



HAL
open science

Optimisation d'un procédé à deux étapes pour la production d'un mélange hydrogène/méthane (biohythane) à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères

Florian Paillet

► To cite this version:

Florian Paillet. Optimisation d'un procédé à deux étapes pour la production d'un mélange hydrogène/méthane (biohythane) à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères. Génie des procédés. Montpellier SupAgro, 2017. Français. NNT : 2017NSAM0027 . tel-02791472v2

HAL Id: tel-02791472

<https://hal.inrae.fr/tel-02791472v2>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ À DEUX ÉTAPES POUR LA PRODUCTION D'UN MÉLANGE H_2/CH_4 (BIOHYTHANE) À PARTIR DE LA FRACTION FERMENTESCIBLE DES ORDURES MÉNAGÈRES

OPTIMIZATION OF A TWO-STEP PROCESS FOR GENERATING A MIXTURE OF H_2/CH_4 (BIOHYTHANE) USING ORGANIC FRACTION OF MUNICIPAL SOLID WASTE

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Génie des procédés

GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA)

Optimisation d'un procédé à deux étapes pour la
production d'un mélange H_2/CH_4 (biohythane) à partir
de la fraction fermentescible des ordures ménagères

Présentée par Florian PAILLET

Le 9 novembre 2017

Sous la direction de Renaud ESCUDIÉ
et Éric TRABLY

Devant le jury composé de

Dr. Pierre FONTANILLE, Institut Pascal Clermont-Ferrand

Dr. Emmanuel GUEDON, CNRS Nancy

Prof. Stephan BROSILLON, IEM Montpellier

Dr. Pascal PEU, IRSTEA Rennes

Dr. Renaud ESCUDIÉ, LBE-INRA Narbonne

Dr. Éric TRABLY, LBE-INRA Narbonne

Dr. Carole BARRAU, Trifyl Labessière-Candeil

Mr. Olivier THEOBALD, ADEME Angers

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrant

Invité

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Optimisation d'un procédé à deux étapes pour la production d'un mélange hydrogène/méthane (biohythane) à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères

La valorisation de la fraction organique des déchets ménagers par un procédé biologique à deux étapes permet la production d'un mélange H_2/CH_4 comprenant 5 à 20% d'hydrogène appelé plus communément biohythane. La première étape consiste en un réacteur de fermentation sombre (hydolyse/acidogénèse) où une partie de la matière organique est dégradée en H_2 et en molécules simples (acides gras volatils, sucres simples, éthanol...). Les déchets prédigérés provenant du réacteur de fermentation peuvent ensuite être utilisés dans un réacteur de méthanisation afin de finaliser la dégradation de la matière organique pour produire du méthane. Cependant, seule une efficacité optimale de l'étape de fermentation sombre permet au procédé d'être économiquement viable comparé à un méthaniseur simple. Cette thèse a donc pour objectif d'améliorer la compréhension du système de fermentation sombre afin d'optimiser le rendement de conversion en hydrogène et en autres métabolites produits. Les expériences menées en réacteurs batch ont permis de mettre en évidence les limites ainsi que les conditions opératoires optimales influençant le rendement en hydrogène. Il a également été montré que la fermentation sombre possède une grande stabilité et robustesse lors de la recirculation de l'effluent pour des batchs successifs. Enfin, différentes échelles de réacteurs ont été réalisées pour se rapprocher des conditions réalisables à l'échelle industrielle. Cette thèse apporte de nouvelles informations et une compréhension poussée du procédé de fermentation sombre pour à terme, envisager la création d'un procédé industriel à deux étapes pour la production de biohythane à partir de déchets ménagers.

Mots clefs: Biohythane, Hydrogène, Méthane, Déchets ménagers, Valorisation, Bioénergie

Optimization of a two-step process for generating a mixture of hydrogen/methane (biohythane) using organic fraction of municipal solid waste

Two-step process producing biologically a mixture of H_2/CH_4 (5-20 % of H_2) so called biohythane can be used for organic fraction of municipal solid waste valorization (OFMSW). The first step consists of a dark fermentation reactor (hydrolysis/acidogenesis) which allows a partial degradation of organic matter into H_2 and simple molecules (volatile fatty acid, sugar, ethanol...). Then the outlet of the first reactor can be used in a second reactor for methane production ending organic matter degradation. However, only high efficiency of the dark fermentation step allows making this two-step process economically viable compared to a simple anaerobic digestion reactor. The aim of this thesis is to improve the knowledge of the dark fermentation process for optimizing hydrogen and metabolites productions. Experiments were achieved to better understanding the main factors limiting hydrogen production along with the operational conditions that could improve hydrogen yield. This thesis also shows the high stability and robustness of effluent recirculation for consecutive hydrogen batch reactor. Finally, several sizes of reactors were performed for a scale-up of the process in order to reach the real operational conditions in industrial scale. This thesis provides new knowledge of the dark fermentation process in mixed culture for creating an industrial two-step process for biohythane production using municipal solid waste.

Key words: Biohythane, Hydrogen, Methane, Municipal solid waste, Valorization, Bioenergy

*«Car il est clair que l'ignorance est une énorme barrière
Un obstacle à l'évolution autre que guerrière »
IAM, 1997*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir évalué mes travaux de thèse. Je remercie tout particulièrement **Pierre Fontanille** et **Emmanuel Guedon** qui ont accepté de rapporter mes travaux de thèse. Je remercie également les autres membres du jury, **Stephan Brosillon** et **Pascal Peu**, pour l'attention qu'ils ont portée à la présentation de mes travaux de thèse et à l'échange qui a suivi.

Je remercie tout particulièrement l'**ADEME**, et **Trifyl** pour leurs aides financières qui a permis la réalisation de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement ceux qui ont permis la réalisation de cette thèse dans leurs établissements : **Nicolas Bernet**, directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, et **Jean-Marc Pastore**, président fondateur de Trifyl. Bien sûr je ne peux pas oublier de citer **Jean-Philippe Steyer**, ancien directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement qui m'a permis de rentrer au sein du laboratoire et de réaliser ce que j'ai accompli depuis (je suis toujours prêt pour une partie de squash). Je remercie également **Olivier Theobald**, ingénieur ADEME, pour ces conseils et son intérêt porté pour ma thèse.

Cette thèse fut une véritable aventure pour moi, j'ai beaucoup appris et je n'en serais pas arrivé là sans mes encadrants de thèse qui ont créé une genèse idéale pour mon apprentissage. Je tiens à dire toute la gratitude que j'ai pour **Carole Barrau**, **Eric Trably** et **Renaud Escudié**. Tout d'abord merci à toi **Carole**, tu m'as énormément aidé tout le long de ma thèse et nos discussions m'ont fait beaucoup réfléchir tout a été positif pour moi et merci de la confiance que tu m'as accordée. Je te suis extrêmement reconnaissant pour tout (par contre j'attends toujours ma revanche au foot !). Je tiens également à remercier **Eric** notamment pour sa patience et ses nombreuses corrections qui m'ont permis d'améliorer mes recherches. J'ai beaucoup appris de mes erreurs et ça a été très formateur. Je tiens à te dédicacer ce fameux proverbe chinois « Le travail de la pensée ressemble au forage d'un puits ; l'eau est trouble d'abord, puis elle se clarifie ». Bien sûr, merci à toi **Renaud** pour toute l'aide que tu m'as apportée durant cette thèse, tous tes conseils m'ont énormément aidé. Je tiens également à te remercier pour la confiance que tu m'as donnée.

Un grand merci à **Célia Campan** qui a réalisé son stage de fin d'études au LBE et qui m'a permis d'approfondir certains points-clés de cette thèse. Ta participation a été très précieuse. Je remercie également **Marta Minale** qui, lors de sa thèse, m'a apporté une aide plus que précieuse pour réaliser certaines expérimentations.

Un merci particulier à **Sylvie**, **Nadine**, **Annie**, **Alexandra** et **Véronique** qui sont toujours là pour nous aider, avec votre bonne humeur, qui au quotidien apporte beaucoup au laboratoire. Vous avez relevé le défi ultime de vous occuper de moi, je pense que vous êtes prêtes pour tous les challenges maintenant.

Un grand merci à **Frédéric** pour tes conseils avisés et pour le montage de mes réacteurs qui ont tenu le coup jusqu'à la fin. Merci à **Guillaume** pour ton support technique et ton travail toujours de qualité. Merci à **Anaïs** pour ta bonne humeur, pour ces parties de volley endiablées et pour toute l'aide et la sécurité que tu mets en place chaque jour qui passe au laboratoire (je n'ai pas baissé les

bras pour te voir un jour en concert ;)). Un énorme merci à **Gaëlle** pour toute l'aide que tu as apportée pour réaliser à bien toutes ses analyses et pour l'organisation des repas de Noël qui ont toujours été au top. Merci à **Nori** pour ton support informatique qui a permis d'avoir les conditions idéales pour travailler. Merci à **Marjolaine** pour ton aide qui m'a permis de mieux comprendre et d'appréhender le monde de la publication. Merci à **Dominique** pour ces œufs frais qui m'ont permis de faire des petits déjeunés de champion et être en forme toute la journée. Merci à **Robert** pour avoir tenu le coup dans la bonne humeur malgré les odeurs nauséabondes de mes expériences et surtout un grand merci pour ta chaise qui m'a permis d'écrire sans mal de dos ma thèse. Merci à **Eric Latrille** pour toutes ses compétences qui m'ont permis de faire avancer ma thèse et notamment sur les plans d'expériences (ce n'était pas facile mais on y est arrivé !), merci également pour ta bonne humeur au boulot et les concerts que l'on a réalisés ensemble. Bien sûr un énorme merci à **Camille Demazure** pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de mon séjour à Trifyl, mais aussi de ta bonne humeur qui m'a permis de m'intégrer à la vie de Trifyl.

Un merci particulier à **Antonella** qui a toujours été là pour moi et qui m'a aidé durant toutes ces années. Tu as été une excellente chef durant mon stage, une très bonne collègue durant ma thèse et une superbe amie en dehors. Merci pour tout ça.

La thèse n'est pas seulement un travail sans fin où l'on ne sort jamais la tête de l'eau. En effet, durant mon passage au LBE, j'ai pu découvrir des gens formidables qui sont vite devenus mes amis. Aujourd'hui je peux le dire, cette expérience a également été réalisable grâce à tous les gens que j'ai rencontrés durant ma thèse. Tout d'abord aux anciens qui m'ont beaucoup appris et fait découvrir les joies de la vie Narbonnaise comme **Thibault** avec ses concours de caps qui n'en finissent jamais, **Julie** qui est devenue ma cousine (faut que j'apprenne l'accent maintenant), **Violette** la reine du coup de poing dans les dents, **Elsa** pour ta sympathie et des bons moments passés. Bien sûr je ne peux pas fermer la page des « anciens » sans parler du **Lucille** alias « Cornichon, crevette, courgette », je n'oublierais pas les pétages de plomb qui nous ont motivé à aller nous baigner entre midi et deux, les soirées « musiques » où un ratio optimal de 10 minutes de musique pour 90 minutes de repas était réalisé. Un grand merci à ma promo avec qui j'ai passé de nombreux mais alors nombreux bons moments, **Diane** (merci pour ton canapé au top ;)), **Wendy** et **Ben** pour vos soirées jeux et les nombreux moments passés à l'échoppe, **Izabel** pour les conversations que l'on a pu avoir, **Marie-lou** pour les très nombreux moments passés ensemble et les longues conversations que l'on a pu avoir, **Alice** (qui aime bien châtie bien), **Clémence** (OK), **Quentin** et **Elias** pour votre joie de vivre, **Javiera**. Merci également à toutes les nouvelles têtes que j'ai rencontré durant ces trois années (**Felipe**, **Clément**, **Aurélié**, **Kevin**, **Pablo**, **Vincente**, **Hicham**, **Nicolas**, **Ulysse**, **Dora**, **Jordan**, **Djalma**, **Antoine**, **Afifi**, **Mokhles**, **Hélène**, **Amandine**). Merci à tous d'avoir été là !

Et bien sûr un grand merci à la coloc de choc, à ce fameux taudis joyeux où j'ai passé des moments inoubliables (surtout avec nos voisins !). Merci à Cycy (**Cyrille**) pour sa bouffe à 2000 kcal qui m'a bien fait dormir, à Mr. Porc (**Roman**) avec sa connaissance sans failles d'IAM, à l'espagnol (**Gabriel**) et ses concerts privés de hard rock, à **Adrien** et sa bonne humeur et pour ses longs moments à refaire le monde. La coloc se termine là mais les souvenirs restent à jamais !

Merci à mes amis (**Stef**, **Bat**, **May** et **Bito**) pour tous les moments intenses, scientifiques et intellectuels, les jeux de cartes stratégiques (le corse) qui ont permis d'aiguiser mon sens du challenge et qui m'aide tous les jours dans mon travail, bref on s'est bien marré.

Parce que rien sans eux n'aurait été possible, je tiens à remercier ma famille qui m'a soutenu durant mes études et qui n'ont jamais douté de moi. A **Sébastien** qui m'a montré comment être combatif, a **Marine** qui a toujours écouté mes conseils avisés. A **ma mère et mon père** qui ont tout fait pour me voir épanouies et qui sont mes premiers admirateurs. Je tiens également à remercier très chaleureusement **Jean-Pierre** qui m'a donné le goût de la science et qui m'a éclairé par ses conseils les plus précieux tout au long de mes études. Un grand merci à vous tous.

Et bien sûr je ne peux finir ces remerciements sans parler de toi, **Lucia**. Toi qui m'as conforté dans mes choix, toi qui m'as motivé, qui m'as soutenu durant ma thèse malgré les 10 000 km qui nous séparait. Merci de tout cœur pour tout ça. Gracias por todo !

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| SOMMAIRE | 9 |
| LISTE DES FIGURES | 13 |
| LISTE DES TABLEAUX | 17 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 19 |
| Introduction..... | 21 |
| Chapitre I : Revue Bibliographique | 29 |
| 1. Déchets Ménagers et Assimilés | 30 |
| 1.1. Histoire de la gestion des déchets ménagers | 30 |
| 1.2. Production de déchets ménagers et assimilés..... | 32 |
| 1.3. Caractérisation des déchets ménagers et assimilés..... | 34 |
| 2. Modes de valorisation des déchets ménagers et assimilés..... | 36 |
| 2.1. Valorisation par voie non biologique | 37 |
| 2.2. Valorisation par voie biologique | 39 |
| 2.2.1. Compostage | 39 |
| 2.2.2. Digestion anaérobie (Méthanisation)..... | 40 |
| 3. La fermentation sombre des déchets ménagers et assimilés | 42 |
| 3.1. Généralité : l'hydrogène..... | 42 |
| 3.1.1. Les nouvelles utilisations de l'hydrogène | 44 |
| 3.1.2. Les voies de production d'hydrogène émergentes | 46 |
| 3.2. Principe de la fermentation sombre | 49 |
| 3.3. Voies métaboliques liées à l'hydrogène | 52 |
| 3.4. Conditions opératoires favorables à la production d'hydrogène | 57 |
| 3.5. Inhibiteurs principaux de la fermentation sombre | 66 |
| 3.6. Les installations à échelle pilote | 71 |
| 4. Le biohythane | 72 |
| 4.1. Caractéristique et utilisation de l'hythane® | 73 |
| 4.2. Principe de production de biohythane | 74 |
| 5. Conclusion du chapitre et objectif de la thèse | 80 |
| Chapitre II : Matériel et Méthodes | 83 |
| 1. Préparation de la fermentation sombre | 84 |
| 1.1. Reconstitution des déchets ménagers | 84 |
| 1.2. MODECOM..... | 84 |
| 1.3. Protocole de préparation | 85 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 1.4. | Inoculum..... | 86 |
| 1.4.1. | Traitement thermique | 87 |
| 1.4.2. | Stripping..... | 87 |
| 1.5. | Les réacteurs de fermentation sombre | 89 |
| 1.6. | Déroulement d'une expérimentation | 92 |
| 2. | Procédure spécifique pour chaque étude du chapitre III..... | 93 |
| 2.1. | Etude de l'effet inhibiteur du TAN et de la force ionique | 93 |
| 2.2. | Etudes des conditions optimales pour le procédé de fermentation sombre | 94 |
| 2.3. | Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre | 96 |
| 3. | Analyses physico-chimiques | 97 |
| 3.1. | Matières sèches (MS) et matières volatiles (MV) | 97 |
| 3.2. | Mesure des concentrations en acides gras volatils (AGVs) | 97 |
| 3.3. | Mesures des concentrations en acides organiques et en sucres par HPLC..... | 98 |
| 3.4. | Mesures de la concentration des ions..... | 99 |
| 3.5. | Mesure de la composition du biogaz | 99 |
| 4. | Modélisation de la production d'hydrogène par voie fermentaire sombre | 100 |
| 5. | Analyses mathématiques | 101 |
| 6. | Analyses microbiologiques | 102 |
| | Chapitre III : Optimisation de la fermentation sombre dans le but de créer un procédé à deux étapes pour la production de biohythane..... | 105 |
| 1. | Problématique et objectif du chapitre | 106 |
| 2. | Etude de l'effet inhibiteur de l'azote ammoniacal et de la force ionique..... | 108 |
| 2.1. | Introduction | 108 |
| 2.2. | Déroulement de l'étude | 110 |
| 2.3. | Impact de la concentration en ions sur la fermentation sombre | 111 |
| 2.3.1. | Evolution du rendement en hydrogène..... | 111 |
| 2.3.2. | Effet de la force ionique sur le métabolisme fermentaire..... | 123 |
| 2.3.3. | Evolution des communautés microbiennes suivant la force ionique..... | 128 |
| 2.3.4. | Suivi de la fermentation sombre par mesure de la conductivité | 132 |
| 2.3.5. | Etude du seuil critique de la conductivité..... | 133 |
| 2.4. | Conclusion..... | 134 |
| 3. | Evaluation des conditions optimales pour la fermentation sombre..... | 136 |
| 3.1. | Introduction | 136 |
| 3.2. | Déroulement de l'étude | 138 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.3. | Résultats du plan d'expérience | 140 |
| 3.3.1. | Effet sur le rendement en hydrogène | 140 |
| 3.3.2. | Effet de la modification des conditions opératoires sur le temps d'apparition de la production de méthane | 148 |
| 3.3.3. | Etude de la production de métabolites suivant une modification des conditions opératoires | 149 |
| 3.3.4. | Evolution des communautés microbiennes en fonction des conditions opératoires appliquées | 158 |
| 3.3.5. | Evaluation du biohythane théorique produit | 160 |
| 3.4. | Conclusion..... | 165 |
| 4. | Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre | 167 |
| 4.1. | Déroulement de l'étude | 168 |
| 4.2. | Résultats de la modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre | 169 |
| 4.2.2. | Impact de la modification de la composition du substrat sur la production de métabolites | 172 |
| 4.2.3. | Analyse des produits issus de la fermentation pour la production de biohythane | 175 |
| 4.3. | Conclusion..... | 177 |
| 5. | Conclusion de l'optimisation de la fermentation sombre dans le but de créer un procédé à deux étapes pour la production de biohythane | 178 |
| | Chapitre IV : Robustesse et stabilité du procédé de fermentation dans le cadre d'un couplage avec un réacteur de méthanisation | 181 |
| 1. | Problématique et objectif du chapitre | 182 |
| 2. | Etude de la recirculation de l'effluent afin de réaliser des fermentations successives | 184 |
| 2.1. | Problématique et objectif..... | 184 |
| 2.2. | Déroulement de l'étude | 187 |
| 2.3. | Résultats de la robustesse et stabilité de la recirculation de l'effluent | 188 |
| 2.3.1. | Impact de la recirculation de l'effluent sans traitement | 188 |
| 2.3.1.1. | Production d'hydrogène | 188 |
| 2.3.1.2. | Production de métabolites..... | 192 |
| 2.3.2. | Impact de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique initial | 195 |
| 2.3.2.1. | Production d'hydrogène | 195 |
| 2.3.2.2. | Production de métabolites..... | 198 |
| 2.3.3. | Impact de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique | 202 |
| 2.3.3.1. | Production d'hydrogène | 202 |
| 2.3.3.2. | Production de métabolites..... | 205 |
| 2.3.3.3. | Evolution de la communauté microbienne..... | 207 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.3.4. Stabilité du procédé..... | 211 |
| 2.4. Conclusion de l'étude de la recirculation de l'effluent afin de réaliser des fermentations successives | 215 |
| 3. Etude du changement d'échelle sur la fermentation sombre..... | 217 |
| 3.1. Problématique et objectif..... | 217 |
| 3.2. Déroulement de l'étude | 219 |
| 3.3. Résultats de l'étude du changement d'échelle..... | 220 |
| 3.3.1. Etude de la fermentation sombre sur un réacteur pilote..... | 220 |
| 3.4. Conclusion..... | 227 |
| 4. Conclusion du chapitre portant sur la robustesse et stabilité du procédé de fermentation dans le cadre d'un couplage avec un réacteur de méthanisation..... | 228 |
| Conclusion et Perspectives..... | 231 |
| Annexes..... | 243 |
| Références..... | 251 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Procédé à deux étapes pour la production de biohythane® envisagé | 26 |
| Figure 2 : Production de déchets ménagers depuis 1990 (en kg par habitant)[15] | 33 |
| Figure 3 : Production de déchets municipaux en Europe | 33 |
| Figure 4 : Caractérisation des ordures ménagères résiduelles | 35 |
| Figure 5 : Principe de l'économie circulaire (source : ADEME) | 36 |
| Figure 6 : Publication scientifique basé sur le mot clé "hydrogène" (statistique Web of Science) | 44 |
| Figure 7 : Schéma principe de la pile à combustible..... | 45 |
| Figure 8 : Couplage de différent procédé de production d'hydrogène | 48 |
| Figure 9 : Schéma du principe de la digestion anaérobie | 50 |
| Figure 10 : Voies métaboliques pour la production d'hydrogène par fermentation sombre[45] | 52 |
| Figure 11 : Schéma du principe de la production de biohythane[144] | 75 |
| Figure 12 : Schéma principe du procédé de stripping | 88 |
| Figure 13 : Concentration en azote ammoniacal (mg/L) au cours du stripping | 89 |
| Figure 14 : Réacteur à échelle laboratoire | 90 |
| Figure 15 : réacteur semi-pilote | 91 |
| Figure 16 : Réacteur pilote | 92 |
| Figure 17 : Domaine d'étude | 95 |
| Figure 18 : Photo du chromatographe en phase gazeuse..... | 98 |
| Figure 19 : Photo de la chromatographie liquide haute performance | 99 |
| Figure 20 : Photo du micro-chromatographe en phase gazeuse multiplexé | 100 |
| Figure 21 : Effet de l'azote ammoniacal sur le rendement en hydrogène et le temps de latence associé..... | 112 |
| Figure 22 : Impact de l'azote ammoniacal sur le rendement en hydrogène avec la solution Azote-Chlorure et Azote-X | 114 |
| Figure 23 : Temps de latence en hydrogène pour les solutions Azote-Chlorure et Azote-X..... | 115 |
| Figure 24 : Impact des composés chlorés sur le rendement en hydrogène avec les solutions Azote-Chlorure et Chlorure-X..... | 117 |
| Figure 25 : Impact du temps de latence en hydrogène avec les solutions Azote-Chlorure et Chlorure-X | 118 |
| Figure 26 Impact de la force ionique sur le rendement en hydrogène | 121 |
| Figure 27 : Analyse des métabolites produits en fonction de la concentration en force ionique dans le milieu de réaction pour le Témoin et les solutions Azote-Chlorure, Azote-X, Chlorure-X et MII | 125 |
| Figure 28 : Evolution de la structure des communautés microbiennes en fonction des différentes concentrations en force ionique présentes dans le milieu avec la solution Azote-Chlorure..... | 129 |
| Figure 29 : Etude du seuil critique sur le rendement en hydrogène en fonction de la conductivité .. | 133 |
| Figure 30 : Rendement d'hydrogène (mLH ₂ /gMV) en fonction de la concentration en azote ammoniacal et la siccité..... | 146 |
| Figure 31 : Etude de la production de métabolites suivant les différentes conditions du plan d'expérience (siccité, TAN et pH) à la température de 37 et 55°C | 151 |
| Figure 32 : Etude du ratio Bu/Ac (mol/mol) pour les différentes conditions opératoires (siccité, TAN, pH) pour la température de 37 et 55°C | 154 |

Liste des Figures

| | |
|--|-----|
| Figure 33 : Etude du ratio de $H_2/(2 \times [Bu + Ac])$ pour les différentes conditions opératoires (siccité, TAN, pH) pour la température de 37 et 55°C | 156 |
| Figure 34 : Comparaison de la dissimilarité entre différents échantillons aux deux températures étudiées..... | 158 |
| Figure 35 : Production de biohythane à partir de l'hydrogène mesuré expérimentalement et du méthane théorique calculé à la suite des métabolites produits pour les différentes conditions opératoires à 37 et 55°C | 164 |
| Figure 36 : pH final observé par rapport à la quantité de déchets flottants dans les déchets ménagers reconstitués..... | 171 |
| Figure 37 : Etude de la production de métabolites suivant les différentes proportions de PCJ (0%, 21%, 35%, 44%, 51% et 56%) dans le substrat | 173 |
| Figure 38 : Production de biohythane pour les différentes expériences contenant plusieurs proportions en PCJ dans le substrat | 176 |
| Figure 39 : Schéma du procédé de fermentation possédant une boucle de recirculation de l'effluent | 184 |
| Figure 40 : Schéma de l'étude de la recirculation de l'effluent par différentes méthodes de traitement thermique (90°C, 30 min)..... | 188 |
| Figure 41 : Rendement en hydrogène obtenu lors des différentes fermentations avec recirculation de l'effluent sans traitement thermique | 189 |
| Figure 42: Rendement en métabolites (gDCO/gMV) observée dans chaque fermentation lors d'une recirculation de l'effluent sans traitement thermique | 192 |
| Figure 43 : Rendement en hydrogène obtenu lors des différentes fermentations avec recirculation de l'effluent subissant un traitement thermique seulement avant la 1 ^{ère} fermentation | 196 |
| Figure 44 : Concentration en métabolites (gDCO/gMV) observée dans chaque fermentation lors d'une recirculation de l'effluent avec un traitement thermique seulement avant la 1 ^{ère} fermentation | 199 |
| Figure 45 : Rendement en hydrogène obtenu lors des différentes fermentations avec recirculation de l'effluent subissant un traitement thermique systématique | 203 |
| Figure 46 : Concentration en métabolites (gDCO/gMV) observée dans chaque fermentation lors d'une recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique | 206 |
| Figure 47 : Abondance relative de la communauté microbienne (ordre) en fin de chaque fermentation lors de l'étude de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique | 208 |
| Figure 48 : Biohythane théorique produit à partir des produits issus des différentes fermentations lors de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique..... | 212 |
| Figure 49: Etude de la variation du pH et de la force ionique lors d'un traitement systématique sur l'effluent..... | 214 |
| Figure 50 : Réacteur pilote | 219 |
| Figure 51 : Analyse du biogaz produit lors des fermentations..... | 220 |
| Figure 52 : Suivi de la production d'hydrogène cumulé pour la fermentation réalisée en duplicata | 221 |
| Figure 53 : Suivi du pH pour la fermentation réalisée en duplicata | 223 |
| Figure 54 : Régulation du pH des réacteurs batch lors de l'étude « <i>Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre</i> » | 226 |
| Figure 55 : Rendement en hydrogène obtenu en fonction de différentes siccités appliquées dans le milieu | 246 |

Liste des Figures

Figure 56 : Rendement en méthane sur un substrat reconstitué représentant la FFOM issu de Trifyl
frais et un substrat ayant subi une étape de fermentation249

Liste des Figures

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Caractérisation des déchets ménagers et assimilés (DMA) | 34 |
| Tableau 2: Moyens de valorisation en fonction du type de déchets présents dans les DMA proposé par Trifyl | 37 |
| Tableau 3 : Voies biologiques de production d'hydrogène..... | 47 |
| Tableau 4 : Réactions réalisables lors de l'étape d'acétogénèse..... | 54 |
| Tableau 5 : Prétraitement thermique utilisé sur l'inoculum avant fermentation sombre pour la production d'hydrogène à partir de FFOM (fraction fermentescible des ordures ménagères) et d'OMB (ordures ménagères brutes)..... | 58 |
| Tableau 6 : Conditions opératoires pour la production de biohydrogène..... | 65 |
| Tableau 7 : Etat de l'art de l'inhibition par l'azote ammoniacal sur la production de biogaz | 68 |
| Tableau 8: Propriétés physico-chimique de l'hydrogène et du méthane | 74 |
| Tableau 9 : Etat de l'art des procédés à deux étapes pour la production de biohydrogène | 76 |
| Tableau 10 : Caractérisation de la partie fermentescible des déchets ménagers issus de TRIFYL..... | 84 |
| Tableau 11 : Eléments représentant les déchets reconstitués | 85 |
| Tableau 12 : Préparation des déchets reconstitués | 85 |
| Tableau 13 : Spécificité des éléments..... | 86 |
| Tableau 14 : Concentration des AGVs et ions présents initialement dans le lixiviat g/L..... | 86 |
| Tableau 15 : Composition de chaque solution | 94 |
| Tableau 16 : Niveau fixé pour chaque facteur | 95 |
| Tableau 17: Proportion de déchets PCJ dans chaque test réalisé..... | 96 |
| Tableau 18 : Volume de lixiviat à injecter pour une siccité de 15% dans chaque test | 97 |
| Tableau 19 : Composition de chaque solution | 111 |
| Tableau 20 : Etat de l'art de la production d'hydrogène via l'utilisation de FFOM | 112 |
| Tableau 21 : Etat de l'art de l'inhibition par l'ammoniac sur la production d'hydrogène | 116 |
| Tableau 22 : Valeur du rendement, temps de latence en hydrogène et cinétique pour les trois solutions (Azote-Chlorure, Azote-X et Chlorure-X) sur trois gammes de concentrations d'azote ammoniacal ([0-5], [5-10], >10 g/L) et de chlorure ([0-10], [10-20], >20 g/L) | 119 |
| Tableau 23: Ratio Bu/Ac et ($H_2/[2x(Bu+Ac)]$) en fonction des force ionique sur les différentes solutions Azote-Chlorure, Azote-X, Chlorure-X, MII ainsi que le Témoin | 126 |
| Tableau 24 : Abondance relative (en %) de la communauté microbienne (familles) présente dans chaque milieu en fonction de la concentration en ions avec la solution Azote-Chlorure | 130 |
| Tableau 25: Etude statistique de différentes phases observées sur le rendement en hydrogène | 134 |
| Tableau 26 : Niveau fixé pour chaque facteur | 139 |
| Tableau 27 : Caractéristique de chaque test suivant le plan d'expérience fixé | 139 |
| Tableau 28 : Résultats de la production d'hydrogène en termes de rendement, de temps de latence et de cinétique ainsi que la conductivité de milieu pour les expériences du plan d'expérience effectuées à 37°C et 55°C..... | 141 |
| Tableau 29 : pH final mesuré à la fin de chaque expérience pour les températures de 37 et 55°C ... | 143 |
| Tableau 30 : Résultats de la résolution de l'équation du plan d'expérience sur le rendement en hydrogène | 144 |
| Tableau 31 : Résultats de la production de méthane en termes de rendement, de temps de latence pour les expériences du plan d'expérience effectuées à 37 et 55°C | 148 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 32 : Résultats de la résolution de l'équation du plan d'expérience sur le rendement en AGVs | 152 |
| Tableau 33 : Abondance relative des microorganismes observés dans les expériences opérées à une température de 37°C | 159 |
| Tableau 34 : Abondance relative des microorganismes observés dans les expériences opérées à une température de 55°C | 160 |
| Tableau 35 : Résultats de la production d'hydrogène en termes de rendement (mLH ₂ /gMV), de temps de latence (heures) et de cinétique (mLH ₂ /gMV/h) pour les différentes proportions en PCJ ajoutées dans le substrat | 170 |
| Tableau 36: Calcul des ratios Bu/Ac, H ₂ /(2x[Bu+Ac]) et H ₂ /(H ₂ +CH ₄ théorique) pour les expériences contenant différentes proportions en PCJ dans le milieu de fermentation..... | 175 |
| Tableau 37 : Analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production maximale) et de méthane (temps de latence) | 190 |
| Tableau 38 : Analyse de la fermentation sombre sur la conductivité, le pH initial et final ainsi que le ratio Bu/Ac et H ₂ /(2 x[Bu+Ac]) | 194 |
| Tableau 39 : Analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production) et de méthane (temps de latence) | 197 |
| Tableau 40: Analyse de la fermentation sombre sur la conductivité, le pH initial et final ainsi que le ratio Bu/Ac et (H ₂)/(2x[Bu+Ac]) | 200 |
| Tableau 41 : Analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production)) | 204 |
| Tableau 42 : ratio Bu/Ac et H ₂ /(2x[Bu+Ac])..... | 207 |
| Tableau 43 : Analyse réalisée par blast sur les microorganismes d'ordre <i>Clostridiales</i> et <i>Lactobacillales</i> observés dans cette étude | 209 |
| Tableau 44 : Ratio de biohythane théoriquement obtenu issu des produits de fermentation lors de l'étude de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique | 213 |
| Tableau 45 : Analyses liées à la production d'hydrogène pour les deux réacteurs de fermentation . | 221 |
| Tableau 46: Comparaison des résultats de la production d'hydrogène sur trois études avec les conditions identique (siccité : 15%, pH non régulé, T°C : 37°C, traitement thermique) | 222 |
| Tableau 47 : Analyses des composés majoritaires en fin de fermentation | 224 |
| Tableau 48 : Comparaison de la fermentation sombre sur les différentes études | 224 |
| Tableau 49 : Dimensionnement des réacteurs utilisés | 226 |
| Tableau 50 : Conditions opératoires de l'étude de la siccité sur la production d'hydrogène | 245 |
| Tableau 51 : Composition du milieu (substrat/inoculum) en fonction des siccités appliquées..... | 245 |
| Tableau 52 : Conditions opératoires pour réaliser le test BMP..... | 247 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ACV : Analyse du Cycle de Vie

Acetyl-CoA : Acétyl-coenzyme

AGVs : Acides gras volatils

ANOVA : Test statistique de comparaison des variances

ATP : Adénosine TriPhosphate

CE-SSCP : Single Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism

CH₄ : Méthane

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CSR : Combustibles Solides de Récupération

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DMA : Déchets Ménagers et Assimilés

FFOM : Fraction Fermentescible des Ordures Ménagères

H₂ : Hydrogène

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

MODECOM : MéthOde DE Caractérisation des Ordures Ménagères

MS : Matière Sèche

MV : Matière Volatil

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

OMB : Ordures Ménagères Bruts

PCJ : Papier, Carton et déchets de Jardin

pH : Potentiel Hydrogène

SILEX : Système d'Information pour L'Expérimentation

TAN : Azote ammoniacal

TSH : Temps de Séjour Hydraulique

UASB : Upflow Anaerobic Sludge Blanket

Introduction

De nos jours, la production mondiale de déchets ménagers et assimilés s'élève à 1,3 milliard de tonnes par an avec une augmentation à 2,2 milliards de tonnes prévues d'ici 2025 [1]. Sans changement dans les pratiques de gestion, une telle augmentation du volume des déchets collectés posera de nombreux problèmes liés à un manque d'espace pour leur stockage et un impact négatif sur l'environnement. De plus, la faible réutilisation des matériaux va entraîner des difficultés en lien avec la raréfaction des matières premières. Ces problématiques ont largement été étudiées et tout le monde s'accorde sur le fait qu'un effort mondial doit être réalisé pour y remédier. Dès 1995, le protocole de Kyoto fut un élément fondateur dans ce sens, qui visait à lutter contre le réchauffement climatique en réduisant les émissions de gaz à effet de serre (réduction de 5%) et engendrait un premier pas vers la transition énergétique.

