les procédés de digestion anaérobie) permet, dans ces systèmes, de descendre jusqu'à des HRT de 6 à 8 h, tout en maintenant suffisamment de microorganismes dans le bioréacteur. Les réacteurs établissant un découplage des solides et des liquides dans les bioréacteurs permettent de diminuer spectaculairement les HRT minimums (jusqu'à 0.125 h) au profit de meilleures productivités mais aux dépens de bons rendements (diminuant aux alentours de  $1.2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$ ). Ceux-ci étant généralement maximisés pour des temps de rétentions intermédiaires de 5 à 10 h.

Enfin, les réacteurs à membranes se sont montrés, dans le passé, attractifs en raison des rendements très satisfaisants et des hautes productivités, mais se sont révélés peut adaptables à plus large échelle.

### 2.3. Discussion comparative

Comme cela a été abordé au chapitre 1.1, plusieurs des conditions abordées dans ce travail ont visé à l'amélioration des performances sur base des connaissances déjà acquises au sein du laboratoire. En comparaison avec la littérature, les cultures menées en mode batch (bouteilles BHP), les rendements atteints en cultures non améliorées (milieu MD, puis cultures MDT non agitées) sont comparables à celles montrées dans des conditions similaires de la littérature (de l'ordre de  $1.1 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$ ). L'amélioration des rendements obtenus grâce à l'agitation des bouteilles est également comparable aux résultats obtenus en culture pure avec des souches du genre *Clostridium*. Les productivités publiées par plusieurs auteurs sont nettement supérieures à celles obtenues ici (de 10 à 50 fois). Cependant, comme cela a déjà été avancé, ces meilleures productivités sont dues à de plus hautes concentrations en substrats dans les fermentations batch et à un contrôle du pH. En comparaison avec la méthode BHP développée par Lin *et al.* (2007), les résultats obtenus en bouteilles sont comparables en termes de productivité.

L'observation des bioréacteurs (semi-) continus apparaît plus intéressante en ce sens qu'elle permet de confirmer l'intérêt des méthodes développées du point de vue des rendements obtenus. Les réacteurs AnSBR agités et dégazés à l'azote obtiennent des rendements supérieurs aux  $1.75 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$  maximum atteints dans la littérature (de  $2.2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$  jusqu'à  $3.09 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{gluc}}^{-1}$ , ce dernier rendement n'ayant été atteint que dans des conditions similaires de dégazage ou dans des cultures thermophiles). Cela est néanmoins à mettre sur le compte de la culture pure de *C. butyricum*, dans la mesure où l'objectif de ces recherches était d'étudier les paramètres d'agitation ou d'ajout de NP en s'affranchissant de la population microbiologique cultivée. En culture mixte, les rendements atteints tiennent parfaitement la comparaison, illustrant la faisabilité d'un starter *Clostridium* afin de démarrer la production d'hydrogène avant de laisser le système se contaminer et développer une population mixte. À nouveau, les productivités moindres atteintes en AnSBR dans la littérature sont à mettre sur le compte de bioréacteurs AnSBR dont les étapes d'ajout-retrait de milieux se font, dans la littérature, avec plus de substrats et de manière plus fréquente (avec un

pseudo HRT approchant les 24 heures, contre près de quatre fois plus dans la méthode mise en place ici).

Dans la culture continue mise en place dans ce travail (AnBdR), et malgré la population mixte installée dans le bioréacteur, les rendements atteints sont très bons en comparaison avec la littérature. Et les productivités tiennent simultanément la comparaison, renforçant les conclusions tirées dans les chapitres V et VI, à savoir que l'AnBdR et la technique d'augmentation de la surface d'échange permettent de maximiser ces deux indicateurs de performances. Cependant, comme cela a été mis en avant dans le chapitre V, l'originalité géométrique du bioréacteur le rend difficilement adaptable tel quel à plus grande échelle. Le temps de rétention hydraulique expérimenté dans l'AnBdR était de 3.5 heures. Au vu de ces performances, ce réacteur pourrait être classé dans la catégorie des AFBR, réacteurs plus récents et plus complexes dont les technologies restent encore largement à l'échelle du laboratoire.

### 3. Couplage et intégration du procédé

---

Il semble évident que les bioréacteurs qui seront développés dans le futur permettront le découplage des temps de rétention solide et liquide afin de permettre d'atteindre des productivités suffisantes pour rendre le réacteur intéressant en termes de volume. En effet, plus sa capacité de traitement augmente, plus un petit réacteur (et un faible investissement) permettra une production rapide d'hydrogène. Cependant, comme cela a été discuté, les rendements pour de hautes productivités sont généralement diminués, résultant en une difficulté plus grande de rentabiliser l'installation. Dans ce cadre, le coût des matières premières est déterminant et la possibilité de traiter des déchets, avec un coût négatif, permettrait à la commercialisation du bioprocédé de production de bioH<sub>2</sub> de tenir la route. Cependant, la fermentation anaérobie n'est pas un traitement ultime puisqu'elle s'accompagne du rejet en solution d'une concentration non-négligeable de composés organiques solubles, l'effluent nécessitant dès lors un traitement supplémentaire avant d'être rejeté dans l'environnement. En effet, en observant les différents bilans carbones présentés dans les chapitres de résultats, seuls 15 à 20% du carbone contenu dans le substrat carboné est évacué sous forme de CO<sub>2</sub>, le reste étant rejeté en solution (et nécessitant alors un traitement supplémentaire) ou transformé en biomasse pour la croissance bactérienne (alors récupérable sous forme de boues).

Dès lors, il faut considérer la production de biohydrogène comme une partie d'un procédé biologique plus général permettant, *in fine*, l'épuration du substrat carboné et la coproduction d'énergie. Cette méthode de traitement est essentiellement destinée au traitement des charges organiques largement diluées (eaux à haute DCO, pour Demande Chimique en Oxygène). En effet, pour la biomasse solide présentant un plus haut taux de matière sèche, des méthodes thermochimiques se révèlent plus avantageuses (matériaux ligno-cellulosiques notamment).

Le couplage avec d'autres technologies est donc un élément essentiel permettant l'évolution vers une gestion intégrée des fluides énergétiques et des déchets (Guwy *et al.*, 2011). Des choix technologiques seront à réaliser en connaissance de cause et à adapter aux cas particuliers (type et quantité de

substrats alimentés, intérêt de réutilisation de l'énergie produite, etc.). Mais, dans tous les cas, l'arrivée de ces technologies couplées viserait le même objectif : l'épuration des eaux usées par l'abatement de la DCO, la diminution des émissions de gaz à effet de serre et la réduction de la dépendance énergétique vis-à-vis des sources fossiles.

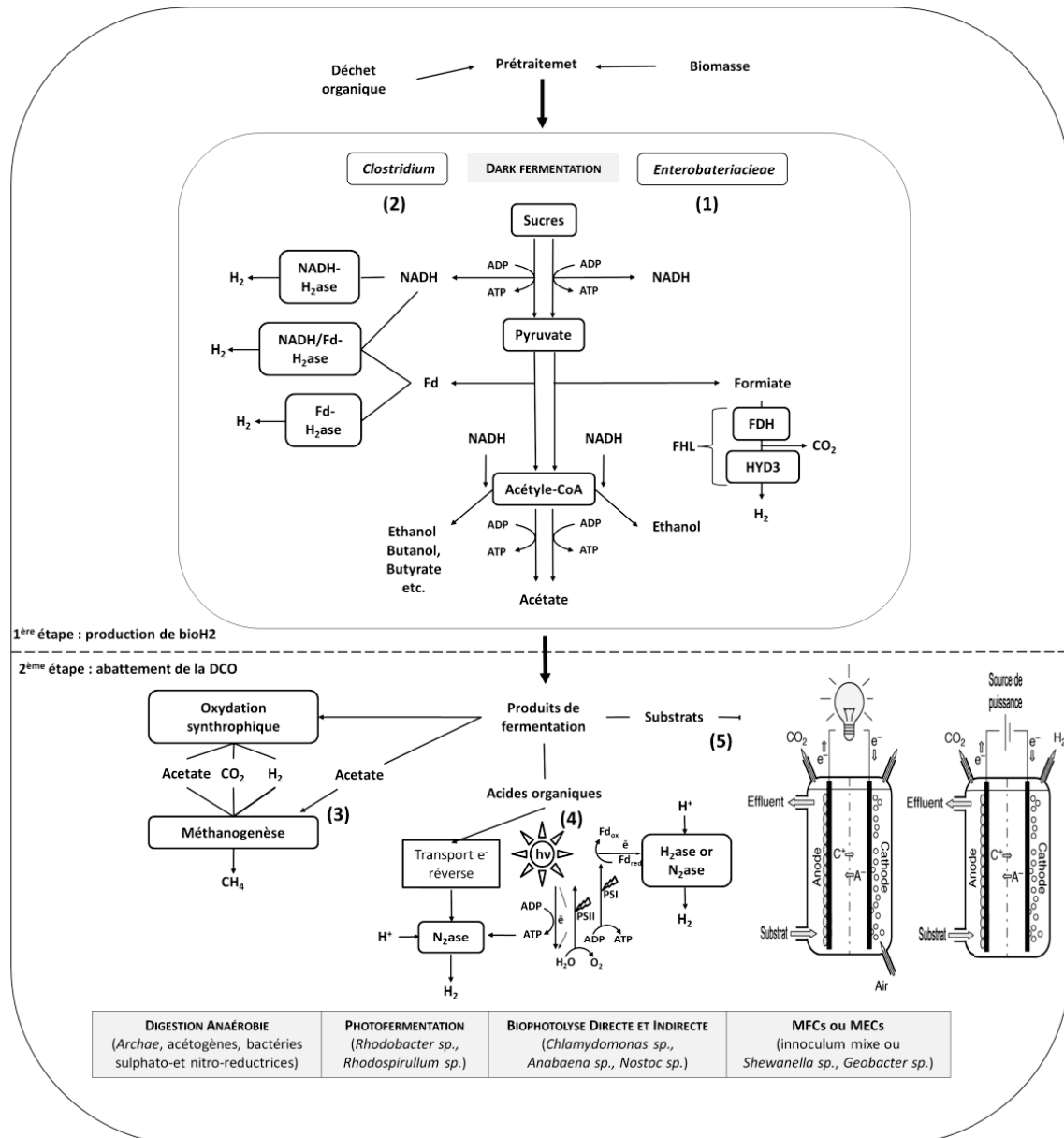


Figure VIII - 2 : Système multi-étape visant une conversion énergétique maximale du substrat en hydrogène et méthane ou en électricité. Après le traitement de la biomasse (étape limitante), afin de la décomposer en sucres simples, la première étape est la dark fermentation productrice d'hydrogène, soit par les *Enterobacteriaceae* (1), soit par les bactéries du genre *Clostridium* (2). Dans les deux cas, il y a relargage d'AGV qui seront utilisés comme substrat à la seconde étape. Dans un digesteur anaérobie (3), l'acétate et autres composés en solution (oxydés en acétate par les différentes communautés de microorganismes) serviront de substrats à la

méthanogène. Les effluents liquides, encore riches en contenu azoté, pourront servir comme fertilisants naturels. Les procédés phototrophes **(4)**, utilisant l'énergie lumineuse, peuvent aussi consommer les molécules organiques en solution en photo fermentation ou en biophotolyse. Enfin, les piles à combustibles microbiologiques (MFC pour Microbial Fuel Cells), les cellules d'électrolyse microbiologique (MEC pour Microbial Electrolysis Cells) **(5)** peuvent également consommer les substrats en solution par l'intermédiaire des populations de microorganismes attachées aux électrodes, soit pour produire une différence de potentiel électrique, soit de l'hydrogène lorsqu'un générateur complète les microorganismes pour électrolyser l'eau. Figure adaptée d'après Hallenbeck et Ghosh (2009).

### **3.1. Couplage avec la biométhanisation**

La dark fermentation productrice d'hydrogène ayant été isolée à partir du procédé de digestion anaérobie, c'est logiquement et naturellement en associant ces deux technologies que l'on pourrait arriver à maximiser les récupérations énergétiques d'une manière élégante. La DF a été proposée pour l'abattement de la DCO contenue dans les déchets semi-liquides organiques riches en carbohydrates, tels que les déchets alimentaires, le petit lait de fromageries, les eaux usées de la fabrication d'huile d'olive ou le résidu de la fabrication de l'huile de palme, les déchets ménagers, etc. (Appels *et al.*, 2008; Coalla *et al.*, 2009; Converti *et al.*, 2009; El-Mashad et Zhang, 2010; Kabouris *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006; Ting et Lee, 2007; Ueno *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008). L'avantage d'une telle approche est qu'elle repose sur la digestion anaérobie dont la technologie est d'ores et déjà bien connue et utilisée industriellement pour l'épuration des eaux. La combinaison des deux technologies est avantageuse par rapport au seul procédé méthanogène car elle permet d'accélérer l'ensemble du procédé et de maximiser la récupération énergétique. En effet, en séparant les étapes productrices d'hydrogène et de méthane, il est possible d'adapter, dans chacun des bioréacteurs, les conditions de fermentation optimales (pH plus faible pour la dark fermentation, température plus élevée pour la méthanogène) et, de la sorte, de porter ces deux étapes au maximum de leur productivité et de leur rendement.

