
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce chapitre, et afin d'illustrer le contexte de l'étude, nous rappellerons d'abord les différents procédés de production d'hydrogène. La production de biohydrogène par voie fermentaire sera ensuite détaillée. Puis la production d'hydrogène par électrolyse microbienne sera explicitée en attachant une attention particulière aux microorganismes électroactifs identifiés dans des biofilms mixtes ou étudiés en cultures pures. Enfin, dans un dernier volet, nous présenterons les études existantes relatives au couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène.

L'HYDROGENE ,UN COMBUSTIBLE D'AVENIR

En 1766, le physicien et chimiste Henri Cavendish parvient à recueillir le gaz inflammable produit de la réaction de l'acide sulfurique sur le Fer. Il montre que sa densité est plus faible que celle de l'air et que sa combustion produit de l'eau. Par la suite, les français Antoine Lavoisier, Pierre Laplace et Jean Baptiste Meunier présentent en 1783 à l'académie des sciences un rapport sur la synthèse de l'eau, « composée, poids pour poids, d'air inflammable et d'air vital ». C'est cet air inflammable qui est alors dénommé « hydrogène » (i.e « qui produit de l'eau »). En 1782, les frères Joseph et Etienne Montgolfier ont d'abord gonflé leur ballons avec de l'hydrogène, plus léger que l'air. Constatant qu'il fuyait au travers des parois des montgolfières trop poreuses, ils l'ont finalement remplacé par de l'air chaud. Au début du 19^{ème} siècle, l'hydrogène est utilisé en mélange avec le monoxyde de carbone pour éclairer les rues de Paris (Alleau, 2007).

En 1898, le physicien Ecosais James Dewar, professeur à l'université de Cambridge, parvient à liquéfier l'hydrogène. Son utilisation industrielle est alors facilitée et développée dans de nombreux secteurs comme la chimie, la pétrochimie et la fabrication d'engrais (Alleau, 2007).

Du point de vue de l'énergie, Jules Vernes, écrivain visionnaire, avait décrit l'alternative énergétique de l'hydrogène dans son roman « L'île mystérieuse » en 1874 où il écrit « *oui, mes amis, je crois que l'eau sera un jour employée comme combustible, que l'hydrogène et l'oxygène, qui la constituent, utilisés isolément ou simultanément, fourniront une source de chaleur et de lumière inépuisables et d'une intensité que la houille ne saurait avoir* ». Si l'on ajoute à cette approche littéraire et populaire les récentes découvertes sur la composition du Soleil (à 92.1% composé d'hydrogène en volume) et de son fonctionnement (fusion nucléaire de 4 atomes d'hydrogène pour former de l'hélium), l'idée de l'hydrogène comme vecteur d'énergie semble orienter les recherches scientifiques vers un effort accru pour le développement de cette filière. Notamment, le programme ITER de « fusion contrôlé » en cours sur le site de Cadarache du CEA en France témoigne de l'intérêt de la communauté scientifique et des sphères politiques pour la recherche d'une nouvelle source d'énergie et également pour la filière hydrogène (Alleau, 2007).

I.1.1. L'HYDROGENE : UN VECTEUR ENERGETIQUE

L'hydrogène est l'élément le plus abondant sur terre. Cependant, cet élément ne se trouve pas sous sa forme pure mais combiné au sein de molécules organiques à d'autres atomes comme le carbone, l'oxygène et l'azote par des liaisons covalentes. Sa seule forme diatomique (dihydrogène ou H₂) correspond à la forme pure de l'hydrogène. L'hydrogène H₂ est très rare dans la nature, avec moins de 1 ppm dans l'atmosphère. Il ne peut donc pas être considéré comme une énergie primaire car des étapes de production, de purification et de stockage sont requises avant toute utilisation. On qualifie donc plutôt l'hydrogène de vecteur énergétique.

L'hydrogène présente de nombreux avantages en tant que vecteur énergétique de par ses propriétés physico-chimiques. En effet, dans les conditions standards de température et de pression (0°C, 1 atm), l'hydrogène est inodore, non-coloré, non-toxique, combustible et son énergie massique est la plus importante répertoriée, soit 122 kJ/g (contre 50 kJ/g et 45 kJ/g dans les cas du méthane et de l'essence respectivement). Toutefois, la molécule de dihydrogène est la molécule de plus faible poids moléculaire (2 g/mol). Ainsi à poids égal, l'hydrogène occupe un volume plus élevé qu'un autre gaz et son énergie volumique de combustion est très faible (10 kJ/L contre 30 kJ/L avec le méthane). Ceci implique des contraintes de stockage (compression) et de transport.

Cependant, l'utilisation de l'hydrogène ne produit que de l'eau et pas de gaz à effet de serre. Ainsi, s'il est produit de manière à limiter la production de gaz à effet de serre, l'hydrogène constitue une énergie propre (Hajjaji et al., 2013).

I.1.2. LES UTILISATIONS DE L'HYDROGENE

I.1.2.1. UTILISATION EN SYNTHÈSE CHIMIQUE

L'hydrogène est une des matières de base de l'industrie chimique. Il est principalement utilisé lors de la synthèse d'ammoniac (NH₃), mais aussi pour la fabrication d'engrais, l'hydrogénation des corps gras (graisses alimentaires, savons, lubrifiants, peintures, etc...) et la synthèse de molécules chimiques telles que les amines, le méthanol, l'eau oxygénée, etc... (Association Française de l'hydrogène)

Dans les industries, l'hydrogène peut être fabriqué spécifiquement dans des unités dédiées à sa production. Il peut aussi être co-produit lors de la fabrication d'autres composés et directement utilisé sur site (Association Française de l'hydrogène).

Dans l'industrie pétrolière, suivant les procédés mis en œuvre, les raffineries peuvent produire de l'hydrogène (reformage, cracking thermique ou catalytique...) ou au contraire en consommer (hydrocracking, hydrotraitement, désulfuration...). La variété croissante des produits pétroliers préparés à partir de pétrole brut fait croître la demande en hydrogène et induit des rendements globaux déficitaires en hydrogène. Ainsi, les raffineries sont le plus souvent amenées à produire l'hydrogène complémentaire nécessaire à leur activité grâce à des unités de « vaporéformage » (i.e. dissociation de chaînes carbonées) (Association Française de l'hydrogène).

L'industrie pétrolière présente en Europe la plus grande part de consommation d'hydrogène (44%), devant la production d'ammoniac (36%) et les autres industries chimiques (13%) (Association Française de l'hydrogène).

I.1.2.2. UTILISATION COMME CARBURANT

I.1.2.2.1. Combustion dans un moteur

L'utilisation de l'hydrogène comme carburant pour le transport routier est en cours de développement. Il est possible de l'utiliser dans un moteur à combustion bien qu'il faille opérer des modifications sur ce dernier pour permettre une injection adaptée à un carburant gazeux, une taille de moteur adaptée au volume de fluide utilisé, l'utilisation de matériaux adaptés à l'utilisation de l'hydrogène et un réglage précis du moteur lié à la vitesse de combustion de l'hydrogène (Association Française de l'hydrogène, n.d.).

L'hydrogène sous forme liquide est également utilisé dans l'aérospatiale pour la propulsion de fusées avec sa combustion par l'oxygène. Dans le moteur Vulcain de la fusée Ariane V, ces deux éléments sont transportés sous forme liquide et la combustion se fait dans la chambre de combustion grâce à l'ajout d'hydrogène et d'oxygène à l'aide d'injecteurs.

I.1.2.2.2. Pile à combustible

Il est possible de convertir l'hydrogène en électricité grâce aux piles à combustible. Au sein de ces systèmes, deux électrodes sont plongées dans un électrolyte et séparées par une membrane échangeuse d'ions. L'anode et la cathode sont respectivement alimentées par de l'hydrogène et de l'oxygène pour assurer séparément l'oxydation de l'hydrogène et la réduction de l'oxygène. La pile à combustible fournit de l'électricité et de la chaleur et co-produit de l'eau Figure I-1.