Depuis, la France a affiché sa volonté d'assurer une gestion optimale des déchets tout en accélérant la transition énergétique pour une croissance verte. Aujourd'hui, cette volonté est appuyée par la loi LTE du 17 août 2015 qui permet de contribuer de façon efficace à la lutte contre le dérèglement climatique, à la préservation de l'environnement ainsi qu'au renforcement de l'indépendance énergétique de la France et à la limitation des déchets organiques mis en ISDND (Installation de Stockage des Déchets Non Dangereux). Dans ce contexte, une nouvelle manière de consommer émerge, notamment dans le but de passer d'une économie dite linéaire à une économie circulaire qui vise, entre autres, à limiter le gaspillage des ressources et à perfectionner les technologies de traitement/valorisation/recyclage des déchets. Dans le domaine du traitement des déchets, nombreux sont ceux qui ont choisi la voie de la valorisation énergétique par incinération ou bien par dégradation biologique de la partie fermentescible des ordures ménagères (FFOM) pour la production et la valorisation du biogaz. La valorisation par voie biologique est en effet particulièrement prometteuse pour les déchets organiques qui ne peuvent entrer dans une filière de recyclage.

Parmi les solutions possibles, la méthanisation est une technologie largement développée et éprouvée pour convertir la matière organique en énergie sous forme de méthane (ou CH₄). Depuis quelques années, un intérêt croissant s'est également porté sur la production d'hydrogène qui est considérée comme un autre vecteur clé de la transition énergétique [2]. En effet, l'hydrogène possède un pouvoir calorifique plus élevé (120 kJ/g) que le méthane

(50 kJ/g) [3] et l'eau est le seul produit issu de sa combustion ce qui en fait un composé de choix pour le secteur des transports [4]. De plus, l'hydrogène peut être ajouté au méthane à hauteur de 5 à 20% pour former un mélange appelé Hythane[®] qui possède un impact environnemental plus faible que du méthane pur s'il est utilisé en tant que carburant [5]. En effet l'ajout d'hydrogène dans le méthane permet de réduire les émissions de gaz polluant tels que le monoxyde de carbone (CO) ou les hydrocarbures (HCs) [6,7]. Alors que ce mélange est essentiellement généré à partir de ressources fossiles (gaz naturel), l'Hythane[®] peut également être produit par voie biologique à l'aide de procédés en deux étapes, couplant un réacteur de fermentation sombre producteur d'H₂ et un réacteur de méthanisation. La production de ce mélange appelé alors biohythane, consiste donc en la séparation physique des réactions microbiologiques d'hydrolyse/d'acidification et de méthanisation, permettant ainsi d'optimiser les conditions opératoires de chaque réacteur indépendamment pour une production optimale des deux gaz [8].

Ces travaux de thèse ont été réalisés en collaboration avec le syndicat Trifyl, et ce contexte particulier doit être décrit pour mieux appréhender le cadre des recherches réalisées. Trifyl est un syndicat départemental de traitement des déchets ménagers et assimilés du Tarn, qui est né de l'élaboration du premier Plan Départemental d'élimination de ces déchets en 1999. A cette date, Trifyl a choisi comme technologie de traitement et de valorisation des ordures ménagères la voie d'alvéoles de stockage hermétiques avec percolation des lixiviats (eaux résiduelles) et récupération des gaz (autrement dénommés procédés bioréacteurs). Au début des années 2000, ce procédé constituait la meilleure solution technique et sociétale, et offrait une avancée importante par rapport à un simple enfouissement technique. De nos jours, les cellules bioréacteurs implantées sur le site de Trifyl à Labessière Candeil permettent de valoriser, par dégradation biologique, les déchets qui n'ont pu être préalablement recyclés, compostés ou valorisés, soit en d'autres termes, les « déchets ultimes ». Actuellement, le débit de biogaz collecté dans les casiers du bioréacteur est d'environ 1 500 m³/h avec une composition de celui-ci d'environ 50% de méthane, le reste étant des gaz non énergétiques (CO₂, O₂, N₂, H₂S). A partir du biogaz produit par dégradation des déchets fermentescibles dans les casiers du bioréacteur, TRIFYL a mené un important travail pour évaluer toutes les voies possibles de valorisation dans un esprit de bioraffinerie environnementale. Sur le site de Trifyl, ce biogaz est aujourd'hui transformé en électricité

(19,8 millions de kWh produit en 2016) et en chaleur par cogénération, en biométhane carburant (qui alimente une douzaine de véhicules légers des services de Trifyl et trois véhicules lourds, 45 400 Nm³ produit en 2016) ainsi qu'en hydrogène, grâce au projet de reformage de biogaz « VABHYOGAZ ». Afin de se conformer aux nouvelles dispositions légales introduites par la loi sur la transition énergétique du 17 août 2015 (LTE), Trifyl a également engagé une réflexion sur le devenir du traitement des déchets ménagers résiduels sur son territoire. Ce nouveau cadre oblige Trifyl à repenser son mode de traitement afin d'être en adéquation avec cette loi qui pousse à augmenter la part de valorisation des déchets et, finalement, diminuer la quantité de déchets stockés. C'est dans ce contexte que Trifyl, en 2014, a mis en œuvre un travail d'anticipation pour définir une solution de traitement des déchets résiduels répondant aux prescriptions réglementaires et fiscales à venir, et en adéquation avec les équipements déjà en place. Le nouveau projet du syndicat concernant le changement de technique de traitement des déchets ménagers se veut innovant mais dans la continuité de ce qui a déjà été fait.

Cela comprend notamment une technique de traitement de déchets pour la valorisation de matière et plusieurs voies de valorisation énergétique des sous-produits :

- Injection de biométhane produit par méthanisation dans le réseau de gaz naturel
- Développement de la filière biométhane carburant
- Production et distribution d'hydrogène carburant vert
- Production de combustibles solides de récupération (CSR) pour la production de gaz ou de chaleur et d'électricité

C'est dans ce contexte que Trifyl a souhaité travailler sur la production d'hydrogène par voie fermentaire et s'est intéressé à la production de biohythane, en complément de la production d'hydrogène par voie thermochimique.

Dans le procédé à deux étapes pour la production de biohythane, la méthanisation étant un procédé mature, il a été nécessaire de s'intéresser plus en détail à la fermentation sombre pour la production d'hydrogène qui reste à l'état de recherche. La possibilité de passer d'une échelle laboratoire à une échelle pilote et enfin industrielle repose sur une meilleure compréhension des mécanismes clés mis en œuvre dans ce procédé afin d'envisager une

optimisation ultérieure. Les paramètres clés liés au contexte industriel de Trifyl ont été essentiellement centrés autour des ressources présentes sur le site de Trifyl pour réaliser un procédé de fermentation sombre à savoir, la FFOM collectée par Trifyl et le lixiviat permettant d'une part un apport de la communauté microbienne productrice d'hydrogène, et d'autre part un apport d'eau indispensable pour une production conséquente d'hydrogène. Cependant l'utilisation de ces ressources spécifiques à Trifyl a entraîné plusieurs problématiques propres à cette étude. En effet, plusieurs inhibitions peuvent être causées par des éléments contenus dans le lixiviat qui, à force de s'accumuler dans le milieu, peuvent impacter négativement la production d'hydrogène. Dans ce contexte, il a donc été nécessaire dans un premier temps de s'intéresser aux principaux inhibiteurs de la fermentation sombre en culture mixte. Lors de l'utilisation de déchets de types FFOMs composés de déchets alimentaires (44 %), l'azote ammoniacal sous sa forme ammoniac a régulièrement été rapportée comme fortement problématique [9]. Il a donc été nécessaire lors de cette thèse d'en étudier l'impact dans notre procédé de fermentation. De plus, le lixiviat possède une concentration importante en ions qui peut également perturber la fermentation sombre via la force ionique, il a alors été primordial d'étudier les conséquences de ce facteur sur la production d'hydrogène.

En opposition avec les paramètres perturbant négativement la production d'hydrogène, l'amélioration du rendement en hydrogène via l'étude de différents paramètres, soit facilement ajustables (taux de matière sèche, température) ou difficilement modifiables au niveau industriel (pH, concentration en ammoniac, caractéristique du substrat) a été effectuée. En effet, la connaissance globale des valeurs permettant une intensification de la productivité d'hydrogène permettra une meilleure fiabilité du procédé à l'échelle industrielle. Globalement, l'optimisation de la production d'hydrogène va permettre d'améliorer la stabilité et la robustesse du réacteur de fermentation afin de favoriser la crédibilité économique d'un tel procédé.

De plus, dans un souci de gestion de la phase liquide en sortie de fermenteur (effluent), il a été décidé de s'intéresser à un procédé de recirculation de l'effluent pour réaliser des fermentations successives. Ce procédé de recirculation va permettre d'une part un apport de microorganismes adapté à la fermentation sombre et d'autre part de réguler le pH du milieu. Cependant un tel procédé va entraîner une accumulation d'inhibiteurs (acides gras

volatils, ammoniac, archées méthanogènes) qui vont engendrer une diminution du rendement en hydrogène au cours des recirculations. Il a donc été nécessaire d'étudier le procédé de recirculation de l'effluent pour des fermentations successives dans sa globalité afin de connaître les limites d'un tel procédé. Lors de cette étude une attention particulière c'est portée sur le développement des archées méthanogènes (consommatrice d'hydrogène) avec pour volonté de trouver une méthode de traitement efficace et optimale pour limiter leurs impacts sur le rendement en hydrogène.

Enfin, dans le but de réaliser un procédé de production de biohythane à échelle industrielle, des problématiques liées aux changements d'échelle et plus particulièrement au dimensionnement du réacteur ont également été étudiées attentivement. En effet, la configuration du réacteur peut modifier certaines données physico-chimiques (pression partielle en hydrogène, transfert gaz/liquide) qui vont potentiellement engendrer une diminution du rendement en hydrogène.

Les résultats de ces différentes études serviront de base de dimensionnement d'un procédé à deux étapes en vue à terme, d'une production industrielle de biohythane® (Figure 1).

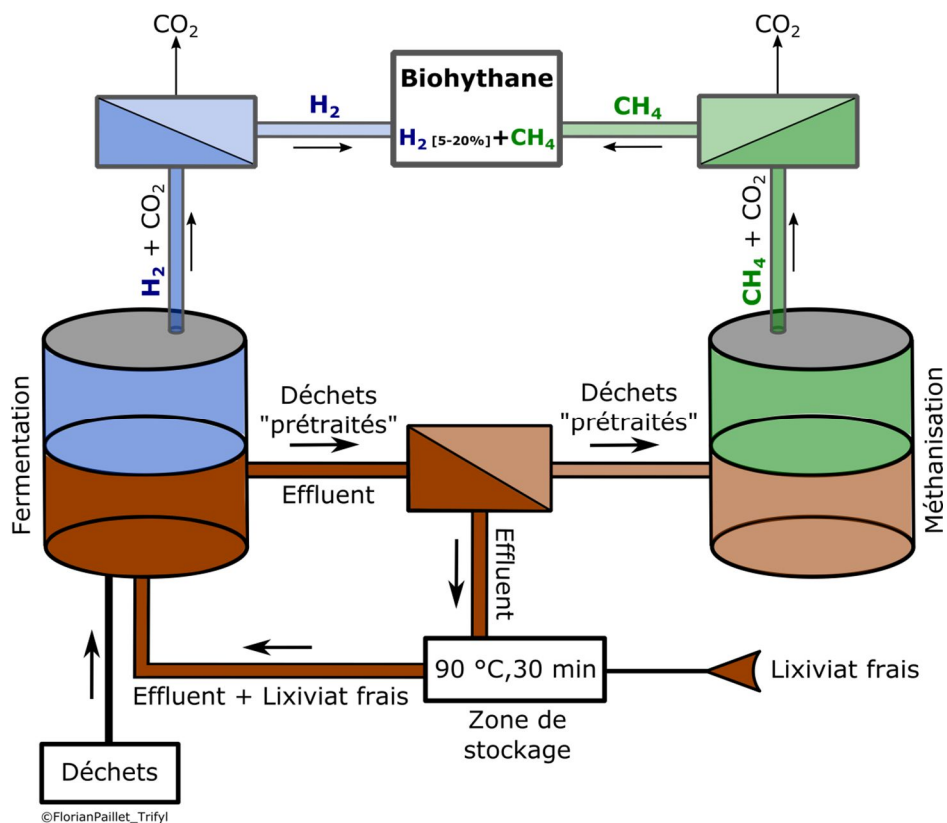


Figure 1 : Procédé à deux étapes pour la production de biohythane® envisagé

Ce document est constitué de cinq chapitres.

Le premier chapitre consiste en une *Etude Bibliographique* qui rappelle le contexte et les enjeux de la gestion et la valorisation des déchets ménagers et assimilés dans le cadre d'une économie circulaire. Ce chapitre va également mettre en avant les enjeux scientifiques et techniques d'un procédé à deux étapes pour la production de biohythane avec une attention particulière pour la production d'hydrogène. Dans ce contexte, le procédé de fermentation sombre sera largement étudié.

La partie *Matériel et Méthodes* constitue le deuxième chapitre de cette thèse et décrit l'ensemble des techniques expérimentales qui ont été mises en œuvre au cours de ce travail.

La partie *Résultats et Discussion* est décomposée en deux chapitres qui synthétisent plusieurs études expérimentales. Ainsi le *Chapitre III* est dédié à l'optimisation des paramètres opératoires liés à la production d'hydrogène d'un procédé de fermentation sombre de FFOM. Dans un premier temps, l'inhibition de la production d'hydrogène causée par l'accumulation d'azote ammoniacal et de la force ionique, qui peuvent être deux facteurs très problématiques lors de l'utilisation de substrats réels comme la FFOM, a été évaluée. Dans un second temps, l'optimisation de différents paramètres opératoires a été réalisée, en se focalisant plus particulièrement aux paramètres liés au contexte industriel, ie. température, taux de matière sèche (siccité), pH et concentration en azote ammoniacal. Enfin, une dernière partie a été consacrée à l'étude des caractéristiques du substrat utilisé pour la fermentation sombre et, en particulier, l'impact de la proportion des déchets types papiers, cartons et déchets de jardin présents en grande quantité dans les FFOMs.

Le *Chapitre IV* concerne la stabilité et la robustesse du procédé de fermentation, dans le cadre d'un couplage avec un réacteur de méthanisation. Une première étude va s'intéresser à un procédé de recirculation de l'effluent afin de réaliser des fermentations successives permettant ainsi un apport d'eau et d'une communauté bactérienne propice à la production d'hydrogène. Cette étude aura deux objectifs qui sont d'une part : de déterminer une méthode de traitement thermique pertinente de l'effluent dans le cadre d'une recirculation et, d'autre part : d'évaluer l'accumulation d'inhibiteurs potentiels retenus dans la phase liquide après plusieurs recirculations. Enfin, une dernière étude présentera des résultats expérimentaux menés sur un réacteur pilote (60 L) afin d'évaluer l'impact d'un changement

d'échelle sur un procédé de fermentation sombre et ainsi de mettre en avant les premières problématiques et différences observées sur la production d'hydrogène par rapport à une échelle laboratoire.

Enfin, un dernier chapitre *Conclusions et Perspectives* permettra de synthétiser sur les résultats majeurs de ce doctorat et d'envisager les perspectives de ces travaux, tant au niveau académique sur le procédé de fermentation sombre, qu'au niveau de la mise en place de la filière de valorisation de la fraction fermentescible des ordures ménagères au niveau industriel.

Chapitre I : Revue Bibliographique

1. Déchets Ménagers et Assimilés

D'après l'article L541-1 du Code de l'Environnement, un déchet correspond à « *toute substance ou tout objet, ou plus généralement tout bien meuble, dont le détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire* ».

1.1. Histoire de la gestion des déchets ménagers

Aux origines, les êtres humains produisaient peu de déchets (os, cendres, outils) du fait de leur mode de vie primaire, et les déchets étaient alors directement jetés dans la nature. La gestion des déchets a réellement commencé à voir le jour lors de la sédentarisation des populations à la période de l'antiquité avec la construction des premières cités. En effet, à partir de cette période, différents édifices tels que des fosses ont été construits en dehors des villes pour accueillir les déchets urbains et les restes d'animaux [10]. La période du Moyen-Age va quant à elle être marquée par une période d'insalubrité où la gestion des déchets est devenue extrêmement problématique. En effet, lors de cette période, la croissance démographique dans les villes a entraîné une accumulation de déchets sans gestion adéquate. Des espaces vides, des ruines ou encore des terrains vagues ont alors été utilisés en tant que dépotoirs [11]. En Europe, il était répandu de jeter les déchets directement par la fenêtre. A cette époque, des porcs étaient même élevés à l'intérieur des villes pour jouer le rôle de nettoyeurs capables d'éliminer des quantités importantes de déchets [12]. Lors de cette période, la mauvaise gestion des déchets engendra une répétition de crises sanitaires. En effet, l'augmentation de l'insalubrité accrue la pullulation de rats et la contamination de l'eau provoquant d'importantes épidémies, telles que le choléra ou encore la peste noire, qui tuèrent entre 30 et 50% de la population européenne, soit 25 millions de personnes, entre 1347 et 1352.

Ce n'est seulement qu'au XVI^e et XVII^e siècles que l'on retrouve des traces de réelles avancées en gestion de déchets. En effet, Louis XII est le premier, lors de la Renaissance en 1506, à décider que les ordures de la capitale seraient ramassées et évacuées par la royauté [12]. C'est à ce moment-là que la population n'a plus la charge de la gestion des ordures.

C'est alors que la première taxe sur la gestion des déchets apparaît (1509), appelée taxe des boues et des lanternes. Les premiers paniers pour accueillir les déchets sont ensuite apparus lors du règne de François 1^{er} en 1515 [12]. D'après De Silguy (1996), les premiers horaires de passage pour la collecte des déchets se font sous l'ordre du Roi soleil en 1666 [13].

Il faudra attendre le 19^{ème} siècle avec Eugène Poubelle qui, à l'aide des arrêtés du 24 novembre 1883 et du 7 mars 1884, va imposer à chaque immeuble de Paris de posséder des récipients munis de couvercles avec une capacité de 120 litres maximum ayant pour but de collecter les déchets ménagers. Ces arrêtés vont, pour la première fois, mettre en place un système de tri avec trois poubelles obligatoires pour : les déchets putrescibles, les papiers et textiles, et enfin le verre, la faïence etc.

De nos jours, les lois en vigueur fixent comme objectifs de favoriser et d'optimiser la valorisation et la gestion des déchets. Ces objectifs sont définis dans un cadre communautaire et national (directive cadre 2008/98/CE) relatif à la protection de l'environnement et de la santé humaine, dont la loi Grenelle I adoptée en octobre 2008 (réduction des déchets ménagers et assimilés de 7% par habitant) et la loi Grenelle II promulguée le 12 juillet 2010 (amélioration du tri et de la collecte sélective). Les objectifs de recyclage, de récupération et de valorisation des déchets, fixés par ce cadre réglementaire pour la période 2012-2020, concernent de nombreux types de déchets, dont les emballages ménagers, les VHU (Véhicules Hors d'Usages), les DEEE (Déchets des Equipements Electriques et Electroniques), les piles et accumulateurs et les déchets de construction et démolition [14].

Par ailleurs, la loi LTE du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte a été promulguée afin de définir les objectifs communs pour réussir la transition énergétique, en renforçant l'indépendance énergétique et la compétitivité économique de la France, tout en préservant la santé humaine et l'environnement, et en luttant contre le changement climatique. Une place est réservée à la gestion des déchets, notamment **l'article 70** qui prévoit que la France se donne pour objectif de passer à un modèle d'économie circulaire avec une réduction de 30% d'ici 2020 de la quantité de déchets non dangereux non inertes admis en installation de stockage. Ce modèle est fondé sur une consommation sobre et responsable des ressources naturelles et des matières premières

primaires en limitant la production de déchets et en améliorant les modes de traitements des déchets (recyclage, valorisation énergétique).

Au-delà des lois imposées par l'UE et la France dans le cadre de la gestion des déchets, la problématique actuelle des déchets est mondiale avec un impact croissant sur l'ensemble des populations. En effet, d'après le rapport « What a waste », les déchets ménagers et assimilés génèrent de fortes émissions de gaz à effet de serre (1 460 mtCO₂e soit environ 5% des émissions mondiales de gaz à effet de serre). Ces rejets sont causés, en autres, par le méthane produit lors du stockage des déchets organiques non traités [1]. Or, la production de ce type de déchets ne cesse d'augmenter avec le développement démographique mondial, suggérant potentiellement un impact environnemental croissant.

1.2. Production de déchets ménagers et assimilés

Aujourd'hui la production mondiale de déchets ménagers et assimilés s'élève à 1,3 milliard de tonnes par an et atteindrait près de 2,2 milliards de tonnes d'ici 2025 selon la banque mondiale. En parallèle, le coût de gestion de ces déchets, estimé à 205,4 milliards de dollars aujourd'hui, s'élèverait à 375,5 milliards de dollars en 2025.

Dans le monde, les Etats-Unis sont les plus gros producteurs de déchets ménagers par habitant avec plus de 700 kg de déchets produits par an (Figure 2) [15]. L'Europe est actuellement le quatrième producteur avec une stabilisation en dessous de 500 kg par habitant et par an. Autres acteurs économiques majeurs, les pays émergents (Turquie, Mexique ou Chine) ont vu leurs productions annuelles de déchets par habitant augmenter significativement entre 1990 et 2012.

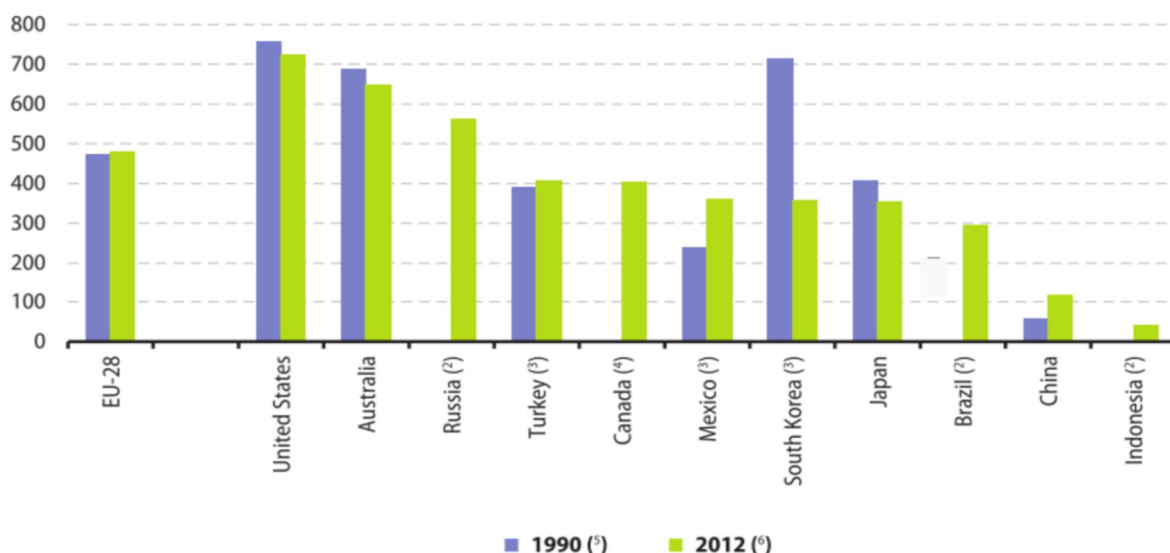


Figure 2 : Production de déchets ménagers depuis 1990 (en kg par habitant)[15]

Les dix plus grands producteurs de déchets ménagers à l'échelle européenne sont présentés sur la Figure 3. L'Allemagne, la France, le Royaume-Uni, la Turquie, l'Italie et l'Espagne sont de loin les plus gros producteurs avec un record atteint par l'Allemagne en 2015 avec près de 51 millions de tonnes de déchets ménagers produits. Dans sa globalité, la production en Europe est restée stable de 2006 à 2015 (251,6 ± 6,9 millions de tonnes).

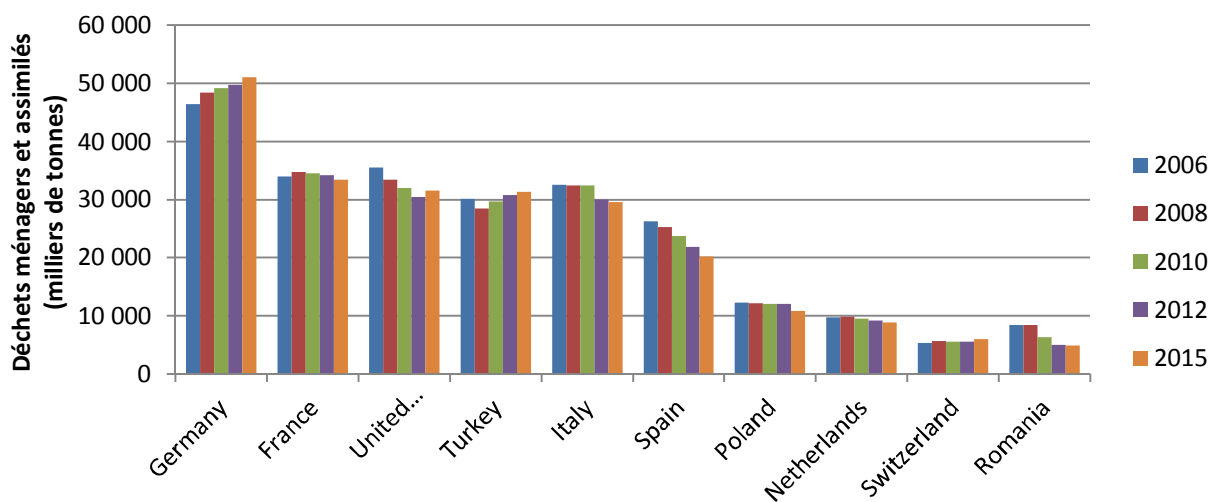


Figure 3 : Production de déchets municipaux en Europe

L'augmentation de la quantité générée provient principalement de l'expansion de la population urbaine mais également de l'augmentation de la quantité de déchets produits par habitant. En effet, chaque citoyen produisait environ 0,64 kg de déchets ménagers par jour il y a dix ans, alors qu'actuellement la production par habitant est de 1,2 kg/jour et est estimée à 1,42 kg/hab/jour à l'horizon de 2025 [1]. Aujourd'hui, au vu de l'augmentation de la production de déchets ménagers et assimilés dans le monde et afin d'éviter leurs

accumulations, il est primordial de connaître avec précision les caractéristiques d'une telle entité afin de réaliser une gestion adéquate.

1.3. Caractérisation des déchets ménagers et assimilés

Les déchets ménagers et assimilés (DMA) aussi appelés déchets municipaux sont les déchets des ménages ou provenant des entreprises industrielles, des artisans, des commerçants, des écoles, des services publics, des hôpitaux (non dangereux) et des services tertiaires. Les DMA sont composés de plusieurs éléments présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractérisation des déchets ménagers et assimilés (DMA)

| | |
|--------------------------------------|--|
| Déchets ménagers et assimilés | Déchets résiduels |
| | Déchets recyclables |
| | Déchets verts et organiques |
| | Déchets d'équipements électriques et électroniques |
| | Déchets ménagers spéciaux |
| | Déchets toxique en quantités dispersées |
| | Déchets inertes |
| | Déchets amiante/ciment |
| | Déchets assainissement |
| | Déchets issus du traitement de l'eau potable |

Afin d'améliorer les connaissances sur l'évolution de la composition des déchets issus des ménages et, ainsi, de les valoriser et les traiter plus efficacement, une caractérisation spécifique des ordures ménagères résiduelles est régulièrement effectuée en France. Les déchets résiduels désignent les déchets qui restent après les collectes sélectives. C'est une fraction très hétérogène dans sa composition mais possédant un potentiel de valorisation, il est donc nécessaire de réaliser une caractérisation précise de ces types de déchets. Pour cela, un protocole national appelé MODECOM (MéthOde DE Caractérisation des Ordures Ménagères) a été mis en place par l'ADEME pour permettre une caractérisation précise et robuste en déterminant différentes fractions. La campagne nationale de caractérisation des ordures ménagères résiduelles menée en 2007 et réalisée sur 100 communes a montré

qu'en majorité les ordures ménagères résiduelles étaient composées de déchets putrescibles, de papier, d'éléments fins (<20 mm), de plastique, de verre, de textiles sanitaires et de carton (Figure 4). Les déchets contiennent également des éléments en plus faibles proportions (<5%), comme les composites, les textiles, les combustibles non classés, les métaux, les incombustibles non classés et enfin les déchets dangereux [16]. D'après l'ADEME, la composition globale des ordures ménagères (ordures ménagères résiduelles et collectes séparées confondues) n'a que peu évolué entre 1993 (date de la première campagne nationale de caractérisation) et 2007. Seuls la proportion de textiles sanitaires a été observée en forte augmentation.

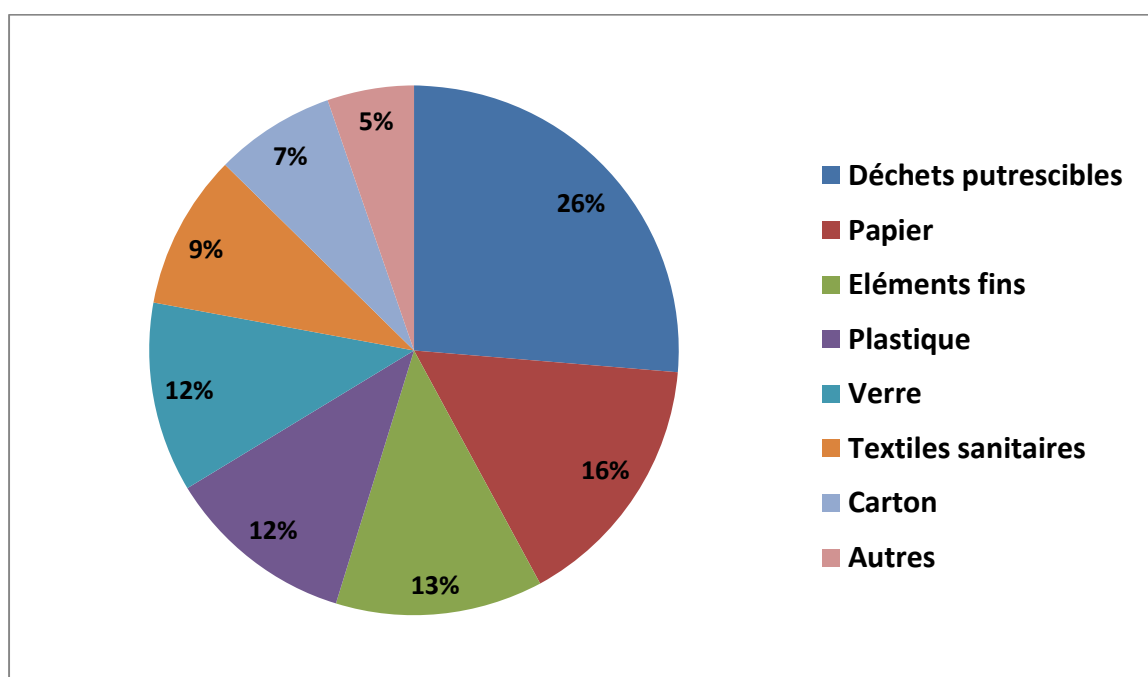


Figure 4 : Caractérisation des ordures ménagères résiduelles

A partir de cette caractérisation, l'ADEME a estimé que 27% du gisement d'ordures ménagères résiduelles présentaient un potentiel de valorisation matière, et que les 63 % restant présentaient un potentiel de valorisation organique (déchets putrescibles, papier, carton, textiles sanitaires).