Plusieurs essais ont déjà été portés à l'échelle pilote. Ainsi, un procédé en deux étapes a été développé en UASB suivi pendant 120 jours (Han *et al.*, 2005). Les auteurs ont montré une efficacité d'épuration de plus de 70% à un taux d'alimentation organique de  $12.5 \text{ kg}_{\text{COD}} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{jour})^{-1}$ . Les productivités



présentées dans une autre étude ont atteint  $5.4 \text{ m}^3_{\text{H}_2} \cdot (\text{m}^3_{\text{reacteur}} \cdot \text{jour})^{-1}$  et  $6.1 \text{ m}^3_{\text{CH}_4} \cdot (\text{m}^3_{\text{reacteur}} \cdot \text{jour})^{-1}$  avec une efficacité d'abattement de la DCO de 80%. Ces exemples montrent que la combinaison des deux procédés permet d'augmenter l'énergie récupérée sous forme de biogaz et l'abattement de la DCO en comparaison avec les procédés en une seule étape. La récupération de deux gaz de nature différente pourra, dans un futur proche, être valorisée énergétiquement en cogénération dans un moteur ou une turbine, sans nécessiter une méthode énergivore pour extraire le gaz des bioréacteurs, contrairement aux procédés de production d'éthanol de première et seconde génération, par exemple, dont la distillation requiert une quantité importante d'énergie pour parvenir à un produit non dilué.

### 3.2. Couplage avec la photo fermentation

Un autre moyen attrayant pour augmenter le rendement total de conversion énergétique du contenu organique contenu dans les eaux usées est le couplage de la dark fermentation avec la photo fermentation ou la biophotolyse directe (bactéries pourpres ou algues vertes). Un procédé à deux étapes permet d'atteindre un meilleur rendement et permet de diminuer l'apport d'énergie lumineuse apportée au système. La seconde étape de ce système permet la consommation des acides organiques, par exemple avec les souches *Rhodobacter sp.* (Afsar *et al.*, 2011; Argun *et al.*, 2008b; Chen *et al.*, 2008b; Keskin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Redwood et Macaskie, 2006). Néanmoins, ces technologies demandent encore des recherches au niveau du moyen de couplage des deux procédés. En effet, en effectuant une co-culture des microorganismes hétérotrophes et phototrophes, la turbidité du milieu augmente rapidement, limitant alors l'efficacité d'apport de lumière aux microorganismes et nécessitant l'application de bioréacteurs aux géométries complexes. Au contraire, le fonctionnement en deux étapes séparées permet d'améliorer les conditions de fermentation mais requiert un investissement plus important ainsi que des moyens de contrôle des deux étapes de fermentation.

Plusieurs essais ont également été portés au niveau pilote. Les co-cultures ont permis d'atteindre des rendements de  $2.76 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ , soit une augmentation de 105% par rapport à la culture pure de souches fermentatives (Vatsala *et al.*, 2008). Un procédé en deux étapes dans des bioréacteurs de

1.48 m<sup>3</sup> ont augmenté les rendements de 317% par rapport à la seule première étape (Ren *et al.*, 2009). Ces résultats permettent de produire un biogaz composé uniquement d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> et surtout exempt de méthane. Cependant, la production de biomasse cellulaire doit également faire l'objet d'un traitement ultérieur (séchage et conversion énergétique ou digestion anaérobie).

### **3.3. Couplage avec les cellules bioélectriques**

Une dernière forme de couplage envisagée dans la littérature scientifique est d'utiliser les composés résiduels en solutions après la dark fermentation comme substrats pour alimenter des cellules bioélectriques. On distingue deux fonctionnements de ce type de cellule : la MFC (pile à combustible microbiologique) et la MEC (cellule d'électrolyse microbiologique). Leur fonctionnement est similaire en ce sens que les différentes populations de microorganismes oxydent les AGV et dirigent les électrons issus de cette réaction vers une électrode métallique, soit par contact direct avec l'électrode, soit par l'intermédiaire de molécules transporteuses d'électrons. Dans les MFC, cela crée une tension électrique capable de créer un courant électrique en associant plusieurs cellules. Dans les MEC, on ajoute au circuit une tension extérieure (~ 0.2 V) afin de permettre l'électrolyse de l'eau dans l'autre compartiment de la cellule, mais avec une tension moindre que dans une cellule électrolytique classique, résultant en la production supplémentaire d'hydrogène. Ces technologies ont récemment reçu beaucoup d'attention car elles peuvent utiliser une large gamme de substrats et fonctionner dans des conditions très variées.

Cependant, les intensités électriques ou productivités en hydrogène sont très faibles pour le volume utilisé par la cellule bioélectrique. L'amélioration des électrodes (matériaux, surface spécifique) et la compréhension des mécanismes de transfert des électrons depuis la cellule jusqu'à la surface de l'électrode sont des éléments essentiels à l'amélioration des performances de ces cellules. Leur flexibilité en alimentation permettent néanmoins d'atteindre de très bonnes capacités d'abattement de la DCO, à savoir, jusqu'à 95% de la charge organique initiale (Oh et Logan, 2005). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont montré l'intérêt des couplages avec les MFC et MEC pour la

dégradation de la cellulose, permettant de produire à la fois de l'hydrogène dans la première étape du procédé et de co-générer de l'électricité dans la seconde (Wang *et al.*, 2011).

### **3.4. Autres pistes d'intégration de technologies**

D'autres techniques de couplage sont envisageables, même si nettement moins étudiées. En effet, la production d'hydrogène peut également être un moyen de traitement d'autres procédés biologiques. Dans ce cas, il faut, bien sûr, garder à l'esprit que l'abattement de la DCO est loin d'être complet et nécessiterait une étape complémentaire de traitement. Néanmoins, la dark fermentation de la biomasse produite dans des photo-réacteurs à haut rendement permettrait une valorisation énergétique intéressante de ce procédé. En effet, l'objectif de ces technologies est de produire rapidement une haute concentration d'algues grâce à leur photosynthèse, c'est-à-dire en consommant du CO<sub>2</sub>. Le produit de cette production est utilisable à des fins énergétiques. Cependant, le séchage de cette biomasse, en vue de l'utiliser dans des chaudières, est énergétiquement contradictoire au regard de la quantité d'énergie nécessaire pour évaporer l'eau du produit filtré afin de le rendre apte à la combustion. Dès lors, la dark fermentation de cette biomasse pour produire de l'hydrogène est envisageable, tout comme cela est déjà plus fréquemment étudié en couplage avec la digestion anaérobie. Ces procédés ont cependant un avenir non négligeable puisqu'ils font partie des bioénergies de quatrième génération, permettant la production d'énergie sans avoir recours à l'utilisation de biomasse végétale (alimentaire ou non, ou encore ligno-cellulosique). Dans ce même esprit, la digestion des boues activées produites en station d'épuration des eaux usées pourrait être une piste utile de production d'énergie renouvelable.

## **4. Potentiel industriel et faisabilité du procédé**

---

### **4.1. Contexte d'application du bioprocédé**

Les avancées scientifiques au niveau fondamental sont les premières étapes à franchir dans le but de permettre des améliorations de performances nécessaires pour imaginer l'utilisation du procédé biohydrogène à l'échelle industrielle. Les voies proposées dans cette recherche constituent quelques pistes de travail. Mais la technologie devra, à l'avenir, faire partie d'un système complet et intégré visant à la production de vecteurs énergétiques « verts ». Cette évolution est envisageable si, et seulement si, les avancées scientifiques sont conjuguées à la volonté politique et la possibilité économique de réaliser la société hydrogène.

Tout d'abord, les études scientifiques manquent encore de réalisations à moyenne ou grande échelle sur le long terme. Cela est pourtant une condition *sine qua non* pour éveiller l'intérêt d'investisseurs qui reposera sur des preuves de fonctionnement sur la durée, étant donné les investissements que des installations de production de biohydrogène demanderaient. Actuellement, les études les plus longues ont été réalisées sur des périodes allant de quelques mois à un an. Les volumes les plus larges étudiés approchent les quelques mètres cubes maximum, la plupart des pilotes ayant un volume de quelques dizaines à centaines de litres. Par ailleurs, comme cela a été discuté, le procédé devra montrer sa faisabilité en intégration avec une seconde technologie de valorisation énergétique. Cette conception devra tenir compte du type de substrat à dégrader, de sa concentration, de sa quantité, etc.

Ensuite, le monde politique devra probablement montrer un intérêt franc et massif pour l'hydrogène afin de favoriser l'émergence de ces technologies. Cela pourrait arriver avec une prise de conscience importante de l'urgence environnementale dans laquelle la planète se trouve. Cependant, le contexte macro économique actuel pousse plutôt les politiques à oublier cet aspect pour régler prioritairement les problèmes sociaux et économiques. Pourtant, une politique forte d'incitants fiscaux en faveur de la production d'énergie renouvelable, mais aussi de vecteurs énergétiques plus verts, pourrait amener rapidement des solutions à des problèmes économiques, sociaux et

environnementaux (création d'une plus-value, d'emplois et d'énergie verte en une seule fois). Plusieurs États prévoient l'arrivée de l'hydrogène et développent des plans d'investissement massifs en faveur des technologies qui tournent autour de cet élément.

De nombreux autres facteurs technologiques influenceront l'apparition du biohydrogène dans nos sociétés, résidant principalement en les moyens d'utilisation de l'hydrogène (développement des piles à combustible) et de stockage. Des marchés de niches sont d'ores et déjà identifiés, tels que le secteur automobile, celui du transport local ou du traitement individuel des eaux usées.

## **4.2. Potentiels et barrières économiques**

Actuellement, l'augmentation du prix des ressources fossiles (gaz naturel, pétrole et charbon) utilisées comme sources d'hydrogène dans les procédés thermochimiques rend les moyens alternatifs de production d'hydrogène à partir de biomasse de plus en plus attractifs. Néanmoins, la conception d'un procédé de biohydrogène ne permet de dégager une certaine rentabilité que lorsque certaines conditions sont rencontrées. Actuellement, les techniques traditionnelles de production d'hydrogène « fossile » (gaz naturel et charbon) permettent de produire 1kg d'hydrogène (soit 119.9 MJ, environ équivalent à 1 gallon d'essence) pour respectivement 2.33 – 4 \$ et 0.36 – 1.83 \$ (Bartels *et al.*, 2010). Les technologies de production renouvelable d'hydrogène (biomasse, nucléaire, solaire, éolien) permettent d'envisager des coûts de production de l'ordre de respectivement 1.44 \$, 1.84 \$, 5.78 \$ et 2.27 \$. Certaines de ces technologies pourraient donc être déjà compétitives avec les méthodes classiques de production. Cependant, seul le biohydrogène fermentatif permet d'ajouter à la production d'hydrogène un « service » de digestion des matières organiques, apportant dès lors une plus-value au procédé. C'est seulement dans ce cadre que celui-ci peut être défini comme rentable.

En effet, le choix du substrat est un point essentiel afin de permettre la faisabilité du procédé à grande échelle. L'utilisation d'un substrat coûteux ne permet pas d'envisager une rentabilité du procédé. Ainsi, deux voies s'ouvrent quant aux substrats qu'il faudra envisager dans un procédé

biohydrogène. D'une part, les substrats à coût négatif, c'est-à-dire les eaux usées nécessitant un traitement d'abattage de la DCO, constituent un premier moyen d'arriver à la rentabilité du procédé. D'autre part, l'utilisation de biomasse ligno-cellulosique est également envisageable dans le futur. Cependant, ce substrat nécessite des prétraitements chimiques ou biologiques rendant actuellement cette perspective assez éloignée.

Plusieurs business-plans de production de biohydrogène ont été étudiés dans la littérature scientifique et sont encourageants pour l'avenir de cette technologie. Les défis restent cependant nombreux (Levin et Chahine, 2010; Li *et al.*, 2012; Ljunggren et Zacchi, 2010; Nath et Das, 2004b). À Taiwan, le traitement d'eaux usées de brasseries pour la production de méthane et d'hydrogène par fermentation anaérobie montre un taux annuel de retour de 30 à 80%, selon la technologie envisagée (UASB ou CSTR), la taille du bioréacteur (de 50 à 400 m<sup>3</sup>) et du système d'évaluation utilisé. La taille optimale du bioréacteur a été déterminée à environ 50 m<sup>3</sup>. Les effluents alimentés dans le bioréacteur devraient être suffisamment concentrés afin de pouvoir limiter le volume nécessaire au plan de méthanisation qui souffre plus rapidement de washing out des microorganismes et requiert des temps de séjour plus long. Selon les hypothèses retenues, un tel système coûterait de l'ordre de 3 à 6 \$ par kg d'hydrogène produit et serait autosuffisant énergétiquement parlant, permettant de produire, sous forme de biogaz, de l'ordre de quelques centaines de KW à une dizaine de MW d'hydrogène, selon la dimension de l'installation envisagée. Cela permet de traiter les effluents d'industries agro-alimentaires de taille moyenne (quelques dizaines de tonnes de matière sèche par jour). Par comparaison, les technologies de photo fermentation demandent des surfaces de production nettement plus importantes pour atteindre les mêmes puissances d'installation (de l'ordre de plusieurs centaines de m<sup>2</sup>), rendant les coûts fixes extrêmement importants (plus de 90% de l'investissement annuel) En outre, les coûts de productions s'avèrent plus faibles (1.5 à 2 \$ par kg) car, dans le cas de la biophotolyse, les substrats ne doivent pas y être apportés. Le couplage avec la dark fermentation augmente substantiellement les coûts de production (jusqu'à 3.5 \$ par kg) mais permet d'accélérer l'ensemble du procédé.