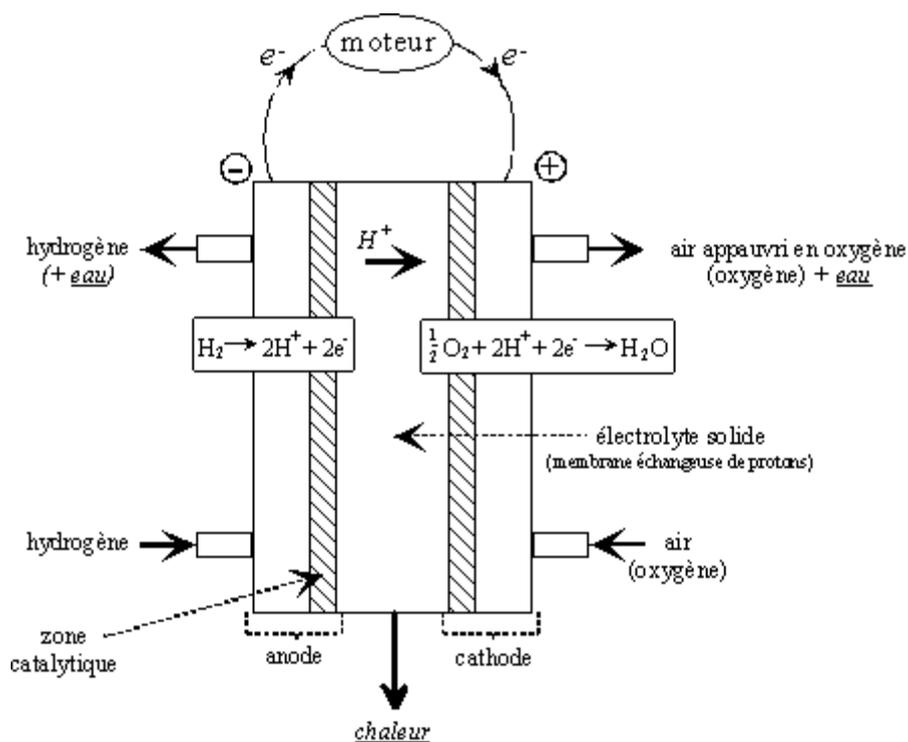


Figure I-1 : Schéma de principe de la pile à combustible PEMFC (Proton Exchange Membrane Fuel Cell).

(Association Française de l'hydrogène)

Les piles à combustibles à hydrogène sont en cours de développement chez les constructeurs automobiles (Pile à combustible à membrane échangeuse d'ions – PEMFC). Les PEMFC permettent d'obtenir des puissances jusqu'à 1MW et présentent l'avantage d'être transportables grâce à leurs compacité. Malgré le manque de sites de réapprovisionnement en hydrogène, certains modèles sont déjà proposés à la vente aux particuliers (Mercedes classe B F-Cell, Honda FCX Clarity).

I.2. LES PROCÉDES DE PRODUCTION D'HYDROGÈNE

Les différents modes de production d'hydrogène sont répertoriés dans le Tableau I-1. La plus grande partie de l'hydrogène utilisé actuellement est produite par reformage de combustibles fossiles (95%). La production de bio-hydrogène présente donc un enjeu environnemental fort. Pour que l'hydrogène devienne un combustible propre, il est nécessaire de développer des filières durables de production. Deux familles de technologies sont explorées : Celles fondées sur la décomposition thermochimique ou électrochimique de l'eau et celles utilisant des sources de biomasse.

Plusieurs voies biologiques de production existent : la photobiolyse de l'eau, la fermentation, la photofermentation et l'électrolyse microbienne. Ces trois méthodes fonctionnent car les micro-organismes peuvent utiliser les ions hydrogène comme accepteurs d'électrons selon la demi-réaction : $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$. Ces 3 approches diffèrent cependant dans l'origine des électrons.

La production de H_2 par photobiolyse de l'eau est lente ($0,355 \text{ mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{h}$) (Levin et al., 2004) et son efficacité dépend des conditions climatiques.

La productivité de H_2 par fermentation est la plus importante (jusqu'à $121 \text{ mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{h}$ en cultures mixtes (Levin et al., 2004)) mais le rendement de conversion (en équivalent H_2 par équivalent électrons fournis) reste faible (de l'ordre de $2,5 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Hexose}}$ (Hawkes et al., 2007). Ceci représente 63% du rendement maximum théorique de ce procédé qui est de $4 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Hexose}}$ et une conversion de seulement 21% d'hexose en hydrogène (la conversion maximale étant de $12 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Hexose}}$).

La cellule d'électrolyse microbienne ou MEC (« Microbial Electrolysis Cell ») issue de la pile à combustible microbienne (MFC ou « Microbial Fuel Cell »), utilise des micro-organismes électroactifs à l'anode qui peuvent transmettre des électrons provenant de la matière organique vers la cathode. En suivant un circuit électrique externe, les électrons atteignent la cathode où ils réagissent avec les ions H^+ pour produire de l' H_2 . Toutefois, à la différence de la pile qui produit de l'électricité, la MEC nécessite l'apport d'une tension électrique. Les MECs présentent plusieurs avantages. Notamment, des substrats co-produits peuvent être complètement oxydés en CO_2 , ce qui permet un très bon taux de conversion de la matière organique en hydrogène (Logan, 2010; Pant et al., 2012).

Tableau I-1 : Modes de production d'hydrogène physico-chimiques et biologiques principaux : principe, avantages et inconvénients. (adapté de Rafrafi, 2010)

TECHNIQUES	PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
LES PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES			
Réformage :	Chauffage à haute température (à 840-950°C) pour obtenir des éléments gazeux ensuite séparés par un jeu de températures à partir de : <ul style="list-style-type: none"> - combustibles fossiles (vaporeformage): $C_nH_m + n H_2O \rightarrow n CO + (m/2 + n) H_2$ $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$ - charbon : (gazéification du charbon), coke et solides carbonés autres. - vapeur d'eau 	Technologie mature, peu coûteuse	Rejet de CO ₂ , utilisation d'énergies fossiles
Electrolyse de l'eau :	Séparation de la molécule d'eau 80°C < Température < 1000°C, réaction inverse d'une pile : <ul style="list-style-type: none"> - Anode : $H_2O \rightarrow 2H^+ + 2e^- + 1/2O_2$ $\Delta G^\circ = 285kJ.mole^{-1}$ (apport électrique nécessaire) - Cathode: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ 	Technologie mature, pas de rejet de CO ₂	Coûteuse énergétiquement ; Taille des installations
Pyrolyse de la biomasse :	Chauffage (sans flamme) à haute température de corps organiques complexes, pour produire des éléments simples. Utilisation de déchets solides et de boues d'épuration possible.	Pas de production de CO ₂	Coûteuse énergétiquement
Nucléaire :	Utilisation de réacteurs de 4 ^{ème} génération	Pas de rejet de CO ₂	Déchets nucléaires Technologie non mature
Photoélectrolyse :	Utilisation de la lumière solaire qui agit sur une cellule photoélectrique produisant des bulles d'H ₂ et d'O ₂ si elle est immergée dans l'eau.	Pas de rejet de CO ₂	A l'état de recherche
LES PROCEDES BIOLOGIQUES			
Bio-photolyse de l'eau	Réaction réalisée par des algues et des cyanobactéries (ex. : l'algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) $2 H_2O + hv \rightarrow 2 H_2 + O_2$ (couplage de la photosynthèse et de l'action d'hydrogénases ¹)	Besoin d'eau et de lumière Pas de rejet de CO ₂	Coûts des photo-bioréacteurs Faible conversion de l'énergie solaire Production d'H ₂ limitée par rapport aux procédés physico-chimiques Production séquencée (cycle de la photosynthèse et/ou stress bactérien)
Photo-fermentation	Réaction réalisée par des bactéries photosynthétiques anoxygènes (bactéries pourpres, hétérotrophes) (ex. : <i>Rhodobacter capsulatus</i>) Utilisation de la lumière et des nitrogénases ² , sous carence d'azote $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + hv \rightarrow 12 H_2 + 6CO_2$	Rendement théorique de conversion en H ₂ élevé Valorisation des déchets organiques	
Fermentation	Réaction réalisée par des bactéries anaérobies strictes (ex. <i>Clostridium butyricum</i>) ou facultatives (ex. <i>Enterobacter cloacae</i>) lors de la transformation de la matière organique grâce à des hydrogénases ¹ . $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4 H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$ $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	Production à partir de matière organique variée, Pas besoin de lumière	Purification de l'H ₂ nécessaire, Sensibilité à la pression d'H ₂ , Accumulation de métabolites secondaires
Electrolyse Microbienne	Réaction réalisée par des bactéries électroactives formant un biofilm (ex. <i>Shewanella</i> , <i>Geobacter</i>) qui transfère les électrons issus de l'oxydation de molécules organiques au système : $C_2H_4O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 8 H^+ + 8 e^-$ Pour une réduction des protons à la cathode : $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$	Rendement de conversion en H ₂ élevé Valorisation des déchets organiques	A l'état de recherche

(1) Hydrogénase : enzyme catalysant l'oxydation réversible de l'H₂.(2) Nitrogénase : enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃).