2. Modes de valorisation des déchets ménagers et assimilés

Suite à la loi LTE qui vise à réduire le stockage des déchets et la raréfaction des matières premières, les déchets ménagers sont aujourd'hui perçus comme une ressource non négligeable de matières. Cette nouvelle vision entre parfaitement dans une dynamique d'un nouveau mode de consommation et de fonctionnement basé sur une économie plus durable appelée « économie circulaire ».

Selon l'ADEME, l'économie circulaire « vise à changer de paradigme par rapport à l'économie dite linéaire, en limitant le gaspillage des ressources et l'impact environnemental, et en augmentant l'efficacité à tous les stades de l'économie des produits » (Figure 5). L'économie circulaire vise donc, dès la conception d'un produit, d'un procédé ou d'un service à en minimiser son impact environnemental (écoconception). Ceci passe par une consommation responsable où le consommateur est amené à choisir au mieux ce qu'il consomme en prenant en compte l'impact environnemental du cycle de vie du produit. Une volonté d'allonger la durée de vie du produit par sa réparation ou par l'achat de produits d'occasion est un facteur important. Lors de la fin de vie du produit, la matière première peut également être recyclée ou valorisée afin de créer un nouveau produit à mettre sur le marché.

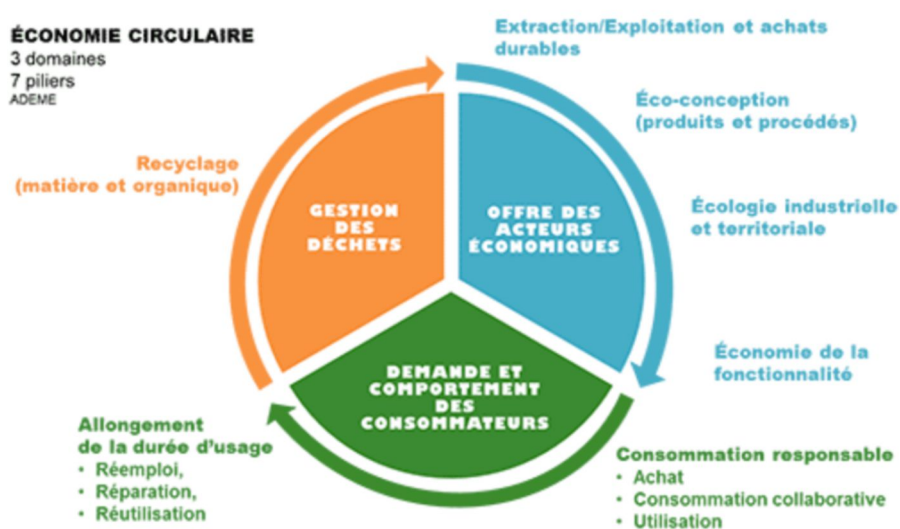


Figure 5 : Principe de l'économie circulaire (source : ADEME)

Une gestion durable des déchets doit donc intégrer :

- des voies de valorisation de la matière via les procédés de recyclage,
- des voies de valorisation thermique pour la production d'énergie,
- des voies de valorisation biologique utilisant des microorganismes pour transformer la matière en fertilisant (compost) ou en énergie (biogaz).

La filière de valorisation doit être adaptée au type de déchets contenus dans les déchets ménagers et assimilés (Tableau 2). En effet, la valorisation matière concerne principalement les déchets recyclables et les déchets d'équipements électriques et électroniques (DEEE), tandis que les valorisations thermique et biologique sont plus adaptées respectivement aux déchets résiduels et aux déchets verts et organiques.

Tableau 2: Moyens de valorisation en fonction du type de déchets présents dans les DMA proposé par Trifyl

| | |
|--|---|
| Déchets résiduels | Stockage ou valorisation énergétique |
| Déchets recyclables | Valorisation matière |
| Déchets verts et organiques | Valorisation organique/bois énergie |
| Déchets d'équipements électriques et électroniques | Valorisation matière |
| Déchets ménagers spéciaux | Traitement spécifique |
| Déchets toxique en quantités dispersées | |
| Déchets inertes | Réemploi ou stockage |
| Déchets amiante/ciment | Stockage |
| Déchets assainissement | Valorisation agricole, compostage, stockage |

2.1. Valorisation par voie non biologique

Les valorisations par voie non biologique sont aujourd'hui les procédés les plus utilisés permettant une réutilisation de la matière première. Les voies non biologiques comprennent une valorisation directe de la matière par le procédé de recyclage, ou, la valorisation énergétique par voie thermique.

La valorisation matière réalisée via les procédés de recyclage permet la réutilisation directe de la matière première (verre, carton, métal, plastique...). La première étape consiste à trier les déchets ménagers et assimilés afin d'acheminer la matière vers les différents procédés de recyclage. Celle-ci doit être préalablement séparée en différentes fractions correspondant à des familles de matériaux. La mise en place d'une collecte sélective permet de faciliter ce tri préalable. En 2014, 17,5 millions de tonnes de déchets ont été recyclés [17]. Les familles de matériaux qui peuvent être recyclées sont le papier et le carton, le verre, le plastique, les métaux et les combustibles solides de récupération (CSR). Aujourd'hui, Chaque famille de matériau est recyclée de façon plus ou moins importante notamment en fonction de la difficulté technique engendrée par leur recyclage, par exemple ; en 2007, 7 millions de tonnes de papier et de carton ont été recyclés en France [10]. En 2014, 2,5 millions de tonnes de verre et entre 250 000 et 300 000 tonnes de plastique ont également fait l'objet d'un recyclage [19,20]. La valorisation de la matière par recyclage est la voie à privilégier pour répondre aux objectifs législatifs.

La valorisation énergétique par voie thermique consiste quant à elle à récupérer et valoriser l'énergie produite lors du traitement des déchets. En général ce type de valorisation est effectué pour des déchets qui n'ont pu subir une valorisation matière associée au recyclage. Le traitement thermique est actuellement le mode de valorisation le plus répandu pour transformer les déchets en énergie (électricité, chaleur et gaz). En France en 2010, 11,8 millions de tonnes de déchets ménagers ont été traités thermiquement pour la production d'énergie selon la « Confédération of European Waste-to-Energy Plants » [21]. Le traitement thermique comprend plusieurs procédés tels que l'incinération, la pyrolyse et la gazéification. Aujourd'hui, l'incinération est le procédé le plus couramment utilisé. Selon l'ADEME, en France, la plupart des technologies de pyrolyse et de gazéification sont encore au stade pilote ou de démonstration industrielle. Les principaux leviers pour le développement de ces procédés sont d'ordre technique, économique (étude de la viabilité économique) et réglementaire.

L'incinération, seul procédé répandu au niveau industriel de valorisation thermique, consiste à l'oxydation des matières combustibles contenues dans les déchets. Les matières organiques brûlent lorsqu'elles atteignent leurs températures d'inflammation au contact de

l'oxygène. La combustion permet de récupérer l'essentiel de l'énergie produite sous forme de chaleur. Si la proportion d'oxygène et de déchets est optimale, il peut y avoir une réaction thermique en chaîne et donc une combustion auto-entretenu sans apport de combustibles complémentaires [22]. En sortie d'un incinérateur, la composition des gaz brûlés est en majorité de l'azote, du dioxyde de carbone et de l'oxygène. Les impuretés comme les métaux lourds volatils ou les composés inorganiques sont retrouvées dans la poussière (cendres volantes de résidus minéralisés) ou les mâchefers (cendres solides plus lourdes) [22]. Le principal avantage de l'incinération est qu'il peut réduire de 95% le volume des déchets [23]. En 2012, 127 installations ont été recensées par l'ADEME en France, ce qui correspond à une capacité d'accueil de 15,4 millions de tonnes de déchets par an, soit une production de 3,6 GWh d'électricité et de 7,6 GWh de chaleur [24].

2.2. Valorisation par voie biologique

Un autre moyen de traiter les déchets et notamment les déchets résiduels, vert et organiques est la valorisation par voie biologique qui, du fait de son faible impact environnemental, rend ce procédé attractif. Historiquement le compostage et la méthanisation sont les procédés les plus utilisés industriellement. La méthanisation a connu notamment un fort développement en France depuis 2006 grâce aux augmentations du tarif de rachat de l'électricité issu de la biomasse [25].

2.2.1. Compostage

Le compostage est un procédé biologique de décomposition de la matière fermentescible en conditions aérobies qui permet d'obtenir une matière fertilisante riche en composés humiques. Le compostage est un processus composé de quatre phases : La phase initiale qui est la phase mésophile (37°C) où des microorganismes mésophiles se développent (bactéries et champignons) dégradant les composés complexes (protéines, acides nucléiques, amidon, cellulose...) en molécules plus simples (sucres, acides aminés, alcools). Lors de cette étape un dégagement important de CO₂ est observé [26]. La deuxième phase du compostage est une phase thermophile caractérisée par une température élevée (60-70°C). Des bactéries

thermophiles vont dégrader les matières facilement dégradables (sucres, acides aminés, alcools) tout en générant de la chaleur lors de leur développement. Une forte production d'ammonium peut alors être observée. Lors de cette étape, l'augmentation de la température entraîne une déperdition d'eau qui engendre une réduction du volume de déchets jusqu'à 50% du volume initial [27]. La troisième phase représente la phase de refroidissement lente jusqu'à atteindre une température ambiante. Le milieu est alors à nouveau colonisé par des bactéries mésophiles qui finalisent la dégradation des polymères. Enfin, la dernière phase dite de maturation présente une faible activité microbienne (développement de champignons) mais est adaptée à la colonisation d'insectes comme les lombrics. Les matières organiques sont stabilisées et humifiées et le pH s'équilibre vers la neutralité.

En 2005, 3,3 millions de tonnes de déchets organiques ont été traitées par compostage. Les déchets valorisés sont constitués essentiellement de déchets verts (66%), de boues d'épuration (18%), de biodéchets des ménages (3%), d'effluents d'élevage (3%) ainsi que de résidus de récoltes, produits alimentaires, déchets de bois... (9%). L'inconvénient majeur du compostage des ordures ménagères est qu'un tri rigoureux doit être réalisé en amont afin de séparer la matière organique. Dans le cas contraire, le compost ne peut être épandu au risque de contaminations par des éléments indésirables (plastiques, métaux,...).

2.2.2. Digestion anaérobie (Méthanisation)

La méthanisation également appelée « digestion anaérobie » correspond à la transformation de la matière organique par une communauté microbienne complexe travaillant en anaérobiose (en absence d'oxygène) pour produire un biogaz principalement composé de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2). La méthanisation est un phénomène naturel retrouvé dans divers milieux où les conditions physico-chimiques permettent ce processus (intestins des animaux, rizières, fond des lacs, marais...). En conditions contrôlées, cette technologie peut être utilisée comme moyen de valorisation pour la dépollution des eaux ou encore pour le traitement des déchets d'origine urbaine, industrielle ou agricole.

La méthanisation est un procédé depuis longtemps industrialisé qui peut être mis en œuvre de différentes façons en fonction des substrats utilisés. En effet, la quantité de matière contenue dans le milieu réactionnel joue un rôle majeur sur le type de procédé utilisé. En fonction de la teneur en matières sèches (MS) également appelé siccité, un procédé dit en « voie liquide » ou « voie sèche » est préférentiellement utilisé.

∴ Voie Liquide

La méthanisation en voie liquide correspond à une teneur en matières sèches inférieures à environ 10%. En voie liquide, l'homogénéisation et le mélange du réacteur sont facilités [28]. Cependant, l'inconvénient majeur lié à ce type de technologie est l'apport non négligeable d'eau aux déchets bruts pour atteindre la teneur en MS souhaitée en entrée du procédé. Par conséquent un post-traitement onéreux du digestat est obligatoire afin d'extraire la phase liquide.

∴ Voie sèche

La méthanisation en voie sèche correspond à une teneur en matières sèches supérieures à 15-20 % [29]. Cette teneur en matières sèches est généralement choisie pour éviter d'obtenir un milieu diphasique (liquide/solide). En voie sèche, l'ajout d'eau est minimisé et ce mode de fonctionnement est bien adapté aux déchets ménagers et assimilés contenant une faible proportion en eau. Les avantages de ce procédé par rapport à la voie liquide sont qu'il requiert un volume de digesteur plus faible pour une même charge organique et nécessite un apport en énergie plus faible pour le chauffage des digesteurs. Enfin, de manière générale, la voie sèche réduit l'utilisation de post-traitements des digestats [30]. Cependant, l'inconvénient d'un procédé en voie sèche est qu'il peut induire des difficultés d'homogénéisation du réacteur et une forte accumulation d'inhibiteurs freinant la production de méthane.

En France, la plupart des procédés de méthanisation pour le traitement des déchets ménagers et assimilés correspondent à des procédés en voie sèche avec comme principales technologies les procédés Valorga (6 unités) et Kompogas (4 unités).

3. La fermentation sombre des déchets ménagers et assimilés

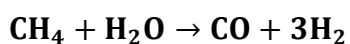
Au-delà de la production de méthane, une nouvelle voie de valorisation biologique est de nos jours en train d'émerger. En effet, un intérêt grandissant se porte sur la production d'hydrogène par fermentation sombre [42]. Comparé à la digestion anaérobie, cette nouvelle voie de valorisation allie la nécessité de valoriser au mieux la fraction fermentescible des ordures ménagères avec l'intérêt croissant récemment porté sur l'hydrogène en tant que vecteur énergétique.

Tout comme la voie de digestion anaérobie, la fermentation sombre consiste à utiliser une communauté microbienne spécifique pour la dégradation des composés organiques en hydrogène. Comme expliqué ci-dessous, l'hydrogène est considéré comme un élément clé pour sa capacité à être stockée et pour son utilisation en tant que carburant. Si celui-ci est issu de la fraction fermentescible des déchets ménagers, alors son impact environnemental devient très faible.

3.1. Généralité : l'hydrogène

La molécule de dihydrogène ou plus communément appelé hydrogène est la plus petite molécule existante avec une densité de 0,084 kg/m³. Elle se compose de deux atomes d'hydrogène et possède une masse moléculaire de 2,016 g/mol. L'hydrogène est l'élément le plus abondant mais reste cependant faiblement disponible à l'état naturel sur terre [31].

Le vaporeformage du gaz naturel est aujourd'hui le moyen le plus répandu pour la production d'hydrogène (Equation 1) :



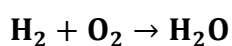
(Equation 1)

Il consiste à faire réagir, à haute température (entre 850 et 900°C) et sous pression (20 à 30 bars), un hydrocarbure léger ou du gaz naturel avec de la vapeur d'eau en présence d'un catalyseur à base de nickel. Cette réaction permet de produire du monoxyde de carbone et de l'hydrogène [32]. Ce procédé bien que très polluant a permis de produire, en 2012, près de 95% de l'hydrogène total marchand dans le monde [45,46].

La production d'hydrogène par vaporeformage du gaz naturel est la méthode la plus économique (2€/kgH₂) alors que le prix de l'hydrogène issu d'autres procédés tel que l'électrolyse de l'eau varie entre 5 et 10 €/kgH₂ [32]. Au total, 60 millions de tonnes d'hydrogène sont produits chaque année dans le monde dont 11 millions de tonnes aux Etats-Unis, 8,8 millions de tonnes en Europe et 922 000 tonnes en France [35].

Aujourd'hui, l'hydrogène est essentiellement utilisé dans les industries chimiques et pétrochimiques pour la synthèse de l'ammoniac (54% de la consommation totale), le raffinage et désulfuration des hydrocarbures (35%), l'industrie de l'électronique (6%), l'industrie du verre et de la métallurgie (3%) et l'industrie alimentaire (2%)[36].

Cependant, une nouvelle utilisation de l'hydrogène consiste à l'employer en tant que vecteur énergétique, pour sa valeur hautement énergétique et son faible impact environnemental. En effet, le seul produit généré par sa combustion est l'eau, ce qui rend l'utilisation de cette molécule en tant que vecteur énergétique très peu polluante (Equation 2).



(Equation 2)

De plus, l'énergie produite par unité de masse d'hydrogène (120 MJ/kg) est nettement supérieure à celle liée à la combustion du méthane (46.8 MJ/kg), du diesel (45.6 MJ/kg) ou encore de l'éthanol (29.6 MJ/kg) [37].

D'après l'étude RECORD (2015), l'hydrogène est perçu comme une alternative sérieuse aux énergies fossiles, avec un développement de la filière dans un premier temps pour une

utilisation directe de l'hydrogène soit en tant que vecteur énergétique dans des piles à combustibles ou en mélange avec le gaz naturel (Hythane®), soit en tant que réactant chimique (industrie pétrolière) [38].

De ce fait, les thématiques de recherche sur l'hydrogène sont en pleine expansion. La Figure 6, qui représente le nombre de publications scientifiques parues sur l'hydrogène au cours de ces dernières années, confirme cet engouement et met notamment en évidence que des recherches académiques sur la filière hydrogène n'ont jamais cessé de se développer.

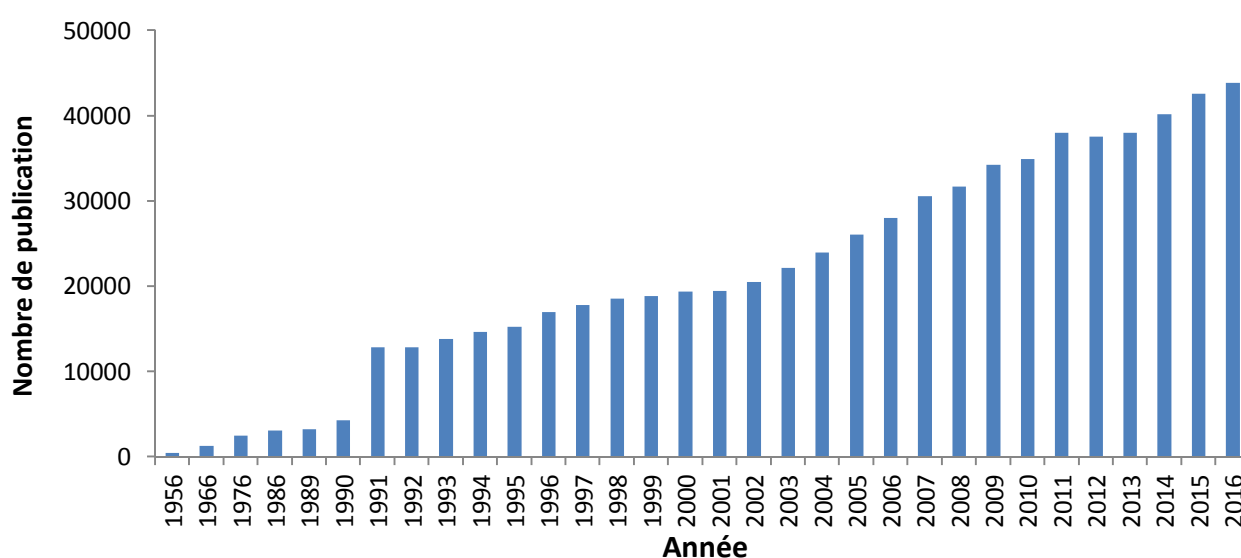


Figure 6 : Publication scientifique basé sur le mot clé "hydrogène" (statistique Web of Science)

3.1.1. Les nouvelles utilisations de l'hydrogène

A la suite de la COP 21, un conseil de l'hydrogène a été créé afin de soutenir le développement et le déploiement de cette filière. Ce conseil, dans un rapport publié en 2017 a décrit la place de l'hydrogène dans le cadre de la transition énergétique à venir [39]. A ce titre, elle mentionne l'hydrogène comme vecteur énergétique notamment dans le transport et le stockage. En effet, dans le cadre de la transition énergétique, l'hydrogène peut être utilisé en tant que carburant dans le secteur du transport. Depuis les années 90, plusieurs compagnies automobiles dont Toyota se sont déjà intéressées aux véhicules à hydrogène [40]. La technologie utilisée pour cela est la pile à combustible (Figure 7) qui permet de transformer l'hydrogène et l'oxygène en électricité et en eau.

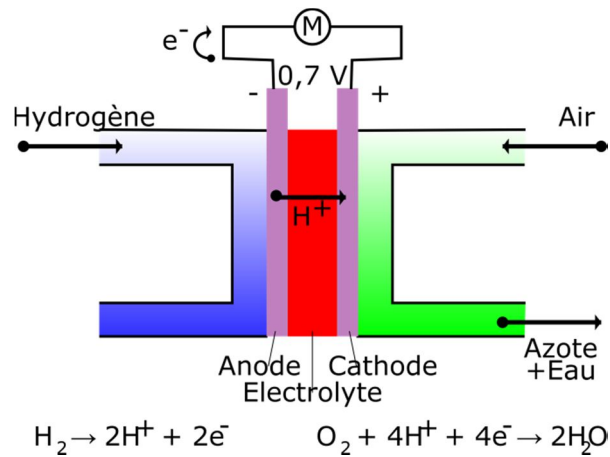


Figure 7 : Schéma principe de la pile à combustible

L'intérêt d'une telle technologie repose sur le fait qu'elle possède de bons rendements énergétiques (conversion énergétique de plus de 50%), émet peu de matière polluante et est silencieuse. L'autonomie des voitures à hydrogène peut être supérieure à 500 km et la recharge est très rapide (moins de 5 minutes) ce qui est un atout majeur comparé aux véhicules électriques à batteries.

En Europe, dès les années 80, la commission Européenne s'est intéressée à l'hydrogène. Et, à partir des années 2000, le programme cadre de recherche et développement a consacré près de 300 millions d'euros à la filière hydrogène en cofinçant notamment 6 projets relatifs aux piles à combustible. En 2008, le programme FCH-JU a été créé (Fuel Cell and Hydrogen – Joint Undertaking) : il s'agit d'un partenariat public-privé dont l'objectif est d'améliorer le développement et le déploiement des technologies compétitives basées sur l'hydrogène et les piles à combustible. Le dernier programme FCH 2 JU débuté en juillet 2014 a pour objectif d'investir 1,33 milliard d'euros pour améliorer les performances et diminuer le coût des technologies liées à l'hydrogène (transport, stockage, production, distribution) [41]. L'AFHYPAC (Association Française pour l'Hydrogène et les Piles à Combustible) a également la volonté, avec le soutien de l'ADEME, d'accélérer le développement de solutions hydrogène en France.

Dans ce contexte, plusieurs projets novateurs ont vu le jour pour l'utilisation de l'hydrogène dans les transports : le projet Hyway à Lyon et Grenoble avec la construction de deux

stations de distribution d'hydrogène et le déploiement de 50 véhicules ; le projet GRHYD à Dunkerque portant sur l'adaptation d'une station de distribution d'un mélange H₂/CH₄ pour fournir du carburant à une flotte de 50 bus ; et enfin le projet Hype à Paris avec 12 taxis à hydrogène, qui prévoit une flotte de 72 véhicules (Hyundai) d'ici fin 2017. Le projet Hyport réalisé en région Occitanie vise également à mettre en place des écosystèmes hydrogène économiquement viables et pérennes sur des zones aéroportuaires (Toulouse Blagnac et Tarbes).

L'hydrogène peut également être une solution intéressante pour le stockage de l'énergie. En effet, suite à l'augmentation de la production d'électricité renouvelable issue du photovoltaïque et de l'éolien, la flexibilité des réseaux électriques est devenue un facteur de plus en plus problématique. L'électricité ne pouvant être massivement stockée, un équilibre doit être trouvé entre l'injection d'électricité dans le réseau et sa consommation. Cependant, l'apport d'électricité issue des énergies renouvelables est variable en fonction des conditions climatiques et des phases de jour et de nuit. Il est alors courant d'éliminer l'électricité produite par les énergies renouvelables si la demande en électricité est trop faible. C'est dans ce contexte que l'hydrogène peut être considéré comme vecteur de stockage d'énergie [42]. En effet, l'électricité en surplus peut être transformée par électrolyse de l'eau et stockée sous forme hydrogène. L'hydrogène étant un gaz, il peut être stocké dans des bouteilles de gaz (350 ou 700 bars) ou injecté dans le réseau de gaz naturel. En effet, l'ajout direct d'hydrogène dans les réseaux de gaz est aujourd'hui possible mais reste limité notamment pour des raisons de sécurité et de compatibilité technique. En Allemagne, l'ajout d'hydrogène dans les réseaux est toléré à hauteur de 2-5%vol et tendra à augmenter à 10%vol dans les prochaines années [43].

3.1.2. Les voies de production d'hydrogène émergentes

C'est donc dans cette dynamique que plusieurs technologies novatrices de production d'hydrogène (autre que l'électrolyse de l'eau) se sont développées. Tout d'abord, un premier prototype de reformage du biométhane issu du biogaz a été développé par Trifyl grâce au projet VABHYOGAZ soutenu par l'ADEME. Après une étape d'élimination des

composés soufrés du biogaz issu des cellules du bioréacteur (ISDND), ce procédé permet d'obtenir une production journalière d'hydrogène de 10 kg à 99,99 % de pureté. Trifyl s'est également équipé d'une station de distribution d'hydrogène et d'un véhicule électrique doté d'une pile à combustible.

L'hydrogène peut également être produit par voie biologique à partir de matières organiques. L'hydrogène joue un rôle primordial pour les microorganismes car il permet le transfert d'électrons entre les espèces et aide à maintenir un potentiel équilibré d'oxydo-réduction et de pH dans la cellule. En fonction des conditions environnementales, l'hydrogène issu des microorganismes peut être récupéré. On distingue alors deux types de procédés, les photobioprocédés tels que la bio-photolyse de l'eau et la photo-fermentation qui nécessite un apport de lumière, et les procédés en voie sombre sans apport nécessaire de lumière comme la fermentation sombre et les cellules d'électrolyse microbienne (Tableau 3) [44].

Tableau 3 : Voies biologiques de production d'hydrogène

| Technologies | Principe | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|---|
| Bio-photolyse de l'eau | Réaction effectuée par des algues et des cyanobactéries via la photosynthèse et les hydrogénases | Besoin seulement d'eau et de lumière, pas de rejet de CO ₂ | Coût élevé (investissement et maintenance), faible rendement |
| Photo-fermentation | Réaction effectuée par des bactéries photosynthétiques anoxygènes par l'utilisation de la lumière et des nitrogénases sous carence d'azote | Rendement théorique élevé, valorisation des déchets organiques | Coût élevé (investissement et maintenance), faible rendement et production séquencée |
| Fermentation sombre | Réaction effectuée par des bactéries anaérobies strictes ou facultatives via les hydrogénases | Valorisation des déchets organiques, pas besoin de lumière, robuste, adaptable | Purification de l'hydrogène, accumulation de métabolites, rendement de conversion |
| Cellules d'électrolyse microbienne | Réaction bio-électro-chimique (abiotique) effectuée par la distribution d'électrons libre via une cathode à des microorganismes tels que les <i>Geobacter</i> | Consommation de CO ₂ , utilisation d'un large spectre d'effluents, basse température | Faible intensité de courant générée par les microorganismes, instabilité des cultures mixtes, pas adapté pour des substrats solides |

L'inconvénient majeur de ces différentes technologies est le coût élevé d'investissement et de fonctionnement qui peut constituer un frein pour leur développement. De plus, le niveau de maturité technologique de ces différents procédés est faible, et des activités de recherche et de développement sont indispensables pour lever certains verrous technologiques, afin d'augmenter leur productivité et leur rendement. Néanmoins, de toutes les technologies émergentes pour la production d'hydrogène, la fermentation sombre reste la technologie la plus aboutie ayant le plus de retour d'expérience notamment dans le domaine de l'agroalimentaire et la santé.

De plus, une solution largement envisagée afin de rendre ces procédés plus compétitifs consiste à coupler plusieurs procédés biologiques afin de dégrader au maximum la matière organique et de maximiser la production de biomolécules à fortes valeurs ajoutées. Par exemple, la Figure 8 met en avant les couplages possibles entre les différents procédés biologiques en fonction de leurs besoins énergétiques et nutritifs dans un objectif de production optimale d'hydrogène [45].

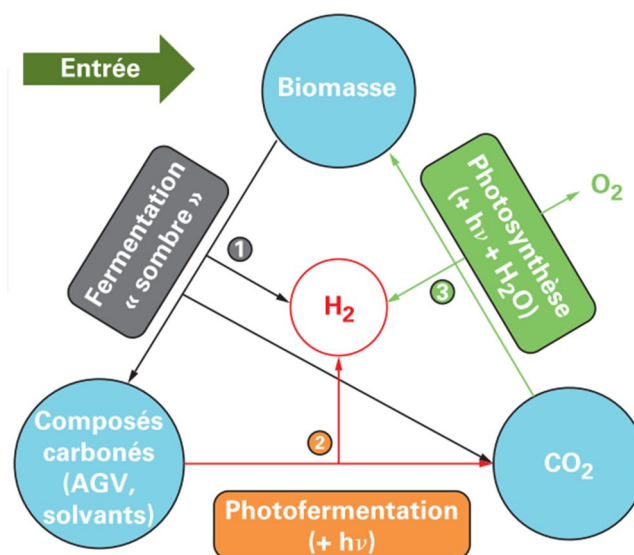


Figure 8 : Couplage de différent procédé de production d'hydrogène

Une autre solution également envisagée consiste en le couplage d'un réacteur de fermentation sombre avec un réacteur de digestion anaérobie dans le but de produire d'une

part de l'hydrogène et d'autre part du méthane. En effet, comme décrit dans le Tableau 3, durant l'étape de fermentation sombre, seulement 7,5 à 15 % de l'énergie contenue dans la matière organique est convertie en hydrogène et en molécules simples (acides gras volatils) [46]. Afin de valoriser ces molécules simples et le reste de la matière organique non dégradée, il est possible de les convertir en méthane dans un second réacteur [47]. Ce procédé à deux étapes pour la production d'un mélange d'hydrogène/méthane (5 à 20% d'H₂) est appelé biohythane et sera traité dans un chapitre spécifique.

3.2. Principe de la fermentation sombre

La fermentation sombre est un processus naturel qui consiste, dans un environnement anaérobie (absence d'oxygène), en la décomposition de matières organiques par une série de réactions biologiques impliquant des communautés microbiennes spécifiques [48]. La fermentation sombre fait partie intégrante du processus global de digestion anaérobie (méthanisation).

En effet, la fermentation sombre correspond aux premières étapes de la digestion anaérobie [49]. En d'autres termes cela consiste en la transformation de la matière organique via un consortium microbien fonctionnant en anaérobiose produisant plusieurs métabolites dont un biogaz riche en hydrogène et dioxyde de carbone. La décomposition de la matière organique est essentielle aux microorganismes afin d'obtenir l'apport en carbone et en énergie nécessaires à leur développement.

La Figure 9 est un schéma simplifié représentant les différentes étapes de la digestion anaérobie dont la première étape consiste en l'hydrolyse de la matière organique. La matière organique composée de chaînes longues (protéines, lipides, polysaccharides et acides nucléiques) est hydrolysée en chaînes plus courtes de monomères et d'oligomères solubles (sucres, acides aminés ou encore acides gras). Ces réactions sont possibles grâce à des enzymes extracellulaires (cellulases, protéases, lipases) excrétées par des microorganismes anaérobies stricts (*Clostridium* sp.) ou anaérobies facultatifs (*Acetobacter* sp., *Streptococcus* sp.) [50].

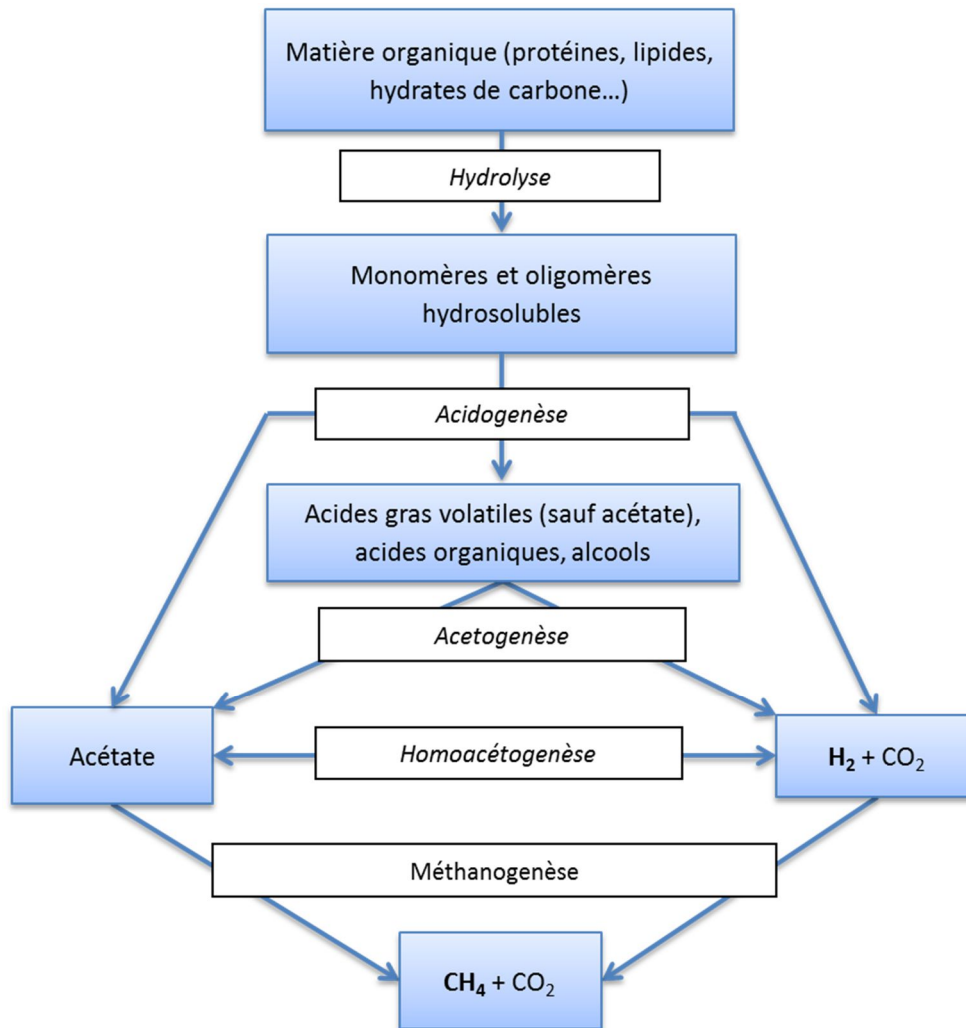


Figure 9 : Schéma du principe de la digestion anaérobie

La deuxième étape est l'étape d'acidogenèse qui consiste en la transformation des monomères et oligomères solubles en acides organiques (butyrate, propionate, lactate) et en alcools. Cette étape est réalisée notamment par des espèces d'*Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. et *Clostridium* sp. ou encore *Escherichia coli* qui sont également productrices d'hydrogène. Cette étape peut entraîner une accumulation d'acides gras volatils (AGVs) qui sont potentiellement néfastes pour les étapes suivantes (acétogénèse, méthanogénèse) [51].