Cependant, l'utilisation du biohydrogène produit doit faire l'objet de toutes les attentions en vue d'être soit consommé (combustion avec le méthane, requérant une désulfuration, ou utilisation en pile à combustible) ou injecté sur un réseau hydrogène (adaptation aux normes du réseau). Ces infrastructures supplémentaires engendrent des coûts et nécessitent surtout la commercialisation de ces structures de consommation d'hydrogène, ce qui sera, dans les années à venir, la barrière principale à l'application de ces technologies à grande échelle.

### **4.3. La recherche fondamentale**

Outre les perspectives d'application des procédés de production d'hydrogène par voie microbiologique, la recherche fondamentale sur le sujet n'a pas à être laissée en reste. Quelques voies ont été explorées au cours de ce travail, mais de nombreux domaines sont encore à investiguer en profondeur.

D'une part, l'utilisation des souches du genre *Clostridium* pour la production de biocarburant liquide fait l'objet de nombreuses recherches. En effet, placé en conditions de pH particulières, ce genre a la possibilité de réaliser la solvantogénèse, permettant la production d'éthanol ou de butanol. Ce dernier carburant liquide (une fois raffiné) présente un intérêt particulier au vu de sa haute densité énergétique en comparaison avec la plupart des carburants liquides (essence, diesel, éthanol, etc.). Cette voie de production est étudiée en particulier sur certaines souches telles que *C. beijerinckii* ou *C. acetobutylicum*.

D'autre part, les recherches approchant l'ingénierie métabolique et les outils biomoléculaires constituent également un large champ d'investigation qui pourrait permettre la compréhension de nombreux phénomènes biochimiques prenant place lors de la production d'hydrogène. D'une manière indirecte, cela permettrait donc d'améliorer la production d'hydrogène en observant, au plus près de la cellule, la manière dont celle-ci réagit à telle ou telle condition de fermentation. Ces différentes perspectives ont déjà été présentées dans le chapitre I. Il faut noter que plusieurs travaux ont été réalisés au laboratoire, notamment dans le cadre du projet MicroH2.





## **Chapitre IX – Conclusions et perspectives**



## 1. Conclusions

---

La production de biohydrogène par voie microbiologique, et plus particulièrement par fermentation anaérobie, est, aujourd’hui, une technologie largement cantonnée au niveau du laboratoire. Plusieurs raisons pour expliquer cet état de fait ont été avancées dans ce manuscrit : les performances actuellement atteintes ne sembleraient pas suffisantes, le système énergétique actuel ne trouverait pas d’intérêt dans la production d’hydrogène, les coûts de production resteraient trop importants. Et pourtant, le biohydrogène est régulièrement cité comme l’un des moyens qui permettra, à l’avenir, une diversification de la production d’hydrogène et qui pourra être utilisé dans le traitement des eaux usées, notamment. Plus précisément, c’est aujourd’hui, en association avec d’autres procédés de production de bioénergie, que le biohydrogène serait le plus attractif et avantageux. Par exemple, la digestion anaérobie offrirait une grande complémentarité avec le biohydrogène, ce qui permettrait à la fois d’accélérer globalement le traitement des matières organiques et d’augmenter les rendements énergétiques, de par l’optimisation des deux étapes du procédé intégré (biométhane + biohydrogène).

Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à l’étude de plusieurs voies d’optimisation et d’application du bioprocédé, poursuivant l’objectif d’une application future à plus grande échelle. Ces travaux ont été réalisés en laboratoire et montrent une transition entre une approche fondamentale (cultures pures, optimisation des paramètres de culture et détermination des facteurs d’influence) et une approche plus appliquée (cultures mixtes, techniques de contrôle et de maintien de la production d’hydrogène sur le moyen et long terme, évolution vers des volumes plus importants).

D’un point de vue fondamental, ces travaux ont abordé deux thèmes de recherches ayant tous les deux mené à une amélioration des performances de production de l’hydrogène. D’une part, l’effet inhibiteur de l’hydrogène sur sa propre production, même s’il avait déjà été cité dans la littérature scientifique à de nombreuses reprises, a pu être démontré et mis en relation avec les conditions de transfert massique et avec la concentration en hydrogène sous

forme dissoute. Un effet sur le métabolisme bactérien a été mis en avant, permettant ainsi une nette amélioration des rendements et, dans une moindre mesure, des productivités. Par la suite, ces résultats ont été mis en application dans un bioréacteur à biodisque. D'autre part, l'ajout en très faibles concentrations de nanoparticules métalliques encapsulées a montré une accélération de la production d'hydrogène. Les déductions tirées de ces recherches, concernant la structure, la concentration et la nature des nanoparticules, ont permis d'avancer plusieurs hypothèses concernant le mécanisme d'interaction entre microorganismes et particules solides. Ainsi, le transfert d'électrons issus du métabolisme de consommation de glucose serait facilité par l'intermédiaire de médiateurs redox permettant une accélération de la réaction au niveau des sites catalytiques des nanoparticules. Ces déductions restent néanmoins très théoriques et feront l'objet de plusieurs vérifications fondamentales et perspectives de recherches, ainsi que cela sera proposé plus tard.

D'un point de vue appliqué, cette recherche s'est d'abord attardée sur le travail en culture mixte plutôt qu'en culture pure. Si cette dernière possède de nombreux avantages au niveau du laboratoire, le principal étant la reproductibilité des cultures et des résultats, la culture mixte est le seul type de fermentation envisageable à plus grande échelle pour des raisons pratiques évidentes. Cependant, le passage d'une seule souche bactérienne à une culture mixte n'est pas sans risque pour le maintien de la production d'hydrogène à moyen ou long terme. Par ailleurs, la souche *Clostridium butyricum* est particulièrement rapidement inhibée par l'oxygène et l'introduction de microorganismes aérobies facultatifs permettrait d'atteindre aisément les conditions d'anaérobiose requises pour la production d'hydrogène sans utilisation d'agent réducteur artificiel et coûteux. Les résultats ont montré que le passage d'une culture pure vers une culture mixte suite à une contamination opportuniste du milieu de culture a entraîné une diminution des rendements de conversion en hydrogène de 30 à 50%. Cela a été attribué à la consommation du substrat par les microorganismes non producteurs d'hydrogène. Cependant, les performances atteintes sont comparables aux résultats obtenus en cultures mixtes, publiés dans littérature scientifique, Par ailleurs, le maintien de la production d'hydrogène a été

réalisé sur plusieurs semaines de fermentation sans altération des performances après l'établissement de la culture mixte. Ensuite, un bioréacteur en fonctionnement continu a été testé sur le long terme, également en culture mixte. Ce réacteur à biodisque résulte, entre autres, des recherches sur l'hydrogène dissout présentées ci-dessus. Ce réacteur a montré un fonctionnement sur de longues périodes à de très hautes performances (productivités et rendements). Par ailleurs, l'analyse de la population microbienne a été réalisée afin de mettre en évidence le développement de plusieurs souches bactériennes productrices d'hydrogène fonctionnant en consortium dans le bioréacteur. Les travaux sur ce bioréacteur ont montré l'attention à porter au design d'un bioréacteur pour la production d'hydrogène en vue d'augmenter les performances.

L'ensemble des résultats a permis des avancées significatives du bioprocédé pour évoluer vers une application à plus grande échelle. Ces recherches ouvrent également la voie à de nombreuses recherches et essais d'application faisant l'objet de perspectives présentées ci-dessous.

## 2. Perspectives

---

Ces perspectives de recherches consistent en quelques pistes mises en lumière au cours de ces travaux de thèse. Elles abordent de nombreux thèmes, reflétant l'aspect multidisciplinaire que revêt ce sujet d'étude. Au niveau fondamental, de nombreuses zones d'ombre restent à investiguer, comme en témoignent les nombreux articles qui sont aujourd'hui publiés sur le sujet. Du point de vue pratique, la recherche devra évoluer vers une mise en oeuvre pratiques du procédé, en privilégiant probablement certaines pistes plus porteuses.

Les perspectives mises en évidence dans la 2<sup>ème</sup> section (consacrée à l'étude des cultures mixtes et des substrats) sont énoncées ci-dessous.

- L'étude des populations microbiennes productrices d'hydrogène constituent un vaste champ de recherches dont les techniques de caractérisation se multiplient. La méthode de sélection d'une population, mise en évidence dans ce travail, se basait sur une première étape en culture pure avant de laisser celle-ci être contaminée par des souches opportunistes. Cette technique devra faire l'objet d'une étude au niveau de la biologie moléculaire fin de pouvoir quantifier les populations en présence, mais aussi leur évolution dans le temps.
- Le but sera de valider le maintien des souches productrices d'hydrogène, voire de sélectionner celles qui résistent le mieux aux changements imposés par l'arrivée d'autres microorganismes. Les techniques de qPCR et RT-qPCR pourront s'avérer d'une grande aide dans ce domaine.
- Il faudra également étudier la réalisation et la méthode de conditionnement des starters de *Clostridium* qui pourraient servir de point de départ à une production d'hydrogène. Tout d'abord, il faudra définir les paramètres de culture pour augmenter la concentration cellulaire en vue de permettre la mise en oeuvre des techniques de *downstream processing* (séchage, formulation, etc.) afin de réaliser des starters viables. Par ailleurs, leur efficacité devra être vérifiée en fonction des conditions utilisées. Enfin, la production demandera une étude de coûts, de rentabilité et de faisabilité.

- L'étude portant sur la diversification des sources de carbone pour la production d'hydrogène pourra être étendue en deux temps. D'une part, les substrats plus complexes (amidon, pentoses, composés cellulosiques) pourront être abordés en évoluant vers de la matière de plus en plus complexe. La sélection de microorganismes possédant les complexes enzymatiques nécessaires à la digestion de ces substrats pourra s'avérer nécessaire, de même que l'utilisation de méthodes de dégradation chimique ou enzymatique. D'autre part, les eaux usées pourront faire l'objet d'une attention particulière car elles concentrent de nombreuses sortes de substrats dans une même solution. Ces eaux pourront être synthétiques ou industrielles et permettront ainsi de proposer quelques pistes d'applications pour des industries en activité.
- Les moyens de couplage avec d'autres technologies devront aussi faire l'objet d'une attention particulière, puisqu'il a été dit que, actuellement, le procédé de production de biohydrogène semble peu envisageable s'il n'est pas associé à un autre procédé bioénergétique. Au CWBI, cela peut notamment être envisagé en couplage avec la digestion anaérobie, le laboratoire possédant une certaine expérience en la matière. Par ailleurs, le projet MicroH<sub>2</sub>, bien que touchant à sa fin à la fin de l'année 2012, a mis en place une collaboration avec les laboratoires étudiant le biohydrogène photosynthétique, ce qui pourrait également faciliter le couplage avec cette technologie.
- L'évaluation du prix de revient selon le système de production et le substrat envisagé devra également faire l'objet d'une étude complète afin de concrétiser la faisabilité économique du procédé et de proposer quelques recommandations en vue de le réaliser de la manière la plus efficace possible (choix de technologies, etc.). Par ailleurs, le procédé pourra aussi faire l'objet d'une étude environnementale en comparaison avec d'autres moyens de production et/ou de traitement des eaux usées, via des outils tels que l'analyse par cycles de vie (LCA), par exemple.
- Enfin, le bioprocédé envisagé devra être soumis à un *scaling-up* afin pour vérifier la tenue des performances sur de grands volumes (échelle pilote). Au CWBI, cela est par exemple envisagé dans un bioréacteur de 650 L à cuve agitée alimenté en mode SBR. La réalisation pratique demandera néanmoins d'adapter les moyens de mesure du biogaz produit, de pratiquer le contrôle de la température et de l'agitation, etc.

Dans la 3<sup>ème</sup> section, portant sur l'effet inhibiteur de l'hydrogène sur sa propre production et l'application de cette étude sur le réacteur à biodisque, les perspectives avancées portent principalement sur une certaine continuité avec la démarche qui a été suivie pour la conception et la mise en œuvre de ce réacteur original.