I.2.1. PRODUCTION D'HYDROGENE PAR DECOMPOSITION ELECTROCHIMIQUE DE L'EAU

La voie électrochimique représente environ 4% de la production actuelle (Damien, 1992). L'électrolyse en milieu alcalin ($\text{pH} > 14$) est la technologie la plus répandue. Toutefois, elle présente des problèmes de corrosion et les catalyseurs d'électrodes restent améliorables. La forte concentration des électrolytes peut poser des problèmes environnementaux et des phénomènes de décantation (des précipités formés par les ions dissous), en phase d'arrêt. L'électrolyse en milieu acide ($\text{pH} < 1$), moins répandue, est surtout utilisée pour produire de faibles quantités d'hydrogène de grande pureté.

En électrolyse de l'eau, la cathode est le siège de la production d'hydrogène et l'anode celui de l'oxydation de l'eau (cf. ci-dessous : réactions en milieu acide):



Pour que la réaction globale se produise, il est nécessaire de fournir entre l'anode et la cathode une différence de potentiel supérieure à la valeur de l'équilibre thermodynamique (1,23V en conditions standards). Les électrolyses en milieu alcalin sont usuellement réalisées à des différences de potentiel de l'ordre de 1,8 à 2 V. Ce procédé est très coûteux en énergie et la consommation électrique, de l'ordre de 4 à 5 kWh/Nm³ d'hydrogène, représente 80% du coût de production de l'hydrogène.

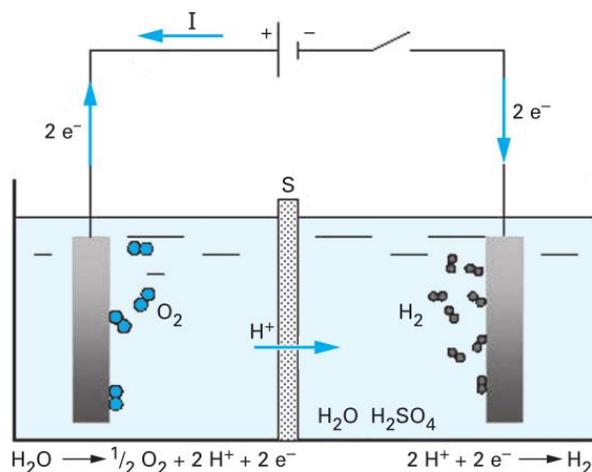


Figure I-2 : Schéma de principe d'une cellule d'électrolyse de l'eau (Millet, 2008).

I.2.2. VOIES BIOLOGIQUES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

I.2.2.1. LES PHOTO-BIOPROCEDES

Les algues ou bactéries photosynthétiques utilisent l'énergie solaire pour convertir le dioxyde de carbone et l'eau en carbohydrates et oxygène. Certains micro-organismes, peuvent aussi utiliser l'énergie solaire pour produire de l'hydrogène. Les trois principaux procédés sont : la biophotolyse direct, la biophotolyse indirecte et la photofermentation.

La biophotolyse directe consiste à l'utilisation des électrons issus de la scission de l'eau en oxygène et en protons par l'hydrogénase, ce qui permet la production d'hydrogène. Cependant les productivités en hydrogène citées dans la littérature sont faibles, de l'ordre de 0.007 mmolH₂/L/h (Levin et al., 2004) à cause de la forte sensibilité des hydrogénases vis-à-vis de l'oxygène qui est malheureusement un des produits de la réaction.

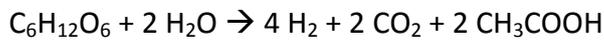
La biophotolyse indirecte est similaire à la biophotolyse directe. La différence réside dans le fait que la production d'hydrogène est découplée de manière spatiale ou temporelle, limitant le problème de sensibilité des hydrogénases à l'oxygène. Ce qui est par exemple le cas pour les cyanobactéries qui fixent le dioxyde de carbone la journée et produisent de l'hydrogène la nuit via la nitrogénase (Hallenbeck and Benemann, 2002).

La photofermentation est similaire à la photosynthèse classique. Cependant, les photons oxydent des substrats organiques à la place de la molécule d'eau. Elle est réalisée par les bactéries pourpres telles que *Rhodobacter* ou *Rhodospseudomonas*. Le rendement théorique de conversion de l'énergie lumineuse en hydrogène est proche de 100%. Cependant, en pratique les rendements obtenus sont proche de 4%. Ces faibles rendements peuvent être expliqués par l'inhibition due à l'excès de lumière (Hallenbeck and Benemann, 2002).

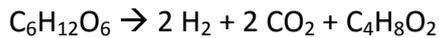
I.2.2.2. FERMENTATION

Les procédés par voie fermentaire permettent la production d'hydrogène à partir de carbohydrates simples (saccharose, glucose) ou de polysaccharides complexes. Les productivités de tels systèmes sont intéressantes, de l'ordre de quelques litres d'hydrogène/L réacteur/h (Hallenbeck and Benemann, 2002; Hawkes et al., 2007; Guo et al., 2010). Par exemple, Levin et al. (2004) ont obtenu 2.7 L/L/h en condition mésophiles. Les

rendements restent cependant limités en termes de moles d'hydrogène produit par mole de substrat du fait de la co-production d'acides organiques non-fermentescibles. Par exemple, la fermentation du glucose produit au maximum 4 moles d'hydrogène par mole de glucose par la voie métabolique de l'acide acétique (Figure I-3):



ou 2 moles d'hydrogène par mole de glucose si elle co-produit l'acide butyrique :



En pratique, les techniques de fermentation donnent de 2,4 à 3,2 moles d'hydrogène par mole de glucose (Hawkes et al., 2007). Ceci est dû au grand nombre de métabolismes impliqués en cultures mixtes. Bien que des pistes proposent d'augmenter cette conversion avec par exemple la conversion phototrophe des acides organiques tels que l'acétate et le butyrate issus de la fermentation (Fang et al., 2005), la stœchiométrie maximale de 12 moles d'hydrogène par mole de glucose : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{H}_2 + 6 \text{CO}_2$ est encore loin d'être atteinte.

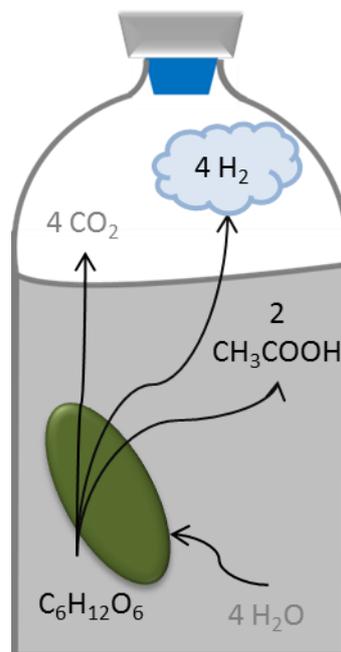
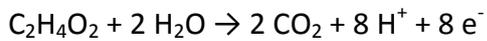


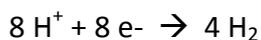
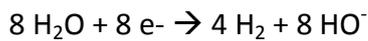
Figure I-3 : Représentation schématique de la fermentation sombre en Batch. Cas de la fermentation du glucose par la voie acétate.