Au cours de la troisième étape d'acétogénèse, les acides gras volatils et les alcools sont transformés en acétate, en dioxyde de carbone, en hydrogène et en formate par la voie hétérofermentaire. Elle est portée par des bactéries acétogènes syntrophes des

méthanogènes comme *Syntrophomonas* sp. ou encore *Syntrophobacter wolinii* [52]. Cependant, certaines des réactions notamment à partir du propionate, du butyrate et de l'éthanol présentent une énergie libre de Gibbs positive donc thermodynamiquement défavorables dans les conditions normales de réaction : ces réactions deviennent possibles seulement avec des pressions partielles en hydrogène très faibles [10^{-4} – 10^{-6}] atm [52]. C'est donc lors des étapes d'acidogénèse et d'acétogénèse, si les conditions sont favorables, qu'il est observé une production d'hydrogène.

L'étape d'acétogénèse peut également être réalisée par des bactéries non syntrophes des méthanogènes qui peuvent consommer l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour former de l'acétate par homoacétogénèse en conditions de stress ou d'épuisement du substrat [53].

Enfin, une quatrième étape, non désirée lors de la fermentation sombre, transforme l'acétate et l'hydrogène en méthane et dioxyde de carbone par méthanogénèse.

D'après ce schéma et comme rapporté par Das et al. (2007), l'inconvénient de la fermentation sombre se trouve dans l'instabilité de la production d'hydrogène qui réside en grande partie dans la capacité à sélectionner les voies métaboliques productrices d'hydrogène et empêcher la reconsommation de l'hydrogène pour produire de l'acétate et du méthane [4].

De plus, l'étape d'hydrolyse est souvent limitante lors de la fermentation de déchets solides lorsque le substrat est complexe (déchets agricoles, déchets végétaux, papier, carton). En effet, les composés complexes tels que des composés lignocellulosiques contenant une forte proportion en lignine (par exemple, les végétaux, le bois, la paille) ont régulièrement été cités comme produisant une faible quantité d'hydrogène car ils possèdent une structure limitant l'accessibilité de la cellulose et de l'hémicellulose pour les microorganismes [54]. Par exemple, il a été référencé un faible potentiel hydrogène pour la paille de blé, de maïs ou de l'herbe (1-68, 3-57 et 6-16 mLH₂/gMV respectivement). En outre, les composés faciles d'accès pour les microorganismes ont quant à eux un meilleur potentiel hydrogène. En particulier, les déchets alimentaires, tels que la salade, le chou, les carottes, les pommes de

terre ou le riz, présentent des potentiels élevés (50, 62, 71, 106 et 134 mLH₂/gMV respectivement) [55]. En comparaison, pour des substrats simples tels que le glucose ou le fructose, le rendement en hydrogène peut atteindre 271 mLH₂/gMV et 258 mLH₂/gMV [56]. D'un point de vue général, une étude a montré que le potentiel hydrogène diminuait en suivant l'ordre: déchets alimentaires > déchets agricoles > déchets d'élevages [57].

3.3. Voies métaboliques liées à l'hydrogène

∴ Voies productrices d'hydrogène

Plusieurs voies métaboliques sont productrices d'hydrogène ; ce sont notamment les voies coproductrices d'acétate, de butyrate et de formate (Figure 10).

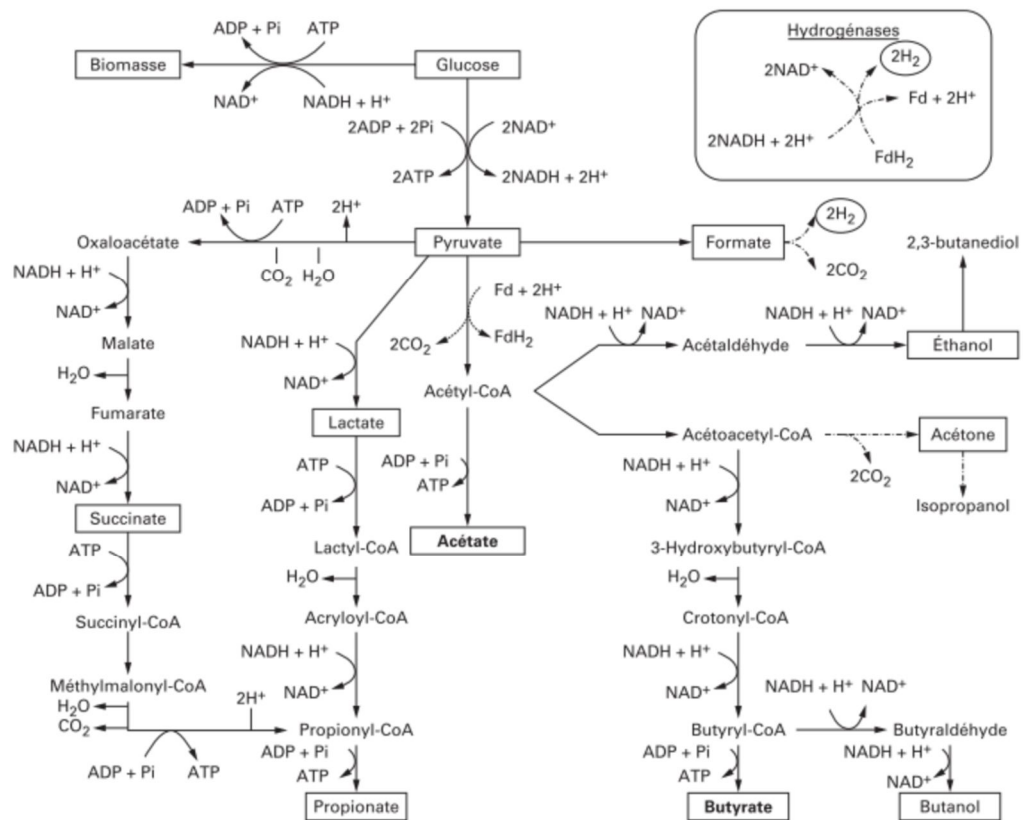


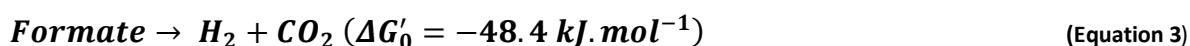
Figure 10 : Voies métaboliques pour la production d'hydrogène par fermentation sombre [45]

D'après cette figure, lors de la dégradation du glucose, le pyruvate est tout d'abord produit via la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas (ou glycolyse). Lors de cette transformation des éléments tels que l'adénosine triphosphate (ATP) et la forme réduite de la nicotinamide adénine nucléotide (NADH) sont produits. Ensuite, une réaction intermédiaire produisant de

l'Acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) à partir de pyruvate peut être réalisée. Lors de cette réaction, deux voies principales sont capables de catalyser la production d'hydrogène:

- La voie formate :

La réaction du pyruvate pour former de l'Acétyl-CoA produit également du formate grâce à l'enzyme *pyruvate formate lyase*. Le formate peut ensuite être converti en hydrogène et en CO₂ par le complexe enzymatique *formate hydrogenlyase* que possède notamment les bactéries de type *Escherichia coli* (Equation 3).



- La voie liée à la réoxydation des éléments réducteurs de la cellule (ferrédoxine et NADH) :

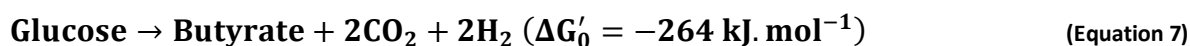
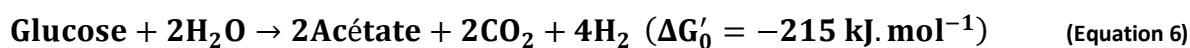
D'une manière plus générale, le pyruvate peut être transformé en acétyl-CoA en réduisant la ferrédoxine (Equation 4).



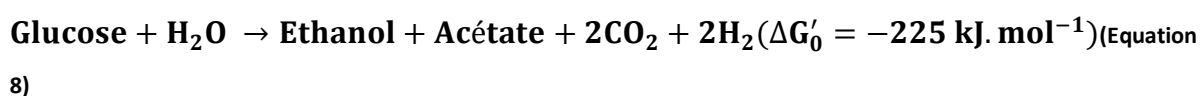
L'enzyme hydrogénase réoxyde alors l'excès de ferrédoxine réduite tout en produisant de l'hydrogène (Equation 5).



Les deux co-produits majeurs associés à la production d'hydrogène sont alors l'acétate et le butyrate. Ces deux voies métaboliques sont réalisées par de nombreuses espèces de *Clostridium. sp* ou d'*Enterobacteriaceae* [45]. La voie acétate entraîne un rendement de 4 moles d'hydrogène par mole d'hexose (Equation 6) et la voie butyrate conduit à un rendement en hydrogène de 2 moles par mole d'hexose (Equation 7)[58].



Une autre voie permettant la production d'hydrogène à partir du glucose via la production d'acétate et d'éthanol est également possible mais reste sujette à discussion car elle a été peu observée. Cette voie permet de produire deux moles d'hydrogène par mole de glucose selon l'équation 8 [59].



Enfin, lors de l'étape d'acétogénèse, certaines voies de production d'acétate sont obligatoirement productrices d'hydrogène, notamment lors de la dégradation du lactate, de l'éthanol, du butyrate et du propionate (Tableau 4). Cependant ces réactions sont thermodynamiquement défavorables ou peu favorables et requièrent une consommation immédiate des sous-produits de réactions, dont l'hydrogène.

Tableau 4 : Réactions réalisables lors de l'étape d'acétogénèse

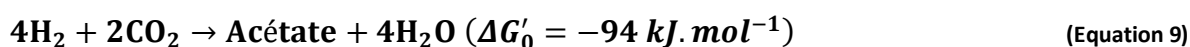
| Réaction | ΔG^0 (kJ/mol) |
|---|-----------------------|
| $\text{Lactate}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acétate}^- + 2\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ | -3,9 |
| $\text{Ethanol} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acétate}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$ | +9,6 |
| $\text{Butyrate}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acétate}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$ | +48,1 |
| $\text{Propionate}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acétate}^- + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$ | +76,1 |

Cependant, en utilisant des cultures mixtes (mélange d'espèces bactériennes), le rendement en hydrogène peut facilement diminuer à cause de la présence de microorganismes consommateurs d'hydrogène, présents dans de nombreux milieux anaérobies [60]. En effet, les études portant sur la production d'hydrogène par fermentation sombre utilisent des inoculas variés tels que des digestats de boues provenant du traitement des eaux usées [61], des effluents de méthaniseurs [62], des composts de déchets d'élevage ou municipaux [63] ou encore des lixiviats de décharge [64]. Ces sources microbiennes présentent une grande diversité et, contrairement aux cultures pures, sont peu coûteuses et plus faciles d'utilisation

mais présentent des voies alternatives de fermentation, telles que décrites ci-dessous [65,66].

∴ Les voies consommatrices d'hydrogène

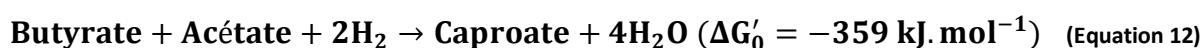
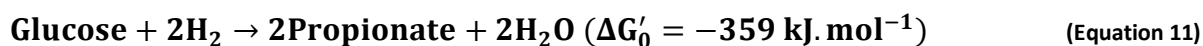
En cultures mixtes, certains microorganismes possèdent des voies métaboliques qui peuvent consommer directement l'hydrogène ou entrer en compétition pour le substrat avec les bactéries productrices d'hydrogène (Figure 10). L'hydrogène est non seulement une forme de stockage énergétique pour les bactéries mais aussi un très bon vecteur énergétique pour le transfert d'énergie entre espèces. De plus, les voies consommatrices d'hydrogène sont en règle générale thermodynamiquement très favorables, ce qui rend propice sa reconsumation. Notamment, certaines bactéries appartenant à la famille des *Clostridiaceae* (*Clostridium aceticum* ou *Clostridium thermoceticum*) produisent de l'acétate à partir d'hydrogène par homoacétogénèse selon l'équation suivante (Equation 9):

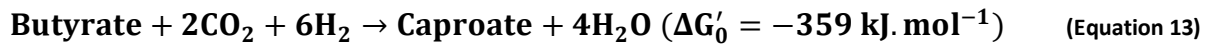


Par ailleurs, la méthanogénèse peut consommer directement l'hydrogène pour produire du méthane (Equation 10). La méthanogénèse est effectuée par les *Archaeobactéries hydrogénotrophes* qui est thermodynamiquement très favorable:



D'autres voies métaboliques consommatrices d'hydrogène ont été décrites, comme la voie formatrice de propionate (Equation 11) ou de caproate à partir de butyrate et d'acétate (Equation 12 et 13)





Au-delà de la consommation directe d'hydrogène, un autre phénomène peut réduire de manière indirecte la production d'hydrogène, du fait de la consommation du substrat par des voies non productrices d'hydrogène. En effet, la production de certains métabolites passe par l'utilisation de la nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme réduite (NADH). Cet élément réducteur est soit réoxydé via les hydrogénases (ou le bilan de production d'hydrogène est positif), soit réoxydé par des voies annexes (succinate, valérate, caproate, 2,3-butanediol, 1,3-propanediol) où le bilan de production d'hydrogène est nul [67]. Ces différentes voies ont ainsi pour conséquence de concurrencer la production d'hydrogène à partir d'un même substrat.

Le lactate est également un métabolite intermédiaire dont les voies réactionnelles utilisées pour sa production ne sont pas productrices d'hydrogène : la production de lactate est cependant régulièrement observée lors de la fermentation sombre [68]. Ce métabolite est essentiellement produit par les lactobacilles regroupant les membres des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ou encore *Lactococcus*. En plus du fait que le lactate utilise une voie de production concurrente à la production d'hydrogène, les espèces telles que *Lactobacillus* ont tendance à sécréter des bactériocines dans le milieu qui peuvent être stressantes pour les clostridies et engendrer une modification des voies réactionnelles avec une diminution de la production d'hydrogène [69]. Ce phénomène est étroitement lié au phénomène de solvantogénèse qui est caractérisée par une forte production d'Acétone, Butanol et Ethanol (fermentation ABE), suite à une accumulation des sous-produits de fermentation (acétate, butyrate à 60 mM) ou une sécrétion de bactériocines [68,73]. Néanmoins, les bactéries lactiques sont non-sporulantes, mais pour certaines thermo-résistantes, et peuvent être globalement éliminées en réalisant un traitement thermique de l'inoculum [69].

L'objectif principal lors de l'optimisation d'un procédé de fermentation sombre est donc de favoriser le développement des microorganismes producteurs d'hydrogène tout en limitant

l'impact négatif de certains paramètres sur le rendement final en hydrogène (inhibiteurs, reconsommation...).

3.4. Conditions opératoires favorables à la production d'hydrogène

Afin d'améliorer le rendement de conversion en hydrogène et d'augmenter les productivités, plusieurs stratégies peuvent être envisagées : (1) prétraiter l'inoculum pour diminuer la quantité de microorganismes impactant la production d'hydrogène (archées méthanogènes, bactéries lactiques...), (2) prétraiter le substrat pour permettre une meilleure accessibilité de la matière organique (3) fixer des conditions de culture favorables au développement des microorganismes producteurs d'hydrogène et défavorables à la croissance des microorganismes consommateurs et concurrents.

∴ Prétraitement de l'inoculum

Différents prétraitements (thermique, chimique, choc de pH) peuvent être utilisés afin d'éliminer les microorganismes non-sporulants (bactéries lactiques et archées méthanogènes) présents dans des cultures mixtes. En effet, la faculté à sporuler de certaines bactéries telles que les *Bacillus* ou encore les *Clostridium* leur permettent de résister à des facteurs environnementaux défavorables ou extrêmes. La sporulation conduit les bactéries à passer d'une cellule végétative (capable de se multiplier) à une forme de spore en attendant l'amélioration des conditions environnementales. Ce type de traitement est donc efficace pour enrichir l'inoculum en bactéries sporulantes majoritairement productrices d'hydrogène (*Clostridia*) [70], et pour éliminer les microorganismes tels que les bactéries lactiques et les archées méthanogènes connues comme non-sporulantes. Cependant, ce traitement n'est pas adapté pour éviter la réaction d'homoacétogénèse portée notamment par certaines espèces de *Clostridium*. Le prétraitement thermique est la méthode la plus utilisée dans la littérature (Tableau 5). Ce traitement est généralement effectué à 100°C pour une durée comprise entre 15 min et 4 h. Cependant l'efficacité de ce traitement est très variable et encore discutée, aucune procédure standardisée n'existant à ce jour.

Tableau 5 : Prétraitement thermique utilisé sur l'inoculum avant fermentation sombre pour la production d'hydrogène à partir de FFOM (fraction fermentescible des ordures ménagères) et d'OMB (ordures ménagères brutes)

| Inoculum | Substrat | Conditions opératoires | Traitement thermique | pH | Température | Rendement H ₂ | Réf |
|------------------|----------|------------------------|----------------------|-------|-------------|---|------|
| Boues anaérobies | FFOM | Batch | 100°C, 4h | 7 | 35°C | 23,4±2.9 NmLH ₂ /gMV | [71] |
| Boues anaérobies | OMB | Batch | 100°C, 1h | 5-5,5 | 37°C | 43 mLH ₂ / gMV | [72] |
| Boues aérobies | FFOM | Continu TSH : 24 h | 100°C, 15min | 5,7 | 38°C | 127 mLH ₂ / gMV _{removed} | [73] |
| Boues anaérobies | FFOM | Batch | 100°C, 4h | 5,5 | 35°C | [25±9 - 85±3] mLH ₂ / gMV | [74] |

FFOM : Fraction Fermentescible des Ordures Ménagères, OMB : Ordures Ménagères Brut

Un prétraitement chimique peut aussi être utilisé pour inhiber spécifiquement les archées méthanogènes en utilisant des composés tels que l'acide 2-bromoethanesulfonique (BESA), le chloroforme ou encore l'iodopropane [65,75].

Enfin, un prétraitement par choc pH permet d'éliminer les communautés consommatrices d'hydrogène [70]. En effet, un traitement acide (en dessous de 6,3) ou basique (supérieur à 7,8) est efficace pour réduire la présence de méthanogènes [76]. Le traitement acide reste le plus utilisé dans la littérature. Il consiste à ajouter de l'acide chlorhydrique à hauteur de 1 à 2 mol/L pour ajuster le pH à 3 pendant 24 heures [77,78]. Le traitement basique consiste quant à lui à ajuster le pH à 10 avec de la soude à 1 mol/L et maintenir le milieu à 25°C pendant 24 heures [78,79].

Bien que de nombreuses méthodes de prétraitement de l'inoculum existent, elles peuvent toutefois également induire un effet délétère sur les communautés productrices d'hydrogène et ainsi affecter négativement la production d'hydrogène. A titre d'exemple, Luo et al. (2010) ont étudié les performances de production d'hydrogène dans des réacteurs batchs inoculés avec des cultures mixtes ayant subi différents prétraitements : ces auteurs ont mis en évidence que le rendement maximal était atteint sans prétraitement de l'inoculum [80]. Néanmoins, d'après la littérature, le traitement thermique reste le choix le plus judicieux en termes de facilité technique et économique.

∴ Prétraitement du substrat

Le prétraitement du substrat permet également d'améliorer l'accessibilité des composés difficilement dégradables par les microorganismes. En effet, les objectifs de ce traitement sont de dissoudre la structure complexe de la lignine, réduire le degré de polymérisation de la cellulose et de l'hémicellulose et de diminuer la cristallinité de la cellulose [81]. En d'autres termes, c'est un moyen de faciliter l'étape d'hydrolyse. Dans la fraction fermentescible des ordures ménagères, certains éléments comme le papier, le carton et les déchets de jardin sont composés de matières complexes qui nécessitent un temps de dégradation élevé [82].

Un des prétraitements couramment utilisés est le traitement mécanique qui consiste à broyer et/ou écraser la matière, permettant de réduire la taille des particules. La biomasse est ainsi transformée en poudre fine ce qui va augmenter la surface accessible et diminuer le degré de polymérisation de la cellulose et de l'hémicellulose [83]. L'utilisation de micro-ondes combinées à l'ajout d'un traitement à l'acide a également été rapportée. Les micro-ondes permettent en particulier de modifier la structure de la cellulose et également de dégrader l'hémicellulose [81]. Cependant, ce type de traitement est coûteux d'un point énergétique et pour l'équipement [84]. Des traitements thermiques nécessitant des conditions extrêmes (fortes températures et/ou fortes pressions) permettent également de déstructurer les composés complexes. Dans ces procédés on retrouve le traitement par eau chaude, l'explosion à la vapeur, l'explosion à l'ammoniac liquide, l'explosion au CO₂ [83]. L'ajout d'un agent oxydant (peroxyde d'hydrogène, ozone) est un autre moyen permettant de diminuer le degré de polymérisation avec une hydrolyse complète des composés types hémicelluloses. Les traitements chimiques (acides, alcalins, solvants) vont permettre de casser les liaisons internes des composés complexes de lignine, d'hémicellulose et de cellulose [85]. Enfin des traitements biologiques sont également à l'étude. Zhang et al. (2007) ont en effet réalisé une recirculation d'un effluent issu d'un réacteur de méthanisation dans un réacteur d'hydrolyse alimenté avec des résidus végétaux et ont montré une amélioration de l'activité enzymatique [86].

∴ Configuration du fermenteur

La production d'hydrogène par voie fermentaire peut être réalisée selon trois configurations principales de réacteur: réacteur batch, réacteur fed-batch et réacteur continu [87]. La majorité des études au niveau laboratoire, notamment celles utilisant des substrats complexes, sont réalisées dans des réacteurs de type batch afin d'éviter les difficultés techniques liées au fonctionnement en continu (pompages, fuites...) [45]. Le réacteur batch est généralement utilisé pour identifier les conditions permettant l'amélioration de la production d'hydrogène par la sélection du substrat, de la communauté bactérienne ou par l'ajustement des conditions opératoires [88]. De plus, les réacteurs batchs sont fermés et le milieu n'interagit donc pas avec l'extérieur, ce qui permet de réduire les risques de contaminations.

Le mode fed-batch consiste à alimenter au fur et à mesure le réacteur, sans soutirage. Cette technique est encore peu utilisée pour la production d'hydrogène [89]. Argun et al., (2011) indique que ce genre de procédé permettrait, entre autres, un développement rapide des micro-organismes [88].

Le mode continu est représenté par un apport continu de substrat, avec un débit de sortie égal au débit d'entrée afin de conserver un volume constant dans le réacteur. Un réacteur fonctionnant en mode continu permet de limiter le développement des microorganismes consommateurs d'hydrogène (méthanogènes et homoacétogènes) en appliquant un temps de séjour hydraulique (TSH) court [90]. Le TSH est défini comme le rapport entre le volume utile du réacteur et le débit en intrant : il permet de sélectionner la communauté microbienne par rapport aux taux de croissance des microorganismes présents. Si le taux de croissance est inférieur au taux de dilution (i.e., inverse du temps de séjour hydraulique), les microorganismes planctoniques (mobiles) ne peuvent se maintenir et, par effet de dilution, sont alors « lessivés » du réacteur. Les microorganismes consommateurs d'hydrogène ayant généralement un taux de croissance inférieur aux bactéries productrices d'hydrogène, un temps de séjour court peut être une manière efficace pour les éliminer.

Zhang et al. (2006) ont étudié l'effet de différents temps de séjour hydraulique sur la production d'hydrogène en utilisant du glucose comme substrat [91]. Cette étude a mis en évidence que le temps de séjour hydraulique permettait de sélectionner une population microbienne avec un rendement en hydrogène optimal lorsqu'un temps de séjour égal à 6 heures était fixé. L'étude bibliographique de Valdez-Vazquez et Poggi-Varaldo (2009) a également mis en évidence qu'un temps de séjour de 6 heures semble être recommandé pour une production d'hydrogène optimale [92].

∴ pH

Le pH est également un paramètre crucial pour les réactions de fermentation, puisqu'il permet, entre autres, de sélectionner les bactéries productrices d'hydrogène, de limiter la croissance des microorganismes méthanogènes et d'éviter les réactions annexes comme la solvantogénèse [62,84].

La gamme de pH utilisée dans la littérature lors de la fermentation sombre est très étendue, allant de 4,5 à 8 [93,94]. Cette large gamme peut notamment être expliquée par la grande variété de substrats et d'inocula utilisés dans les différents travaux [95]. En effet, pour des sucres simples comme le glucose, Lie et al. (2008) ont reporté un rendement optimal en hydrogène à un pH de 6 (1,83 molH₂/mol) [96]. Dans un réacteur continu alimenté avec du glucose, Fang et Liu (2002) ont également trouvé un pH optimal de 5,5 avec un temps de séjour hydraulique de 6 heures [97]. Avec des substrats complexes comme des déchets agro-alimentaires comme le lactosérum de fromage (composé essentiellement de lactose, protéines, lipides et des sels (NaCl, KCl)) De Gioannis et al. (2014) ont montré que le pH optimal se situe entre 6,5 et 7,5 (171,3 NmL H₂/g_{TOC}) en réacteur batch avec une régulation continue du pH [98].

Bien que la gamme de pH soit large, un pH inférieur à 4,5 lié à une accumulation d'acides gras volatils (AGVs), va induire une production de solvants et une réduction du rendement en hydrogène [99]. En effet, à de faibles pH (< 4,5), le phénomène de solvantogénèse par production d'acétone et de butanol voire d'éthanol implique des voies concurrentes à la

production d'hydrogène [112,112]. En général ce phénomène est lié au stress cellulaire de sporulation chez les *Clostridium* sp. (choc de température, baisse brutale du pH, présence d'oxygène) [62,99].

Enfin, les microorganismes méthanogènes se développent à une gamme de pH supérieure à 6,8 avec une inhibition forte en dessous de 6,6 [103]. Fixer un pH inférieur à 6,6 dans un réacteur de fermentation sombre permet donc de réduire la probabilité d'implantation d'archées méthanogènes et donc d'apparition de méthane.

∴ Température

La température joue également un rôle important dans les réactions biologiques [95]. Trois gammes opératoires de températures sont généralement décrites pour la fermentation sombre: mésophile (35°C), thermophile (55°C) et hyperthermophile (>65°C). Ces gammes de températures correspondent aux températures optimales de fonctionnement et de croissance des micro-organismes. Ainsi, une variation de la température peut affecter la structure de la communauté bactérienne présente lors de la fermentation. Comme le rapporte Lazaro et al. (2014), une différence importante de la structure de la communauté microbienne est observée entre des températures mésophiles et thermophiles [104]. Cette étude a notamment rapporté un shift entre des *Clostridium*. sp en conditions mésophiles et des *Thermoanaerobacterium*. sp en conditions thermophiles. Cependant, dans ces conditions, la modification de température n'impacte pas la production d'hydrogène (2,31 et 2,23 mmolH₂/g_{D_{CO}} respectivement).

Ghimire et al. (2015) ont également mis en évidence qu'un changement de température avait un effet sur les voies métaboliques, et par conséquent sur les coproduits issus de la fermentation sombre [95]. L'étude de Valdez et al. (2005) a également montré une différence sur la distribution des métabolites produits en conditions mésophiles et thermophiles : le métabolite majoritairement produit en mésophilie était le butyrate alors qu'en thermophilie, l'acétate était le produit majoritaire [105].

Globalement, il est rapporté qu'une augmentation de la température permet une hydrolyse plus rapide sur des substrats complexes [57]. De plus, la vitesse de croissance des microorganismes est 27 à 60% plus rapide en digestion anaérobie thermophile sur des substrats mixtes tels que les fractions fermentescibles des ordures ménagères [106]. Cependant, une étude a également rapporté une dégradation de la matière organique plus faible à 50°C qu'à 35°C (39 et 46% respectivement) lors de l'utilisation de déchets alimentaires [107].

L'impact de la température sur la fermentation peut également être différent en fonction de l'inoculum utilisé. Danko et al. (2008) ont étudié la production d'hydrogène et d'AGVs à partir de deux inocula (boues granulaires et boues en suspension) en faisant varier la température (37, 60 et 70°C) en réacteur batch. Cette étude a montré que l'augmentation de la température impactait différemment en fonction du type d'inoculum. En effet, pour les boues granulaires, l'augmentation de la température jusqu'à 60°C était favorable à la production d'hydrogène alors que la boue en suspension était sévèrement affectée par l'augmentation de la température avec une forte diminution de la production d'hydrogène et d'AGVs [108].

∴ Cas des déchets ménagers

Le Tableau 6 permet de dresser un état de l'art des paramètres opératoires en se focalisant sur les études utilisant comme substrats des ordures ménagères et notamment la fraction fermentescible (FFOM) ou des déchets alimentaires. La grande majorité des études a été réalisée avec un inoculum constitué de boues issues de méthaniseur ayant subi un prétraitement thermique, et avec un mode de fonctionnement de type batch. Le pH était généralement fixé aux alentours de 5 afin d'éviter le développement des archées méthanogènes. La plupart des études fixent le pH initial sans le réguler par la suite [75,104,105,106,107]. L'utilisation d'un tampon tel que l'acide 2-(*N*-morpholino)ethanessulfonique (MES) ou un tampon à base de phosphate a également été rapportée [74,77]. Enfin, une régulation continue du pH afin de le maintenir à une valeur fixe a également été opérée [76,108]. La température est quant à elle variable allant de 30-37 à

55°C. Les rendements en hydrogène lors des différentes études montrent que la fraction fermentescible des ordures ménagères génère toutefois moins d'hydrogène (23 à 99 mLH₂/gMV) que des déchets alimentaires (43 à 120 mLH₂/gMV).

Les substrats peuvent être globalement regroupés en trois catégories : la fraction fermentescible des ordures ménagères, les déchets alimentaires et les ordures ménagères brutes. Concernant la fraction fermentescible des ordures ménagères, plusieurs études ont utilisé des substrats réels : cependant peu de travaux ont pris en compte les déchets de type papiers et cartons. Seule l'étude de Alzate-Gaviria et al. (2007) a utilisé la fraction fermentescible composée de déchets alimentaires de papiers et de cartons provenant d'une cafeteria [73]. Certains travaux ont réalisé un tri manuel [113] ou une séparation par trommel [110,113] afin de récupérer seulement la fraction fermentescible des ordures ménagères issues de déchets réels. Enfin, Favaro et al., (2013) ont utilisé la fraction fermentescible d'ordures ménagères (fruits, légumes, viande, poisson, fromage, riz et pâtes mais en éliminant les papiers/cartons) : ce déchet se rapproche ainsi des déchets alimentaires étudiés par Sreela-Or et al. (2011) (riz, légumes, fruits, viande) [73,114]. Enfin, Liu et al. (2006) ont utilisé des ordures ménagères brutes composées de déchets alimentaires, de papier, de déchets de jardin, de plastique, de pierre et de fer [72].

Globalement, sur déchets réels, les substrats composés seulement de déchets alimentaires ou agro-alimentaires ont été répertoriés comme ayant le potentiel de production d'hydrogène le plus élevé (103,6 et 119,7 mLH₂/gMV) [109,112]. Les études utilisant la FFOM sans les éléments papiers et cartons ont obtenu un rendement en hydrogène (51, 24 et 38 mLH₂/gMV) proche de l'étude de Liu et al. (2006) qui a employé des ordures ménagères brutes (43 mLH₂/gMV) [113,112,115,74]. Cependant l'utilisation de la FFOM comprenant la fraction papier/carton a montré un potentiel hydrogène plus élevé (99 mLH₂/gMV) [73].

Tableau 6 : Conditions opératoires pour la production de biohydrogène

| Inoculum | Substrat | Mode | TSH | Prétraitement | pH | Température | Rendement H ₂ | Référence |
|----------------------------|--|-------------------|-----------|-----------------------------|----------------------|-------------|--|-----------|
| Boue de méthanisation | OMB | Batch | - | Thermique (100°C, 1h) | 5-5,5 | 37°C | 43 mLH ₂ /gMV | [72] |
| Boue de méthanisation | FFOM | Batch | - | Thermique (100°, 4h) | 7 | 35°C | 23,4±2,9 NmLH ₂ /gMV | [71] |
| Mélange de boue aérobie | FFOM | Batch | - | Thermique (100°C, 15min) | 5,7 | 38°C | 99 mLH ₂ /gMV éliminé | [73] |
| Boue de méthanisation | FFOM | Batch | - | Thermique (100°C, 4h) | 5,5 | 35°C | [25±9 - 85±3] mLH ₂ /gMV | [74] |
| Boue de méthanisation | FFOM | Batch | - | - | 5,5 | 55°C | 51 mLH ₂ /gMV | [111] |
| Boue de méthanisation | FFOM | Continu | 1,9 jours | - | 5,5 | 55°C | 24,26±0,7 mLH ₂ /gMV | [110] |
| - | FFOM + Déchet alimentaires | Semi- continue | 1,9 jours | - | 5.5 | 55°C | 38 mLH ₂ /gMV ajouté | [113] |
| Boue de méthanisation | Déchets alimentaires (Riz et salade) | Batch | - | Thermique | 5,5 | 37°C | 119,7 mLH ₂ /gMV | [109] |
| Boue de méthanisation | Déchets alimentaires (riz, légume, fruit, viande) | Batch | - | Thermique (105°C, 3h) | 4,8 _{final} | 30°C | 103,6 mL/gMV | [112] |

3.5. Inhibiteurs principaux de la fermentation sombre

Cependant, au-delà des conditions opératoires, d'autres facteurs sont à prendre en considération et peuvent diminuer de façon drastique la production d'hydrogène. En effet, il existe des composés qui peuvent stresser ou altérer les bactéries productrices d'hydrogène : ces molécules sont plus communément appelées inhibiteurs.