- Le réacteur à biodisque (AnBdR) a permis le développement d'un biofilm sur la surface du cylindre rotatif, permettant par ce biais une fixation de la biomasse. L'étude de la formation du biofilm pourrait constituer un sujet d'étude à part entière, afin d'éventuellement envisager d'autres moyens de fixation de la biomasse ou d'optimiser les supports d'immobilisation. Par ailleurs, la répartition dans l'espace de la biomasse fixée pourrait faire l'objet d'études, tel que cela est envisagé par Julien Masset au CWBI dans ses travaux de thèse (en cours), notamment via l'application de techniques biomoléculaires telles que l'imagerie FISH.
- Par ailleurs, le design d'un bioréacteur, qui prendrait en compte l'importance du transfert massique mais qui présenterait une géométrie plus conventionnelle (et dès lors envisageable à plus grande échelle), pourra être réalisé. Une idée serait, par exemple, d'utiliser un lit fixe arrosé, permettant à la fois la fixation de la biomasse et un échange liquide-gaz optimisé par une grande surface d'échange.
- Le réacteur à biodisque, mais aussi tout nouveau bioréacteur qui verrait le jour, devrait faire l'objet d'applications ou d'adaptations des modèles mathématiques utilisés pour la description de la digestion anaérobie. Le modèle ADM-1, présenté par l'IWA, pourrait par exemple servir de base de travail. Le paramètre de l'hydrogène dissout devrait aussi être intégré au modèle afin de permettre, d'une part, la description des phénomènes influençant la production et, d'autre part, la prédiction des résultats attendus dans telle ou telle condition.
- Au niveau biomoléculaire, les outils développés par Magdalena Calusinska et Christopher Hamilton dans leur thèse respective, pourraient être utilisés pour suivre quantitativement l'expression enzymatique des hydrogénases en fonction de la concentration en hydrogène dissout. Des résultats très prometteurs sont en effet à



chercher dans cette voie au vu de ceux qui ont déjà été mis en évidence dans les travaux de ces auteurs.

Enfin, comme cela a déjà été avancé, la 4<sup>ème</sup> section ouvre la voie à de nombreuses recherches futures et domaines d'applications :

- Tout d'abord, les hypothèses avancées concernant les mécanismes d'interaction des nanoparticules avec les microorganismes devront être investiguées : recherche des médiateurs chimiques et suivi des flux d'électrons. Par ailleurs, l'effet de la nature du métal utilisé, de la quantité, de la mise en forme du catalyseur, pourra faire l'objet d'études complètes afin de distinguer et de préciser les différents phénomènes prenant place dans ces interactions.
- Les effets positifs des nanoparticules sur des microorganismes pourront être envisagés dans d'autres domaines de recherches : les MFC, la bioremédiation des sols, la méthanisation. En effet, ces différentes technologies environnementales font également intervenir des transferts d'électrons issus du métabolisme bactérien vers des molécules ou électrodes. Dans ces domaines aussi, les nanoparticules pourraient montrer des effets d'amélioration des mécanismes de transfert électronique. Cependant, l'utilisation des nanoparticules dans des procédés environnementaux devra également faire l'objet d'une attention particulière afin de ne pas engendrer de nouveaux problèmes dus à l'utilisation des ces particules aux propriétés encore largement insoupçonnées.



## **Chapitre X – Bibliographie**



## Chapitre X – Bibliographie

- Abbasi, T., Abbasi, S.A. (2010). Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**(3), 919-937.
- Abbasi, T., Abbasi, S.A. (2011). 'Renewable' hydrogen: Prospects and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**(6), 3034-3040.
- Abelovska, L., Bujdos, M., Kubova, J., Petrezselyova, S., Nosek, J., Tomaska, L. (2007). Comparison of element levels in minimal and complex yeast media. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**(4), 533-535.
- Abo-Hashesh, M., Wang, R., Hallenbeck, P.C. (2011). Metabolic engineering in dark fermentative hydrogen production; theory and practice. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8414-8422.
- Aceves-Lara, C.A., Latrille, E., Buffiere, P., Bernet, N., Steyer, J.P. (2008). Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chemical Engineering and Processing*, **47**(11), 1968-1975.
- Aceves-Lara, C.A., Latrille, E., Steyer, J.P. (2010). Optimal control of hydrogen production in a continuous anaerobic fermentation bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10710-10718.
- Afsar, N., Özgür, E., Gürkan, M., Akköse, S., Yücel, M., Gündüz, U., Eroglu, I. (2011). Hydrogen productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steam peels hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(1), 432-438.
- Ahn, Y., Park, E.J., Oh, Y.K., Park, S., Webster, G., Weightman, A.J. (2005). Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiology Letters*, **249**(1), 31-38.
- Akhtar, M.K., Jones, P.R. (2008). Engineering of a synthetic hydF-hydE-hydG-hydA operon for biohydrogen production. *Analytical Biochemistry*, **373**(1), 170-172.
- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., Wijffels, R.H. (2002). Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1195-1208.
- Akutsu, Y., Lee, D.Y., Li, Y.Y., Noike, T. (2009). Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(13), 5365-5372.
- Allahverdiyeva, Y., Leino, H., Saari, L., Fewer, D.P., Shunmugam, S., Sivonen, K., Aro, E.M. (2010). Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(3), 1117-1127.
- Amend, J.P., Shock, E.I. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**(2), 175-243.
- Andrews, J., Shabani, B. (2012). Re-envisioning the role of hydrogen in a sustainable energy economy. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(2), 1184-1203.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Domiguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, **22**(9), 477-485.
- Antoni, D., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**(1), 23-35.
- 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.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J., Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**(6), 755-781.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, F.K., Oztekin, R. (2008a). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(7), 1813-1819.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K. (2009a). Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(10), 4305-4311.

## Chapitre X - Bibliographie

- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K. (2008b). Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter* species at different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(24), 7405-7412.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K. (2009b). Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(5), 2195-2200.
- Arooj, M.F., Han, S.K., Kim, S.H., Kim, D.H., Shin, H.S. (2008). Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(22), 6509-6514.
- Arriaga, S., Rosas, I., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(5), 3442-3449.
- Arslan, D., Steinbusch, K.J.J., Diels, L., De Wever, H., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M. (2012). Effect of hydrogen and carbon dioxide on carboxylic acids patterns in mixed culture fermentation. *Bioresource Technology*, **118**(0), 227-234.
- Asada, Y., Miyake, J. (1999). Photobiological hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**(1), 1-6.
- Babu, V.L., Mohan, S.V., Sarma, P.N. (2009). Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(8), 3305-3312.
- Badiei, M., Jahim, J.M., Anuar, N., Sheikh Abdullah, S.R., Su, L.S., Kamaruzzaman, M.A. (2012). Microbial community analysis of mixed anaerobic microflora in suspended sludge of ASBR producing hydrogen from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(4), 3169-3176.
- Bagchi, B., Dey, S., Bhandary, S., Das, S., Bhattacharya, A., Basu, R., Nandy, P. (2012). Antimicrobial efficacy and biocompatibility study of copper nanoparticle adsorbed mullite aggregates. *Materials Science and Engineering C*, **32**(7), 1897-1905.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(6), 2573-2579.
- 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. (2011). Revivability of fermentative hydrogen producing bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(3), 2086-2092.
- Balat, H., Kirtay, E. (2010). Hydrogen from biomass - Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(14), 7416-7426.
- Balat, M. (2009a). Political, economic and environmental impacts of biomass-based hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(9), 3589-3603.
- Balat, M. (2009b). Possible Methods for Hydrogen Production. *Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects*, **31**(1), 39-50.
- Barreto, L., Makihira, A., Riahi, K. (2003). The hydrogen economy in the 21st century: a sustainable development scenario. *International Journal of Hydrogen Energy*, **28**(3), 267-284.
- Barros, A.R., de Amorim, E.L.C., Reis, C.M., Shida, G.M., Silva, E.L. (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.
- Bartels, J.R., Pate, M.B., Olson, N.K. (2010). An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(16), 8371-8384.
- Barton, B.E., Olsen, M.T., Rauchfuss, T.B. (2010). Artificial hydrogenases. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**(3), 292-297.

## Chapitre X – Bibliographie

- Basak, N., Das, D. (2009). Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* OU001 in an annular photobioreactor: A case study. *Biomass & Bioenergy*, **33**(6-7), 911-919.
- Bastidas-Oyanedel, J.R., Mohd-Zaki, Z., Zeng, R.J., Bernet, N., Pratt, S., Steyer, J.-P., Batstone, D.J. (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, **110**(0), 503-509.
- Bastidas-Oyanedel, J.R., Aceves-Lara, C.A., Ruiz-Filippi, G., Steyer, J.P. (2008). Thermodynamic Analysis of Energy Transfer in Acidogenic Cultures. *Engineering in Life Sciences*, **8**(5), 487-498.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. (2002). *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)*. IWA Publishing.
- Beckers, L., Hilgsmann, S., Hamilton, C., Masset, J., Thonart, P. (2010). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWB11009 and *Citrobacter freundii* CWB1952 in pure and mixed cultures. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, **14**, 541-548.
- Berberoglu, H., Pilon, L. (2010). Maximizing the solar to H-2 energy conversion efficiency of outdoor photobioreactors using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(2), 500-510.
- Bernard Seguin, B., Soussana, J.F. (2008). Greenhouse gas emissions and climate change: causes and consequences observed for agriculture and animal production. *Courrier de l'Environnement de l'INRA*(No.55), 79-91.
- Bianchi, L., Mannelli, F., Viti, C., Adessi, A., De Philippis, R. (2010). Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(22), 12216-12223.
- Bičáková, O., Straka, P. (2012). Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(16), 11563-11578.
- Bocci, E., Zuccari, F., Dell'Era, A. (2011). Renewable and hydrogen energy integrated house. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(13), 7963-7968.
- Bockris, J.O.M. (2002). The origin of ideas on a Hydrogen Economy and its solution to the decay of the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(7-8), 731-740.
- Bramono, S.E., Lam, Y.S., Ong, S.L., He, J. (2011). A mesophilic *Clostridium* species that produces butanol from monosaccharides and hydrogen from polysaccharides. *Bioresource Technology*, **102**(20), 9558-9563.
- Briguglio, N., Andaloro, L., Ferraro, M., Di Blasi, A., Dispenza, G., Matteucci, F., Breedveld, L., Antonucci, V. (2010). Renewable energy for hydrogen production and sustainable urban mobility. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(18), 9996-10003.
- Cai, G., Jin, B., Monis, P., Saint, C. (2011a). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, **29**(4), 375-387.
- Cai, G., Jin, B., Saint, C., Monis, P. (2011b). Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. *Journal of Biotechnology*, **155**(3), 269-274.
- Cai, G.Q., Jin, B., Saint, C., Monis, P. (2010). Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(13), 6681-6690.
- Cakir, A., Ozmihi, S., Kargi, F. (2010). Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(24), 13214-13218.
- Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., Wilmotte, A. (2010). The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. *Microbiology*, **156**(6), 1575-1588.
- Calusinska, M., Joris, B., Wilmotte, A. (2011). Genetic diversity and amplification of different clostridial [FeFe] hydrogenases by group-specific degenerate primers. *Letters in Applied Microbiology*, **53**(4), 473-480.
- Calusinska, M., Savichtcheva, O., Masset, J., Hamilton, C., Thonart, P., Wilmotte, A. (2009). Application of molecular techniques to monitor biohydrogen production by different bacterial consortia (*Clostridium* spp.) in a Bioreactor. *New Biotechnology*, **25**, Supplement(0), S199-S200.

## Chapitre X - Bibliographie

- Camara, J.M., Rauchfuss, T.B. (2012). Combining acid–base, redox and substrate binding functionalities to give a complete model for the [FeFe]-hydrogenase. *Nat Chem*, **4**(1), 26-30.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(7), 5591-5601.
- Castello, E., Santos, C.G.Y., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(14), 5674-5682.
- Castro-Villalobos, M.C., García-Morales, J.L., Fernández, F.J. (2012). By-products inhibition effects on biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(8), 7077-7083.
- Cetinkaya, E., Dincer, I., Naterer, G.F. (2012). Life cycle assessment of various hydrogen production methods. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(3), 2071-2080.
- Chang, J.J., Chou, C.H., Ho, C.Y., Chen, W.E., Lay, J.J., Huang, C.C. (2008a). Syntrophic co-culture of aerobic Bacillus and anaerobic Clostridium for bio-fuels and bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(19), 5137-5146.
- Chang, J.J., Wu, J.H., Wen, F.S., Hung, K.Y., Chen, Y.T., Hsiao, C.L., Lin, C.Y., Huang, C.C. (2008b). Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1579-1585.
- Chang, J.S., Lee, K.S., Lin, P.J. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1167-1174.
- Chang, S., Li, J.-Z., Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy*, **36**(5), 1517-1522.
- Chen, C.-Y., Liu, C.-H., Lo, Y.-C., Chang, J.-S. (2011). Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8484-8492.
- Chen, C.C., Chen, H.P., Wu, J.H., Lin, C.Y. (2008a). Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration. in: *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 33, pp. 1573-1578.
- Chen, C.C., Lin, C.Y. (2003). Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*, **7**(3), 695-699.
- Chen, C.Y., Yang, M.H., Yeh, K.L., Liu, C.H., Chang, J.S. (2008b). Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(18), 4755-4762.
- Chen, S.D., Lee, K.S., Lo, Y.C., Chen, W.M., Wu, J.F., Lin, C.Y., Chang, J.S. (2008c). Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by Clostridium species. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(7), 1803-1812.
- Chen, W.-H., Sung, S., Chen, S.-Y. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(1), 227-234.
- 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.
- Chen, X., Sun, Y.Q., Xiu, Z.L., Li, X.H., Zhang, D.J. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(4), 539-549.
- Cheng, C.-H., Hsu, S.-C., Wu, C.-H., Chang, P.-W., Lin, C.-Y., Hung, C.-H. (2011a). Quantitative analysis of microorganism composition in a pilot-scale fermentative biohydrogen production system. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 14153-14161.
- Cheng, J., Su, H., Zhou, J., Song, W., Cen, K. (2011b). Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photo fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(1), 450-457.