I.2.2.3. ELECTROLYSE MICROBIENNE

Dans un électrolyseur microbien, un biofilm électroactif développé sur l'anode réalise l'oxydation d'acides organiques ; par exemple pour l'acétate (Figure I-4):



La cathode, quant à elle, assure classiquement la réduction abiotique de l'eau ou du proton suivant la valeur du pH (Figure I-4):



En comparaison avec le procédé traditionnel d'électrolyse de l'eau, les électrolyseurs qui oxydent des acides organiques n'exigent que des tensions beaucoup plus faibles, pouvant descendre jusqu'à 0,14V contre 1.3 V en électrolyse de l'eau abiotique. Pour une production d'hydrogène identique, ce nouveau type d'électrolyseurs permettrait de réduire le coût énergétique d'un facteur proche de 10.

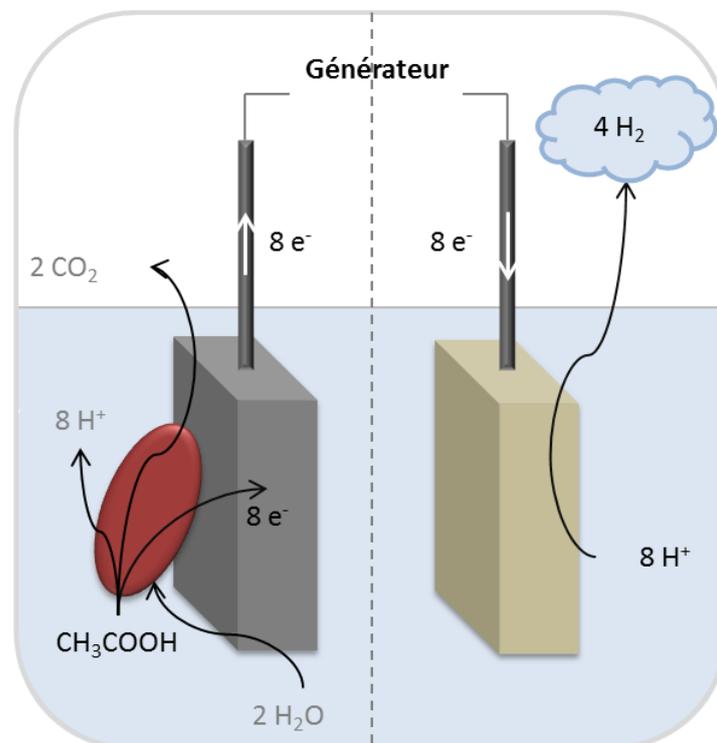


Figure I-4 : Schéma d'un électrolyseur microbien (MEC : "Microbial Electrolysis Cell") avec membrane échangeuse d'ions. Cas de l'oxydation de l'acétate à l'anode.

I.3. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE

I.3.1. PRINCIPE

La production de biohydrogène par fermentation permet de réaliser dans un même temps le traitement d'effluents organiques et la production d'hydrogène (Saratale et al., 2008). Cette fermentation dite « sombre » ne nécessite pas de lumière, requiert moins de place et est beaucoup moins coûteuse (environ 340 fois moins chère) que les procédés de production photosynthétiques tels que la photo-fermentation ou la photobiolyse (Atif et al., 2005).

La fermentation est un procédé simple qui nécessite un faible apport énergétique et qui utilise une large gamme de déchets organiques (Hallenbeck and Benemann, 2002; Hawkes et al., 2007). Des monosaccharides ou encore des polymères tels que la cellulose, l'hémicellulose et l'amidon peuvent ainsi constituer les substrats de ce procédé biologique. Il existe 2 voies principales de production d'hydrogène : la voie acétate et la voie butyrate. Chacune de ces voies génère des co-produits de l'hydrogène qui sont respectivement l'acétate et le butyrate. La voie de production d'acétate présente un rendement molaire maximal de 4 moles d'hydrogène par mole d'hexose équivalent, alors que pour la voie « butyrate », le rendement maximal théorique en hydrogène est plus faible avec 2 moles d'hydrogène par mole d'hexose équivalent. Les rendements effectivement atteints sont cependant inférieurs du fait de plusieurs voies de consommation d'hydrogène ou en concurrence pour le substrat.

I.3.2. VOIES METABOLIQUES DE PRODUCTION D'HYDROGENE PAR FERMENTATION

Plusieurs voies métaboliques sont susceptibles de produire du biohydrogène par voie fermentaire (Figure I-5).

Le glucose est converti en pyruvate par glycolyse (ou voie d'Ebden-Meyerhof Parnas) en produisant de l'Adénosine Triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de la formation de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH). Le pyruvate est alors l'élément central du métabolisme, il peut être notamment :

- Converti en acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA), en CO₂ et en H₂ par la pyruvate ferredoxine oxydoréductase et une hydrogénase.
- Converti en acétyl-CoA et en formate qui peuvent être transformés en CO₂ et H₂ par certaines entérobactéries comme *Escherichia coli*.

L'acétyl-CoA est ensuite converti en acétate, butyrate et/ou éthanol en fonction des micro-organismes, de la charge en substrat et des conditions expérimentales.

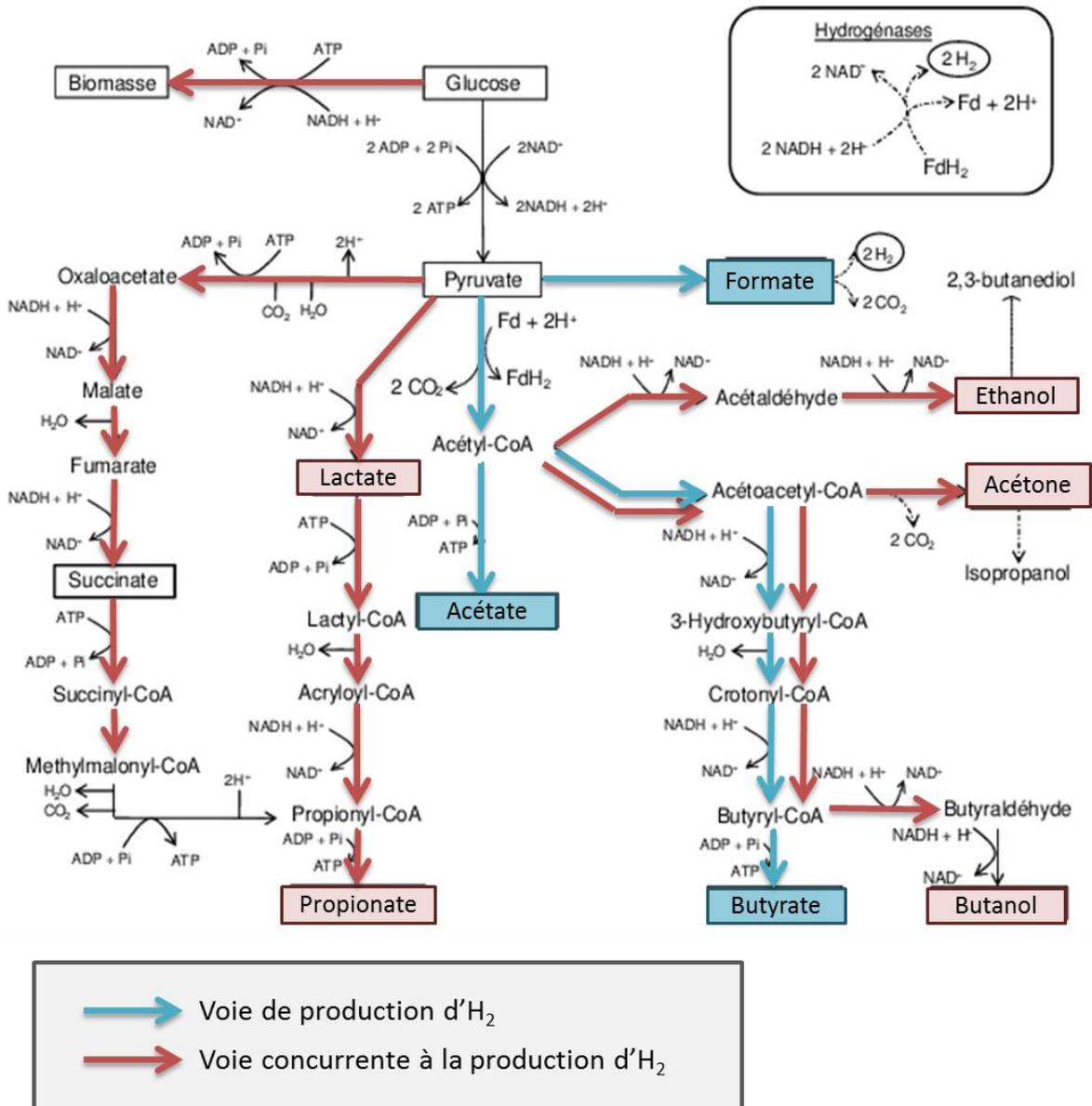
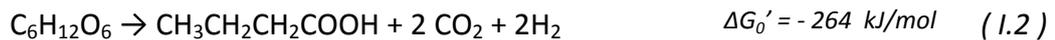
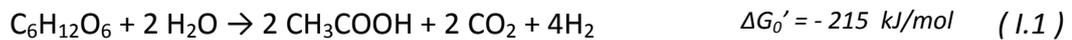