∴ Pression partielle en hydrogène

La fermentation sombre entraîne une production importante d'hydrogène. Cependant, une sursaturation de cette molécule dans le milieu de réaction peut altérer le fonctionnement de la fermentation. En effet, une forte pression partielle en hydrogène peut favoriser sa recombinaison, par exemple par homoacétogène [45]. De plus, de fortes concentrations en hydrogène dissous dans le réacteur peuvent rendre thermodynamiquement défavorable la conversion du NADH en hydrogène effectuée par les hydrogénases [114]. En effet, les hydrogénases sont impliquées dans l'oxydation et la réduction de la ferredoxine et si la concentration en hydrogène augmente dans le milieu, alors l'oxydation de la ferredoxine devient moins favorable et entraîne une diminution de la production d'hydrogène [95].

Pour éviter le phénomène d'accumulation en hydrogène dissous voire les phénomènes de sursaturation, plusieurs solutions sont possibles. Une des techniques consiste à diluer la concentration en hydrogène dissous dans le milieu réactionnel en injectant un gaz inerte (azote, argon ou dioxyde de carbone). Mizuno et al. (2000) ont mis en place cette technique qui a permis d'améliorer le rendement en hydrogène en faisant buller en continu de l'azote avec un débit 15 fois supérieur au débit de production d'hydrogène [115]. Cependant ce système nécessite par la suite une purification poussée et très coûteuse car il tend à diluer le gaz produit. Une méthode plus courante est d'intensifier l'agitation du réacteur pour améliorer le transfert de l'hydrogène de la phase liquide vers la phase gazeuse [116]. D'autres techniques peuvent être utilisées comme l'extraction par membrane ou encore la fermentation sous faible pression absolue [128,129].

∴ Acides gras volatils

L'accumulation d'acides gras volatils peut également être fortement inhibitrice par réduction du pH qui va affecter les performances générales de la fermentation sombre via un changement de voies réactionnelles, de communautés microbiennes et d'activité des hydrogénases [57]. En effet, lorsque le pH est inférieur au pKa des AGVs (4,75 et 4,80 pour l'acétate et le butyrate, respectivement), les acides se trouvent principalement sous formes non dissociées dans le milieu réactionnel, et peuvent alors pénétrer les cellules microbiennes et impacter négativement l'activité microbienne en général [119]. En effet, les acides non dissociés vont libérer des protons dans le cytoplasme, ce qui aura pour conséquence une perturbation de l'équilibre d'oxydo-réduction cellulaire et donc une augmentation de la demande en énergie [120]. La forme dissociée peut également contribuer à augmenter la force ionique du milieu réactionnel jusqu'à causer une lyse cellulaire [121].

Zhang et al. (2011) ont ainsi montré que l'augmentation de la concentration en acétate et butyrate entraînait systématiquement une diminution de la production d'hydrogène [51]. De plus, Wang et al. (2008) ont étudié l'impact inhibiteur de molécules telles que l'acétate, le propionate et le butyrate sur la production d'hydrogène [122]. Quels que soient les AGVs, cette étude montre que l'accumulation d'AGVs de 50 à 300 mmol/L était corrélée à une diminution de la dégradation du substrat et de la production d'hydrogène qui chutait de 274 mL d'H₂ produit à 41, 22 et 26 mL d'H₂ par l'ajout d'acétate, propionate et butyrate respectivement.

∴ Azote ammoniacal

Le caractère inhibiteur de l'azote ammoniacal sur la production d'hydrogène et de méthane est un problème régulièrement cité, notamment lors de l'utilisation de déchets alimentaires ou FFOM (Tableau 7). En effet, l'azote organique est minéralisé en azote ammoniacal lors la dégradation des protéines [106,107], et plus particulièrement, lors de la fermentation des acides aminés [125].

Tableau 7 : Etat de l'art de l'inhibition par l'azote ammoniacal sur la production de biogaz

| Gaz | Substrat | Forme | (g/L) | Effet | Référence |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------|
| H ₂ | Glucose | TAN | 1,60 | Inhibition | [126] |
| | | NH ₃ | 4,00 x 10 ⁻⁴ | | |
| H ₂ | Glucose | TAN | 2,00 | inhibition | [127] |
| | | NH ₃ | 1,93 x 10 ⁻⁴ | | |
| H ₂ | Déchets alimentaires | N-NH ₄ ⁺ | 1,30 | Inhibition | [128] |
| | | NH ₃ | 2,60 x 10 ⁻³ | | |
| CH ₄ | Lisier de porc | TAN | 0,80 – 1,40 | Pas d'effet | [129] |
| | | NH ₃ | 0,43 – 0,76 | | |
| CH ₄ | Eaux résiduelles | N-NH ₄ ⁺ | 5,65 | Inhibition | [130] |
| | | NH ₃ | 0,63 | | |
| CH ₄ | Fumier de bovin | TAN | 10,0 | Inhibition | [124] |
| | | NH ₃ | 1,20 | | |
| CH ₄ | Déchets alimentaires/lisier | TAN | 3,86 | Baisse de 50% du rendement | [131] |
| | | NH ₃ | 0,22 | | |
| CH ₄ | Ordures ménagères | TAN | 5,88 | Inhibition | [132] |
| | | NH ₃ | 0,50 | | |
| H ₂ | Ordures ménagères | NH ₃ | 0,53 | Inhibition | [133] |
| CH ₄ | | | 2,02 | Pas d'effet | |

L'azote ammoniacal, ou l'azote total (TAN, « *total ammonia nitrogen* ») correspond aux formes ionisée (NH₄⁺) et non ionisée (NH₃) qui sont présentes à des concentrations différentes selon le pH et la température de la solution [134]. Les ions ammonium sont présents en tant que couple acido-basique NH₄⁺/NH₃, Selon l'équation 14 :



(Equation 14)

La présence d'azote ammoniacal peut être bénéfique lors de la digestion anaérobie grâce à son pouvoir tampon qui permet *a fortiori* une plus forte tolérance quant à l'accumulation d'AGVs [135]. Cependant, la forme non ionisée a été rapportée comme fortement inhibitrice de l'activité microbienne. D'après l'étude de Chen et al., (2008), cette inhibition serait

causée par sa diffusion dans la cellule créant un déséquilibre de protons et/ou une carence en potassium [136].

D'après ces différentes études, une baisse du rendement en hydrogène est observée à des concentrations plus faibles en ammoniac que lors de la production de méthane. En effet, la concentration minimale créant une baisse de la production d'hydrogène a été observée à partir de 0,19 mgNH₃/l (2,00 gTAN/L) [127]. Alors que lors de la méthanisation, González-Fernández et al., (2009) ont rapporté une inhibition pour des concentrations d'environ 0,80 g/L (TAN) soit 81 mgNH₃/L (pH = 8, 35°C) [129]. En méthanisation, l'inhibition par l'ammoniac engendre une accumulation des AGVs qui a tendance à renforcer l'inhibition de la production de méthane [124].

D'une part, dans l'étude de Cavinato et al. (2012) portant sur la production d'un mélange hydrogène/méthane dans un procédé en deux étapes à partir d'ordures ménagères, la recirculation des jus du deuxième réacteur (méthaniseur) dans le premier réacteur (fermenteur) a conduit à une accumulation d'ammoniac [133]. Une inhibition de la production d'hydrogène a seulement été observée à une concentration de 530 mgNH₃/L, alors que la production de méthane était encore effective à une forte concentration en ammoniac (2 020 mgNH₃/L).

D'autre part, Salerno et al. (2006) ont montré qu'une différence était observée sur le potentiel inhibiteur de l'ammoniac entre un réacteur batch et un réacteur continu. En effet il a été observé que la présence d'ammoniac stoppait la production d'hydrogène dans un réacteur en continu mais n'avait pas d'impact sur la production totale d'hydrogène lors de tests en mode batch [126]. Cela a été expliqué par le fait qu'en mode batch le faible pH (5,2 et 6,2) entraîne une très faible proportion en ammoniac (1,3 et 13 mgNH₃/L respectivement) même lorsque 10 gTAN/L ont été ajoutés. En mode continu, une très faible concentration initiale en ammoniac de 0,4 mgNH₃/L (1,6 gTAN/L) a ainsi engendré un lessivage des microorganismes causé par un temps de doublement allongé. Cette étude a cependant souligné le fait que si la communauté bactérienne était initialement acclimatée à une certaine concentration en ammonium, même faible (>0.8 gTAN/L) avant de réaliser le réacteur continu, une production d'hydrogène pouvait être réalisée même en présence d'une forte concentration en ammoniac dans le milieu (0,20 mgNH₃/L soit 7,8 gTAN/L).

Plusieurs solutions ont également été développées pour éliminer l'azote ammoniacal dans différents procédés (méthanisation, dépollution etc...). La première option est de diluer le milieu réactionnel. Dans le cas d'un méthaniseur, Nielsen et al. (2008) ont prouvé que l'inhibition des ions ammonium pouvait être réduite en diluant le milieu avec un effluent (boue digérée, eau), ce qui permettait une augmentation de la production de méthane de 13% [124]. Dans le cas d'un procédé à deux étapes avec recirculation des jus, Cavinato et al. (2011) ont mis en place une élimination partielle de l'ammonium présent dans l'effluent recirculé par dilution pour maintenir une concentration en ammoniac constante (150 mgNH₃/L) [133]. L'absorption est également une solution physico-chimique permettant de diminuer la concentration en azote ammoniacal. Par exemple, l'argile est un support échangeur d'ions qui peut absorber l'ammonium et libérer du Ca²⁺ [137]. De plus, dans le cas du traitement des eaux usées, Lin et al. (2014) ont utilisé comme échangeur d'ions de la zéolite qui est composée principalement de clinoptilolite-Na, d'heulandite et de quartz avec une surface de 14,33 m².g⁻¹ et d'une capacité échangeuse d'ions de 0,92 meq.g⁻¹ [137]. Ce système a notamment permis de faire diminuer la concentration en ammonium de 0,99 gNH₄⁺/L à 0,29 gNH₄⁺/L, soit d'éliminer 70,7 % d'ammonium.

Les procédés physico-chimiques de stripping ont par ailleurs été étudiés. Le stripping consiste à éliminer, grâce à un flux gazeux, l'azote ammoniacal du milieu réactionnel sous sa forme gazeuse (NH₃), puis de la piéger dans de l'acide sulfurique pour former du sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄. C'est une technique régulièrement utilisée en dépollution. En utilisant comme flux gazeux pour le stripping le biogaz produit dans le digesteur (CH₄ et CO₂), Serna-Maza et al. (2014) ont diminué la concentration du TAN de 32,4% en appliquant une température de 85°C et un pH de 10 [138]. Walker et al. (2011) ont étudié plusieurs scénarios de stripping afin d'optimiser l'élimination de l'azote ammoniacal (0,5 g/l) directement dans un digesteur anaérobie mésophile (35°) [139]. Un stripping *in situ* a permis d'éliminer entre 58 à 90% d'ammonium en appliquant une recirculation du biogaz produit et sans ajustement de pH. Lors d'un stripping *in situ* dans un réacteur de méthanisation, Abouelenien et al. (2010) ont atteint une élimination en azote ammoniacal de près de 82% permettant ainsi de maintenir une concentration en azote ammoniacal inférieure à 2 gN/kg_{boüe} (HRT = 4 jours, T°C = 55°C, pH : 8-9) en appliquant un débit de biogaz recyclé de 0,8 mL/min [140]. Liu et al., (2014) ont également atteint une élimination très importante

(96,8%) de l'ammoniac contenu dans du lisier de porc (1,45 gNH₄⁺/l), en appliquant les conditions suivantes : un pH de 8, une température de 36±1°C et un débit de gaz de 6L/min [141]. Le stripping avait ici été utilisé comme prétraitement pour pouvoir utiliser le lisier de porc dans une installation de digestion anaérobie.

3.6. Les installations à échelle pilote

L'échelle laboratoire permet de comprendre et d'étudier le procédé de fermentation sombre pour une production optimale d'hydrogène, dans un premier temps. Seulement à une échelle plus importante il est nécessaire d'étudier d'autres variables qui ne sont pas considérées à petite échelle mais qui peuvent affecter significativement les performances du procédé, à une échelle pilote voire industrielle. En effet, certains paramètres tels que le stockage du substrat, le maintien des conditions anaérobies, le traitement des sorties de réacteurs, la récupération d'hydrogène produit, le maintien d'un pH homogène dans le fermenteur ou encore la gestion des odeurs peuvent être difficiles à gérer et coûteux [142]. Actuellement aucun réacteur de fermentation sombre n'est opéré à l'échelle industrielle. Néanmoins des réacteurs à échelle pilote ont déjà vu le jour dont quelques unités remarquables :

Liu et al. (2014) ont utilisé un fermenteur agité de 400 L et ont contrôlé la température (35°C), la pression et la concentration en hydrogène. L'inoculum a été prétraité thermiquement (100°C pendant 45 minutes) et un substrat simple (sucrose, 20 gDCO/L) a été utilisé. La stratégie de démarrage du pilote était de réaliser une première étape en mode batch de deux jours, pour ensuite se placer en mode continu pendant 30 jours (TSH de 12 jours) afin d'adapter initialement la communauté microbienne issue de boue (*Clostridium butyricum* et *Clostridium pasteurianum*). La productivité d'hydrogène durant la phase continue a été de 2,71±0,98 m³/m³/j soit un rendement max de 1,01 ± 0,37 molH₂/mol_{sucrose} [142].

Lee et al. (2010) ont développé un réacteur de fermentation sombre en continu de 500 L alimenté avec des déchets alimentaires prétraités. Le prétraitement a consisté à broyer puis presser ces déchets afin de récupérer une fraction liquide. Ce jus, contenant principalement des composés solubles biodégradables, était par la suite traité thermiquement (100 °C pendant 30 minutes) avant d'être injecté dans le fermenteur. La température du réacteur

était fixée à 30°C et le pH régulé à 5,5 avec une agitation continue et le temps de séjour hydraulique était de 21 heures. Cette étude a couplé une étape de fermentation à un méthaniseur UASB (Upstream Anaerobic Sludge Blanket) afin de compléter la dégradation du substrat et de valoriser les AGVs produits par fermentation. Les performances, en termes de rendement d'hydrogène, étaient de $1,82 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucose}}$ soit une productivité de $3,88 \text{ L/m}^3/\text{j}$ [143].

Le procédé nommé « Innovative Hydrogenation & Methanation Technology (HyMeTek) » situé à Taiwan est également un procédé à deux étapes avec un fermenteur continu (TSH de 9 heures) de 380 L et un méthaniseur 2400 L. Le rendement obtenu avec ce procédé est de $1,5 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{hexose}}$ soit une productivité de $2,97 \text{ m}^3/\text{m}^3/\text{j}$ en utilisant de la molasse comme substrat [144].

Enfin, Cavinato et al. (2012) ont également réalisé un procédé à deux étapes avec un réacteur de fermentation suivi d'un réacteur de méthanisation tous les deux en continu (TSH : 3,3 et 12,6 jours respectivement) d'un volume de 200 et 760 L, respectivement [128]. Des déchets alimentaires traités mécaniquement ont été utilisés pour obtenir un rendement en hydrogène de $66,7 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ soit une productivité de $2,6 \text{ m}^3/\text{m}^3/\text{j}$ (pH : 5,5 et température : 55°C).

Finalement, la plupart des procédés à l'échelle pilote sont réalisés en vue de transformer un substrat de type déchet (molasse, déchets alimentaires) avec comme objectif de coupler le procédé de fermentation sombre à d'autres procédés biologiques notamment avec un méthaniseur pour former un mélange de gaz (H_2/CH_4) appelé biohythane afin d'améliorer le rendement de conversion de la matière organique pour, à terme, créer un procédé global économiquement viable.

4. Le biohythane

Bien que de nombreuses études académiques aient été réalisées pour améliorer le rendement de production en biohydrogène, celui-ci reste encore trop faible pour que ce procédé soit économiquement viable seul [145]. En effet, la production d'hydrogène dans un réacteur de fermentation sombre représente au maximum $4 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucose}}$ si la voie acétate, la plus performante, est utilisée par les microorganismes [146]. De plus, la

fermentation sombre ne permet de convertir qu'une partie de la matière organique en hydrogène : des AGVs sont également produits lors de cette conversion, et l'hydrolyse de composés, en particulier des composés lentement biodégradables, n'est pas complètement réalisées. C'est la raison pour laquelle, de nombreuses études envisagent de coupler la fermentation sombre à un autre procédé biologique pour rendre la production de biohydrogène plus économiquement viable. Ce couplage peut être envisagé avec la photofermentation [147], l'électrolyse microbienne [148] ou encore la méthanisation [149]. Ce dernier concept vise à produire un mélange d'hydrogène et de méthane appelé biohythane qui suscite un fort engouement au niveau scientifique et industriel de par ses caractéristiques, tel que décrit ci-dessous :

4.1. Caractéristique et utilisation de l'hythane®

L'hythane® est un gaz composé d'hydrogène (5-25%) et de méthane (95-75%) [5]. Ce mélange est considéré comme un carburant moins polluant qu'un carburant classique. En effet, l'ajout d'hydrogène au gaz naturel permet de réduire les émissions de gaz polluants lors de sa combustion tels que le monoxyde de carbone (CO) et les hydrocarbures non consommés (HCs) [6,7]. De plus, l'hydrogène incorporé au méthane augmente l'inflammabilité et la vitesse de flamme, diminue l'énergie d'allumage et enfin permet une combustion plus complète par rapport au méthane seul ou au diesel dans les véhicules [5]. Toutefois, l'amélioration des performances est conditionnée à l'adaptation des moteurs de combustion (renforcement de la ventilation, installation de bougies dites « froides »)[150].

Même si l'hydrogène possède une faible masse moléculaire (2,016 g/mol) comparée au méthane (16,043 g/mol), son pouvoir calorifique est deux fois supérieur (119,93 kJ/g contre 50,02 kJ/g) (Tableau 8) [3,151]. L'hydrogène possède également une vitesse de combustion dans l'air, comprise entre 265 et 325 cm/s, supérieure à la vitesse de combustion du méthane (37-45 cm/s), ce qui en fait un gaz adapté à la combustion.

Tableau 8: Propriétés physico-chimique de l'hydrogène et du méthane

| | Hydrogène | Méthane |
|---|-----------|---------|
| Masse moléculaire | 2,02 | 16,04 |
| Densité du gaz (kg/m ³) | 0,0838 | 0,6511 |
| Pouvoir calorifique (kJ/g) | 119,9 | 50,0 |
| Vitesse de combustion dans l'air (cm/s) | 265-325 | 37-45 |
| Température de flamme dans l'air (cm/s) | 2318 | 2148 |
| Volume calorifique inférieur (kJ/m ³) | 10,1 | 32,6 |
| Diffusivité dans l'air (cm ² /s) | 0,63 | 0,20 |

Ainsi, la première étude sur l'utilisation de l'hythane a été recensée en 1983 par Nagalingam [152]. Ce travail s'intéressait aux performances de moteurs lors de la combustion de gaz naturel enrichi en hydrogène. Cette étude a notamment montré que l'ajout d'hydrogène (de 20 ou 50%) augmentait l'efficacité thermique et la vitesse de flamme comparé à l'utilisation du gaz naturel seul. Ces premiers résultats ont permis d'initier l'intérêt de l'utilisation de ce mélange. En 1992, la compagnie américaine (Hydrogen Component Inc) a déposé le premier brevet sur l'utilisation d'un mélange hydrogène/méthane dans les moteurs à combustion appelé alors hythane®. Depuis, de nombreuses recherches sur l'utilisation de l'hythane® dans les moteurs ont été réalisées et ont notamment montré la diminution des émissions de gaz polluants lors de l'ajout de l'hydrogène au méthane [153,154,156,162].

L'hythane® est de nos jours produit par injection d'hydrogène dans le gaz naturel. Cependant une autre méthode en développement consiste à mélanger l'hydrogène et le méthane issu de procédés biologiques : ce mélange de gaz est alors appelé biohythane.

4.2. Principe de production de biohythane

La production de biohythane peut être réalisée par un procédé anaérobie en deux étapes (Figure 11). La première étape consiste en la conversion du substrat par fermentation sombre pour produire notamment de l'hydrogène, et des sous-produits de l'activité microbienne, comme acides gras volatils et alcools (éthanol) [157]. Ces composés organiques

ainsi que le substrat non dégradé peuvent alors être convertis en méthane dans un second réacteur [144].

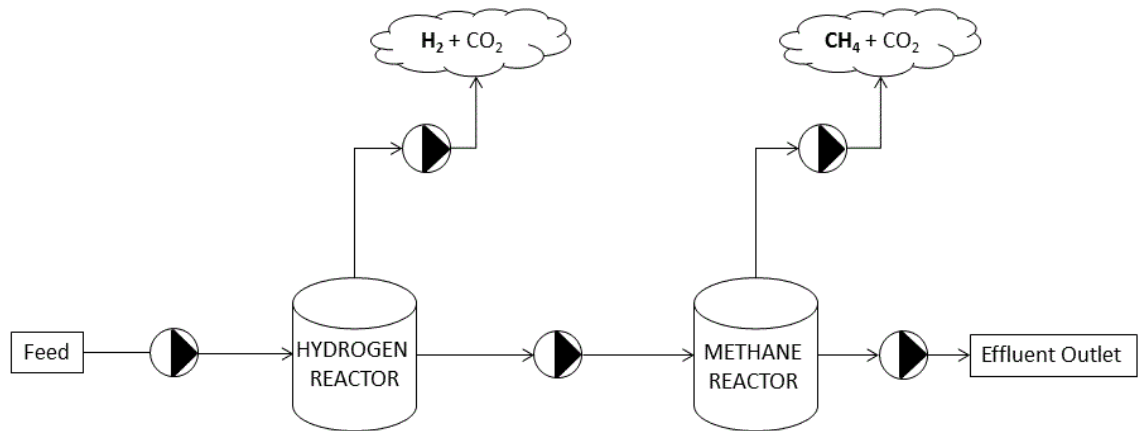


Figure 11 : Schéma du principe de la production de biohythane[144]

Un état de l'art des conditions opératoires utilisées pour la production de biohythane ainsi que les rendements et productivités obtenus en hydrogène et en méthane est présenté dans le Tableau 9.

Lors de l'étape de fermentation sombre, le temps de séjour hydraulique (TSH) est généralement de 13 à 81% inférieur aux TSH appliqués lors de l'étape de méthanisation pour éviter le développement des bactéries méthanogènes. De même, un faible pH favorise le développement des bactéries fermentaires et défavorise les méthanogènes. En comparaison, la valeur optimale du pH lors de l'étape de méthanisation est comprise entre 6,5 et 8,3.

Tableau 9 : Etat de l'art des procédés à deux étapes pour la production de biohythane

| Substrat | Réacteur de fermentation | | | | | Réacteur de méthanisation | | | | | Références |
|-------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|--|--------------------------------|---------------------------|-----------|-----------------------|--|---------------------------------|------------|
| | TSH (j) | Temp (°C) | pH _{initial} | Rendement (H ₂) | Productivité (H ₂) | TSH (j) | Temp (°C) | pH _{initial} | Rendement (CH ₄) | Productivité (CH ₄) | |
| OMB | 2,0 (TSM) | 37 | 5-5,5 | 43 mL/gMV | - | 15 | 37 | 7,5 | 500 mL/gMV | - | [72] |
| Déchets alimentaires | 3,0 | 55 | 6,0 | 69 mL/gMV | 23 L/kgMV/j | 12 | 55 | 8,0 | 348 mL/gMV | 29 L/kgMV/j | [158] |
| Déchets alimentaires | 3,3 | 55 | 5,5 | 66,7 mL/gMV | 20,2 L/kgMV/j | 12,6 | 55 | 7,6 | 482,4 mL/gMV | 57,1 L/kgMV/j | [128] |
| Déchets alimentaires | 6,0 (TSM)* | 37 | 6,5 | 310 mL/gMV | 3,63 L/L/j | 0,6 | 37 | 7,5 | 210 mL/gMV | 1,75 L/L/j | [159] |
| Déchets alimentaires | 6,6 | 40 | 5,7 | 65,0 mL/gMV | 9,8 L/kgMV/j | 26,7 | 40 | 7,0 | 546 mL/gMV | 20,5 L/kgMV/j | [160] |
| Déchets alimentaires | Batch | 37 | 6,0 | 55,0 mL/gMV | - | Batch | 37 | 7,0 | 94 mL/gMV | - | [161] |
| FFOM | 1,9 | 55 | 5-5,7 | 0.056 mL/mol _{hexose} | - | 15,4 | 55 | - | 287 mL/g _{D_{CO}} | - | [162] |
| FFOM | 3,0 | 55 | 5,5 | 50,6 mL/gMV | 16,9 L/kgMV/j | 12,6 | 55 | 8,3 | 416 mL/gMV | 33,0 L/kgMV/j | [133] |
| Riz | Batch (7j) | 37 | 5,5 | 125 mL/gMV | - | Batch | 37 | 6,5 | 232 mL/gMV | - | [163] |
| Sorgho | 0,25 | 35 | 4,9 | 10,4 mL/gMV | 41,6 L/kgMV/j | 0,83 | 35 | 7,5 | 29 mL/gMV | 34,9 L/kgMV/j | [164] |
| Paille de blé | 1,0 | 70 | 5,1 | 89,0 mL/gMV | 89,0 L/kgMV/j | 3,0 | 70 | 7,0 | 307 mL/gMV | 102,3 L/kgMV/j | [165] |
| Huile de palme | 2,0 | 55 | 5,5 | 135 mL/gMV | 1,31 L _{biogaz} /L/j | 15,0 | 35 | 7,5 | 414 mL/gMV | 0,16 L _{biogaz} /L/j | [166] |
| Patate | 2,0 | 55 | 5,5 | 85 mL/gMV | 2,1 L/L/j | 10 | 55 | 7,1-7,6 | 338 mL/gMV | 1,2 L/L/j | [167] |
| Résidus de distillation | Batch | 37 | 5,47 | 478 mL/gD _{CO} _{dégradé} | - | Batch | 37 | 7,17 | 333 mL/gD _{CO} _{dégradé} | - | [168] |

*: temps de séjour massique

Les rendements lors de l'étape de fermentation sont très variables et compris entre 10,4 mLH₂/gMV et 310 mLH₂/gMV. En règle générale, les expérimentations utilisant les déchets alimentaires produisent plus d'hydrogène (43 – 310 mLH₂/gMV) que celles basées sur les déchets agricoles (10,4 – 135 mLH₂/gMV). Concernant l'étape de méthanisation, les rendements sont compris entre 29 mLCH₄/gMV et 500 mLCH₄/gMV. Les meilleures performances en terme de productivité en hydrogène (89 LH₂/kgMV/j) et méthane (102,3 LCH₄/kgMV/j) ont été observées par Kongjan et al (2011) qui utilisaient de la paille de blé comme substrat [165]. Ces auteurs ont utilisé deux réacteurs de volume de travail de 220 mL à une température de 70 °C pour le réacteur de fermentation et 55 °C pour le réacteur de méthanisation.

Une étude de Liu et al., (2006) portant sur les ordures ménagères brutes a rapporté un rendement en hydrogène et méthane de l'ordre de 43,0 mLH₂/gMV et 500 mLCH₄/gMV, respectivement [72]. Cette étude a été effectuée à une température de 37°C avec des temps de séjours différents pour les deux étapes (2 jours pour le fermenteur et 15 jours pour le méthaniseur).

Seulement deux études utilisant la fraction fermentescible des ordures ménagères sont référencées [133,162]. Cavinato et al. (2011) ont en effet travaillé sur la fraction fermentescible des ordures ménagères collectée par la municipalité de Trévise [133]. Les rendements observés pour l'hydrogène et le méthane sont respectivement 50,6 mLH₂/gMV et 416 mLCH₄/gMV. Cette étude a été réalisée sur des réacteurs de 200L pour le réacteur de fermentation et de 760L pour le réacteur de méthanisation (température de 55°C pour les deux réacteurs).

Cette séparation physique d'hydrolyse/acidogénèse et de la méthanogénèse dans deux réacteurs permet d'améliorer le contrôle du procédé de chaque réacteur en optimisant spécifiquement, entre autres, le pH, la température, le temps de réaction, et la charge organique appliquée [128]. Par conséquent, la productivité globale peut être améliorée par rapport à un procédé en une seule étape et l'hydrogène est souvent considérée comme un bonus qui permet d'améliorer la production totale d'énergie [8].

Luo et al. (2011) ont en ce sens montré que le procédé à deux étapes pouvait produire 11% d'énergie supplémentaire par rapport à un procédé de méthanisation classique, résultant notamment du gain obtenu par la production d'hydrogène [158]. Ce travail utilisait des déchets de l'industrie du biodiesel (glycérol et colza). Il a été observé que la production de méthane était identique entre un procédé à deux étapes et à une étape (348 mLCH₄/gMV et 329 mLCH₄/gMV respectivement). Nasr et al. (2012) ont également observé une augmentation de 18,5% du rendement global d'énergie avec un procédé de production de biohydrogène utilisant de la vinasse comme substrat sous une température mésophile [168]. Cette amélioration est liée à l'augmentation de la vitesse de production de méthane et de dégradation de la matière organique (3,88±0,26 mLCH₄/heure et 333 mLCH₄/gCOD_{dégradé}) comparé à un méthaniseur classique (2,82±0,16 mLCH₄/heure et 268 mLCH₄/gCOD_{dégradé}) avec un temps de réaction de 104 jours. En conclusion, ces auteurs ont montré que 1 L de résidu de distillation dans un réacteur de méthanisation de type continu produisait 38,5 L de méthane alors que la même quantité de substrat dans un réacteur à deux étapes pouvait produire 19,5 L d'hydrogène et 38,7 L de méthane.

Liu et al. (2006) ont également mis en évidence que le rendement en méthane pouvait être amélioré dans un procédé en deux étapes par rapport à un procédé à une étape, lorsque le temps de séjour dans le réacteur de méthanisation était fixé à 15 jours. En effet, le rendement en méthane était amélioré de 21% dans des conditions mésophiles en utilisant des déchets ménagers comme substrat [72]. Cette étude a mis en avant une meilleure efficacité de dégradation du substrat dans un procédé en deux étapes (86%) comparée à un procédé unique de méthanisation (79,3%), vraisemblablement grâce à l'amélioration des cinétiques de dégradation. Nathao et al. (2013) ont également observé une augmentation du rendement en méthane (94 mLCH₄/gMV) avec un rendement en hydrogène de 55 mLH₂/gMV dans un procédé à deux étapes par rapport à un méthaniseur seul (82 mLCH₄/gMV). Cette étude a utilisé des déchets alimentaires comme substrat avec un temps de séjour de 96 heures pour les réacteurs de méthanisation et 35 heures pour celui de fermentation sombre [161].

Globalement, en se basant sur ces différentes études, l'amélioration du rendement en méthane est décrite comme le résultat de la décomposition des substrats complexes dans le

réacteur de fermentation en molécules simples rapidement dégradables dans le méthaniseur. Cette amélioration ne peut pas être observée si le substrat de base est simple (glucose) ou si le temps de méthanisation est long et permet une dégradation totale du substrat (le rendement en méthane sera donc probablement le même). Cependant sur des substrats complexes, ce type de procédé est bénéfique. Dans tous les cas, la production d'hydrogène apparaît comme un gain, qui permet d'augmenter l'énergie totale produite comparée à un méthaniseur classique.

Alors que ces différentes études mettent en avant l'intérêt du procédé à deux étapes, une seule étude n'a pas observé de différence de production d'énergie entre les deux technologies [169]. Ces résultats ont été expliqués par la présence de métabolites non dégradés lors de l'étape de méthanisation. Suite à une autre étude réalisée en 2014, ces mêmes auteurs ont cependant montré que l'énergie produite lors d'un procédé à deux étapes pouvait être entre 8 à 43% supérieure par rapport à un méthaniseur classique [170].

En terme économique, une étude a été publiée par Lee et Chung (2010) sur le coût d'un pilote composé d'un réacteur de fermentation de 500 L (température : 30°C, pH : 5.5) et d'un réacteur de méthanisation de 2300 L (température : 36°C, pH : 7.6), en utilisant des déchets alimentaires et du maïs comme substrat. Ces auteurs ont montré qu'il était économiquement plus intéressant d'utiliser des déchets alimentaires (coût de production d'hydrogène de 0,19\$/Nm³ soit env. 1,89€/kg) que du maïs (1,45\$/Nm³ soit env. 14€/kg) [143].

Enfin, à l'aide de la méthode d'analyse du cycle de vie (ACV), Patterson et al. (2013) ont estimé l'impact environnemental d'un méthaniseur classique à une étape et d'un procédé à deux étapes (H₂/CH₄). Cette étude s'est focalisée sur deux substrats (déchets alimentaires et paille de blé), et a comparé ces procédés à la production et l'utilisation du diesel. Il en résulte que l'utilisation d'un procédé à deux étapes pour la production de biohydrogène à partir de déchets alimentaires réduisait l'impact environnemental sur la plupart des indicateurs et notamment en termes de risques cancérigènes et d'écotoxicité. Cette étude a également rapporté que le procédé en deux étapes utilisant de la paille de blé comme

substrat augmentait la production d'énergie et réduisait significativement l'impact environnemental par rapport à un méthaniseur classique [156].