## Chapitre X – Bibliographie

- Cheng, J., Xie, B.F., Zhou, J.H., Song, W.L., Cen, K.F. (2010). Cogeneration of H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> from water hyacinth by two-step anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(7), 3029-3035.
- Cheong, D.Y., Hansen, C.L. (2006). Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochemistry*, **41**(8), 1736-1745.
- Cheong, D.Y., Hansen, C.L., Stevens, D.K. (2007). Production of bio-hydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **96**(3), 421-432.
- Cherubini, F., Strömman, A.H. (2011). Life cycle assessment of bioenergy systems: State of the art and future challenges. *Bioresource Technology*, **102**(2), 437-451.
- Chin, H.L., Chen, Z.S., Chou, C.P. (2003). Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnology Progress*, **19**(2), 383-388.
- Chong, M.L., Rahman, N.A., Yee, P.L., Aziz, S.A., Rahim, R.A., Shirai, Y., Hassan, M.A. (2009a). Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(21), 8859-8865.
- Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Hassan, M.A. (2009b). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(8), 3277-3287.
- Chou, C.H., Wang, C.W., Huang, C.C., Lay, J.J. (2008). Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1550-1558.
- Chu, C.F., Ebie, Y., Inamori, Y., Kong, H.N. (2009). Effect of hydraulic retention time on the hydrogen yield and population of *Clostridium* in hydrogen fermentation of glucose. *Journal of Environmental Sciences-China*, **21**(4), 424-428.
- Clark, I.C., Zhang, R.H., Upadhyaya, S.K. (2012). The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production via anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(15), 11504-11513.
- Coalla, H.L., Fernandez, J.M.B., Moran, M.A.M., Bobo, M.R.L. (2009). Biogas generation apple pulp. *Bioresource Technology*, **100**(17), 3843-3847.
- Cohce, M.K., Dincer, I., Rosen, M.A. (2011). Energy and exergy analyses of a biomass-based hydrogen production system. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8466-8474.
- Collet, C., Gaudard, O., Péringer, P., Schwitzguébel, J.-P. (2005). Acetate production from lactose by *Clostridium thermolacticum* and hydrogen-scavenging microorganisms in continuous culture-Effect of hydrogen partial pressure. *Journal of Biotechnology*, **118**(3), 328-338.
- Converti, A., Oliveira, R.P.S., Torres, B.R., Lodi, A., Zilli, M. (2009). Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. *Bioresource Technology*, **100**(23), 5771-5776.
- Crabtree, G.W., Dresselhaus, M.S. (2008). The hydrogen fuel alternative. *MRS Bulletin*, **33**(4), 421-428.
- Dale, B.E., Ong, R.G. (2012). Energy, wealth, and human development: Why and how biomass pretreatment research must improve. *Biotechnology Progress*, **28**(4), 893-898.
- Das, D. (2009). Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7349-7357.
- Das, D., Veziroglu, T.N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(21), 6046-6057.
- Das, D., Veziroglu, T.N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, **26**(1), 13-28.
- Dasgupta, C.N., Gilbert, J.J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S.A., Skjanes, K., Das, D. (2010). Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10218-10238.

## Chapitre X - Bibliographie

- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatrisme-Mondragon, F., de Leon-Rodriguez, A., Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **7**(1), 27-45.
- de Araujo, J.C., Schneider, R.P. (2008). DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water Research*, **42**(20), 5002-5010.
- Delaney, G.M., Bennetto, H.P., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L., Thurston, C.F. (1984). Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. 2. performance of fuel cells containing selected microorganism—mediator—substrate combinations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, **34**(1), 13-27.
- Demirbas, A. (2009). *Biohydrogen: For Future Engine Fuel Demands*. Springer.
- Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, **33**(1), 1-18.
- Desvaux, M. (2005). The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**(4), 373-385.
- Devi, M.P., Mohan, S.V., Mohanakrishna, G., Sarma, P.N. (2010). Regulatory influence of CO<sub>2</sub> supplementation on fermentative hydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10701-10709.
- Digman, B., Kim, D.S. (2008). Review: Alternative Energy from Food Processing Wastes. *Environmental Progress*, **27**(4), 524-537.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., Hamza, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, **173-174**(0), 19-27.
- Ding, J., Wang, X., Zhou, X.F., Ren, N.Q., Guo, W.Q. (2010). CFD optimization of continuous stirred-tank (CSTR) reactor for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, **101**(18), 7005-7013.
- Do, P.M., Angerhofer, A., Hrdy, I., Bardonova, L., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T. (2009). Engineering *Escherichia coli* for Fermentative Dihydrogen Production: Potential Role of NADH-Ferredoxin Oxidoreductase from the Hydrogenosome of Anaerobic Protozoa. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **153**(1-2), 21-33.
- Douglas, F., Hambleton, R., Rigby, G.J. (1973). An investigation of the oxidation-reduction potential and of the effect of oxygen on the germination and outgrowth of *Clostridium butyricum* spores, using platinum electrodes. *Journal of Applied Bacteriology*, **36**(4), 625-33.
- Dufour, J., Serrano, D.P., Gálvez, J.L., González, A., Soria, E., Fierro, J.L.G. (2012). Life cycle assessment of alternatives for hydrogen production from renewable and fossil sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(2), 1173-1183.
- Dufour, J., Serrano, D.P., Galvez, J.L., Moreno, J., Garcia, C. (2009). Life cycle assessment of processes for hydrogen production. Environmental feasibility and reduction of greenhouse gases emissions. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(3), 1370-1376.
- El-Mashad, H.M., Zhang, R.H. (2010). Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresource Technology*, **101**(11), 4021-4028.
- Eroglu, E., Gunduz, U., Yucel, M., Eroglu, I. (2011). Effect of iron and molybdenum addition on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(10), 5895-5903.
- Eroglu, E., Melis, A. (2011). Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8403-8413.
- Escudié, R., Cresson, R., Delgenès, J.-P., Bernet, N. (2011). Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Research*, **45**(1), 1-10.
- Esquivel, M.G., Amaro, H.M., Pinto, T.S., Fevereiro, P.S., Malcata, F.X. (2011). Efficient H<sub>2</sub> production via *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in Biotechnology*, **29**(12), 595-600.
- Evans, E.A., Evans, K.M., Ulrich, A., Ellsworth, S. (2011). Anaerobic Processes. *Water Environment Research*, **83**(10), 1285-1332.

## Chapitre X – Bibliographie

- Fakhru'l-Razi, A., Yassin, A.A.A., Lyuke, S.E., Ngan, M.A., Morimoto, M. (2005). Bio-hydrogen synthesis from wastewater by anaerobic fermentation using microflora. *International Journal of Green Energy*, **2**(4), 387-396.
- 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.
- Fang, H.H.P., Zhang, T., Liu, H. (2002). Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**(1), 112-118.
- Fernandes, B.S., Peixoto, G., Albrecht, F.R., Saavedra del Aguila, N.K., Zaiat, M. (2010). Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, **14**(2), 143-148.
- Fontes Lima, D.M., Zaiat, M. (2012). The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(12), 9630-9635.
- Frey, M. (2002). Hydrogenases: Hydrogen-activating enzymes. *ChemBioChem*, **3**(2-3), 153-160.
- Friedrich, B., Fritsch, J., Lenz, O. (2011). Oxygen-tolerant hydrogenases in hydrogen-based technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**(3), 358-364.
- Frigon, J.C., Guiot, S.R. (1995). Impact of liquid-to-gas hydrogen mass transfer on substrate conversion efficiency of an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**(12), 1080-1086.
- Fritsch, M., Hartmeier, W., Chang, J.S. (2008). Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fittings. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(22), 6549-6557.
- Fukushima, Y., Huang, Y.-J., Chen, J.-W., Lin, H.-C., Whang, L.-M., Chu, H., Lo, Y.-C., Chang, J.-S. (2011). Material and energy balances of an integrated biological hydrogen production and purification system and their implications for its potential to reduce greenhouse gas emissions. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8550-8556.
- Gadhamshetty, V., Johnson, D.C., Nirmalakhandan, N., Smith, G.B., Deng, S.G. (2009). Dark and acidic conditions for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(2), 821-826.
- Gadhamshetty, V., Sukumaran, A., Nirmalakhandan, N. (2010). Photoparameters in Photofermentative Biohydrogen Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **41**(1), 1-51.
- Gavala, H.N., Skiadas, L.V., Ahring, B.K. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(9), 1164-1175.
- Gheshlaghi, R., Scharer, J.M., Moo-Young, M., Chou, C.P. (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*, **27**(6), 764-781.
- Ghosh, D., Hallenbeck, P.C. (2009). Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(19), 7979-7982.
- Ghysels, B., Franck, F. (2010). Hydrogen photo-evolution upon S deprivation stepwise: an illustration of microalgal photosynthetic and metabolic flexibility and a step stone for future biotechnological methods of renewable H<sub>2</sub> production. *Photosynthesis Research*, **106**(1), 145-154.
- Gilbert, J.J., Ray, S., Das, D. (2011). Hydrogen production using *Rhodobacter sphaeroides* (O.U. 001) in a flat panel rocking photobioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(5), 3434-3441.
- Gilroyed, B.H., Chang, C., Chu, A., Hao, X.Y. (2008). Effect of temperature on anaerobic fermentative hydrogen gas production from feedlot cattle manure using mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(16), 4301-4308.
- Giordano, A., Cantù, C., Spagni, A. (2011). Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process. *Bioresource Technology*, **102**(6), 4474-4479.

## Chapitre X - Bibliographie

- Gogotov, I.N., Azova, L.G. (1976). [Hydrogenase activity of different strains of *Clostridium butyricum*]. *Mikrobiologiya*, **45**(1), 28-32.
- Gomez, X., Cuetos, M.J., Prieto, J.I., Moran, A. (2009). Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy*, **34**(4), 970-975.
- Gorenssek, M.B., Forsberg, C.W. (2009). Relative economic incentives for hydrogen from nuclear, renewable, and fossil energy sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(9), 4237-4242.
- Goud, R.K., Raghavulu, S.V., Mohanakrishna, G., Naresh, K., Mohan, S.V. (2012). Predominance of Bacilli and Clostridia in microbial community of biohydrogen producing biofilm sustained under diverse acidogenic operating conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(5), 4068-4076.
- Grieger, K.D., Fjordbøge, A., Hartmann, N.B., Eriksson, E., Bjerg, P.L., Baun, A. (2010). Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off? *Journal of Contaminant Hydrology*, **118**(3-4), 165-183.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J.P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10660-10673.
- Guwy, A.J., Dinsdale, R.M., Kim, J.R., Massanet-Nicolau, J., Premier, G. (2011). Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8534-8542.
- Hacatoglu, K., Rosen, M.A., Dincer, I. (2012). Comparative life cycle assessment of hydrogen and other selected fuels. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(13), 9933-9940.
- Hafez, H., Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., El Naggari, H. (2009). Comparative assessment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(18), 7603-7611.
- Hafner, S.D. (2007). Biological hydrogen production from nitrogen-deficient substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(2), 435-437.
- Hallenbeck, P.C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7379-7389.
- Hallenbeck, P.C. (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology*, **52**(1-2), 21-29.
- Hallenbeck, P.C. (1983). Immobilized microorganisms for hydrogen and ammonia production. *Enzyme and Microbial Technology*, **5**(3), 171-180.
- Hallenbeck, P.C., Abo-Hashesh, M., Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, **110**(0), 1-9.
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1185-1193.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, **27**(5), 287-297.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D. (2012). Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. *Journal of Environmental Management*, **95**, **Supplement**(0), S360-S364.
- Hambleton, R., Rigby, G.J. (1970). The effect of oxygen on the germination and outgrowth of spores of *Clostridium butyricum*. *Journal of Applied Bacteriology*, **33**(4), 674-8.
- Hamilton, C. (2012). Biohydrogen Production by the *Citrobacter* and *Clostridium* Généra: A Metabolic and Biomolecular Perspective. *Thèse de l'Université de Liège*.
- Hamilton, C., Hilgsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., Thonart, P. (2010). Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(3), 1089-1098.
- Han, S.K., Kim, S.H., Shin, H.S. (2005). UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste. *Process Biochemistry*, **40**(8), 2897-2905.