Figure I-5: Principales voies métaboliques impliquées de production ou concurrente à la production de biohydrogène par voie fermentaire (adapté de Latrille et al. (2011))

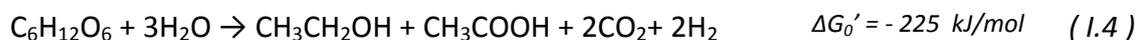
Parmi le large panel de produits finaux générés par les divers groupes microbiens au cours de la fermentation en cultures mixtes, l'acétate et le butyrate sont principalement co-produits par le biais des métabolismes de production d'hydrogène généralement décrits pour *Clostridium* sp. ou les *Enterobacteriaceae*. Les équations de production d'hydrogène par ces deux voies sont décrites ci-dessous (Hawkes et al., 2007; Latrille et al., 2011):



Il est également possible de produire de l'hydrogène à partir de formiate. En effet, certains micro-organismes, comme *Escherichia coli*, présentent la particularité de détourner une partie de leur métabolisme pour produire de l'hydrogène via la voie de synthèse du formiate :



Une autre voie de production a été proposée par Li *et al.* (2007) et Rodríguez *et al.* (2006), avec la production d'acétate et d'éthanol. Cette voie de production présente un rendement maximal de 2 moles d'hydrogène par mole de glucose :



Toutefois, la majeure partie des études en cultures mixtes et en continu ont démontré que les principaux métabolites produits étaient l'acétate et le butyrate, avec prédominance du butyrate pour les pH les plus bas (Hawkes et al., 2007; Guo et al., 2010). Ainsi, Hawkes *et al.* (2007) proposent une équation globale pour décrire la production d'hydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes :



Même si d'après cette équation les rendements de production d'hydrogène en cultures mixtes doivent atteindre 2,5 moles d'hydrogène par mole d'hexose, les rendements actuels de production d'hydrogène sont généralement inférieurs. Ceci s'explique notamment par la présence de voies consommatrices d'hydrogène ou de voies concurrentes à la production d'hydrogène.

I.3.3. VOIES DE CONSOMMATION

L'hydrogène est un vecteur énergétique qui permet le transfert d'électrons inter-espèces. Au sein de la chaîne trophique, l'hydrogène est un intermédiaire moléculaire clé de la symbiose entre consommateurs et producteurs d'hydrogène. Ainsi, en cultures mixtes, d'autres produits métaboliques que ceux cités précédemment peuvent s'accumuler dans le milieu.

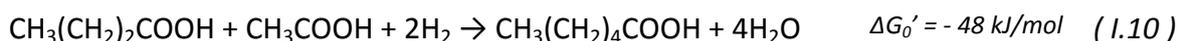
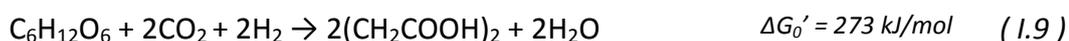
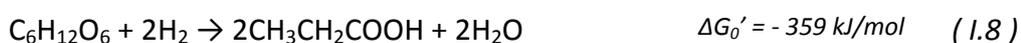
Les espèces les plus connues au sein du processus de digestion anaérobie sont les *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes qui sont capables de produire du méthane à partir d'H₂ et de CO₂. En anaérobiose, elles sont consommatrices d'hydrogène car la réaction de méthanisation y est thermodynamiquement très favorable ($\Delta G_0 = -136 \text{ kJ.mol}^{-1}$), plus favorable même que la production de méthane à partir d'acétate (pour laquelle $\Delta G_0 = -31 \text{ kJ.mol}^{-1}$) (Rafrafi, 2010) :



Une l'accumulation d'acétate dans le milieu n'est pas nécessairement le fait d'une production de biohydrogène par la voie acétate, mais peut être due à l'action des bactéries homoacétogènes, comme *Clostridium aceticum* ou *Clostridium thermoaceticum*, qui sont capables de consommer le CO₂ et l'H₂ pour former de l'acétate selon la réaction d'homoacétogénèse suivante (Latrille et al., 2011):



Le propionate, le succinate et le caproate sont des métabolites issus de voies de consommation d'hydrogène décrites ci-dessous (Latrille et al., 2011):



Les bactéries sulfato-réductrices peuvent également consommer l'hydrogène par réduction des sulfates. Pour de faibles concentrations en sulfate dans le milieu (environs 500

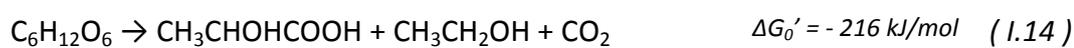
mg.L⁻¹) et un faible taux d'hydrogène (10⁻⁶ atm), la réaction, thermodynamiquement très favorable, peut se produire, selon (Latrille et al., 2011).



I.3.4. VOIES CONCURRENTES

Les voies concurrentes à la production d'hydrogène consomment une partie du substrat qui ne pourra pas être utilisée pour la production d'hydrogène.

C'est le cas des voies homolactiques et hétérolactiques réalisées par les bactéries lactiques (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp. ou *Bifidobacterium* sp.) qui sont en compétition pour le substrat avec les bactéries acétogènes (Figure I-6):



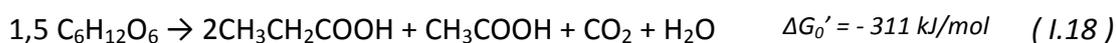
Certaines bactéries acétogènes comme *Sporomusa* sp. ou *Clostridium* sp. sont capables de fermenter le glucose en utilisant la voie homoacétique en produisant alors 3 moles d'acétate par mole de glucose :



Certains micro-organismes, outre les levures, sont également capables de produire de l'éthanol à partir de glucose. C'est le cas de *Zymomonas* sp. (Figure I-6).



Enfin, la fermentation propionique co-produit du propionate et de l'acétate (Figure I-6).



Au sein même des micro-organismes producteurs d'hydrogène, des voies métaboliques alternatives causées par un stress environnemental peuvent apparaître. En de telles situations, ces micro-organismes peuvent effectuer la solvantogénèse. Par exemple, les

bactéries du genre *Clostridium* peuvent produire de l'éthanol, de l'acétone, du butanol, du lactate ou du propionate en cas de stress cellulaire. La production d'hydrogène est alors rendue impossible du fait de la compétition pour l'élément réducteur NADH au sein de la cellule (Figure I-5). Chez *Clostridium* sp. la solvantogénèse est par ailleurs associée à un phénomène de sporulation. La production d'hydrogène peut donc être perturbée par divers facteurs qui déclenchent la sporulation et la solvantogénèse. Ces facteurs peuvent être un choc de température, une baisse brutale du pH (d'une ou deux unités), la présence d'oxygène dans le milieu (traces), un excès ou une carence en nutriments (source de carbone, azote, phosphore ou fer). La solvantogénèse peut aussi être causée par l'accumulation de sous-produits de fermentation (concentrations en acétate et/ou butyrate supérieures à 60mM) ou par la sécrétion de bactériocines dans le milieu par d'autres espèces fermentaires en cultures mixtes telles que *Lactobacillus* (Noike *et al.*, 2002).