5. Conclusion du chapitre et objectif de la thèse

Le rapport bibliographique nous a montré qu'aujourd'hui, en France, il existe une forte volonté de diminuer la mise en stockage des déchets ménagers et assimilés et d'améliorer leur valorisation afin de créer une économie circulaire basée sur le respect de l'environnement. En effet, les problématiques majeures que sont l'augmentation de la quantité de déchets produits par habitant, la pollution causée par le stockage des déchets et la raréfaction de la matière première nous poussent à modifier nos comportements et notre manière de consommer.

La valorisation de l'énergie issue des déchets ménagers produite par voie biologique est prometteuse. La production de biohythane via un procédé à deux étapes à partir d'ordures ménagères est un domaine de recherche qui comporte de nombreuses pistes encore à développer pour, à terme, réaliser ce procédé à une échelle industrielle. Concernant la production de méthane, la technologie est mature avec de nombreux procédés industriels déjà existants. Cependant il est nécessaire d'étudier plus en détail la fermentation sombre pour mieux comprendre ce procédé et ainsi trouver les conditions opératoires optimales permettant une amélioration du rendement en hydrogène.

Aujourd'hui de nombreuses études ont été réalisées sur la fermentation sombre, notamment sur l'étude des inhibitions. L'inhibition de la production d'hydrogène peut être d'origine bien déterminée (pression partielle en hydrogène, AGVs) et pouvant être anticipée facilement, ou bien issue de phénomènes encore peu expliqués ou mal compris (ammoniac, force ionique) qui nécessitent un approfondissement. De plus, il a été observé que la variabilité de la production d'hydrogène était fortement corrélée à la composition du substrat, de l'inoculum et des conditions opératoires utilisées qui sont propres à chaque étude.

L'objectif de la thèse sera donc d'étudier l'optimisation de la production d'hydrogène dans un procédé à deux étapes dans le but de produire du biohythane à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) issue de l'installation de stockages (des ressources) de Trifyl.

Pour cela, il a été nécessaire de se baser sur les ressources (FFOM et lixiviat) exploitables sur le site de Trifyl afin de réaliser le procédé de production de biohythane et notamment le réacteur de fermentation sombre. Ces ressources spécifiques vont entraîner plusieurs problématiques propres à cette étude. Le lixiviat est un élément important qui va permettre d'une part d'apporter la fraction liquide nécessaire pour une production élevée d'hydrogène et, d'autre part, va être une source d'inocula contenant des bactéries productrices d'hydrogène. Seulement, ce lixiviat est aujourd'hui utilisé dans les bioréacteurs de Trifyl et possède donc une proportion en archées méthanogènes importante (consommatrices d'hydrogène). De plus une forte concentration en ions et notamment la présence d'ammoniac issu de la dégradation des protéines peut entraîner une inhibition forte de la production d'hydrogène. La production de lixiviat n'étant pas illimitée, le procédé proposé se base donc sur une recirculation du lixiviat dans le réacteur de fermentation sombre ce qui peut également induire une accumulation d'inhibiteurs (acides gras volatils, force ionique...). Une importante partie de la thèse aura donc pour objectif d'étudier les principaux inhibiteurs pouvant causer une diminution de la production d'hydrogène dans le procédé de fermentation à savoir notamment l'ammoniac, la force ionique et les acides gras volatils.

L'optimisation du rendement en hydrogène en faisant varier différentes variables a également été un objectif majeur afin d'améliorer la fiabilité du procédé. Les conditions étudiées pour cela ont été de deux types : (1) les paramètres facilement ajustables au niveau industriel (température, taux de matière sèche) qui pourront être fixés spécifiquement et (2) les paramètres difficilement modifiables à une échelle industrielle à savoir le pH, l'ammoniac ou encore les caractéristiques du substrat. Ils seront alors étudiés pour connaître les conditions idéales et les comparer avec les conditions réalisables.

Enfin, dans le but de réaliser un procédé de production de biohythane à échelle industrielle, des problématiques liées aux changements d'échelle et plus particulièrement au dimensionnement du réacteur ont également été étudiées attentivement. En effet, la configuration du réacteur peut modifier certaines données physico-chimiques (pression partielle en hydrogène, transfert gaz/liquide) qui vont potentiellement engendrer une diminution du rendement en hydrogène.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Préparation de la fermentation sombre

1.1. Reconstitution des déchets ménagers

Les expérimentations ont été réalisées sur de la fraction fermentescible des ordures ménagères reconstitués afin de stocker au minimum et ainsi, d'éviter toutes dégradations que le stockage pourrait occasionner. Ces déchets reconstitués vont également permettre d'employer un substrat homogène comparé aux déchets bruts issus de Trifyl très hétérogènes à l'échelle laboratoire ce qui facilitera la comparaison des différentes expérimentations effectuées.

1.2. MODECOM

Les déchets ménagers reconstitués ont été inspirés du MODECOM 2014 de Trifyl qui représente la caractérisation des déchets arrivant dans le bioréacteur de Trifyl. Le MODECOM est divisé en 13 catégories permettant ainsi d'avoir une composition précise des déchets. Le Tableau 10 représente la caractérisation de la partie fermentescible des déchets ménagers à savoir les déchets putrescibles, les papiers et les cartons.

Tableau 10 : Caractérisation de la partie fermentescible des déchets ménagers issus de TRIFYL

| <i>Catégories</i> | <i>Sous catégories</i> | <i>MODECOM Trifyl (%masse humide)</i> |
|----------------------|------------------------|---|
| Déchets putrescibles | Déchets alimentaires | 41,2 |
| | Déchets de jardin | 5,1 |
| | Aliments non déballés | 2,0 |
| Papiers | Emballage papiers | 0,9 |
| | Papiers sous plastique | 0,9 |
| | Autres papiers | 29,9 |
| Cartons | Carton plat ondulé | 16,7 |
| | Autres carton | 3,4 |

Afin de faciliter la préparation des déchets reconstitués, la catégorie « Papiers » n'a pas été divisée en trois tel que décrit dans le MODECOM mais regroupée en une seule catégorie.

1.3. Protocole de préparation

Chaque sous-catégorie est caractérisée par des éléments sélectionnés représentant de manière précise ces sous-catégories d'après la méthode MODECOM (Tableau 11). La proportion de chaque déchet alimentaire est issue de l'étude de Debattista (2011).

Tableau 11 : Eléments représentant les déchets reconstitués

| <i>Sous catégories</i> | <i>Eléments constitutifs</i> | <i>%masse humide</i> |
|--------------------------|------------------------------|----------------------|
| Déchets alimentaires | Viande | 7,0 |
| | Marc de café | 3,9 |
| | Riz | 4,3 |
| | Pomme de terre | 20,9 |
| | Biscottes | 5,1 |
| Déchets de jardins | Gazon coupé | 5,1 |
| Aliments non déballés | Yaourt | 2,0 |
| Papiers | Papier de bureau | 31,7 |
| Cartons plats et ondulés | Carton de déménagement | 16,7 |
| | Chemise en carton | 3,4 |

Les déchets sont préparés puis broyés (broyeur BLIK) trois fois afin d'avoir des fragments de 1 cm pour chaque constituant. Pour les aliments non déballés (yaourt) seulement la partie alimentaire a été utilisée sans le contenant. Les modalités de préparation sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Tableau 12 : Préparation des déchets reconstitués

| <i>Eléments</i> | <i>Préparation</i> | <i>Broyage</i> |
|--------------------|---|----------------|
| Viande | Cuisson | Oui |
| Marc de café | | Oui |
| Riz | | Oui |
| Pomme de terre | | Oui |
| Biscottes | | Oui |
| Gazon coupé | ∅ | Oui |
| Yaourt | | ∅ |
| Papier de bureau | Retirer les agrafes | Oui |
| Carton plat ondulé | Retirer les agrafes, les parties avec de la colle et les étiquettes | Oui |
| Autres cartons | | Oui |

Pour chaque expérimentation, les déchets reconstitués sont produits en temps réel pour éviter de le stocker et donc de potentiellement modifier les caractéristiques du substrat. La

viande, les patates et les yaourts ont néanmoins été stockés à -20°C avant leurs préparations, le Tableau 13 présente la provenance des éléments.

Tableau 13 : Spécificité des éléments

| Éléments | Spécificité | Marque |
|--------------|---------------------------------|--------|
| Viande | Steak Haché 5% matière grasse | Casino |
| Yaourt | Nature brassé 0% matière grasse | Casino |
| Riz | Long grain | Casino |
| Marc de café | Moulu | Casino |
| Biscotte | ∅ | Roger |

Les taux de matières sèches (MS) et de matières volatiles (MV) des déchets ont été déterminés selon la méthode normalisée NF T 90 105 (1972) décrite dans la partie « Analyses physico-chimiques ». La MS/MV de la fraction fermentescible des déchets ménagers reconstitués représente 0,74 gMS/g et 0,63 gMV/g respectivement.

1.4. Inoculum

L'inoculum utilisé était un lixiviat provenant du centre de stockage de Trifyl. Ce lixiviat est initialement utilisé par percolation dans les bioréacteurs pour la production de méthane. La quantité de MS/MV dans le lixiviat frais était de 0,020 gMS/g et 0,0074 gMV/g et le pH initial de 8,67.

Les Acides Gras Volatils (AGVs) et les ions initialement présents dans le lixiviat sont présentés dans le Tableau 14 et exprimés en g/L.

Tableau 14 : Concentration des AGVs et ions présents initialement dans le lixiviat g/L

| AGV | Acétate | Propionate | Isubutyrate | Butyrate | Isovalérate | Valérate | Caproate |
|---------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| | 0,77±0,01 | 0,14±0,00 | 0,04±0,00 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,07±0,00 | 0,05±0,01 |
| Anions | Cl ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | PO ₄ ⁻ | SO ₄ ⁻ | | |
| | 2,73±0,58 | - | - | 0,10±0,09 | 0,02±0,02 | - | - |
| Cations | Na ⁺ | NH ₄ ⁺ | K ⁺ | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ | | |
| | 2,55±0,60 | 4,02±0,79 | 1,64±0,34 | 0,19±0,02 | 0,29±0,14 | - | - |

Lors des différentes études, l'inoculum a subi plusieurs traitements (traitement thermique ou stripping) en fonction de l'objectif de l'étude.

1.4.1. Traitement thermique

Le traitement thermique s'est effectué à l'aide d'une table chauffante IKA C-MAG HS7 relié à un contrôleur de température IKATRON ETS-D5. Le traitement thermique était de 90°C pendant 30 minutes. Ce prétraitement avait pour but d'éliminer les microorganismes consommateurs d'hydrogène et se base sur la capacité sporulante des microorganismes producteurs d'hydrogène [95]. Selon les études un traitement thermique a donc été réalisé, ce traitement s'est effectué seulement sur l'inoculum avant de l'introduire dans le réacteur.

1.4.2. Stripping

Lors de la thèse plusieurs études ont nécessité l'élimination de l'azote ammoniacal dans le milieu pour ; (a) éviter l'inhibition de cette molécule sur la communauté microbienne productrice d'hydrogène et (b) étudier l'impact de la force ionique sur la production d'hydrogène. Pour cela, un stripping a été réalisé sur le lixiviat.

Le stripping est une méthode permettant d'éliminer l'azote ammoniacal sous sa forme gazeuse (NH_3) par l'action d'un bullage avec un autre gaz (Figure 12). Le principe du stripping repose la modification de la constante d'acidité afin de transformer un maximum d'azote ammoniacal en ammoniac (NH_3)

La constante d'acidité (pK_a) du couple acido-basique ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) est de 9,25 à une température de 25°C. Cette constante diminue lorsque la température augmente (à 90°C le pK_a du couple descend à 7,59). Ce qui signifie qu'à 90°C, si le pH est supérieur à 7,59, alors la quantité en ammoniac (NH_3) est majoritaire par rapport à la quantité en ammonium (NH_4^+) et inversement si le pH est inférieur à 7,59.

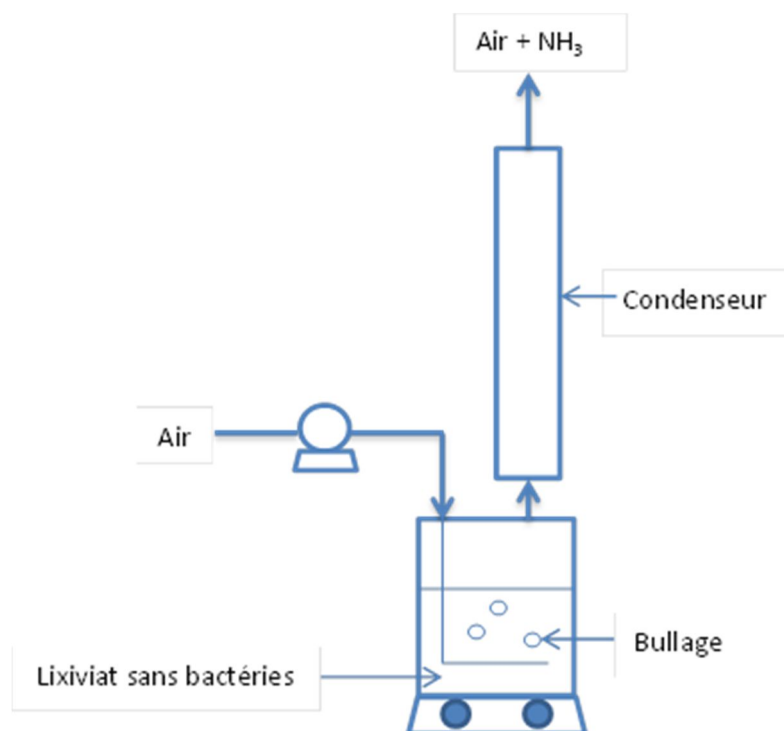


Figure 12 : Schéma principe du procédé de stripping

Avant de réaliser l'étape de stripping et afin d'éviter tout impact du procédé de stripping sur la communauté microbienne, celle-ci est préalablement extraite du lixiviat avant stripping, puis réinjecté à la fin du traitement. En effet, avant prétraitement par stripping, le lixiviat est préalablement centrifugé à 8 000 rpm pendant 30 minutes afin de séparer la phase solide (bactéries) de la phase liquide à l'aide d'une centrifugeuse BECKMAN COULTER Avanti J-26XP.

Le stripping est ensuite réalisé sur la phase liquide. Lors de cette étape, le pH de la phase liquide est ajusté à 9, puis la solution est insérée dans une bouteille de volume défini en fonction de la quantité à stripper. Une pompe péristaltique est placée en entrée afin de produire un bullage à l'air pendant toute la durée du stripping. Un condenseur est placé en sortie pour éviter l'évaporation de produit autre que l'air et le NH_3 strippé. La solution est portée à 90°C et le stripping est effectué pendant 3 heures. A la fin du stripping, le pH de la solution est ajusté selon les paramètres fixés lors des expérimentations, puis la communauté microbienne est réintroduite dans la phase liquide. L'efficacité du procédé de stripping mis en place montre un abattement de l'azote ammoniacal de 96 % dans le lixiviat (Figure 13).

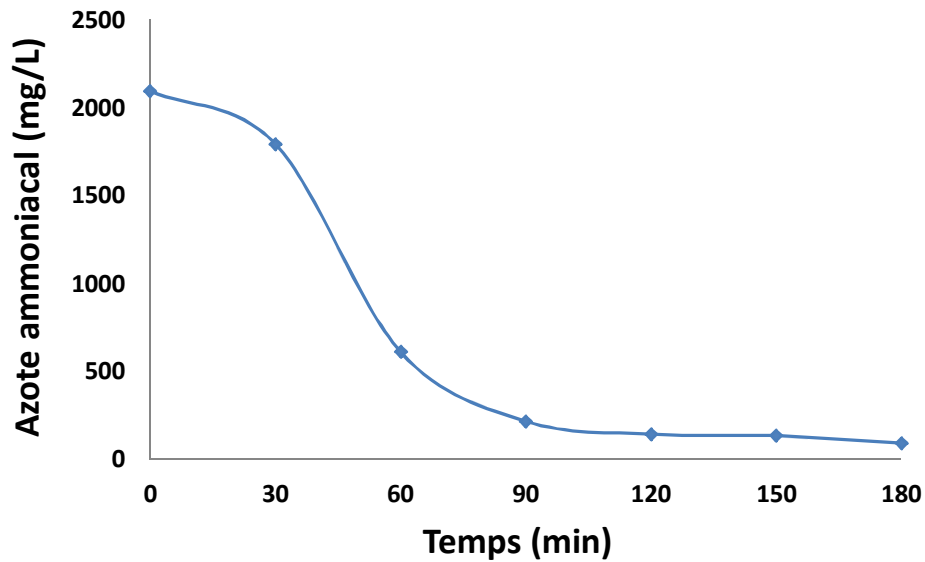


Figure 13 : Concentration en azote ammoniacal (mg/L) au cours du stripping

1.5. Les réacteurs de fermentation sombre

Durant les études, différents types de réacteur batch pour la fermentation sombre ont été réalisés. Chaque type de réacteur a été utilisé pour des études spécifiques permettant d'améliorer la compréhension ; de l'optimisation du rendement en hydrogène, du procédé de fermentation ou encore l'impact du scale-up sur le rendement en hydrogène. Trois réacteurs différents ont été utilisés, caractérisés notamment par leurs tailles (échelle laboratoire, semi-pilote, pilote).

∴ Réacteur échelle laboratoire

Les réacteurs à échelle laboratoire étaient des réacteurs en verre de 8 cm de diamètre et 15 cm de hauteur (Figure 14). Les réacteurs étaient fermés à l'aide d'un bouchon plasma ph 40 en caoutchouc et pouvaient supporter une pression de 3 bars. La réduction de la pression intérieure au cours des expérimentations était réalisée à l'aide de la micro-GC toutes les 4 heures pendant l'analyse du biogaz jusqu'à une valeur imposée (1,5 bars).



Figure 14 : Réacteur à échelle laboratoire

∴ Réacteur semi-pilote

Les expériences ont été réalisées dans un réacteur de 6 litres fabriqué en polyvinyle de chlorure (PVC) de 14 cm de diamètre et 39 cm de hauteur (Figure 15). Ce réacteur a été fabriqué pour l'étude « *Impact de la recirculation du lixiviat sur la fermentation sombre* ». Le réacteur était connecté à un Ritter de type MGC-1 V3.2 PMM de débit de 500 mL/h afin de garder une pression atmosphérique dans le réacteur et pour mesurer le volume de biogaz produit. La micro-GC était connectée en sortie du débitmètre afin d'analyser le biogaz produit



Figure 15 : réacteur semi-pilote

∴ Réacteur pilote

Le fermenteur utilisé était un réacteur pilote avec un volume total et de travail de 60 et 20 L respectivement et une hauteur de 50 cm et 37 cm de diamètre (Figure 16). La température fixée a été appliquée par recirculation d'eau chaude dans une enceinte extérieure. Le pH a été mesuré par une sonde de pH (Mettler Toledo 1100 Calimatic) placé dans le réacteur. Le volume total de biogaz produit a été mesuré quotidiennement à l'aide d'un compteur de gaz Ritter meter (TG05/S, Bochum, German). La composition du biogaz a été analysée par micro-GC.



Figure 16 : Réacteur pilote

1.6. Déroulement d'une expérimentation

Pour toutes les expérimentations de fermentation, le volume de lixiviat puis la quantité de déchets ménagers reconstitués ont été injectés suivant les conditions de l'expérimentation. A la suite, si une régulation de pH devait être effectuée, une solution de HCl (1 ou 10M) était utilisée. Le pH et la conductivité étaient mesurés au début de chaque expérimentation à l'aide d'un pH-mètre CyberScan pH 510 et d'un conductimètre WTW modèle LF325 A/SET. Enfin, le réacteur était fermé hermétiquement, puis flushé à l'azote pendant 5 minutes afin d'être en conditions d'anaérobiose. Au début et en fin de chaque fermentation, deux

prélèvements de 2 mL étaient effectués puis les échantillons étaient centrifugés à 13 400 rpm pendant 15 minutes. Le culot était stocké à -20°C et a permis de caractériser les populations microbiennes. Le surnageant également stocké à -20°C a permis de réaliser l'analyse des AGVs par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ainsi que l'analyse des autres métabolites tels que l'éthanol et le lactate par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Le pH et la conductivité ont une nouvelle fois été mesurés en fin d'expérimentation.

Lors des expérimentations effectuées au cours de cette thèse, différentes conditions opératoires ont été réalisées en fonction du procédé employé. Chaque étude ayant pour but l'optimisation du rendement en hydrogène, les conditions opératoires fixées étaient dépendantes des expérimentations et des résultats observés lors des études précédentes. C'est notamment pour cela, que certaines conditions opératoires ont été modifiées et améliorées au cours de cette thèse.

2. Procédure spécifique pour chaque étude du chapitre III

2.1. Etude de l'effet inhibiteur du TAN et de la force ionique

L'étude s'est déroulée en deux parties. Tout d'abord, les trois premières solutions (Azote-Chlorure, Azote-X et Chlorure-X) ont permis d'étudier l'impact de l'azote ammoniacal sur la production d'hydrogène (Tableau 15). Puis les solutions MI et MII ont été réalisées pour étudier l'impact de la force ionique sur la production d'hydrogène. Lors de la solution MII, le LiCl a remplacé le $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ et le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ car ces molécules avaient tendance à précipiter lors de la régulation de pH (NaOH). L'analyse des métabolites n'a pas pu être effectuée avec cette solution. Pour chaque solution, plusieurs batchs ont été réalisés permettant de couvrir la gamme de concentration définie dans le tableau 15. Lors de cette étude, le temps de fermentation était de 6 jours.

Tableau 15 : Composition de chaque solution

| Solution | Composés | [NH ₄ ⁺] (g/L) | Force ionique (mol/L) |
|----------------|--|---------------------------------------|-----------------------|
| Azote-Chlorure | NH ₄ Cl | [0 – 16,0] | [0 – 4,0] |
| Azote-X | NH ₄ Cl + NH ₄ H ₂ PO ₄ + (NH ₄) ₂ SO ₄ | [0 – 16,0] | |
| Chlorure-X | CaCl ₂ + KCl + NaCl | - | |
| MI | NaCl, KH ₂ PO ₄ , LiBr, KI, (NH ₄) ₂ SO ₄ , MnCl ₂ .4H ₂ O, MgSO ₄ .7H ₂ O | [0 - 2,7] | |
| MII | NaCl, KH ₂ PO ₄ , LiBr, KI, (NH ₄) ₂ SO ₄ , LiCl | [0 – 3,15] | |

La concentration en ammoniac a été calculée en accord avec le calcul utilisé dans l'étude d'Ariunbaatard et al. (2015) [134] :

$$N - NH_3 = \frac{TAN \times \left(\frac{K_a}{10^{-pH}} \right)}{\left(\frac{K_a}{10^{-pH}} \right) + 1} \quad \text{(Equation 15)}$$

Avec TAN, la concentration en azote ammoniacal totale (mg/L) et K_a la constante d'acidité du couple (NH₄⁺/ NH₃).

2.2. Etudes des conditions optimales pour le procédé de fermentation sombre

Lors de cette étude, un plan d'expérience a été effectué. Un plan d'expérience peut être utilisé dès lors que le lien entre une grandeur d'intérêt et plusieurs variables est recherché. Les variables, aussi appelées facteurs, vont influencer la valeur de la grandeur d'intérêt, nommée réponse (ici le rendement en hydrogène) [172]. Réaliser un plan d'expérience permet également d'obtenir un plan d'expérimentation de telle sorte à obtenir le maximum d'informations tout en réalisant le minimum d'essais expérimentaux. Dans notre cas, un plan d'expérience à 4 facteurs a été effectué. Les quatre facteurs étudiés étaient le pH, la siccité, la concentration en azote ammoniacal et la température. Dans un plan d'expérience, les variables étudiées sont appelés « facteur » et les valeurs définies pour chaque facteur sont appelés « niveau ». Pour chaque facteur, plusieurs niveaux (notés -1, 0 ou +1) ont été choisis

de façon à englober le domaine d'étude. Trois niveaux ont été utilisés (-1, 0, 1) pour les facteurs pH, siccité et concentration en azote ammoniacal, alors que deux niveaux ont été utilisés (-1, 1) pour la température (Tableau 16).

Tableau 16 : Niveau fixé pour chaque facteur

| Niveau | -1 | 0 | +1 |
|-------------|------|------|------|
| Siccité (%) | 3 | 11,5 | 20 |
| pH | 5 | 6,5 | 8 |
| TAN (g/L) | 1 | 3 | 5 |
| Température | 37°C | - | 55°C |

Les bornes de chaque facteur doivent nous permettre de définir le domaine d'étude. En d'autres termes, il s'agit de la partie de l'espace expérimental retenu pour réaliser les essais (Figure 17).

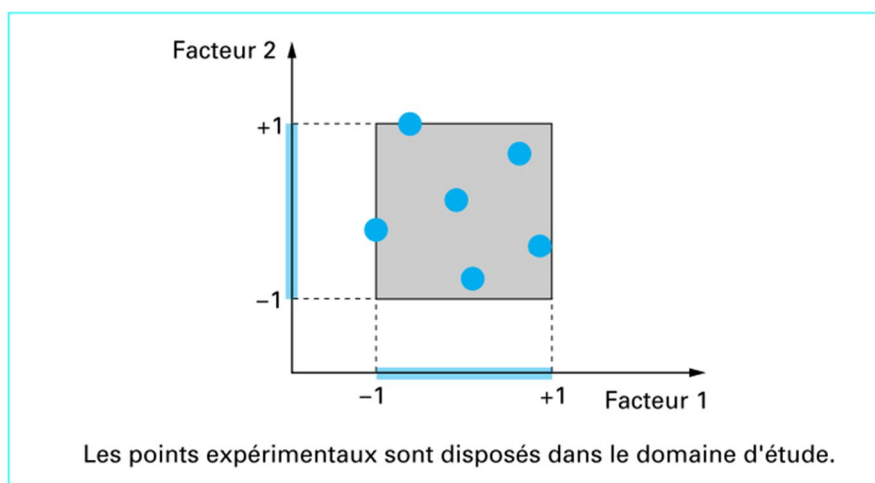


Figure 17 : Domaine d'étude

Le rendement optimal doit être observé dans notre domaine d'étude fixé. De plus, chaque niveau doit être à équidistance des autres pour permettre de résoudre l'Equation 16 ci-dessous.

$$y = a_0 + \sum a_n x_n + \sum a_{nm} x_n x_m + \sum a_{nn} x_n^2 \quad (\text{Equation 16})$$

Avec y la grandeur de la réponse (production d'hydrogène), x_i la valeur de la coordonnée du facteur i pour réaliser les essais (pH, siccité, $[\text{NH}_4^+]$, température), a_i les coefficients du modèle mathématique et a_0 représente le centre du domaine d'étude. La première partie de l'équation ($\sum a_n x_n$) représente le terme linéaire, la seconde ($\sum a_{nm} x_n x_m$) les interactions entre les facteurs, et la troisième le terme quadratique ($\sum a_{nn} x_n^2$).

Chaque point expérimental apporte une valeur de la réponse. Lors de cette étude, chaque fermentation a eu une durée de 7,5 jours. A la fin, on a donc un système de plusieurs équations égale au nombre d'expérience réalisée. Ce système peut par la suite être résolu en utilisant une méthode basée sur le critère d'optimisation des moindres carrés. La méthode des moindres carrés va en effet permettre de comparer les données expérimentales (pouvant contenir des erreurs de mesure) à un modèle mathématique permettant de décrire nos données. Afin de confirmer la pertinence du modèle mathématique, la mesure de la p-value a été effectuée.

2.3. Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre

Afin d'étudier l'effet des déchets de types papiers, cartons, et déchets de jardin (PCJ), différentes proportions PCJ ont été introduites dans chaque réacteur (0 - 8,9 - 17,7 - 26,2 - 35,0 et 43,8 g). Ce qui représente une proportion de 0%, 21%, 35%, 44%, 51% et 56% dans la fraction fermentescible des ordures ménagères (Tableau 17). Lors de cette étude, chaque fermentation a eu une durée de 7,5 jours en moyenne.

Les tests avec 56% de déchets PCJ représentent les proportions habituellement utilisées lors de la reconstitution de la fraction fermentescible des ordures ménagères dans les autres études (Tableau 11).

Tableau 17: Proportion de déchets PCJ dans chaque test réalisé

| Catégories | Sous-catégorie | Modecom Trifyl (g) | | | | | | |
|--------------------|--------------------|------------------------|------|------|-----|-----|----|-------|
| | | Proportion en flottant | | | | | | |
| | | 56% | 51% | 44% | 35% | 21% | 0% | Blanc |
| Déchet putrescible | Déchet alimentaire | 33,3 | | | | | | 0 |
| Déchets flottants | Déchet de jardin | 3,9 | 3,1 | 2,3 | 1,6 | 0,8 | 0 | 3,9 |
| | Papier de bureau | 24,4 | 19,5 | 14,6 | 9,8 | 4,9 | 0 | 24,4 |
| | Carton plat ondulé | 12,9 | 10,3 | 7,7 | 5,2 | 2,6 | 0 | 12,9 |
| | Chemise en carton | 2,6 | 2,1 | 1,6 | 1,1 | 0,6 | 0 | 2,6 |

La quantité de déchets putrescibles est identique pour chaque expérience. Un blanc, composé uniquement de déchets PCJ a été réalisé pour évaluer le potentiel hydrogène de celui-ci. La siccité dans les réacteurs a été fixée à 15 %. Sachant que la teneur en matière

sèche varie en fonction du taux de déchets PCJ, il a été nécessaire d'adapter le volume de lixiviat à ajouter dans chaque réacteur pour atteindre cette siccité (Tableau 18).

Tableau 18 : Volume de lixiviat à injecter pour une siccité de 15% dans chaque test

| Proportion de déchets flottants | MS (gTS/g) | Volume lixiviat (ml) |
|---------------------------------|------------|----------------------|
| 56 % | 0,66 | 300 |
| 51 % | 0,66 | 270 |
| 44 % | 0,66 | 240 |
| 35 % | 0,66 | 208 |
| 21 % | 0,66 | 177 |
| 0 % | 0,37 | 63 |
| Blanc | 0,94 | 240 |

3. Analyses physico-chimiques

3.1. Matières sèches (MS) et matières volatiles (MV)

Afin de déterminer la teneur en matière sèche totale (MS) et en matière volatile (MV), une masse connue a été introduite dans un creuset taré. Le creuset a été mis dans une étuve à une température de 105°C pendant 24 heures. La matière sèche représente ce qui reste dans le creuset à la suite de l'évaporation de l'eau et des AGVs. Le creuset est alors pesé pour connaître la matière sèche contenue dans l'échantillon.

Par la suite, le creuset est introduit dans un four à 550°C pendant 2 heures. Puis pesé afin de déterminer la matière minérale. La quantité de matière volatile a été obtenue par différence entre la masse de matière sèche et la masse de matière minérale. Ces tests ont été réalisés en triplicat.

3.2. Mesure des concentrations en acides gras volatils (AGVs)

La détermination des acides gras volatils a été effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Clarus 580 (Perkin Elmer) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Cette méthode d'analyse permet de séparer les composants d'un mélange par

chauffage sans décomposer les molécules afin de les analyser et de les quantifier. La solution à analyser est vaporisée à l'entrée de la colonne capillaire contenant la phase stationnaire solide, celle-ci se déplace dans la colonne à l'aide d'un gaz vecteur nommé éluant (phase mobile). Les composés vont migrer plus ou moins vite en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire. Il sera alors possible de les identifier grâce à leur temps de rétention. Cette méthode permet de connaître les concentrations en acétate, propionate, butyrate et iso-butyrate, valérate et iso-valérate qui peuvent être notamment produit lors de la fermentation sombre.

Chaque solution à analyser contenait 500 µL d'échantillon et 500 µL d'étalon interne d'acide éthyl-2-butyrique à 1 g/L. La solution est injectée dans une colonne capillaire de 15 m de long et 0,53 mm de diamètre intérieur de type ELITE FFAP (Perkin Elmer) (Figure 18). L'injecteur (splitless) est maintenu à une température de 210°C et le détecteur FID à 280°C. L'analyse des échantillons est effectuée sous un gradient de température de 80 à 120°C en trois minutes. Le détecteur FID est alimenté en hydrogène et en air (40 mL/min). Le gaz étalon était de l'azote et la gamme de mesure est de 100 à 1 000 mg/L pour chaque AGV.



Figure 18 : Photo du chromatographe en phase gazeuse

3.3. Mesures des concentrations en acides organiques et en sucres par HPLC

La concentration en acides organiques (lactate, formate) et les alcools (éthanol, butanol...) ont été mesurés par analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplé

avec un réfractomètre (Waters R410) (Figure 19). Le surnageant issu des expérimentations a été filtré à l'aide d'un filtre de 0,2 μm . Une pré-colonne (Micro guard cation H refill cartridges, Bio-Rad) disposé avant la colonne permet de filtrer les éventuels résidus. La séparation des composés est effectuée par une colonne Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad) à une température de 35°C et un débit de 0,7 mL/min. Une solution d' H_2SO_4 à 4 mM a été utilisée comme éluant.



Figure 19 : Photo de la chromatographie liquide haute performance

3.4. Mesures de la concentration des ions

La concentration des ions a été analysée par un chromatographe DIONEX ICS-3000 qui permet la séparation des anions et des cations par chromatographie ionique grâce à deux systèmes de séparations parallèles. Le système de séparation des cations est équipé d'une colonne de garde CG16 3mm, d'une colonne de séparation CS16 3mm. Le système de séparation des anions est équipé d'une pré-colonne CG11-2mm, d'une colonne de garde AG15-2mm, d'une colonne de séparation AS15-2mm et d'une colonne CR-ATC qui piège les carbonates de l'eau. Le chromatographe permet d'avoir la mesure des ions suivants : Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^- , SO_4^- .