## Chapitre X – Bibliographie

- Hatch, J.L., Finneran, K.T. (2008). Influence of reduced electron shuttling compounds on biological H<sub>2</sub> production in the fermentative pure culture *Clostridium beijerinckii*. *Current Microbiology*, **56**(3), 268-273.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1339-1347.
- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(2), 172-184.
- He, G.Q., Kong, Q., Chen, Q.H., Ruan, H. (2005). Batch and fed-batch production of butyric acid by *Clostridium butyricum* ZJUCB. *Journal of Zhejiang University Science B*, **6**(11), 1076-80.
- He, G.Q., Kong, Q., Ding, L.X. (2004). Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of *Clostridium butyricum*. *Letters in Applied Microbiology*, **39**(4), 363-8.
- Heinekey, D.M. (2009). Hydrogenase enzymes: Recent structural studies and active site models. *Journal of Organometallic Chemistry*, **694**(17), 2671-2680.
- Heinrichs, B., Pirard, J.-P., Schoebrechts, J.-P. (2001). Mass transfer in low-density xerogel catalysts. *AIChE Journal*, **47**(8), 1866-1873.
- Heinrichs, B., Rebbouh, L., Geus, J.W., Lambert, S., Abbenhuis, H.C.L., Grandjean, F., Long, G.J., Pirard, J.-P., van Santen, R.A. (2008). Iron(III) species dispersed in porous silica through sol-gel chemistry. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **354**(2-9), 665-672.
- Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., Thonart, P. (SUBMITTED). Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and biodisc anaerobic reactors with biomass retention. *Bioresource Technology*, **UNDER REVIEW**(-), -.
- 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, J.D., Hu, J., King, D.L., Wang, Y. (2009). An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, **139**(4), 244-260.
- Holzman, D.C. (2005). Microbe power! *Environmental Health Perspectives*, **113**(11), A754-A757.
- Hsiao, C.L., Chang, J.J., Wu, J.H., Chin, W.C., Wen, F.S., Huang, C.C., Chen, C.C., Lin, C.Y. (2009). *Clostridium* strain co-cultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7173-7181.
- Hu, B., Chen, S.L. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(15), 3266-3273.
- Huang, Y., Zong, W.M., Yan, X., Wang, R.F., Hemme, C.L., Zhou, J.Z., Zhou, Z.H. (2010). Succession of the Bacterial Community and Dynamics of Hydrogen Producers in a Hydrogen-Producing Bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(10), 3387-3390.
- Hung, C.-H., Chang, Y.-T., Chang, Y.-J. (2011a). Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8437-8444.
- Hung, C.-H., Cheng, C.-H., Guan, D.-W., Wang, S.-T., Hsu, S.-C., Liang, C.-M., Lin, C.-Y. (2011b). Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8704-8711.
- Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. (2005). Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy*, **30**(5), 471-483.
- Ibrahim, D. (2012). Green methods for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(2), 1954-1971.

## Chapitre X - Bibliographie

- Infantes, D., González del Campo, A., Villaseñor, J., Fernández, F.J. (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(24), 15595-15601.
- Jagadevan, S., Jayamurthy, M., Dobson, P., Thompson, I.P. (2012). A novel hybrid nano zerovalent iron initiated oxidation – Biological degradation approach for remediation of recalcitrant waste metalworking fluids. *Water Research*, **46**(7), 2395-2404.
- Jain, I.P. (2009). Hydrogen the fuel for 21st century. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7368-7378.
- Jegannathan, K.R., Chan, E.S., Ravindra, P. (2009). Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production? *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **13**(8), 2163-2168.
- Jensen, P.D., Hardin, M.T., Clarke, W.P. (2009). Effect of biomass concentration and inoculum source on the rate of anaerobic cellulose solubilization. *Bioresource Technology*, **100**(21), 5219-5225.
- Jeong, T.Y., Cha, G.C., Yeom, S.H., Choi, S.S. (2008). Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **14**(3), 333-337.
- 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.
- Junghare, M., Subudhi, S., Lal, B. (2012). Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(4), 3160-3168.
- Kabouris, J.C., Tezel, U., Pavlostathis, S.G., Engelmann, M., Dulaney, J., Gillette, R.A., Todd, A.C. (2009). Methane recovery from the anaerobic codigestion of municipal sludge and FOG. *Bioresource Technology*, **100**(15), 3701-3705.
- Kalinci, Y., Hepbasli, A., Dincer, I. (2009). Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(21), 8799-8817.
- Kapdan, I.K., Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**(5), 569-582.
- Karadag, D., Puhakka, J.A. (2010). Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(16), 8554-8560.
- Kataoka, N., Miya, A., Kiriya, K. (1997). Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Science and Technology*, **36**(6-7), 41-47.
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K. (2012). Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(25), 10042-10046.
- Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., Furukawa, K. (2005). Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**(5), 524-530.
- Keskin, T., Abo-Hashesh, M., Hallenbeck, P.C. (2011). Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8557-8568.
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L., Sung, S.W. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(11), 1123-1131.
- Khetkorn, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. (2010). Enhanced biohydrogen production by the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(23), 12767-12776.
- Kim, D.-H., Kim, M.-S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8423-8431.
- Kim, D.H., Han, S.K., Kim, S.H., Shin, H.S. (2006). Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(15), 2158-2169.

## Chapitre X – Bibliographie

- Kim, D.H., Kim, S.H., Kim, K.Y., Shin, H.S. (2010). Experience of a pilot-scale hydrogen-producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(4), 1590-1594.
- Kim, D.H., Kim, S.H., Shin, H.S. (2009). Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology*, **45**(3), 181-187.
- Kim, H., Moon, S., Abug, A., Choi, S.-C., Zhang, R., Oh, Y.-S. (2012). Effect of fermentation conditions on biohydrogen production from lipid-rich food material. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(20), 15062-15069.
- Kim, S., Seol, E., Raj, S.M., Park, S., Oh, Y.K., Ryu, D.D.Y. (2008). Various hydrogenases and formate-dependent hydrogen production in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1509-1515.
- Klavysyuk, A.L., Kolesnikov, S.V., Gainullin, I.K., Saletsky, A.M. (2011). Study of the interaction of a palladium nanocontact with a hydrogen molecule. *JETP Letters*, **93**(9), 530-533.
- Kolb, B., Ettre, L.S. (2006). *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*. Wiley.
- Kontur, W.S., Noguera, D.R., Donohue, T.J. (2012). Maximizing reductant flow into microbial H<sub>2</sub> production. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**(3), 382-389.
- Korbekandi, H., Iravani, S., Abbasi, S. (2009). Production of nanoparticles using organisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, **29**(4), 279-306.
- Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H., Puhakka, L.A. (2007). The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(4), 742-758.
- Kotay, S.M., Das, D. (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource - Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(1), 258-263.
- Kotay, S.M., Das, D. (2010). Microbial hydrogen production from sewage sludge bioaugmented with a constructed microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10653-10659.
- Kotay, S.M., Das, D. (2009). Novel dark fermentation involving bioaugmentation with constructed bacterial consortium for enhanced biohydrogen production from pretreated sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7489-7496.
- Kothari, R., Singh, D.P., Tyagi, V.V., Tyagi, S.K. (2012). Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(4), 2337-2346.
- Kothari, R., Tyagi, V.V., Pathak, A. (2010). Waste-to-energy: A way from renewable energy sources to sustainable development. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**(9), 3164-3170.
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M. (2007). Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, **29**(5), 685-695.
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M. (2008). Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(22), 6558-6565.
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M. (2006). Supersaturation of dissolved H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> during fermentative hydrogen production with N<sub>2</sub> sparging. *Biotechnology Letters*, **28**(18), 1485-1491.
- Kruse, O., Hankamer, B. (2010). Microalgal hydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**(3), 238-243.
- Lai, W.-H., Chen, H.-Y., Chang, F.-Y., Wu, C.-C., Lin, C.-Y., Huang, S.-R. (2011). Market and patent analysis of commercializing biohydrogen technology. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 14049-14058.
- Lambert, S., Alié, C., Pirard, J.-P., Heinrichs, B. (2004). Study of textural properties and nucleation phenomenon in Pd/SiO<sub>2</sub>, Ag/SiO<sub>2</sub> and Cu/SiO<sub>2</sub> cogelled xerogel catalysts. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **342**(1-3), 70-81.
- Lamed, R.J., Lobos, J.H., Su, T.M. (1988). Effects of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(5), 1216-1221.

- Lay, C.-H., Kuo, S.-Y., Sen, B., Chen, C.-C., Chang, J.-S., Lin, C.-Y. (2012). Fermentative biohydrogen production from starch-containing textile wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(2), 2050-2057.
- Lay, J.J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(3), 269-278.
- Lay, J.J., Lee, Y.J., Noike, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, **33**(11), 2579-2586.
- Lazaro, C.Z., Vich, D.V., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A. (2012). Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(16), 11691-11700.
- Lecler, R., Godaux, D., Vigeolas, H., Hiligsmann, S., Thonart, P., Franck, F., Cardol, P., Remacle, C. (2011). Functional analysis of hydrogen photoproduction in respiratory-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(16), 9562-9570.
- Lee, D.-J., Show, K.-Y., Su, A. (2011). Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8393-8402.
- Lee, H.S., Salerno, M.B., Rittmann, B.E. (2008). Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. *Environmental Science & Technology*, **42**(7), 2401-2407.
- Lee, K.-S., Tseng, T.-S., Liu, Y.-W., Hsiao, Y.-D. (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(20), 15556-15562.
- Lee, K.S., Lo, Y.S., Lo, Y.C., Lin, P.J., Chang, J.S. (2003). H<sub>2</sub> production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology Letters*, **25**(2), 133-138.
- Lee, M.J., Song, J.H., Hwang, S.J. (2009). Enhanced bio-energy recovery in a two-stage hydrogen/methane fermentation process. *Water Science and Technology*, **59**(11), 2137-2143.
- Lee, Y.J., Miyahara, T., Noike, T. (2001). Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, **80**(3), 227-231.
- Levin, D.B., Chahine, R. (2010). Challenges for renewable hydrogen production from biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(10), 4962-4969.
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(2), 173-185.
- Lew, B., Tarre, S., Beliaevski, M., Green, M. (2009). Anaerobic degradation pathway and kinetics of domestic wastewater at low temperatures. *Bioresource Technology*, **100**(24), 6155-6162.
- Li, C.L., Fang, H.H.P. (2007a). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **37**(1), 1-39.
- Li, C.L., Fang, H.H.P. (2007b). Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere*, **67**(4), 668-673.
- Li, Q., Cai, H., Hao, B., Zhang, C.L., Yu, Z.N., Zhou, S.D., Chenjuan, L. (2010). Enhancing Clostridial Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production and Improving Fuel Properties of ABE-enriched Biodiesel by Extractive Fermentation with Biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**(8), 2381-2386.
- Li, Y.-C., Liu, Y.-F., Chu, C.-Y., Chang, P.-L., Hsu, C.-W., Lin, P.-J., Wu, S.-Y. (2012). Techno-economic evaluation of biohydrogen production from wastewater and agricultural waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(20), 15704-15710.
- Li, Y.F., Ren, N.Q., Chen, Y., Zheng, G.X. (2007). Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(6), 755-760.
- Liang, T.M., Cheng, S.S., Wu, K.L. (2002). Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1157-1165.
- Lin, C.-Y., Lay, C.-H., Sen, B., Chu, C.-Y., Kumar, G., Chen, C.-C., Chang, J.-S. (2012). Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(20), 15632-15642.



## Chapitre X – Bibliographie

- Lin, C.-Y., Wu, S.-Y., Lin, P.-J., Chang, J.-S., Hung, C.-H., Lee, K.-S., Lay, C.-H., Chu, C.-Y., Cheng, C.-H., Chang, A.C., Wu, J.-H., Chang, F.-Y., Yang, L.-H., Lee, C.-W., Lin, Y.-C. (2011). A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8758-8764.
- Lin, C.Y., Cheng, C.H. (2006). Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(7), 832-840.
- Lin, C.Y., Shei, S.H. (2008). Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(2), 587-593.
- Lin, C.Y., Wu, C.C., Hung, C.H. (2008). Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(1), 43-50.
- Lin, C.Y., Wu, S.Y., Lin, P.J., Chang, J.S., Hung, C.H., Lee, K.S., Chang, F.Y., Chu, C.Y., Cheng, C.H., Lay, C.H., Chang, A.C. (2010). Pilot-scale hydrogen fermentation system start-up performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(24), 13452-13457.
- 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.
- Lior, N. (2010). Sustainable energy development: The present (2009) situation and possible paths to the future. *Energy*, **35**(10), 3976-3994.
- Liu, B.F., Ren, N.Q., Tang, J., Ding, J., Liu, W.Z., Xu, J.F., Cao, G.L., Guo, W.Q., Xie, G.J. (2010). Biohydrogen production by mixed culture of photo- and dark-fermentation bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(7), 2858-2862.
- Liu, D.W., Liu, D.P., Zeng, R.J., Angelidaki, I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research*, **40**(11), 2230-2236.
- Liu, H.Y., Wang, G.C., Zhu, D.L., Pan, G.H. (2009). Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(24), 9696-9701.
- Liu, I.C., Whang, L.-M., Ren, W.-J., Lin, P.-Y. (2011). The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(1), 439-449.
- Ljunggren, M., Zacchi, G. (2010). Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane. *Bioresource Technology*, **101**(20), 7780-7788.
- Lo, Y.C., Lee, K.S., Lin, P.J., Chang, J.S. (2009). Bioreactors configured with distributors and carriers enhance the performance of continuous dark hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, **100**(19), 4381-4387.
- Lovley, D.R. (2008a). Extracellular electron transfer: Wires, capacitors, iron lungs, and more. *Geobiology*, **6**(3), 225-231.
- Lovley, D.R. (2008b). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**(6), 564-571.
- Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I. (2011a). Long-Term Effect of Inoculum Pretreatment on Fermentative Hydrogen Production by Repeated Batch Cultivations: Homoacetogenesis and Methanogenesis as Competitors to Hydrogen Production. *Biotechnology and Bioengineering*, **108**(8), 1816-1827.
- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I. (2011b). Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8700-8706.
- Luo, Y., Weng, E. (2011). Dynamic disequilibrium of the terrestrial carbon cycle under global change. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**(2), 96-104.
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J.M., Clark, J.H., Hidalgo, J.M., Luna, D., Marinas, J.M., Romero, A.A. (2008). Biofuels: a technological perspective. *Energy & Environmental Science*, **1**(5), 542-564.