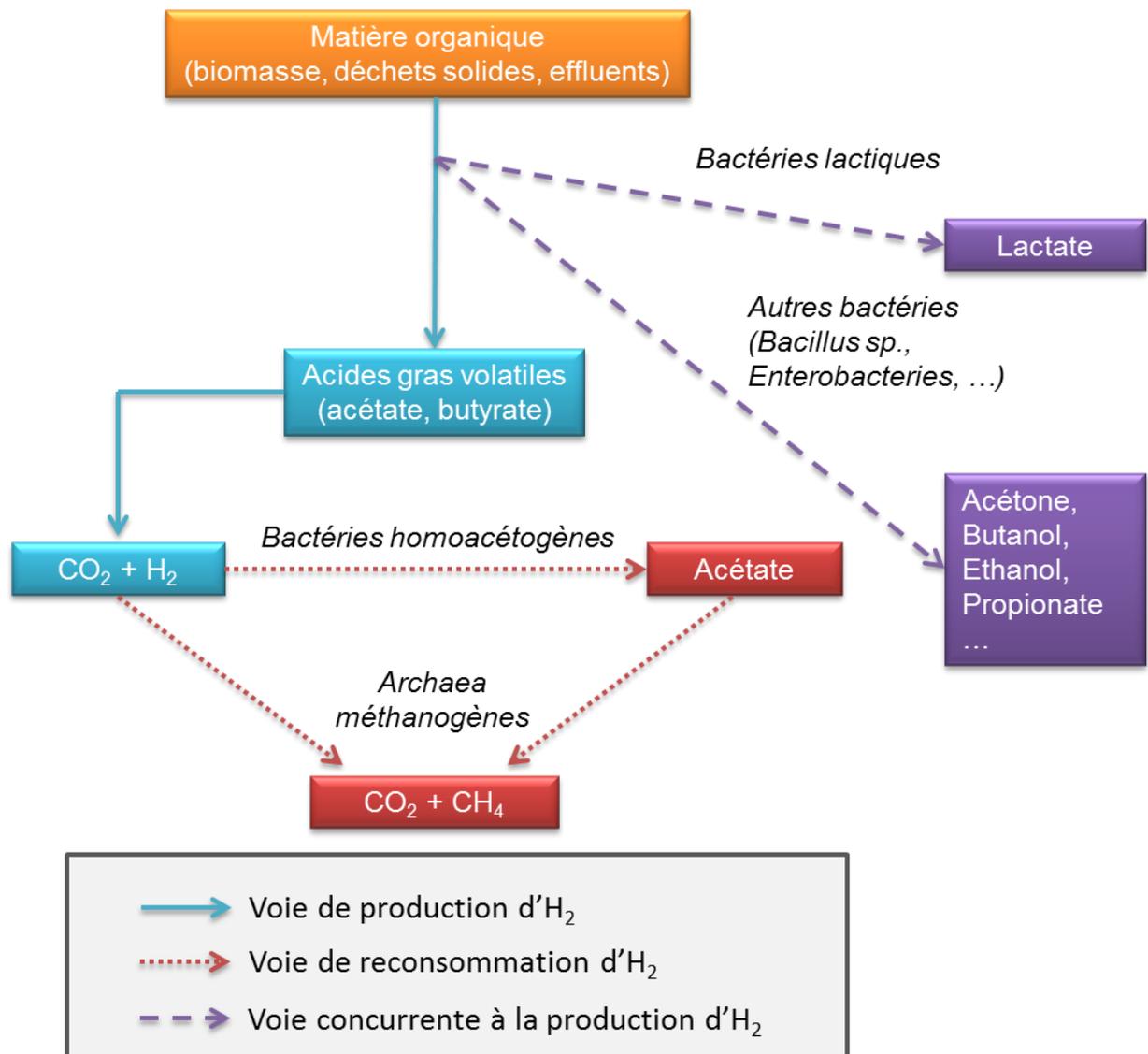


Figure 1-6: Voies métaboliques générales dans le mécanisme de production de biohydrogène par fermentation (adapté de Guo et al. (2010))

I.3.5. CONDITIONS OPERATOIRES

I.3.5.1. pH

Le pH est un facteur essentiel pour la production d'hydrogène (Chu *et al.*, 2008; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009) car il permet de :

- limiter la croissance des organismes méthanogènes,
- améliorer la production de biohydrogène en contrôlant les voies métaboliques (action sur l'activité des hydrogénases),
- éviter la solvantogénèse (formation de lactate, propionate, éthanol, acétone et butanol).

Le pH optimal pour la production d'H₂ reporté dans la littérature se situe entre 5,0 et 6,0 pour les déchets alimentaires et 7,0 pour les résidus agricoles et les fumiers d'animaux (Guo *et al.*, 2010).

Le pH impacte fortement les voies métaboliques de production de biohydrogène. Une étude en batch a répertorié les pH optimaux (dans un intervalle de 4 à 8) pour la production d'hydrogène à partir de différents substrats et en cultures mixtes (Li *et al.*, 2007). La gamme de pH optimaux varie de 5,2 à 7,0 avec une moyenne à pH 6 (Li *et al.*, 2007). L'effet du pH sur la conversion du glucose en hydrogène en cultures mixtes a été étudié par Fang and Liu (2002). A 36°C, un pH optimal a été déterminé à 5,5 en termes de production de biohydrogène (64±2 % du biogaz produit) avec un rendement de 2,1 ± 0,1 mol H₂/mol glucose.

Dans la plupart des études, à pH régulé et en cultures mixtes, le butyrate et l'acétate sont les deux principaux produits, avec une prédominance du butyrate à des pH bas et du propionate à des pH neutres ou basiques (Li *et al.*, 2007). Plus particulièrement, d'après une étude de Fang et Liu (2002), le butyrate est prédominant à des valeurs de pH inférieures ou égales à 6 et l'acétate devient majoritaire pour des valeurs supérieures à 6,5. Plus généralement, les voies productrices d'hydrogène « butyrate » et « acétate » sont favorisées à des pH relativement bas (pH 4,5-6,0) alors qu'à pH neutre ou alcalin, l'accumulation d'éthanol, de propionate, de lactate et de caproate est observée (Hawkes ., 2007, Fang et Liu, 2002).

L'impact du pH sur l'activité métabolique et la diversité microbienne a été étudié par Temudo *et al.* (2008) au cours de la fermentation du glucose, du xylose et du glycérol à 30°C. Il a ainsi d'abord été vérifié que pour des valeurs de pH inférieures à 6, les métabolites produits étaient principalement l'acétate et le butyrate tandis que pour des pH plus élevés, l'éthanol et l'acétate étaient principalement retrouvés. La prédominance d'espèces du genre *Clostridium* a été montrée pour toutes les valeurs de pH testées (4–8,5). Cependant une plus grande diversité microbienne a été notée aux pH plus élevés avec la sélection d'espèces appartenant à d'autres genres comme *Klebsiella* (Temudo *et al.*, 2008).

Le pH du milieu influence donc non seulement les voies métaboliques empruntées, mais aussi la diversité des communautés microbiennes.