3.5. Mesure de la composition du biogaz

Les analyses de la composition biogaz ont été effectuées à l'aide d'un micro-chromatographe R 3000 (SRA Instrument) composé de deux colonnes (Figure 20). La

première colonne permettant la quantification des gaz O_2 , CH_4 , H_2 et N_2 est une colonne Molsieve de 10 m de longueur et 0,32 mm de diamètre à $80^\circ C$ utilisant de l'Argon comme gaz vecteur. La deuxième colonne (VAR (8 m x 0,32 mm) à température de $70^\circ C$ utilisant de l'Hélium comme gaz vecteur permet d'analyser de CO_2 . La température de l'injecteur est de $90^\circ C$.

Un manomètre intégré permet de mesurer la pression au cours des expérimentations lors des analyses. Le logiciel associé SOPRANE MicroGC Analyse Methode permet de récupérer les données.

Toutes les mesures effectuées en ligne ont ensuite été récupérées sur le Système d'Information pour l'Expérimentation (SILEX). Ce système permet d'acquérir et de visualiser l'analyse de la composition des gaz ainsi que la pression obtenue dans les réacteurs batchs.



Figure 20 : Photo du micro-chromatographe en phase gazeuse multiplexé

4. Modélisation de la production d'hydrogène par voie fermentaire sombre

La composition du biogaz produit et le volume associé a permis de calculer la production d'hydrogène via l'utilisation d'une courbe d'ajustement. La courbe d'ajustement utilisée est la courbe de Gompertz modifiée (Equation 17) :

$$H(t) = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{m,e}}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{(Equation 17)}$$

Avec H l'hydrogène cumulé en fonction du temps (mL), P la quantité maximale d'hydrogène produite (mL.gMV⁻¹), R_m la productivité maximale (mL.gMV⁻¹.j⁻¹), λ le temps de latence (jour) et e le nombre d'Euler. L'ajustement de Gompertz a été réalisé sous le package R *grofit* suivant une méthode de régression non linéaire.

5. Analyses mathématiques

Une analyse de la variance a également été effectuée dans certaines études. L'ANOVA est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population, c'est-à-dire qu'ils ont statistiquement une même moyenne. L'hypothèse nulle correspond au cas où les distributions suivent la même loi normale et l'hypothèse alternative est qu'il existe au moins une distribution dont la moyenne s'écarte des autres moyennes.

La p-value a également été utilisée. Dans un test statistique, la p-value (ou valeur-p) est la probabilité d'obtenir la même valeur du test si l'hypothèse nulle est vraie. La procédure consiste ensuite à comparer la p-value à un seuil préalablement défini (5%). En d'autres termes, si la p-value est inférieure à 0,005 alors l'hypothèse nulle est rejetée et le résultat du test est déclaré « statistiquement significatif » : les résultats peuvent donc être exploités.

La distance de Bray-Curtis ou indice de dissimilarité permet d'évaluer les dissimilarités entre différents échantillons : si l'indice est proche de 1, cela signifie que les échantillons comparés sont similaires ; si il est proche de 0, alors les échantillons sont dissimilaires [173]. L'Equation 18 permettant le calcul de Bray-Curtis est représentée ci-dessous où deux échantillons *j* et *k* sont comparés.

$$BC_{jk} = 1 - \frac{2 \sum_{i=1}^p \min(N_{ij}, N_{ik})}{\sum_{i=1}^p (N_{ij} + N_{ik})} \quad \text{(Equation 18)}$$

Avec N_{ij} l'abondance d'une espèce i dans l'échantillon j et N_{ik} l'abondance de la même espèce dans l'échantillon k .

6. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont permis de quantifier et/ou de nommer les communautés microbiennes présentes dans le milieu de réaction. Cela a donc permis une compréhension plus poussée du milieu de fermentation et, ainsi, de répondre à certaines interrogations. Afin de réaliser une analyse microbiologique, en fonction de l'analyse souhaitée, plusieurs étapes sont à réaliser.

Tout d'abord, lors de l'analyse microbiologique, l'ADN génomique a été extrait et purifié à partir du culot des échantillons en utilisant le kit d'extraction et de purification d'ADN (Fast DNA SPIN kit for soil) suivant les instructions du fabricant (MP Biomedicals).

Après extraction et purification de l'ADN, la pureté et la quantité d'ADN extrait ont été vérifiées par mesure spectrophotométrique (Infinite NanoQuant M200, Tecan).

La paire d'amorce 515-532U et 909-928U ont été utilisés (CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTA et GAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCTCCCGCAATTCTTTRAGT), pour amplifier la région V4-V5 du gène codant l'ARN 16S sur 30 cycles d'amplifications à une température d'hybridation de 65°C [174]. Les paires de primer ciblaient les gènes codant l'ARN pour les archées et les bactéries. Le séquençage a été effectué à la plateforme technique Genotoul basé à Toulouse. Une version modifiée de la procédure standard pour les données MiSeq (Kozich et al., 2013) pour la version Mothur 1.35.0 (Schloss et al., 2009) a été utilisé afin d'assembler les séquences complémentaires [175,176]. La méthode Uchime a été utilisée pour la vérification de chimères [177]. Les séquences qui apparaissaient moins de trois fois dans les données totales étaient éliminées. L'alignement de la séquence d'ARN 16S a été effectué en utilisant la base de donnée SILVA SSURef NR99, comme prévu par Mothur [176]. Les même

sources de données ont été utilisées pour la classification de type Mothur. L'affiliation de la taxonomie a été effectuée en utilisant un seuil de 97%.

**Chapitre III : Optimisation de la fermentation sombre
dans le but de créer un procédé à deux étapes pour la
production de biohythane**

1. Problématique et objectif du chapitre

Dans le cadre de la production de biohydrogène, la viabilité économique d'un procédé de fermentation sombre réside en partie dans sa capacité à produire de l'hydrogène avec un rendement élevé. Cependant, la production d'hydrogène peut fortement varier en fonction du type de substrat utilisé [178], des conditions opératoires fixées (pH, température, taux de matières sèches) [95], des communautés microbiennes dont la présence de microorganismes consommateurs d'hydrogène [179] mais aussi de l'accumulation d'inhibiteurs pouvant impacter la fermentation sombre [2,3,4].

En effet, certains inhibiteurs potentiels sont présents dans les ressources (substrat et inoculum), dont celles issues de Trifyl (FFOM et lixiviat). Par exemple, l'azote ammoniacal (TAN) sous sa forme non ionisée (NH_3) est un fort inhibiteur de la production d'hydrogène, et souvent citée comme problématique dans la littérature [11,12,15]. Une accumulation de cet élément est, de plus, régulièrement observée lors de l'utilisation de déchets alimentaires ou de FFOM car il est issu de la décomposition des acides aminés [125]. Au-delà, la charge totale de la solution, qui se caractérise par la force ionique, peut également être à terme un fort inhibiteur de la production d'hydrogène [121]. Le lixiviat étant initialement chargé en ions (NH_4^+ , Cl^-), il était donc important d'étudier ce phénomène sur le processus de fermentation.

La production d'hydrogène peut également être fortement impactée par les conditions opératoires appliquées et principalement par le pH, la température et la siccité (taux de matières sèches) [181]. D'un point de vue industriel, ces paramètres ne peuvent être contrôlés qu'en entraînant un coût élevé d'exploitation. Par exemple, le pH peut être tamponné en ajoutant un agent chimique onéreux, et une température élevée entraîne aussi une augmentation des coûts de production. De plus, la siccité est un facteur important qui peut modifier significativement le dimensionnement du réacteur.

D'après l'étude bibliographique, la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) possède un potentiel hydrogène plus faible que les déchets alimentaires. Ceci est

notamment dû à la proportion élevée en déchets de types « papiers et cartons » (cf. MODECOM) [82]. D'après l'étude de Fonoll et al. (2016) réalisée en digestion anaérobie, l'élimination de ce type de substrat présent dans la FFOM peut impacter la stabilité de la production de biogaz avec une diminution de près de 15% du rendement en méthane [182]. Cependant aucune étude ne s'est à ce jour intéressée au rôle de la fraction « papiers et cartons » sur la production d'hydrogène.

Ainsi, dans le but d'optimiser le rendement en hydrogène par fermentation sombre, l'objectif de ce chapitre a été dans un premier temps d'élucider l'impact de l'azote ammoniacal et notamment de l'ammoniac sur la fermentation sombre en cultures mixtes avec un substrat complexe (FFOM) et de le comparer avec l'effet de la force ionique en général. Dans un deuxième temps, la production d'hydrogène a été optimisée en faisant varier différentes conditions opératoires (pH, température, TAN, siccité) sous un plan d'expérience prédéfini; l'objectif était de déterminer les valeurs permettant d'optimiser le rendement global, et de trouver un compromis en prenant en compte la faisabilité industrielle. Enfin, dans une dernière partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'impact de la composition du substrat, et notamment de la proportion en papiers/cartons/déchets de jardin, sur le rendement en hydrogène. Au cours de ces différentes études, une attention particulière a été portée sur la production des autres métabolites qui peuvent être facilement dégradés dans un méthaniseur dans l'optique de réaliser un procédé à deux étapes pour la production de biohythane (H_2/CH_4).

2. Etude de l'effet inhibiteur de l'azote ammoniacal et de la force ionique

Un brevet lié aux résultats de ce chapitre a été déposé « Procédé de contrôle d'un réacteur de fermentation sombre »

2.1. Introduction

La littérature montre que la production d'hydrogène dans un réacteur de fermentation peut être limitée par des inhibiteurs provenant du milieu de réaction. En particulier, l'utilisation de la FFOM et du lixiviat peut engendrer plusieurs formes d'inhibition. Tout d'abord, l'azote ammoniacal (TAN) est considéré comme un des principaux inhibiteurs et est généralement produit au cours de la fermentation sombre par minéralisation de l'azote organique provenant des acides aminés du substrat. En effet, la proportion moyenne d'azote dans les déchets alimentaires a été estimée à 8,9 kg/tonne [183]. L'azote ammoniacal peut donc être produit en quantités importantes lors de la dégradation biologique des déchets ménagers et est un inhibiteur potentiel de la digestion anaérobie, notamment sous sa forme non ionisée (NH_3) [125]. En fermentation, l'étude de Cavinato (2011) a par ailleurs mis en évidence l'inhibition par l'ammoniac de la production d'hydrogène dans un fermenteur utilisant des biodéchets, à partir d'une concentration de 528 mg/L [133]. Cependant, la valeur critique d'inhibition est très variable en fonction des études, cette valeur variant entre 0,19 mg/L jusqu'à 530 mg/L, comme rapporté précédemment [7,9]. De plus, l'étude de Salerno et al. (2006) a montré le potentiel inhibiteur de cette molécule mais seulement en réacteur continu, alors qu'en batch, aucun impact n'a été observé.

Au-delà de la simple mesure d'ions ammonium, très peu d'études ont mis en avant le caractère plus global d'une inhibition par la force ionique totale du milieu réactionnel, qui pourrait également jouer un rôle important et expliquer, en partie, la variabilité des seuils d'inhibition observés [126]. L'étude de Van Niel et al. (2003), portant sur l'inhibition de la production d'hydrogène par le substrat (sucrose) et les métabolites produits lors de la fermentation, a montré que les sels inorganiques avaient tendance à inhiber de la manière similaire la production d'hydrogène. Cependant cette étude n'a permis de mettre en évidence qu'une baisse partielle de la production d'hydrogène et non une inhibition totale

de l'activité biologique par les sels et ce seulement sur une culture pure (*C. saccharolyticus*) et en conditions hyperthermophiles (70°C), ce qui rend les résultats de cette étude très spécifiques [121]. Il a également été observé l'influence de sels sur la production d'hydrogène par l'étude de Zheng et al. (2005) avec l'utilisation de glucose comme substrat en se focalisant majoritairement sur le chlorure de sodium ce qui pourrait s'apparenter à une inhibition par la force ionique [184].

Dans le cas spécifique de la mise en place d'un réacteur de fermentation sombre chez Trifyl en utilisant les ressources présentes sur le site, la présence de ces inhibiteurs pourrait s'avérer problématique. En effet, la concentration initiale en ammoniac dans le lixiviat à pH 8 (410 mg/L) est proche de la gamme des valeurs inhibitrices indiquées dans la littérature. De plus, la fraction fermentescible des ordures ménagères contient des acides aminés qui pourraient conduire à une augmentation de la teneur en ammoniac dans le milieu lors de la dégradation biologique et donc causer une plus forte inhibition de la production d'hydrogène. La forte concentration en ions dans le lixiviat, tels que le chlorure ($2,73 \pm 0,58$ g/L) ou encore le sodium ($2,55 \pm 0,60$ g/L), pourraient également occasionner une augmentation de la force ionique ce qui pourrait avoir, à terme, un impact négatif sur la production d'hydrogène.

Cette première étude a donc eu pour objectif d'approfondir l'effet de l'azote ammoniacal et de la force ionique sur la production d'hydrogène, qui sont, deux facteurs à fort potentiel inhibiteur lors de l'utilisation des ressources complexes comme celles de Trifyl.

La méthodologie a consisté à étudier l'ajout d'une solution de NH_4Cl sur la production d'hydrogène dans une première partie. Puis une seconde partie a permis de comparer l'effet de l'azote ammoniacal au chlorure pour enfin, en dernière partie s'intéresser plus spécifiquement à l'effet global de la force ionique par l'ajout d'un mélange ionique. Enfin, une partie annexe a eu pour objectif d'identifier un moyen simple et peu coûteux pour prédire l'inhibition de l'hydrogène dans une unité industrielle via la mesure de la conductivité.

2.2. Déroulement de l'étude

Cette étude s'est déroulée dans des réacteurs de type batch de 500 mL. Les expérimentations ont été réalisées sous les mêmes conditions opératoires, à savoir un pH initial de 6 non régulé et non tamponné, une température de 37°C et une siccité de 3%. Pour chaque batch, 9,25 gMV de FFOM (correspondant à 14,6g de substrat brut) ont été utilisés (Cf Chapitre 2 « *Matériel et Méthode* »), et du lixiviat préalablement traité par stripping, afin d'éliminer l'azote ammoniacal initial, a été ajouté. La production d'hydrogène a été suivie de façon continue à l'aide d'une micro-GC avec un intervalle d'analyse de quatre heures. Une analyse des co-produits métaboliques a été réalisée à la fin de chaque expérience sur le milieu réactionnel.

Le Tableau 19 résume les différentes solutions utilisées lors de cette étude. La solution Azote-Chlorure consiste en une solution usuellement utilisée dans la littérature pour étudier l'effet de l'azote ammoniacal sur la production d'hydrogène ou de méthane ([8,12,13,14]). Seulement, cette solution n'étant composée que d'ions NH_4^+ et Cl^- , il est donc difficile de conclure sur l'impact unique de l'azote ammoniacal en écartant une inhibition possible causée par les ions Chlorures. Les solutions Azote-X et Chlorure-X ont donc été préparées afin d'observer l'impact de l'azote ammoniacal (Sol Azote-X) et du chlorure (Sol Chlorure-X) avec une forte proportion en l'ion étudié et plusieurs contre-ions différents. Enfin, les solutions MI et MII ont été préparées avec des mélanges constitués de nombreux ions pour évaluer l'impact global de la force ionique en limitant le biais de l'inhibition par un ion spécifique.

Pour chaque solution, plusieurs tests en batch ont été réalisés permettant de couvrir la gamme de concentration définie dans le Tableau 19. La force ionique initiale du lixiviat, calculée grâce à la concentration de chaque composé présent, a été estimée à 0,09 M. La conductivité des milieux réactionnels a été mesurée à l'aide d'un conductimètre portable. Un témoin a été réalisé sans ajout de solution ionique au milieu afin d'estimer l'évolution du potentiel d'hydrogène lié à l'ajout d'ions dans le milieu.

Tableau 19 : Composition de chaque solution

| Solution | Composés | TAN (g/L) | Force ionique (mol/L) |
|----------------|--|------------|-----------------------|
| Azote-Chlorure | NH₄Cl | [0 – 18,5] | [0 – 4,0] |
| Azote-X | NH₄Cl + NH₄H₂PO₄ + (NH₄)₂SO₄ | [0 – 18,5] | |
| Chlorure-X | CaCl₂ + KCl + NaCl | - | |
| MI | NaCl, KH ₂ PO ₄ , LiBr, KI, (NH ₄) ₂ SO ₄ , MnCl ₂ .4H ₂ O, MgSO ₄ .7H ₂ O | [0 - 2,7] | |
| MII | NaCl, KH ₂ PO ₄ , LiBr, KI, (NH ₄) ₂ SO ₄ , LiCl | [0 – 3,15] | |

2.3. Impact de la concentration en ions sur la fermentation sombre

2.3.1. Evolution du rendement en hydrogène

Durant cette étude, aucune production de méthane n'a été observée ce qui permet de conclure que les variations de production d'hydrogène et de métabolites n'étaient pas liées à sa consommation par les archées méthanogènes.

A. Impact de l'azote ammoniacal sur la production d'hydrogène

La Figure 21 représente le rendement en hydrogène obtenu en fonction de la concentration en TAN du milieu de réaction. Le temps de latence a également été calculé à l'aide de l'équation de Gompertz.

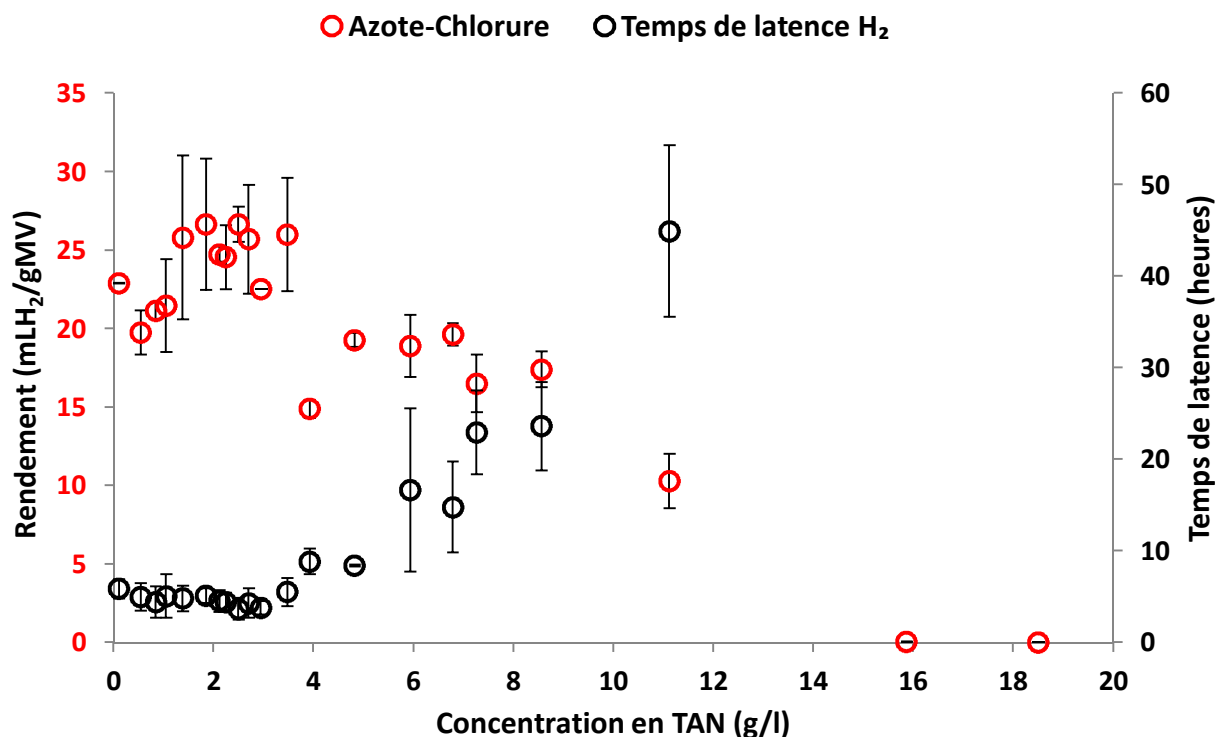


Figure 21 : Effet de l'azote ammoniacal sur le rendement en hydrogène et le temps de latence associé

D'après la Figure 21, le rendement en hydrogène obtenu avec le témoin, sans ajout d'azote ammoniacal, a été de $22,9 \pm 0,1 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ avec un temps de latence de $5,9 \pm 0,1$ heures. Cette valeur est proche des rendements observés dans la littérature dans les études utilisant la fraction fermentescible des ordures ménagères comme substrat (Tableau 20). En effet, pour l'étude la plus proche par rapport à nos conditions opératoires, l'utilisation de la fraction fermentescible des ordures ménagères à une température mésophile et un pH de 7 a permis d'observer un rendement en hydrogène de $23,4 \pm 2,9 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ [71]. D'après la littérature, l'augmentation de la température (55°C), ou la diminution du pH ($5,5$) semble améliorer la production d'hydrogène (de 25 ± 9 jusqu'à $85 \pm 3 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$) [74, 111].

Tableau 20 : Etat de l'art de la production d'hydrogène via l'utilisation de FFOM

| Inoculum | Substrat | Mode | Prétraitement | pH | Température | Rendement H_2 | Référence |
|-------------------------|----------|-------|--|-----|--------------------|--|-------------|
| Lixiviât | FFOM | Batch | Thermique (90°C , 30min) | 6 | 37°C | $24,9 \pm 4,4 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ | Cette étude |
| Boue de méthanisation | FFOM | Batch | Thermique (100° , 4h) | 7 | 35°C | $23,4 \pm 2,9 \text{ NmLH}_2/\text{gMV}$ | [71] |
| Mélange de boue aérobie | FFOM | Batch | Thermique (100°C , 15min) | 5,7 | 38°C | $99 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ éliminé | [73] |
| Boue de méthanisation | FFOM | Batch | Thermique (100°C , 4h) | 5,5 | 35°C | $[25 \pm 9 - 85 \pm 3] \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ | [74] |
| Boue de méthanisation | FFOM | Batch | - | 5,5 | 55°C | $51 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$ | [111] |

Pour des valeurs plus élevées, une augmentation du rendement légère mais significative (p -value $< 0,001$) a été observée entre 1,4 et 3,5 gTAN/L avec un rendement moyen en hydrogène de $24,9 \pm 2,5$ mLH₂/gMV soit une augmentation de 8% par rapport au témoin. Dans les conditions de pH (6) et de température (37°C) du milieu, une concentration de 3,5 gTAN/L équivaut à 4,5 mgNH₃/L. Pour une concentration comprise entre 3,5 gTAN/L et 8,6 gTAN/L (11,0 mgNH₃/L), une zone intermédiaire a été observée avec un rendement plus faible que celui observé avec le témoin ($17,8 \pm 1,5$ mLH₂/gMV) et un impact négatif significatif (p -value $< 0,001$) sur le rendement en hydrogène. A partir de 11,1 gTAN/L (14 mgNH₃/L), le rendement en hydrogène chute significativement jusqu'à une absence totale d'hydrogène à partir de 15,9 gTAN/L soit une concentration en ammoniac de 20 mgNH₃/L.

Le temps de latence de la production d'hydrogène subit le même effet. Il reste stable et court ($5,23 \pm 0,52$ heures) pour une concentration comprise entre 0 et 3,5 gTAN/L. Puis, au-delà de cette plage de concentration, une forte augmentation du temps de latence a été observée jusqu'à atteindre $44,9 \pm 9,3$ heures à une concentration 11,1 gTAN/L.

B. Impact d'un mélange d'ions (Azote-X et Chlorure-X) sur la production d'hydrogène

La Figure 22 permet de faire la comparaison entre le rendement en hydrogène observé par l'ajout d'azote ammoniacal soit sous forme NH₄Cl (Solution Azote-Chlorure) seul, soit sous plusieurs formes NH₄Cl + NH₄H₂PO₄ + (NH₄)₂SO₄ (Solution Azote-X).

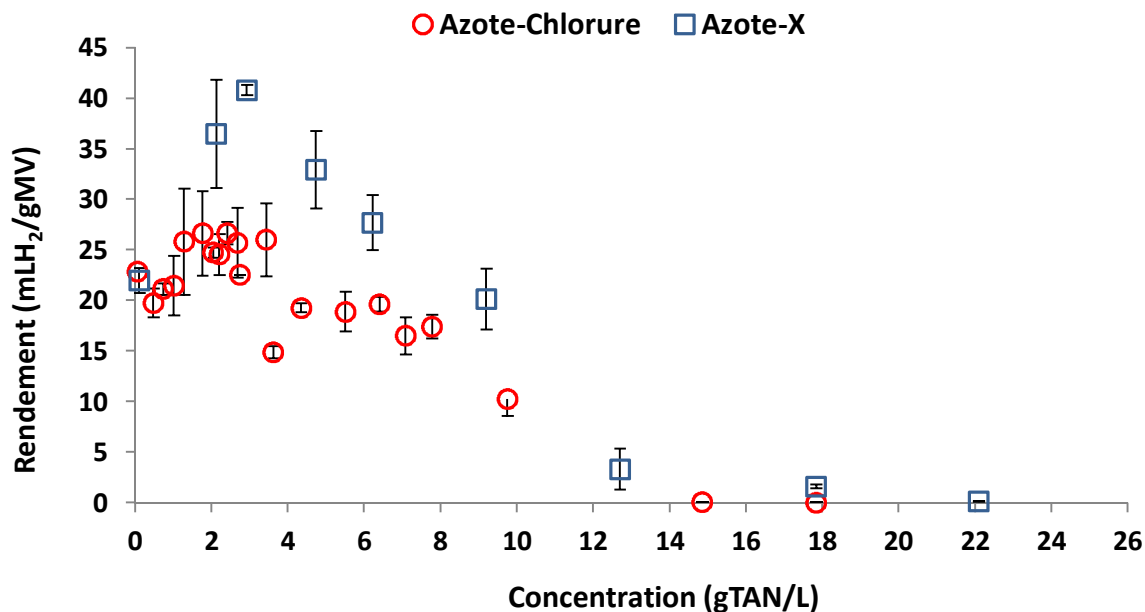


Figure 22 : Impact de l'azote ammoniacal sur le rendement en hydrogène avec la solution Azote-Chlorure et Azote-X

Lorsque le NH_4^+ est ajouté sous différentes formes (solution Azote-X), un effet positif sur la production d'hydrogène est observé entre 0 et 6,2 gTAN/L (7,9 mg NH_3 /L) avec un maximum atteint à 1,6 gTAN/L (41,0 mLH₂/gMV). L'augmentation de la production d'hydrogène suggère que les molécules ajoutées (NH_4Cl , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) étaient probablement absentes ou en quantités insuffisantes dans les déchets ménagers reconstitués vu qu'elles ont potentiellement un effet positif sur les bactéries productrices d'hydrogène à faibles concentrations. Ce phénomène est connu dans le cas du phosphore et de l'azote qui peuvent améliorer la croissance des microorganismes [185]. Cependant, à de plus fortes concentrations en azote ammoniacal, le rendement en hydrogène diminue fortement, jusqu'à une production inférieure à 5 mLH₂/gMV à partir de 12,7 gTAN/L (16,5 mg NH_3 /L). D'après ces résultats, et quelles que soient les solutions utilisées, la tendance est identique à la solution Azote-Chlorure avec une diminution puis une inhibition complète de la production d'hydrogène liée à l'augmentation de la concentration en TAN.

La Figure 23 représente les temps de latence associés à la production en hydrogène suivant les concentrations en TAN pour les expériences Azote-Chlorure et Azote-X. D'après cette Figure, les temps de latence pour les expériences Azote-X suivent la même tendance que pour les expériences Azote-Chlorure. En effet, le temps de latence en hydrogène à de faibles

concentrations en azote ammoniacal (<5 g/L) est en moyenne de $12,2 \pm 3,9$ heures, légèrement plus élevé que le temps observé pour la même plage de valeur lors de l'ajout de NH_4Cl seul ($5,23 \pm 0,52$ heures). Au-delà de cette valeur de TAN, la production d'hydrogène apparaît plus tardivement avec une forte variabilité. Une moyenne de $26,4 \pm 11,4$ heures a ainsi été observée entre une gamme en TAN de 5 et 10 g/L. Au-dessus de 10 gTAN/L, une forte variabilité du temps de latence en hydrogène apparaît avec une valeur moyenne de $47,7 \pm 10,3$ heures.

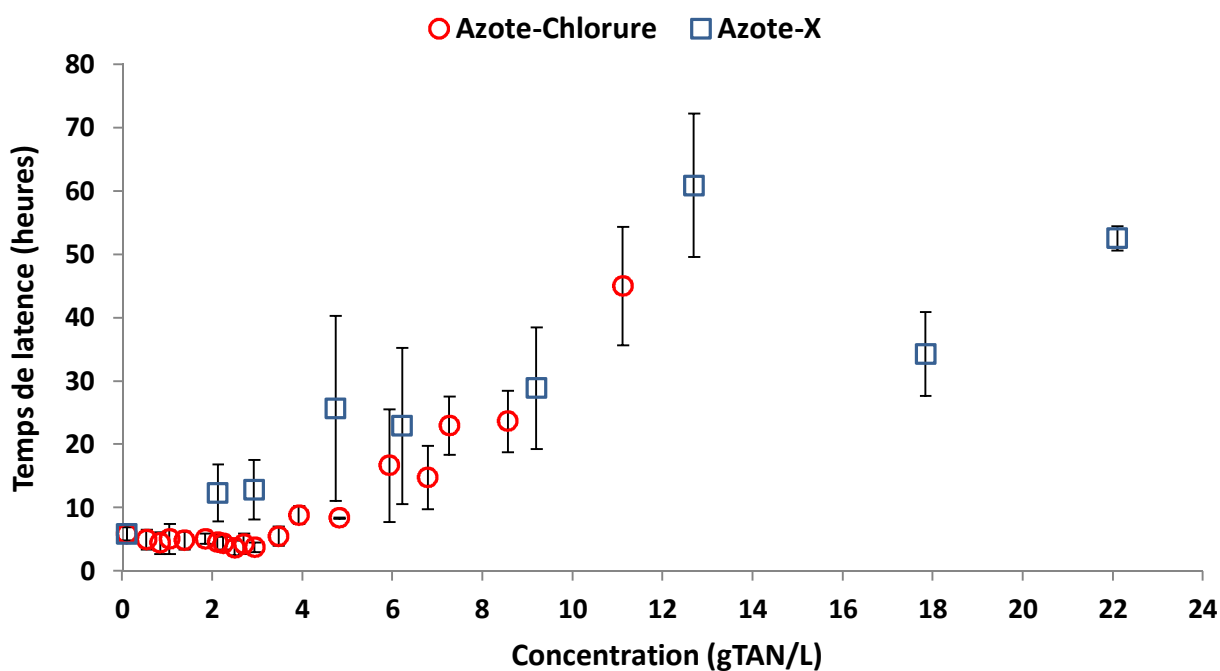


Figure 23 : Temps de latence en hydrogène pour les solutions Azote-Chlorure et Azote-X

D'après l'ensemble de ces résultats, l'utilisation des deux solutions (Azote-Chlorure et Azote-X) a conduit à un effet similaire, avec une diminution du rendement en hydrogène et une augmentation du temps de latence lié à l'augmentation du TAN dans le milieu. Cette observation va dans le sens de la littérature où le caractère inhibiteur de l'azote ammoniacal a déjà été documenté (Tableau 21).

Tableau 21 : Etat de l'art de l'inhibition par l'ammoniac sur la production d'hydrogène

| Gaz | Substrat | Forme | NH ₃ (mg/L) | Effet | Référence |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------|------------------------|------------|-------------|
| H ₂ | FFOM | NH ₃ | 11,0 – 13,9 | Inhibition | Cette étude |
| H ₂ | Glucose | NH ₃ | 0,4 | Inhibition | [126] |
| H ₂ | Glucose | NH ₃ | 0,19 | inhibition | [127] |
| H ₂ | Déchets alimentaires | NH ₃ | 2,60 | Inhibition | [128] |
| H ₂ CH ₄ | Déchets alimentaires | NH ₃ | 530 | Inhibition | [133] |

L'inhibition par l'azote ammoniacal est causée notamment par la forte perméabilité de la forme non ionisée (NH₃) au sein des cellules membranaires des microorganismes [186]. Dans notre cas, une inhibition apparaît lorsque la concentration en ammoniac est de 11,0 et 13,9 mgNH₃/L pour la solution Azote-Chlorure et Azote-X, respectivement. Ces valeurs sont sensiblement plus élevées que la majorité des études où l'inhibition par l'ammoniac a été observée à partir de 0,4 à 2,60 mgNH₃/L. Une telle différence peut provenir de l'adaptabilité des microorganismes à l'azote ammoniacal. En effet, ce phénomène est souvent observé, notamment en réacteur continu. Par exemple, Cavinato et al. (2012) ont observé une tolérance à l'ammoniac jusqu'à près de 530 mgNH₃/L en utilisant des déchets alimentaires comme substrat dans un réacteur continu (TSH : 3,3 jours). L'étude de Salerno et al. (2006) a montré qu'une différence était observée sur le potentiel inhibiteur de l'ammoniac dans un réacteur continu si initialement la communauté microbienne était acclimatée à cette molécule [126]. En effet, une très faible concentration en ammoniac de 0,4 mgNH₃/L (1,6 gTAN/L) engendrait initialement un lessivage de la communauté bactérienne non adaptée causé par un temps de doublement des microorganismes allongés. Cependant si la communauté bactérienne était pré-acclimatée à une certaine concentration en ammonium, même faible (>0.8 gTAN/L), avant de démarrer le réacteur continu, une production d'hydrogène se produisait même en présence d'une forte concentration en ammoniac dans le milieu (0,20 mgNH₃/L soit 7,8 gTAN/L). Dans notre cas, le lixiviat initial possède une concentration importante en ammoniac (410 mgNH₃/L) dans les conditions initiales (pH=8), ce qui aurait pu permettre une meilleure résistance à cette molécule et un effet inhibiteur observé à de plus fortes concentrations que dans la littérature.