## Chapitre X - Bibliographie

- Magnusson, L., Islam, R., Sparling, R., Levin, D., Cicek, N. (2008). Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5398-5403.
- Maintinguer, S.I., Fernandes, B.S., Duarte, I.C.S., Saavedra, N.K., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(16), 4309-4317.
- Mandal, B., Nath, K., Das, D. (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, **28**(11), 831-835.
- Mangayil, R., Santala, V., Karp, M. (2011). Fermentative hydrogen production from different sugars by *Citrobacter* sp. CMC-1 in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(23), 15187-15194.
- Mansilla, C., Avril, S., Imbach, J., Le Duigou, A. (2012). CO<sub>2</sub>-free hydrogen as a substitute to fossil fuels: What are the targets? Prospective assessment of the hydrogen market attractiveness. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(12), 9451-9458.
- Marban, G., Vales-Solis, T. (2007). Towards the hydrogen economy? *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(12), 1625-1637.
- Massanet-Nicolau, J., Guwy, A., Dinsdale, R., Premier, G., Esteves, S. (2010). Production of hydrogen from sewage biosolids in a continuously fed bioreactor: Effect of hydraulic retention time and sparging. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(2), 469-478.
- Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hiligsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A., Thonart, P. (2012). Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnology for Biofuels*, **5**(1), 35.
- 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* CWB11009. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(8), 3371-3378.
- Mathews, J., Wang, G.Y. (2009). Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7404-7416.
- Mazloomi, K., Gomes, C. (2012). Hydrogen as an energy carrier: Prospects and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(5), 3024-3033.
- McKinlay, J.B., Harwood, C.S. (2010). Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**(3), 244-251.
- Melis, A., Melnicki, M.R. (2006). Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(11), 1563-1573.
- Mertens, R., Liese, A. (2004). Biotechnological applications of hydrogenases. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**(4), 343-348.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, **73**(1), 59-65.
- Mohan, S.V. (2008). Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **67**(11), 950-961.
- Mohan, S.V., Babu, V.L., Sarma, P.N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, **99**, 59-67.
- Mohan, S.V., Raghavulu, S.V., Goud, R.K., Srikanth, S., Babu, V.L., Sarma, P.N. (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.
- Mohan, V., Shah, A., Sheffield, J.W., Martin, K.B. (2012). Design of a hydrogen community. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(2), 1214-1219.

## Chapitre X – Bibliographie

- Momirlan, M., Veziroglu, T.N. (2002). Current status of hydrogen energy. *Renewable and Sustainable Energy Review*, **6**(1-2), 141-179.
- Moriarty, P., Honnery, D. (2009). Hydrogen's role in an uncertain energy future. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(1), 31-39.
- Moriarty, P., Honnery, D. (2010). A hydrogen standard for future energy accounting? *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(22), 12374-12380.
- Moriarty, P., Honnery, D. (2012). What is the global potential for renewable energy? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(1), 244-252.
- Morimoto, K., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2005). Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. *FEMS Microbiology Letters*, **246**(2), 229-234.
- Mu, Y., Yu, H.Q., Wang, G. (2007). Evaluation of three methods for enriching H<sub>2</sub>-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**(4), 947-953.
- Mu, Y., Yu, H.Q., Wang, Y. (2006). The role of pH in the fermentative H<sub>2</sub> production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere*, **64**(3), 350-358.
- Nandi, R., Sengupta, S. (1998). Microbial production of hydrogen: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*, **24**(1), 61-84.
- Nath, K., Das, D. (2004a). Biohydrogen production as a potential energy resource - Present state-of-art. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **63**(9), 729-738.
- Nath, K., Das, D. (2004b). Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**(5), 520-529.
- Nath, K., Kumar, A., Das, D. (2006). Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Canadian Journal of Microbiology*, **52**(6), 525-532.
- Neal, A. (2008). What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, **17**(5), 362-371.
- Nowotny, J., Veziroglu, T.N. (2011). Impact of hydrogen on the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(20), 13218-13224.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, **178**(19), 5636-43.
- Obazu, F.O., Ngoma, L., Gray, V.M. (2012). Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H<sub>2</sub>, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(7), 5579-5590.
- Oh, S., Logan, B.E. (2005). Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research*, **39**(19), 4673-4682.
- Oh, Y.-K., Raj, S.M., Jung, G.Y., Park, S. (2011). Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8357-8367.
- Oh, Y.K., Kim, H.J., Park, S., Kim, M.S., Ryu, D.D.Y. (2008a). Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1471-1482.
- Oh, Y.K., Park, S., Seol, E.H., Kim, S.H., Kim, M.S., Hwang, J.W., Ryu, D.D.Y. (2008b). Carbon and energy balances of glucose fermentation with hydrogen-producing bacterium *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**(3), 532-538.
- Oh, Y.K., Seol, E.H., Kim, J.R., Park, S. (2003). Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, **28**(12), 1353-1359.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M. (2010). Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(16), 8544-8553.
- Okkerse, C., van Bekkum, H. (1999). From fossil to green. *Green Chemistry*, **1**(2), 107-114.

## Chapitre X - Bibliographie

- Olivo, C., Lebedeva, I., Chu, C.-Y., Lin, C.-Y., Wu, S.-Y. (2011). A patent analysis on advanced biohydrogen technology development and commercialisation: Scope and competitiveness. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 14103-14110.
- Oncel, S., Sukan, F.V. (2011). Effect of light intensity and the light: dark cycles on the long term hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by batch cultures. *Biomass and Bioenergy*, **35**(3), 1066-1074.
- Oppong, D., Bryant, S.D., Rangarajan, R., Steele, S., Radwell, D., Hyllengren, L. (2006). Application of molecular techniques to identify bacteria isolated from the leather industry. *Journal of the American Leather Chemists Association*, **101**(4), 140-145.
- Pan, C.M., Fan, Y.T., Zhao, P., Hou, H.W. (2008). Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5383-5391.
- Paredes, C.J., Alsaker, K.V., Papoutsakis, E.T. (2005). A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, **3**(12), 969-978.
- Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Kim, M., Chang, I.S., Park, Y.K., Chang, H.I. (2001). A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Anaerobe*, **7**(6), 297-306.
- Patel, S.K.S., Kumar, P., Kalia, V.C. (2012). Enhancing biological hydrogen production through complementary microbial metabolisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(14), 10590-10603.
- Pattra, S., Lay, C.-H., Lin, C.-Y., O-Thong, S., Reungsang, A. (2011). Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8697-8703.
- Pauss, A., Andre, G., Perrier, M., Guiot, S.R. (1990). Liquid-to-gas mass-transfer in anaerobic processes - inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(6), 1636-1644.
- Perera, K.R.J., Ketheesan, B., Gadhamshetty, V., Nirmalakhandan, N. (2010). Fermentative biohydrogen production: Evaluation of net energy gain. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(22), 12224-12233.
- Pilavachi, P.A., Chatzipanagi, A.I., Spyropoulou, A.I. (2009). Evaluation of hydrogen production methods using the Analytic Hierarchy Process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(13), 5294-5303.
- Redwood, M.D., Macaskie, L.E. (2006). A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(11), 1514-1521.
- Redwood, M.D., Mikheenko, I.P., Sargent, F., Macaskie, L.E. (2008). Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production. *FEMS Microbiology Letters*, **278**(1), 48-55.
- Ren, N.Q., Guo, W.Q., Wang, X.J., Xiang, W.S., Liu, B.F., Wang, X.Z., Ding, J., Chen, Z.B. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(16), 4318-4324.
- Ren, N.Q., Liu, B.F., Zheng, G.X., Xing, D.F., Zhao, X., Guo, W.Q., Ding, J. (2009). Strategy for enhancing photo-hydrogen production yield by repeated fed-batch cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(18), 7579-7584.
- Rittmann, B.E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, **100**(2), 203-212.
- Ruggeri, B., Tommasi, T., Sassi, G. (2009). Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bacteria (HFB) culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(2), 753-763.
- Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y., Logan, B.E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Research*, **40**(6), 1167-1172.

## Chapitre X – Bibliographie

- Saraphirom, P., Reungsang, A. (2011). Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8765-8773.
- Savichtcheva, O., Joris, B., Wilmotte, A., Calusinska, M. (2011). Novel FISH and quantitative PCR protocols to monitor artificial consortia composed of different hydrogen-producing *Clostridium* spp. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(13), 7530-7542.
- Searcy, E., Flynn, P.C. (2010). A criterion for selecting renewable energy processes. *Biomass & Bioenergy*, **34**(5), 798-804.
- Seifert, K., Waligorska, M., Laniecki, M. (2010). Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(18), 9624-9629.
- Seppälä, J.J., Puhakka, J.A., Yli-Harja, O., Karp, M.T., Santala, V. (2011). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(17), 10701-10708.
- Sherwood, T.K., Pigford, R.L., Wilke, C.R. (1975). *Mass transfer*. McGraw-Hill.
- Shida, G.M., Barros, A.R., dos Reis, C.M., de Amorim, E.L.C., Damianovic, M., Silva, E.L. (2009). Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(9), 3679-3688.
- Shizas, I., Bagley, D.M. (2004). Fermentative hydrogen production in a system using anaerobic digester sludge without heat treatment as a biomass source. *10th IWA Congress on Anaerobic Digestion, Montreal, Canada, 29 August - 2 September 2004*. IWA Publishing. pp. 139-144.
- Shizas, L., Bagley, D.M. (2002). Improving anaerobic sequencing batch reactor performance by modifying operational parameters. *Water Research*, **36**(1), 363-367.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., Chang, J.S. (2012). Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(20), 15616-15631.
- Show, K.Y., Zhang, Z.P., Lee, D.J. (2008). Design of bioreactors for hydrogen production. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **67**(11), 941-949.
- Show, K.Y., Zhang, Z.P., Tay, J.H., Liang, D.T., Lee, D.J., Ren, N.Q., Wang, A.J. (2010). Critical assessment of anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(24), 13350-13355.
- Sinha, P., Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(13), 7460-7478.
- Smith, P.R., Bingham, A.S., Swartz, J.R. (2012). Generation of hydrogen from NADPH using an [FeFe] hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(3), 2977-2983.
- Song, J., An, D., Ren, N., Zhang, Y., Chen, Y. (2011). Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresource Technology*, **102**(23), 10875-10880.
- Sotiriou, G.A., Pratsinis, S.E. (2010). Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles. *Environmental Science & Technology*, **44**(14), 5649-5654.
- Sreethawong, T., Niyamapa, T., Neramitsuk, H., Rangsunvigit, P., Leethochawalit, M., Chavadej, S. (2010). Hydrogen production from glucose-containing wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of COD loading rate, nitrogen content, and organic acid composition. *Chemical Engineering Journal*, **160**(1), 322-332.
- Sun, Y., Zhuang, J.P., Lin, L., Ouyang, P.K. (2009). Clean conversion of cellulose into fermentable glucose. *Biotechnology Advances*, **27**(5), 625-632.
- Taibi, E., Gielen, D., Bazilian, M. (2012). The potential for renewable energy in industrial applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(1), 735-744.
- Tanisho, S., Kuromoto, M., Kadokura, N. (1998). Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **23**(7), 559-563.

## Chapitre X - Bibliographie

- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, **41**(1), 100-180.
- Thauer, R.K., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., Shima, S. (2010). Hydrogenases from Methanogenic Archaea, Nickel, a Novel Cofactor, and H<sub>2</sub> Storage. *Annual Review of Biochemistry*, **79**(1), 507-536.
- Ting, C.H., Lee, D.J. (2007). Production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(6), 677-682.
- Tiwari, A., Pandey, A. (2012). Cyanobacterial hydrogen production – A step towards clean environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(1), 139-150.
- Tolvanen, K.E.S., Koskinen, P.E.P., Raussi, H.M., Ylikoski, A.I., Hemmila, I.A., Santala, V.P., Karp, M.T. (2008). Profiling the *hydA* gene and *hydA* gene transcript levels of *Clostridium butyricum* during continuous, mixed-culture hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5416-5421.
- Tolvanen, K.E.S., Mangayil, R.K., Karp, M.T., Santala, V.P. (2011). Simple Enrichment System for Hydrogen Producers. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(12), 4246-4248.
- Tracy, B.P., Jones, S.W., Fast, A.G., Indurthi, D.C., Papoutsakis, E.T. (2012). Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**(3), 364-381.
- Treybal, R. (1980). *Mass-transfer operations*. McGraw-Hill.
- Trohalaki, S., Pachter, R. (2010). Mechanism of hydrogen production in Fe-Fe -hydrogenases: A quantum mechanics/molecular mechanics study. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(11), 5318-5331.
- Tsygankov, A.A. (2007). Biological generation of hydrogen. *Russian Journal of General Chemistry*, **77**(4), 685-693.
- Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M.K., Maness, P.C., Kroposki, B., Ghirardi, M., Evans, R.J., Blake, D. (2008). Renewable hydrogen production. *International Journal of Energy Research*, **32**(5), 379-407.
- Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., Morimoto, M. (1995). BIOLOGICAL PRODUCTION OF HYDROGEN FROM CELLULOSE BY NATURAL ANAEROBIC MICROFLORA. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **79**(4), 395-397.
- Ueno, Y., Tataru, M., Fukui, H., Makiuchi, T., Goto, M., Sode, K. (2007). Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresource Technology*, **98**(9), 1861-1865.
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **13**(5), 1000-1013.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Carmona-Martinez, A., Munoz-Paez, K.M., Poggi-Varaldo, H.M. (2006). Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environmental Science & Technology*, **40**(10), 3409-3415.
- Van't Riet, K. (1979). Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, **18**(3), 357-364.
- Van Ginkel, S.W., Logan, B. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, **39**(16), 3819-3826.
- Vatsala, T.M., Raj, S.M., Manimaran, A. (2008). A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5404-5415.
- Verhaart, M.R.A., Bielen, A.A.M., Oost, J.v.d., Stams, A.J.M., Kengen, S.W.M. (2010). Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal. *Environmental Technology*, **31**(8-9), 993-1003.