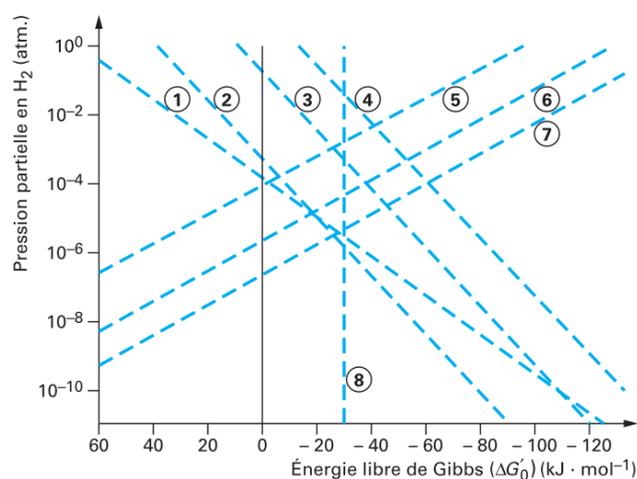
I.3.5.2. TEMPERATURE

Les travaux portant sur la production d'hydrogène ont été réalisés soit à température ambiante (15-30 °C), soit en conditions mésophiles (32-39°C) ou thermophiles (50-64°C). Sur des substrats simples, les rendements de production d'hydrogène sont comparables à des températures mésophiles et thermophiles mais sont inférieurs à température ambiante (Li *et al.*, 2007; Wang and Wan, 2009a). Bien que la température optimale des hydrogénases soit de 50 °C (Adams and Mortenson, 1984), ce sont les conditions mésophiles qui sont les plus étudiées dans la littérature s'intéressant à la production d'hydrogène par fermentation (Li *et al.*, 2007). En effet, à rendements similaires, elles restent moins coûteuses en énergie.

I.3.5.3. PRESSION PARTIELLE EN HYDROGENE

La pression partielle en hydrogène joue également un rôle important dans la production d'hydrogène par fermentation. Elle conditionne la valeur des enthalpies libres des réactions métaboliques. En anaérobiose, les dispositifs expérimentaux engendrent une sursaturation des gaz dans la phase liquide, favorisant la formation de bulles de gaz et augmentant la pression partielle en hydrogène du milieu. Une pression partielle croissante cause une diminution de l'activité des hydrogénases et rend les réactions de production d'hydrogène thermodynamiquement défavorables (Kim *et al.*, 2006).

Ainsi, l'augmentation de la concentration du milieu en hydrogène non seulement inhibe la production d'hydrogène mais induit également un changement des voies métaboliques vers la production de lactate et/ou solvantogénèse avec production d'éthanol, de butanol et/ou d'acétone (Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo, 2009).



- | | |
|---------------------------|---|
| ① propionate vers acétate | ⑤ homoacétogénèse |
| ② butyrate vers acétate | ⑥ méthanogénèse hydrogénotrophe |
| ③ éthanol vers acétate | ⑦ sulfatoréduction vers H ₂ S |
| ④ lactate vers acétate | ⑧ méthanogénèse acétotrophe (indépendante de l'hydrogène) |

Les concentrations en réactants utilisées sont de : 25 mM (acétate), 10 mM (propionate, butyrate, lactate et éthanol), 5 mM (sulfates), 20 mM bicarbonates, 0,7 atm. (méthane).

Figure I-7 : Évolution de l'énergie libre standard de Gibbs (à pH 7 et 25°C) des réactions de conversion d'acides gras volatils en acétate avec production d'hydrogène ou de réactions de respiration inorganique, en fonction de la pression partielle en hydrogène du milieu (Latrille et al. 2011).

Pour diminuer artificiellement la pression partielle en hydrogène, plusieurs solutions peuvent être mises en œuvre dans les procédés de production d'hydrogène par voie fermentaire.

L'agitation est la technique la plus utilisée. En effet, augmenter la vitesse d'agitation du milieu revient à augmenter le coefficient de transfert gaz/liquide et donc à réduire la concentration en hydrogène dans la phase liquide du réacteur. Ainsi, Lay (2000) a obtenu une augmentation du rendement en hydrogène de 100% en augmentant la vitesse d'agitation du mélange en fermentation de 100 à 500 rpm. Plus récemment, Aceves-Lara et al. (2008) ont obtenu avec des mélasses d'industries sucrières une production d'hydrogène maximale à la plus forte vitesse testée dans un intervalle compris entre 150 à 300 rpm.

Il est également possible de diluer l'hydrogène en introduisant dans le réacteur un gaz inerte comme de l'azote ou de l'argon. L'inconvénient de cette technique est qu'elle induit une dilution importante de l'hydrogène produit et donc un coût énergétique ultérieur conséquent pour le purifier (Latrille *et al.*, 2011).

Enfin une troisième solution consiste à submerger une membrane de séparation dans le milieu liquide afin de séparer l'hydrogène des autres gaz. Cette méthode présente néanmoins des risques majeurs de colmatages (Valdez-vazquez and Poggi-varaldo, 2009).

D'autre part, pour de très faibles pressions partielles en hydrogène, une formation supplémentaire d'hydrogène pourrait théoriquement provenir de la dégradation de l'acétate par une réaction inverse de l'homoacétogénèse. Cette conversion, thermodynamiquement défavorisée aux températures modérées, est extrêmement sensible à la concentration en hydrogène :



1.3.5.4. SALINITE

Bien que la concentration en sodium Na^+ puisse avoir un effet inhibiteur important sur la digestion anaérobie (Feijoo *et al.*, 1995; Oren, 2001; Lefebvre *et al.*, 2007), des communautés microbiennes d'origine naturelle ont présenté des facultés pour s'adapter à de fortes salinités (jusqu'à 210 $\text{g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$). Finalement, une bonne capacité pour la digestion anaérobie dans ces conditions a été révélée, et notamment pour le traitement des eaux usées chargées en sels (Lefebvre and Moletta, 2006). Certaines de ces communautés microbiennes sont dites halophiles (Mosquera-Corral and Sanchez, 2001; Lefebvre *et al.*, 2006) tandis que d'autres ne le sont pas et doivent être pré-adaptées à des concentrations en sels croissantes avant d'être utilisées comme inocula (Guerrero *et al.*, 1997; Gebauer, 2004; Lefebvre *et al.*, 2007).

Alors que beaucoup d'espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Escherichia* ont été décrites comme productrices d'hydrogène en cultures mixtes et en milieu non-salin (Hawkes *et al.*, 2007; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo *et al.*, 2010; Quéméneur *et al.*, 2010, 2012; Quéméneur, Hamelin, Benomar, *et al.*, 2011; Quéméneur, Hamelin, Latrille, *et al.*, 2011), seules quelques études ont porté sur la fermentation

d'effluents salins en cultures mixtes pour la production de biohydrogène (Zheng *et al.*, 2005). Zheng *et al.* (2005) ont mis en exergue une diminution progressive des rendements de conversion d'hydrogène de 0,597 mol_{H₂}/mol_{Sucrose}·j à 0,089 mol_{H₂}/mol_{Sucrose}·j avec une augmentation de la concentration en NaCl de 0 à 30 g_{NaCl}/L en milieu acide (pH 6) avec des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement.

Des études en cultures pures et en conditions salines (>20 g_{NaCl}/L) à pH 7 ont permis de montrer les capacités de production de biohydrogène par voie fermentaire de *Bacillus megaterium* (Liu and Wang, 2012), *Halocella cellulolytica* (Simankova *et al.*, 1993) et *Clostridium acetobutylicum* (Alshiyab *et al.*, 2008). De plus, Alshiyab *et al.* (2008) ont montré que la production d'hydrogène diminuait de 18 % chez *Clostridium acetobutylicum* suite à l'augmentation des concentrations en NaCl de 0 à 5 g_{NaCl}/L. Simankova *et al.* (1993) ont montré que *Halocella cellulolytica*, isolée de lagons hypersalins, était aussi capable de produire de l'hydrogène à partir de cellulose microcristalline (avec des concentrations en NaCl de 50 à 200 g_{NaCl}/L), avec jusqu'à 4 mmol_{H₂}/L pour 100 g_{NaCl}/L. Liu and Wang (2012) ont étudié la capacité de *Bacillus megaterium* (*Bacillus* sp. B2) à produire de l'hydrogène dans une gamme de concentration allant de 4 à 70 g_{NaCl}/L. Un maximum de production d'hydrogène a pu être observé avec 1,65 mol_{H₂}/mol_{Glucose} en conditions marines (30 g_{NaCl}/L). Kivisto *et al.* (2010) ont montré que *Halanaerobium saccharolyticum* ssp. *saccharolyticum* (Hssa) et *senegalensis* (Hsse) produisent respectivement 0,6 et 1,6 mol_{H₂}/mol_{Glucose}, à pH 7 et 150 g_{NaCl}/L. En accord avec ces résultats, Brown *et al.* (Brown *et al.*, 2011) décrivent *Halanaerobium hydrogeniformans* comme une bactérie fermentaire qui produit de l'hydrogène en conditions salines (70 g_{NaCl}/L) et alcaline (pH11).