## Chapitre X – Bibliographie

- Vignais, P.M., Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology*, **6**, 159-188.
- Vijayaraghavan, K., Karthik, R., Nalini, S.P.K. (2009). Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* under light driven sulfur deprived condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(19), 7964-7970.
- Wang, A., Sun, D., Cao, G., Wang, H., Ren, N., Wu, W.-M., Logan, B.E. (2011). Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, **102**(5), 4137-4143.
- Wang, J., Wan, W. (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5392-5397.
- Wang, J.L., Wan, W. (2009a). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(2), 799-811.
- Wang, J.L., Wan, W. (2009b). Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(8), 3313-3323.
- Wang, X., Ding, J., Guo, W.Q., Ren, N.Q. (2010). Scale-up and optimization of biohydrogen production reactor from laboratory-scale to industrial-scale on the basis of computational fluid dynamics simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(20), 10960-10966.
- Wang, X., Hoefel, D., Saint, C.P., Monis, P.T., Jin, B. (2007a). The isolation and microbial community analysis of hydrogen producing bacteria from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(5), 1415-1423.
- Wang, X., Monis, P.T., Saint, C.P., Jin, B. (2009). Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(2), 791-798.
- Wang, X.J., Ren, N.Q., Xiang, W.S., Guo, W.Q. (2007b). Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(6), 748-754.
- Wang, X.Y., 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.
- Whelan, W.J., Nasr, H. (1951). The amylase of *Clostridium butyricum*. *Biochemical Journal*, **48**(4), 416-22.
- Wigley, T.M.L. (2005). The Climate Change Commitment. *Science*, **307**(5716), 1766-1769.
- Wigley, T.M.L. (1985). Climatology: Impact of extreme events. *Nature*, **316**(6024), 106-107.
- Won, S.G., Lau, A.K. (2011). Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, **102**(13), 6876-6883.
- Wonglimpiyarat, J. (2010). Technological change of the energy innovation system: From oil-based to bio-based energy. *Applied Energy*, **87**(3), 749-755.
- Wu, L.F., Mandrand, M.A. (1993). Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiology Letters*, **104**(3-4), 243-269.
- Wu, X.M., Wang, X.Q., Yang, H.H., Guo, L.J. (2010). A comparison of hydrogen production among three photosynthetic bacterial strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(13), 7194-7199.
- Xu, S., Liu, H., Fan, Y., Schaller, R., Jiao, J., Chaplen, F. (2012). Enhanced performance and mechanism study of microbial electrolysis cells using Fe nanoparticle-decorated anodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**(2), 871-880.
- Yang, C. (2008). Hydrogen and electricity: Parallels, interactions, and convergence. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(8), 1977-1994.
- Ying, Z., Yang, S.T. (2004). Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*, **110**(2), 143-157.
- Yokoi, H., Maeda, Y., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y. (1997). H<sub>2</sub> production by immobilized cells of *Clostridium butyricum* on porous glass beads. *Biotechnology Techniques*, **11**(6), 431-433.

## Chapitre X - Bibliographie

- Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., Hayashi, S. (2002). Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass & Bioenergy*, **22**(5), 389-395.
- Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y. (1995). Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**(6), 571-574.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y. (1998). H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, **20**(2), 143-147.
- Yu, H.Q., Mu, Y. (2006). Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II: Reactor performance in 3-year operation. *Biotechnology and Bioengineering*, **94**(5), 988-995.
- Yuan, Z.L., Yang, H.J., Zhi, X.H., Shen, J.Q. (2008). Enhancement effect of L-cysteine on dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(22), 6535-6540.
- Zhang, H.S., Bruns, M.A., Logan, B.E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research*, **40**(4), 728-734.
- Zhang, K., Ren, N.-Q., Cao, G.-L., Wang, A.-J. (2011). Biohydrogen production behavior of moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 under different gas-phase conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 14041-14048.
- Zhang, Y.F., Shen, J.Q. (2007). Enhancement effect of gold nanoparticles on biohydrogen production from artificial wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(1), 17-23.
- Zhang, Z.P., Tay, J.H., Show, K.Y., Yan, R., Liang, D.T., Lee, D.J., Jiang, W.J. (2007). Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(2), 185-191.
- Zhu, H., Stadnyk, A., Beland, M., Seto, P. (2008). Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, **99**(11), 5078-5084.
- Zidansek, A., Blinc, R., Jeglic, A., Kabashi, S., Bekteshi, S., Slaus, I. (2009). Climate changes, biofuels and the sustainable future. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(16), 6980-6995.



## **A propos de l'auteur**



**Laurent BECKERS**

Rue Gué d'Amont, 19  
B - 4130 ESNEUX  
tél. +32 (0) 4 / 388 00 72  
GSM +32 (0) 472/66 66 13  
Courriel : beckers.laurent@gmail.com

**Ingénieur Civil Chimiste****PhD Student**

Né à Liège le 15 septembre 1985  
Célibataire - Belge  
Permis B (auto); Permis A (moto)  
Non fumeur

**OBJECTIFS :**

- SECTEURS R&D ET INNOVATIONS
- GESTION DE PROJETS ET D'ÉQUIPES

**Secteurs : industrie chimique – environnement – agro-alimentaire – procédés**

**PROFIL**

Doctorant (défense de thèse en octobre 2012) en environnement – recherche appliquée et scale-up de procédés.

Etude et modélisation de procédés, création-suivi-gestion de projets, travaux de groupe et recherche scientifique.

Esprit d'équipe et de gestion de groupes (animation scout), imagination et créativité, persévérance et perfectionnisme, esprit d'entreprise, sens de la méthode et de la planification, autonomie et patience.

Humaniste, volonté de respecter les autres, le matériel et l'environnement.

Maîtrise des outils informatiques usuels et appliqués (logiciels de la gamme Office, Outlook, Suite Adobe CS4 (Photoshop, Contribute, Dreamwaver, Premiere, Illustrator). Programmation et calculs sur Matlab, Belsim (modélisation de procédés chimiques) et EES (calculs thermodynamiques), Origin Pro, EndNote, langage LaTeX.

**FORMATION**

2008 - Today: **Formation doctorale en Science de l'Ingénieur** – CWBI - Promoteur : Prof. P. Thonart – Université de Liège - Collège doctoral de Chimie appliquée (président : Pr. M. Crine)

**Sujet de thèse : Moyens d'optimisations de la production d'hydrogène par fermentation microbiologique à partir de substrats carbohydrates complexes : effets de l'hydrogène dissout et design de bioréacteurs**

*Autres points importants de la formation :*

Formations LaTeX (Réseau des doctorants) et EndNote (réseau des bibliothèques ULg)

Formation d'équipier de 1<sup>ère</sup> intervention et de sécurité de laboratoire (SUPHT, ULg)

Organisation et encadrement d'un TFE (Ingénieur HEPL), de trois stages 1<sup>er</sup> master BBMC et de trois semaines thématiques en microbiologie industrielle 2<sup>ème</sup> master BBMC.

Suivi de cours « Protein purification » et « Fluorescent In Situ Hybridization » (CIP, ULg)

Participation au projet ARC MicroH2 (rapports annuels ; création du site web [www.microh2.ulg.ac.be](http://www.microh2.ulg.ac.be); résultats)

Suivi technique de la production de méthane au CET de Mont St Guibert

Liste des publications et des participations à des congrès et conférences : voir ci-dessous

2005 – 2008 : **Années Techniques Ingénieur Civil Chimiste** – Université de Liège – Plus Grande Distinction  
**TFE : Contribution à l'étude de la production d'hydrogène par voie microbiologique** (CWBI, promoteur : Pr. P. Thonart)

*Autre travaux importants réalisés au cours des Techniques :*

Le nitrate d'ammonium et la catastrophe d'AZF à Toulouse (Sécurité des procédés : Pr. A. Germain)

Modélisation de la synthèse Fisher-Tropsch sur Matlab (Génie des systèmes polyphasiques, Pr. P. Marchot)

Analyse d'éléments métalliques en trace (Chimie analytique environnementale – Pr. E. De Pauw)

Modélisation d'un procédé de production d'isopropanol (Atelier de modélisation de procédés – Pr. G. Heyen)

Etude d'analyse élémentaire quantitative par la méthode LIBS (CRM 2007) (Chimie analytique – Pr. B. Gilbert)

Modélisation de réacteurs chimiques sur Matlab (Etude des réacteurs – D. Toye)

Travaux d'étude d'écoulement de fluide et du « coup de bélier » (Mécanique des fluides – Pr. A. Lejeune)

Etude de cinétique chimique sur base de publication scientifique (Cinétique chimique – Pr. J. P. Pirard)

Etude des propriétés thermodynamiques de corps purs et mélanges (Thermodynamique Appliquée – Pr. G. Heyen)

Heyen)

2003 - 2005: **Candidature Ingénieur Civil** - Université de Liège – Distinction  
2003: **Humanités générales** - Orientation latin et sciences-mathématiques - Athénée Royal Air Pur à Seraing

### EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

---

2008 – Today :

- CDD : **Aspirant FNRS** (doctorant - PhD Student) – Université de Liège – CWBI (Prof P. Thonart)
- Recherche appliquée en laboratoire – rédaction d'articles scientifiques – rédaction d'une thèse de doctorat
  - Encadrement d'étudiants et de stages en laboratoire
  - Organisation de séminaires internes au service
  - Gestion et entretien de matériel de laboratoire (HPLC VWD-RID Agilent 1100, GC TCD HP Series)
  - Libre de contrat en octobre 2012

2005 - 2008 : Département de chimie (Pr. J. Marien) – **Université de Liège** – Elève moniteur

- Assistant de cours (remédiations) pour les premières années ingénieurs.

2006 & 2007 : Synthèse d'oligonucléotides – **Eurogentec S.A.** – Sart-Tilman  
Employé laborantin jobiste. Travail en laboratoire sur la purification d'oligonucléotides.

2005 : Grande distribution – **Cora** – Rocourt – Employé caissier jobiste

2003 & 2004 : Département de mécanique des fluides (Pr. A. Lejeune) – **Université de Liège** – Etudiant jobiste

- Ouvrier de construction et de déconstruction de modèles réduits de barrages.

### LANGUES PRATIQUÉES (ÉVALUATION DE NIVEAUX EUROPÉENS CECR)

---

<b>Français</b> :	langue maternelle
<b>Anglais</b> :	niveau C2 - excellente connaissance – cours depuis 1991 – pratique régulière – rédactions d'articles
<b>Néerlandais</b> :	niveau B2 - connaissance à actualiser (6 ans d'apprentissage en humanité et nombreux stages)
<b>Allemand</b> :	niveau A2 - connaissance approximative (4 ans d'apprentissage en humanité, non pratiquée depuis)
<b>Italien</b> :	niveau B1 – apprentissage en cours du soir (deux semestres ISLV 2010 - 2011) – pratique régulière

### RENSEIGNEMENTS COMPLÉMENTAIRES ET INTÉRÊTS

---

- Animateur breveté de la Communauté française aux mouvements de jeunesse (Les Scouts – OA006 – animateurs des sections de Baladins et Eclaireurs).
- Actuellement membre de la section des routiers d'Hony (OA021). Organisation d'évènements à portée locale, actions bénévoles sociales et environnementales, projets humanitaires internationaux.
- Participation active à l'organisation du Raid Kayak Aventure de 2003 à 2008 ([www.rka.be](http://www.rka.be)).
- En possession du BEPS de la Croix-Rouge (mai 2010).
- Fabrication artisanale de bière ambrée re-fermentée en bouteille par cuvée de 60L.
- Achat et rénovation complète d'une maison d'habitation à Esneux en 2009.
- Loisirs : sports (vélo, badminton, karaté), lecture, jeux de société et de rôles, initiation au piano et à la guitare, travaux manuels et bricolage domestique, cuisine, œnologie, jardinage.
- Excellentes capacités de concentration, de rédaction (scientifique et vulgarisation, en français et en anglais), d'apprentissage et d'adaptation à toutes situations.

### LISTE DES PUBLICATIONS, PARTICIPATION À DES CONGRÈS, ...

---

Ensemble des publications à trouver sur <a href="http://orbi.ulg.ac.be">http://orbi.ulg.ac.be</a> => Feuilleter par auteur => Laurent Beckers
6 publications scientifiques dans des revues internationales « peer-reviewed »
7 communications en congrès à portée internationale
6 communications en congrès à portée nationale