Ces résultats en cultures pures montrent qu'une production d'hydrogène est réalisable en conditions salines, principalement à pH neutre ou alcalin, contrairement aux conditions de pH usuelles en fermentation pour produire de l'hydrogène.

I.3.6. MICROORGANISMES IMPLIQUÉS

I.3.6.1. GENERALITES EN CULTURES MIXTES

Parmi les bactéries hétérotrophes qui peuvent produire de l'hydrogène par fermentation, les micro-organismes les plus efficaces sont les bactéries des genres *Clostridium* (anaérobies

stricts), *Enterobacter* et *Bacillus* (anaérobies facultatifs) (Li *et al.*, 2007). Ils sont capables de produire de l'hydrogène en cultures pures ou mixtes ainsi qu'en co-cultures. Les cultures pures souvent étudiées pour la production d'hydrogène sont anaérobies strictes (*Clostridium*) ou facultatives (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*...) (Ntaikou *et al.*, 2010). Les plus fréquemment étudiées sont les bactéries des genres *Clostridium* sp. et *Enterobacter* sp. La production d'hydrogène atteint $2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ avec *Clostridium* sp. et $1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ (Girbal *et al.*, 1995) avec *Enterobacter* sp. (Ohkawara *et al.*, 1995).

La plupart des études en cultures mixtes utilisent comme inoculum des environnements naturels comme des échantillons de sols ou des boues anaérobies pour produire de l'hydrogène (Ntaikou *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2013). Les cultures mixtes sont plus faciles à mettre en œuvre dans un procédé car elles ne requièrent pas de conditions stériles et permettent la conversion en hydrogène d'un large panel de substrats (Ntaikou *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2012, 2013). Cependant, l'utilisation de cultures mixtes implique généralement la présence d'autres microorganismes non producteurs d'hydrogène qui entrent en compétition pour le substrat, comme les bactéries lactiques, ou participent à des réactions de consommation de l'hydrogène produit, les méthanogènes ou les homoacétogènes, entraînant une baisse des rendements apparents de conversion du substrat en hydrogène (Guo *et al.*, 2010; Ntaikou *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2013). Les *Archaea* méthanogènes peuvent être inhibées en appliquant par exemple un prétraitement thermique sur l'inoculum ou en contrôlant le pH dans le réacteur. Le traitement thermique est basé sur la capacité de certaines bactéries acidogènes, comme *Bacillus* et *Clostridium*, à sporuler à hautes températures alors que les archées méthanogènes, par exemple, seront facilement éliminées avec un choc thermique de 15 minutes à 110°C (Lay *et al.*, 2003; Argun *et al.*, 2008). D'autres méthodes de prétraitement peuvent être utilisées comme l'éradication des microorganismes non sporulants (i.e. les archées méthanogènes) par le pH avec une exposition prolongée à pH acide ou basique alors que les méthanogènes ne peuvent pas survivre dans ces conditions extrêmes (Ntaikou *et al.*, 2010) ou par agent chimique comme le bromoéthanesulfonate, l'acétylène et le chloroforme (Guo *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2012, 2013).

1.3.6.2. CLOSTRIDIUM SP.

Les espèces appartenant au genre *Clostridium* sont particulièrement étudiées pour la production d'hydrogène par voie fermentaire. Les principales espèces étudiées sont *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium beijerinckii* (Guo *et al.*, 2010; Latrille *et al.*, 2011).

En culture pure, les rendements couramment rapportés pour *Clostridium butyricum* sont de l'ordre de 1,8 à 2 mol_{H₂}/mol_{Hexose} et peuvent atteindre 3 mol_{H₂}/mol_{Glucose} (Jo *et al.*, 2008).

La production d'hydrogène s'effectue principalement par la voie acétate, avec un ratio butyrate/acétate de 0,3 mol_{butyrate}/mol_{acétate} (Latrille *et al.*, 2011).

1.3.6.3. ENTEROBACTER SP.

En fermentation, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae* ont été les deux espèces anaérobies facultatives les plus étudiées (Zhang *et al.*, 2011). Les rendements de conversion retrouvés dans la littérature restent relativement faibles, entre 0,2 et 1 mol_{H₂}/mol_{Hexose}. Les sous-produits métaboliques des *Enterobacter* produits lors de la fermentation sombre sont variés (lactate, éthanol...) (Kumar *et al.*, 2001).

1.3.6.4. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli est le micro-organisme le plus étudié en laboratoire. Son métabolisme fermentaire pour la production d'hydrogène est connu. *Escherichia coli*, et plus généralement les bactéries anaérobies facultatives, ont la particularité de pouvoir détourner une partie de leur métabolisme pour la production d'hydrogène via la voie de synthèse du formate. Alors que les rendements généralement atteints avec des souches sauvages avoisinent 1 mol_{H₂}/mol_{Glucose}, Turcot *et al.* (2008) ont obtenu avec cette espèce 2 mol_{H₂}/mol_{Glucose}.

I.4. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR ELECTROLYSE MICROBIENNE

I.4.1. PRINCIPE

Il a été découvert par 2 groupes de chercheurs différents, il y a quelques années, que les micro-organismes pouvaient être utilisés pour produire de l'hydrogène dans un procédé d'électrolyse microbienne basé sur celui des piles à combustibles microbiennes (Liu, Grot, et al., 2005; Rozendal et al., 2006). L'électrolyseur microbien, aujourd'hui appelé en anglais « Microbial Electrolysis Cell » (MEC), a d'abord été appelé « bio-electrochemically assisted microbial reactor » (Liu, Grot, et al., 2005) ou « biocatalyzed electrolysis cell » (Rozendal et al., 2006).

Il est possible d'utiliser des acides organiques tels que ceux présents dans les boues anaérobies pour la génération de courant (Freguia et al., 2010). Dans le compartiment anodique, des micro-organismes forment un biofilm, oxydent la matière organique et transfèrent les électrons issus de cette oxydation via un circuit externe à la cathode, où ils réagissent avec les ions H^+ pour produire de l' H_2 (Figure I-8) (Liu, Grot, et al., 2005; Rozendal et al., 2006). Parmi les AGVs, l'acétate et le propionate sont des donneurs d'électrons préférés (Freguia et al., 2010).

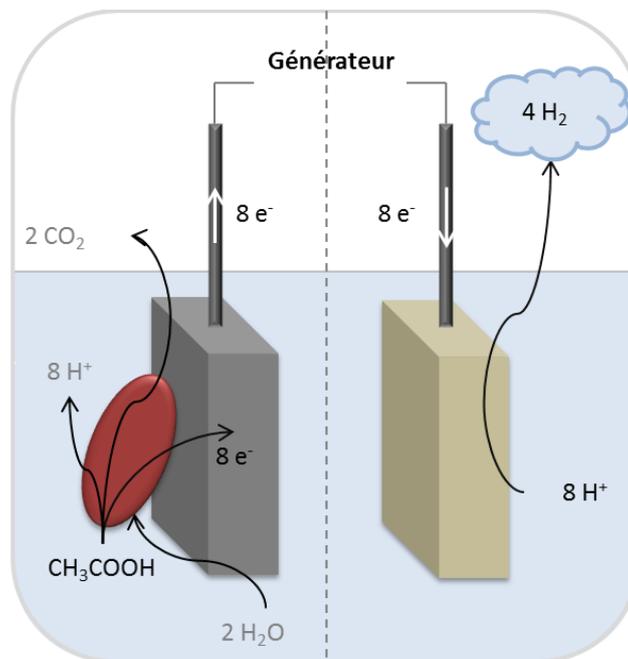


Figure I-8 : Schéma d'un électrolyseur microbien (MEC : "Microbial Electrolysis Cell") avec membrane échangeuse d'ions. Cas de l'oxydation de l'acétate à l'anode.