Afin de comprendre l'impact du chlorure dans la solution Azote-Chlorure, la même étude a été réalisée en comparant cette expérience avec une solution contenant des composés à base de chlorure. La Figure 24 présente ci-dessous la comparaison du rendement en hydrogène de la solution Azote-Chlorure avec les résultats de la solution Chlorure-X ne contenant pas d'azote ammoniacal mais seulement des composés à base de chlorure (CaCl_2 , KCl , NaCl). D'après cette Figure 4, la tendance inhibitrice de cette solution est statistiquement identique (p -value < 0,05) au phénomène observé avec la solution Azote-Chlorure. En effet, un rendement en hydrogène maximal a été observé à une faible concentration en chlorure ($5,0 \text{ gCl}^-/\text{L}$) avec une valeur de $25,1 \pm 5,6 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$. La production d'hydrogène reste stable entre 0 et $9,1 \text{ gCl}^-/\text{L}$ ($23,9 \pm 1,2 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$). A plus fortes concentrations en chlorure, le rendement en hydrogène diminue jusqu'à une inhibition totale observée à $35,5 \text{ gCl}^-/\text{L}$.

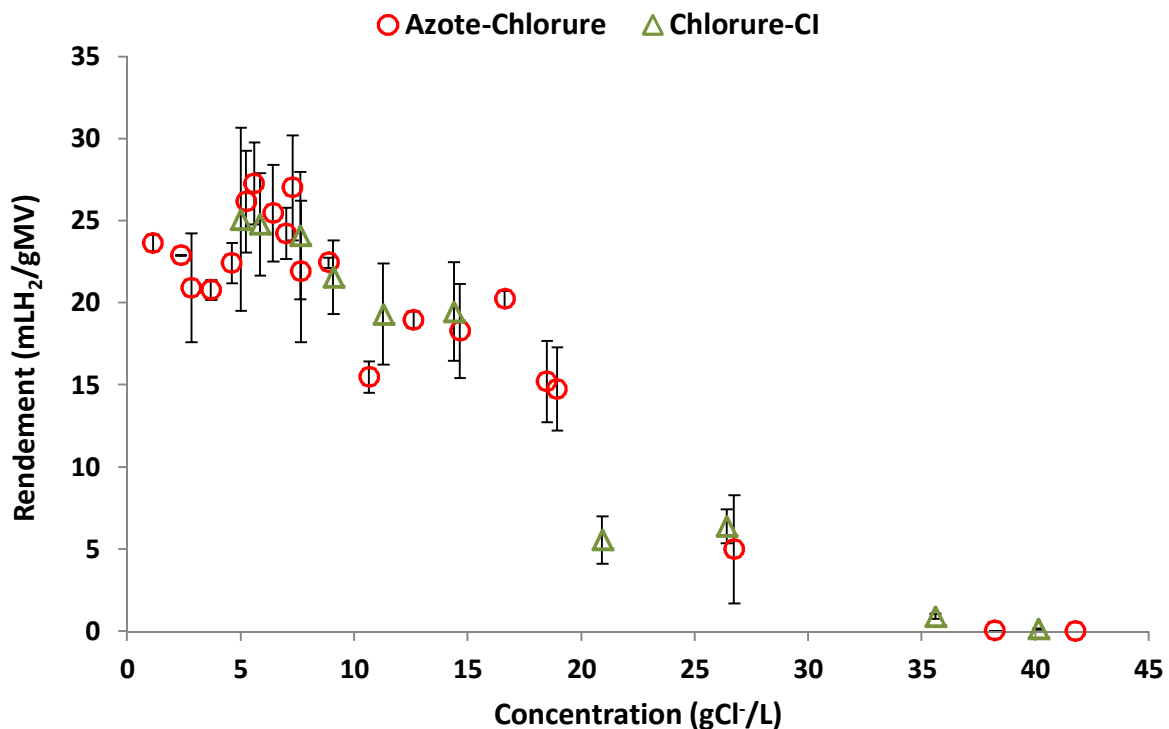


Figure 24 : Impact des composés chlorés sur le rendement en hydrogène avec les solutions Azote-Chlorure et Chlorure-X

La Figure 25 permet de comparer les temps de latence en hydrogène de l'expérience Azote-Chlorure avec ceux de l'expérience Chlorure-X. Le temps d'apparition d'hydrogène est stable sur une gamme en chlorure de 5 à $15 \text{ gCl}^-/\text{L}$ ($10,4 \pm 1,7$ heures). Puis au-delà de cette

concentration en chlorure (>15 g/L), le temps de latence en hydrogène augmente jusqu'à 95,2 heures pour une concentration de 35,6 gCl⁻/L. Lors des expériences menées à des concentrations de 26,4 gCl⁻/L et 35,6 gCl⁻/L, seul un des trois triplicats par condition a produit de l'hydrogène ce qui explique l'absence d'écart-type.

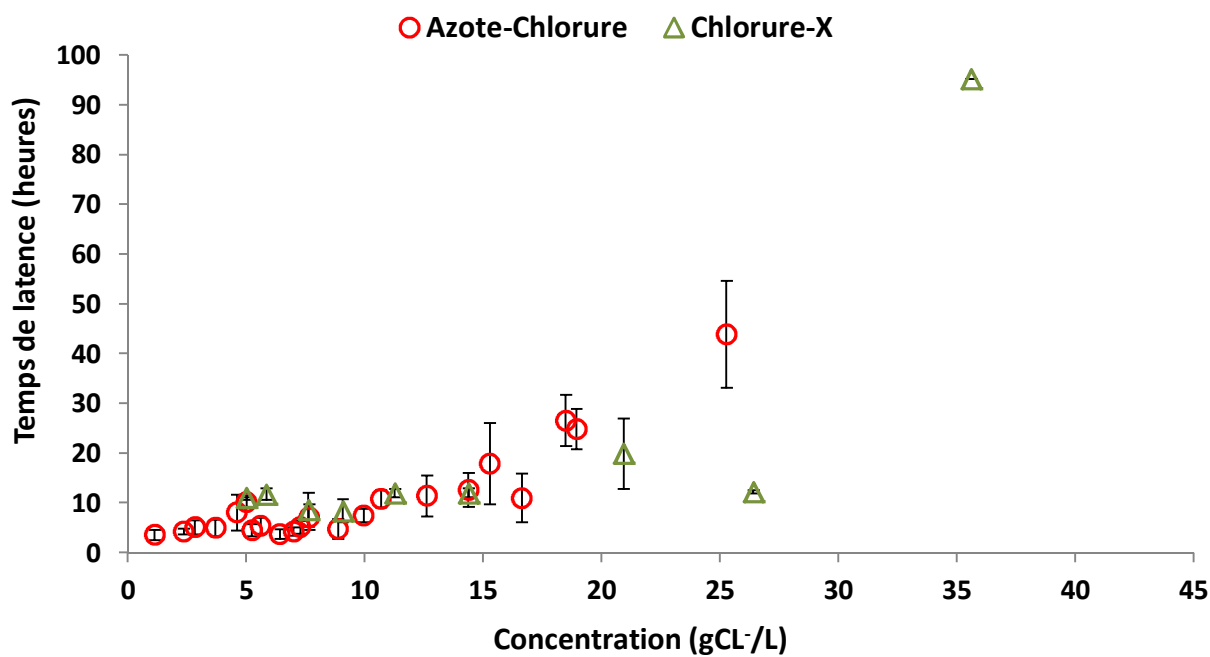


Figure 25 : Impact du temps de latence en hydrogène avec les solutions Azote-Chlorure et Chlorure-X

D'après la littérature, l'inhibition observée peut être expliquée par les ions chlorures qui peuvent avoir un impact négatif sur l'activité microbienne. En effet, l'inhibition en digestion anaérobie dans un milieu salin (NaCl) est classiquement observée pour des concentrations en NaCl inhibitrices qui sont variables en fonction du substrat. Par exemple, l'étude de Lefebvre et al. (2007) a observé une inhibition de la production de méthane à partir d'une concentration en NaCl de 20,0 g/L soit 12,1 gCl⁻/L avec de l'éthanol comme substrat, alors que l'utilisation de vinasse faisait apparaître une inhibition à partir de 1 gNaCl/L seulement [187].

En fermentation, Pierra et al. (2013) ont montré que ce composé n'avait pas d'impact sur la production d'hydrogène qui était même améliorée à de fortes concentrations en NaCl (75 gNaCl/L soit 45,50 gCl⁻/L) avec toutefois un temps de réaction long (20 jours). Cette étude a

notamment mis en évidence la capacité des cultures mixtes à produire du biohydrogène en conditions salines lorsque l'inoculum provenait d'un milieu adapté (milieu marin) [188].

L'inhibition du chlorure reste toutefois peu documentée et contestée en fonction des études. En comparaison avec l'étude de Lefebvre et al. (2007), la concentration inhibitrice en chlorure observée dans notre étude a été de 20 gCl⁻/L, supérieure à celle reportée par Lefebvre et al. (2007) (12 gCl⁻/L). Cela pourrait être expliqué par l'adaptation des microorganismes comme l'indique l'étude de Pierra et al. (2013).

Le Tableau 22 regroupe les performances de production d'hydrogène par rapport au rendement, au temps de latence en hydrogène et à la vitesse maximale de production d'hydrogène pour chaque solution, sur trois gammes de concentrations. Ces trois gammes correspondent aux trois zones distinctes observées lors de l'expérimentation Azote-Chlorure ([0-5], [5-10], >10 gTAN/L) ; elles correspondent aux gammes de concentrations en chlorure de [0-10], [10-20] et >20 gCl⁻/L respectivement.

Tableau 22 : Valeur du rendement, temps de latence en hydrogène et cinétique pour les trois solutions (Azote-Chlorure, Azote-X et Chlorure-X) sur trois gammes de concentrations d'azote ammoniacal ([0-5], [5-10], >10 g/L) et de chlorure ([0-10], [10-20], >20 g/L)

| | TAN (g/L) | [Cl ⁻] (g/L) | Rendement (mLH ₂ /gMV) | Latence H ₂ (heures) | Vitesse maximale H ₂ (mLH ₂ /gMV/h) |
|--------------------|--------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---|
| Azote- Chlorure | 0-5 | 0-10 | 22,9±2,7 | 5,2±0,5 | 3,04±0,71 |
| | 5-10 | 10-20 | 17,2±2,2 | 20,4±6,6 | 1,06±0,50 |
| | >10 | >20 | 1,9±2,8 | 44,9±9,3 | 0,03±0,04 |
| Azote-X | 0-5 | | 35,9±5,4 | 12,2±3,9 | 1,48±0,52 |
| | 5-10 | - | 26,9±2,9 | 26,3±11,4 | 0,69±0,18 |
| | >10 | - | 3,9±4,2 | 47,7±10,3 | 0,06±0,07 |
| Chlorure-X | | 0-10 | 25,4±5,1 | 9,9±2,1 | 1,56±0,81 |
| | - | 10-20 | 17,7±4,1 | 14,1±3,7 | 0,91±0,22 |
| | | >20 | 2,8±2,5 | 28,9±26,5 | 0,11±0,07 |

D'après le Tableau, sur les trois gammes de concentrations sélectionnées, une diminution du rendement en hydrogène de 92% a été observée entre la gamme basse en TAN ([0-5] gTAN/L) et la gamme haute (> 10 gTAN/L) pour l'expérience Azote-Chlorure. Une diminution semblable et significative de près de 89 % du rendement en hydrogène est observé pour l'expérience Azote-X sur les mêmes gammes de concentrations. Cette tendance est

également dentique avec une baisse de 89 % pour l'expérience Chlorure-X entre la gamme basse en chlorure ([0-10] gCl⁻/L) et la gamme haute (> 20 gCl⁻/L).

Le temps de latence en hydrogène est quant à lui plus élevé avec l'augmentation de la concentration en TAN et en Chlorure. L'apparition la plus rapide d'hydrogène a été observé lors de l'étude Azote-Chlorure à de faibles concentrations en TAN (0-5 gTAN/L) et Chlorure (0-10 gCl⁻/L) avec une valeur de 5,2±0,5 heures. Puis une augmentation du temps de latence de 88 % a été observé dans cette même étude entre des concentrations basses en TAN et Chlorure ([0-5] gTAN/L et [0-10] gCl⁻/L) et des concentrations hautes (>10 g/L et >20 g/L respectivement). Cette tendance est également observable pour les deux autres expériences avec une augmentation de 74% et 66% pour Azote-X et Chlorure-X respectivement entre la gamme basse de concentration (0-5 gTAN/L et 0-10 gCl⁻/L) et la gamme haute (>10 gTAN/L et >20 gCl⁻/L).

La vitesse maximale de production d'hydrogène a également subi une forte variation avec l'augmentation des espèces ioniques présentes dans la solution. A de faibles concentrations, la vitesse maximale est comprise entre 3,04±0,71 mLH₂/gMV/h pour la solution Azote-Chlorure et 1,48±0,52 pour la solution Azote-X. Par la suite, une diminution de la vitesse maximale en moyenne de 53±11 % a été observée lors de la phase intermédiaire avec des valeurs de concentration en TAN et chlorure de [5-10] et [10-20] g/L respectivement. Enfin, à de fortes concentrations, et quelle que soit la solution, une vitesse maximale faible a été observée allant de 0,03±0,04 mLH₂/gMV/h pour la solution Azote-Chlorure à 0,11±0,07 mLH₂/gMV/h pour la solution Chlorure-X.

La comparaison entre ces trois études a ainsi permis de mettre en évidence une même tendance d'inhibition pour chaque solution en présence ou non d'azote ammoniacal. Ces résultats laissaient donc supposer qu'une inhibition plus globale liée à la force ionique correspondant à la charge totale ait pu se produire.

C. Impact de la force ionique sur la production d'hydrogène

Pour mettre en avant ce phénomène, la force ionique des solutions Azote-Chlorure, Azote-X et Chlorure-X a été calculée à partir de la concentration des ions présents en solution. Afin de confirmer cet effet, deux autres expériences contenant des solutions ioniques mixtes riches en différents ions (MI et MII) ont été réalisées à plusieurs concentrations. L'utilisation d'une solution avec de nombreux anions et cations (MI et MII) permettait en effet de répartir la charge totale sur plusieurs ions et donc d'éviter d'ajouter un unique ion à de trop fortes concentrations. Par exemple, la concentration maximale en azote ammoniacal testée pour la solution MI et MII était de 2,7 et 3,2 gTAN/L respectivement, en dessous du seuil d'inhibition observé précédemment. Ces deux solutions ont notamment été testées afin d'augmenter le nombre de points permettant ainsi d'avoir une plus large gamme de données, et mieux évaluer l'impact de la force ionique sur le rendement en hydrogène.

La Figure 26 regroupe les résultats obtenus à partir des cinq solutions, et représente le rendement d'hydrogène en fonction de la force ionique sur une gamme de 0 à 3,0 mol/L.

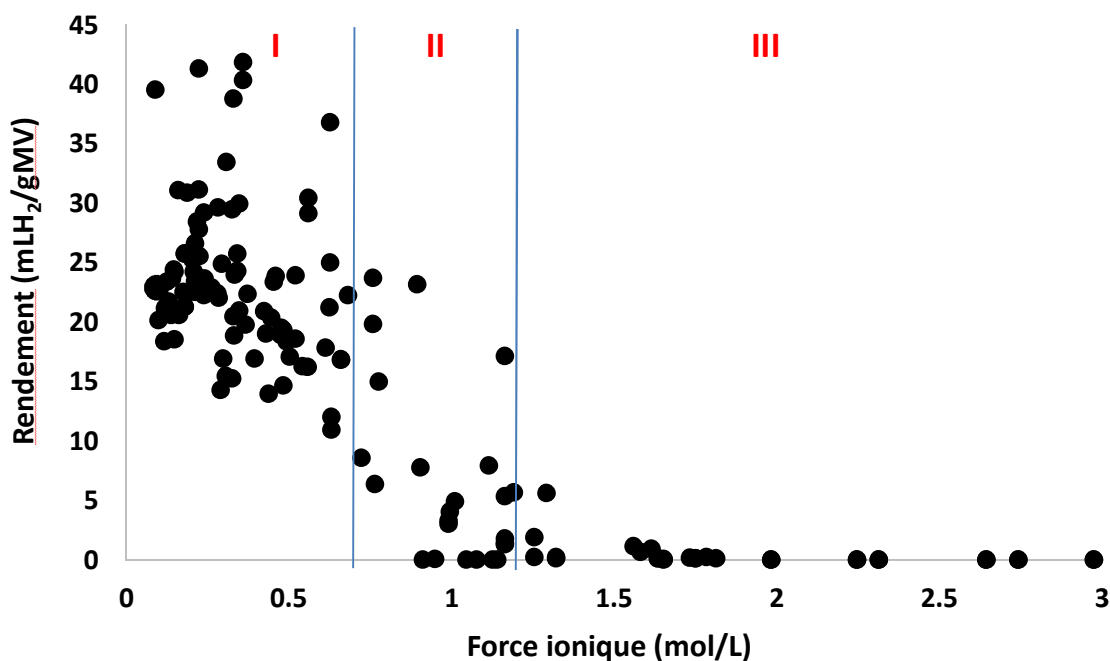


Figure 26 Impact de la force ionique sur le rendement en hydrogène

D'après la Figure 26, une inhibition est observée pour chaque solution dans la même gamme de force ionique. Trois groupes de données statistiquement différents (p -test < 0,0001) se

distinguent sur la base du rendement en hydrogène. Une première zone (I) associée à une production d'hydrogène a été observée entre une force ionique de 0 et 0,7 mol/L. Lors de cette gamme de force ionique, le rendement moyen en hydrogène atteint $23,2 \pm 6,5$ mLH₂/gMV. Cette valeur est statistiquement identique à celle du rendement observé dans le témoin ($22,9 \pm 0,1$ mLH₂/gMV) sans ajout d'ions dans le milieu. Ensuite, une deuxième zone (II) correspond à une période de forte variabilité du rendement en hydrogène où une diminution notable du rendement a été observée ($5,9 \pm 7,3$ mLH₂/gMV). Cette zone correspond à une gamme de force ionique entre 0,7 et 1,2 mol/L. Enfin une troisième zone (III) au-delà de 1,2 mol/L a été observée et est caractérisée par une très faible production d'hydrogène avec une moyenne de $0,5 \pm 1,3$ mLH₂/gMV.

Cette étude met donc bien en évidence une tendance globale liée à la force ionique pour chaque expérience, quels que soient les ions présents dans la solution qui se caractérise par une diminution du rendement en hydrogène au-delà d'une valeur seuil de la force ionique (0,7 mol/L).

L'effet de la force ionique peut être expliqué par un effet sur les membranes cellulaires. En effet, Van Niel et al. (2003) ont montré que l'augmentation de sels, tel que l'acétate de sodium, augmentait la présence de protéines dans la solution directement causée par la destruction des membranes des cellules. Cette destruction pouvait être causée par la saturation en protons dans le milieu qui empêche leur évacuation de la cellule. En effet, les bactéries excrètent des protons par chimiosmose qui est la transformation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase où l'énergie libérée par la dissipation du gradient de concentration des cations (en général un proton H⁺) à travers la membrane est utilisée par la cellule. Cependant, une augmentation de la concentration de cations dans le milieu peut entraîner un fort gradient électrochimique et causer un déséquilibre entre le milieu et la cellule. Par conséquent, les réactions excrétant les protons ne sont alors pas favorisées voire stoppées (ADP, NADH). Jolliffe et al. (1981) ont mis en évidence que l'activité d'autolyse des cellules de *Bacillus subtilis* augmentait lorsque le phénomène de chimiosmose était bloqué par l'ajout de conducteurs de protons [189]. Certaines enzymes appelées autolysines sont alors capables d'hydrolyser le peptidoglycane qui est un constituant de la paroi, conduisant à une lyse bactérienne [190].

2.3.2. Effet de la force ionique sur le métabolisme fermentaire

Les co-produits métaboliques accumulés pour chaque expérience ont été analysés en fin de fermentation (6 jours). La Figure 27 représente les métabolites produits en fonction de la force ionique présente dans le milieu de fermentation. Dans cette figure, des points spécifiques ont été choisis pour analyse afin de couvrir l'ensemble de la gamme de force ionique utilisée pour chaque solution. Le témoin réalisé sans ajout d'ions dans le milieu montre une concentration totale en métabolites de 290 ± 50 mgDCO/gMV, avec comme composés majoritaires l'acétate et le butyrate à des concentrations de 100 ± 10 et 130 ± 10 mgDCO/gMV respectivement (soit 37 et 48% des métabolites produits). L'éthanol et le propionate sont également des produits observés issus de la fermentation sombre avec une concentration de 17 ± 3 et 10 ± 1 mgDCO/gMV, respectivement.

Globalement, d'après cette Figure, l'augmentation de la force ionique dans le milieu de fermentation, et ce quelle que soit la solution utilisée, a entraîné une diminution de la production totale de métabolites.

En effet, pour le test avec ajout d'ions (Azote-Chlorure), la quantité de métabolites produits pour une force ionique de 0,25 mol/L a été observé à 290 ± 50 mgDCO/gMV et reste stable au-dessus de 250 mgDCO/gMV jusqu'à une force ionique de 0,35 mol/L. Puis, l'augmentation de la force ionique jusqu'à 1,02 mol/L va entraîner une diminution des métabolites produits avec une production totale en métabolite observée à 16 ± 5 mgDCO/gMV, soit une diminution de 94% comparé au témoin.

Une tendance identique a été observée avec les solutions Azote-X et MII où une baisse de la production de métabolites s'est produite avec l'augmentation de la force ionique dans le milieu. En effet, pour les deux solutions, lorsqu'une faible force ionique est contenue dans le milieu de fermentation (0,28 et 0,18 mol/L), alors une production de métabolites maximale a été observée avec une valeur de 220 ± 40 et 210 ± 50 mgDCO/gMV pour les solutions Azote-X et MII respectivement. Puis l'augmentation de la force ionique a entraîné une diminution de la production de métabolites jusqu'à atteindre une production totale de 100 ± 30 et 60 ± 10 mgDCO/gMV pour une force ionique de 1,02 et 1,14 mol/L respectivement.

L'analyse des métabolites produits dans la solution Chlorure-X en fonction de la force ionique a montré une tendance identique aux solutions précédemment utilisées avec une concentration totale en métabolites qui passe de 430 ± 70 mgDCO/gMV lorsqu'une force ionique de 0,35 mol/L est appliquée à une concentration de 60 ± 10 mgDCO/gMV pour une force ionique de 1,71 mol/L.

Concernant les autres métabolites comme le valérate et le caproate, ceux-ci sont observés à l'état de traces dans le milieu (10 mgDCO/gMV) et ont également tendance à diminuer avec l'augmentation de la force ionique.

D'après l'ensemble des résultats, l'analyse de la production des sous-produits métaboliques de fermentation montre une tendance identique à celle observée avec la production d'hydrogène qui se caractérise par une diminution du rendement global liée à l'augmentation de la force ionique, quelle que soit la solution ionique utilisée. En ce sens, l'augmentation de la force ionique entraîne une diminution de la production d'acétate et de butyrate qui sont les deux voies privilégiées pour la production d'hydrogène, ceci étant en cohérence avec la diminution du rendement d'hydrogène observée [58]. De plus, quelle que soit la force ionique appliquée, l'acétate et le butyrate restent les métabolites majoritaires observés. L'augmentation de la force ionique ne montre donc pas un changement dans les voies métaboliques utilisées mais plutôt une limitation de l'activité microbienne. En effet, aucune accumulation d'autres métabolites n'a été observée comme, par exemple, l'accumulation de lactate qui pourrait être présent en cas de stress microbien [69]. Ce qui met en évidence, à priori, un effet toxique de la force ionique sur l'activité microbienne pour un même substrat.

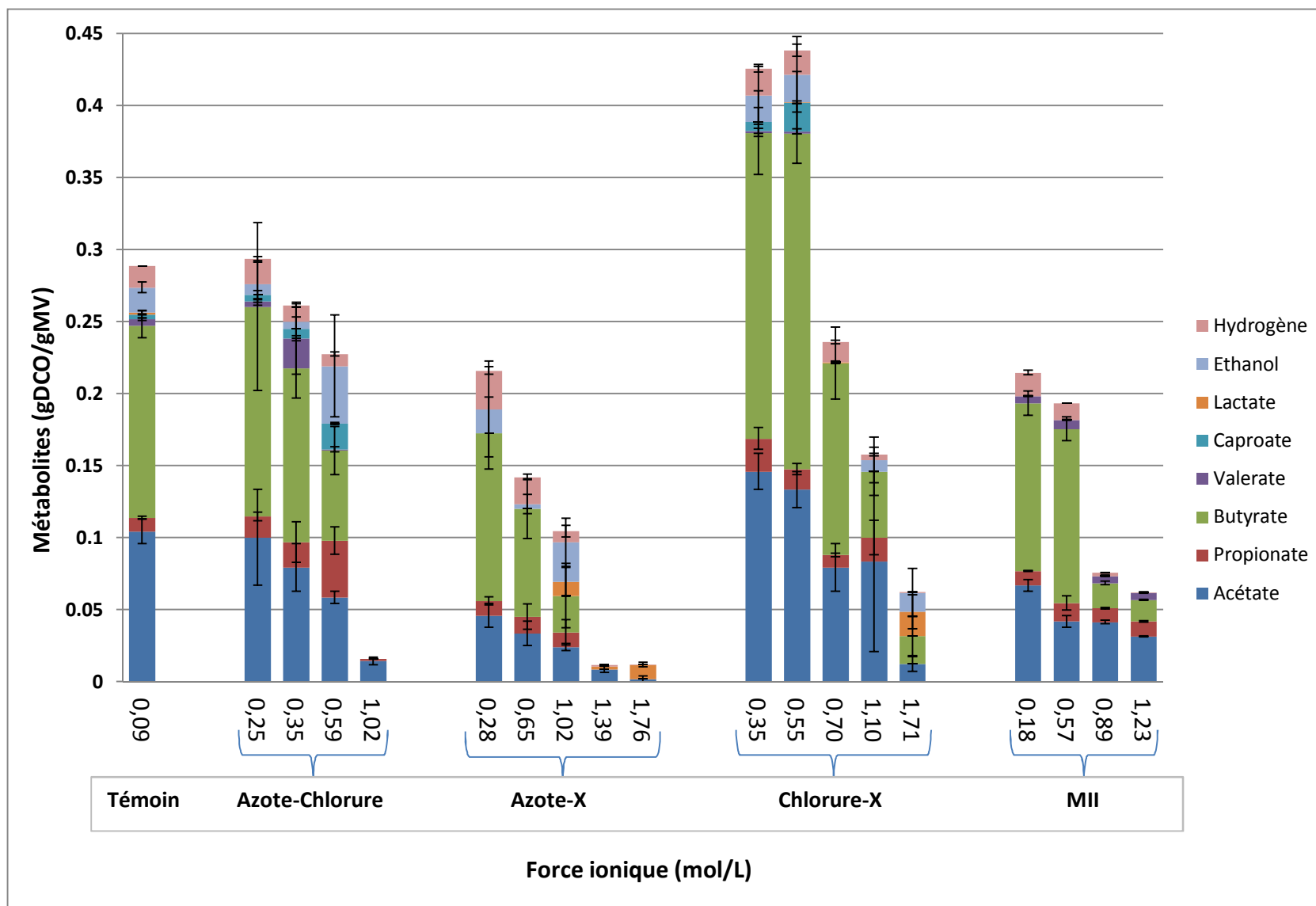


Figure 27 : Analyse des métabolites produits en fonction de la concentration en force ionique dans le milieu de réaction pour le Témoïn et les solutions Azote-Chlorure, Azote-X, Chlorure-X et MII

En utilisant les concentrations en acétate et en butyrate produits pour les points expérimentaux présentés dans la Figure 27, le ratio (Bu/Ac) a été déterminée (Tableau 23). Un ratio théorique représentant la quantité observée sur la quantité théorique en hydrogène a également été calculé. Ce ratio correspond au nombre de moles d'hydrogène produit par rapport à deux fois le nombre de moles d'acétate et de butyrate produits ($H_2/[2x(Bu+Ac)]$). En effet, en se référant aux équations de production d'hydrogène via les voies idéales qui sont la voie acétate et butyrate, la production d'une mole d'acétate ou de butyrate est idéalement associée à la production de deux moles d'hydrogène (Equation 6 et 7). Une valeur égale à 1 indique donc que l'hydrogène a été produit seulement via les voies butyrate et acétate. Si la valeur est inférieure à 1, cela peut signifier qu'une partie de l'hydrogène a été consommé entraînant, par exemple, une production d'acétate (homoacétogénèse), de caproate (Equation 13) ou encore de méthane.

Tableau 23: Ratio Bu/Ac et ($H_2/[2x(Bu+Ac)]$) en fonction des force ionique sur les différentes solutions Azote-Chlorure, Azote-X, Chlorure-X, MII ainsi que le Témoin

| Expériences | Force ionique (mol/L) | Ratio (Bu/Ac) (mol/mol) | $H_2/[2x(Bu + Ac)]$ (mol/mol) |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Témoin | 0,09 | 0,51 | 0,19 |
| | | | |
| Azote-Chlorure | 0,25 | 0,58 | 0,22 |
| | 0,35 | 0,61 | 0,18 |
| | 0,59 | 0,43 | 0,20 |
| | 1,02 | 0 | 0 |
| Azote-X | 0,28 | 1,02 | 0,59 |
| | 0,65 | 0,90 | 0,59 |
| | 1,02 | 0,43 | 0,46 |
| | 1,39 | 0 | 0,26 |
| | 1,76 | 0 | 0,08 |
| Chlorure-X | 0,35 | 0,58 | 0,16 |
| | 0,55 | 0,70 | 0,15 |
| | 0,70 | 0,67 | 0,21 |
| | 1,10 | 0,22 | 0,08 |
| | 1,71 | 0,65 | 0,05 |
| MI | 0,18 | 0,70 | 0,29 |
| | 0,57 | 1,20 | 0,26 |
| | 0,90 | 0,17 | 0,09 |
| | 1,23 | 0,19 | 0,06 |

De manière générale, pour de faibles forces ioniques ($<0,60$ mol/L) associées à la zone stable de production d'hydrogène (zone I), le ratio Bu/Ac est en moyenne de $0,67 \pm 0,17$ quelle que soit la force ionique appliquée. Ceci met en évidence que l'acétate est produit de façon majoritaire par rapport au butyrate. Seule l'expérience Azote-X et MII présentent une expérience dont le ratio est supérieur à 1 pour les forces ioniques de 0,28 et 0,48 respectivement (1,02 et 1,20). De manière globale, les ratios observés lors de cette étude sont proche des valeurs observés dans l'étude de Dong et al. (2009) qui a étudié l'impact individuel des composés caractéristiques de la fraction fermentescible des ordures ménagères avec un ratio Bu/Ac de 0,55, 0,75 et 0,38 pour les substrats riz, patate et salade respectivement. Seules les expériences avec la viande et l'huile ont mis en évidence un ratio Bu/Ac supérieur ou égale à 1 (1,00 et 9,13 respectivement) [55]. Dans notre cas, les ratios Bu/Ac supérieur à 1 pourraient donc provenir d'une dégradation plus importante de la viande qui était présente à hauteur de 7% dans le substrat reconstitué issu du MODECOM de Trifyl. Excepté pour la solution Chlorure-X à une force ionique de 1,71 mol/L, l'augmentation de la force ionique va entraîner une diminution du ratio Bu/Ac jusqu'à une valeur proche de 0 ce qui met en évidence que la production de butyrate semble avoir été plus impactée que la production d'acétate qui est en général présent même à de fortes forces ioniques.

Pour l'ensemble des données, les ratios $H_2/[2x(Bu+Ac)]$ suivent la même tendance et sont inférieurs à 1 ce qui suggère une consommation de l'hydrogène. Une consommation d'hydrogène par homoacétogénèse peut potentiellement s'être produite et expliquerait la forte production en acétate observée. L'augmentation de la force ionique semble faire diminuer ce ratio ce qui montre un déséquilibre accru entre le rendement en hydrogène observé et la production d'acétate et de butyrate.

2.3.3. Evolution des communautés microbiennes suivant la force ionique

Une première analyse des communautés microbiennes par CE-SSCP a été réalisée. Les profils correspondant à la structure de l'inoculum avant fermentation, et des différents échantillons issus de l'expérience Azote-Chlorure, sur plusieurs valeurs de la force ionique sont présentés en Figure 28.

Entre l'inoculum et l'écosystème présent lors des différentes fermentations, la structure de la communauté microbienne évolue significativement en fonction de la valeur de la force ionique. Trois structures de communautés sont alors distinguées : Une structure proche a été observée pour les trois premières expérimentations avec des valeurs de forces ioniques de 0,25, 0,35 et 0,59 mol/L correspondant à la zone I de production d'hydrogène (25,2, 16,9 et 18,5 mLH₂/gMV respectivement). Un deuxième groupe (II) correspondant aux profils à 0,63 et 0,72 mol/L met en évidence une modification de l'écosystème assimilé à la phase de forte perturbation de la production d'hydrogène (5,7 et 2,5 mLH₂/gMV). Enfin le dernier groupe correspond aux profils 0,95, 1,02 et 1,13 mol/L, possède des profils proches, et représente les expérimentations à forte teneur en ions dans le milieu avec une absence de production d'hydrogène (groupe III). En conclusion d'après ces résultats, l'augmentation de la force ionique a entraîné une variation significative de la communauté microbienne en lien avec les performances de production d'hydrogène.

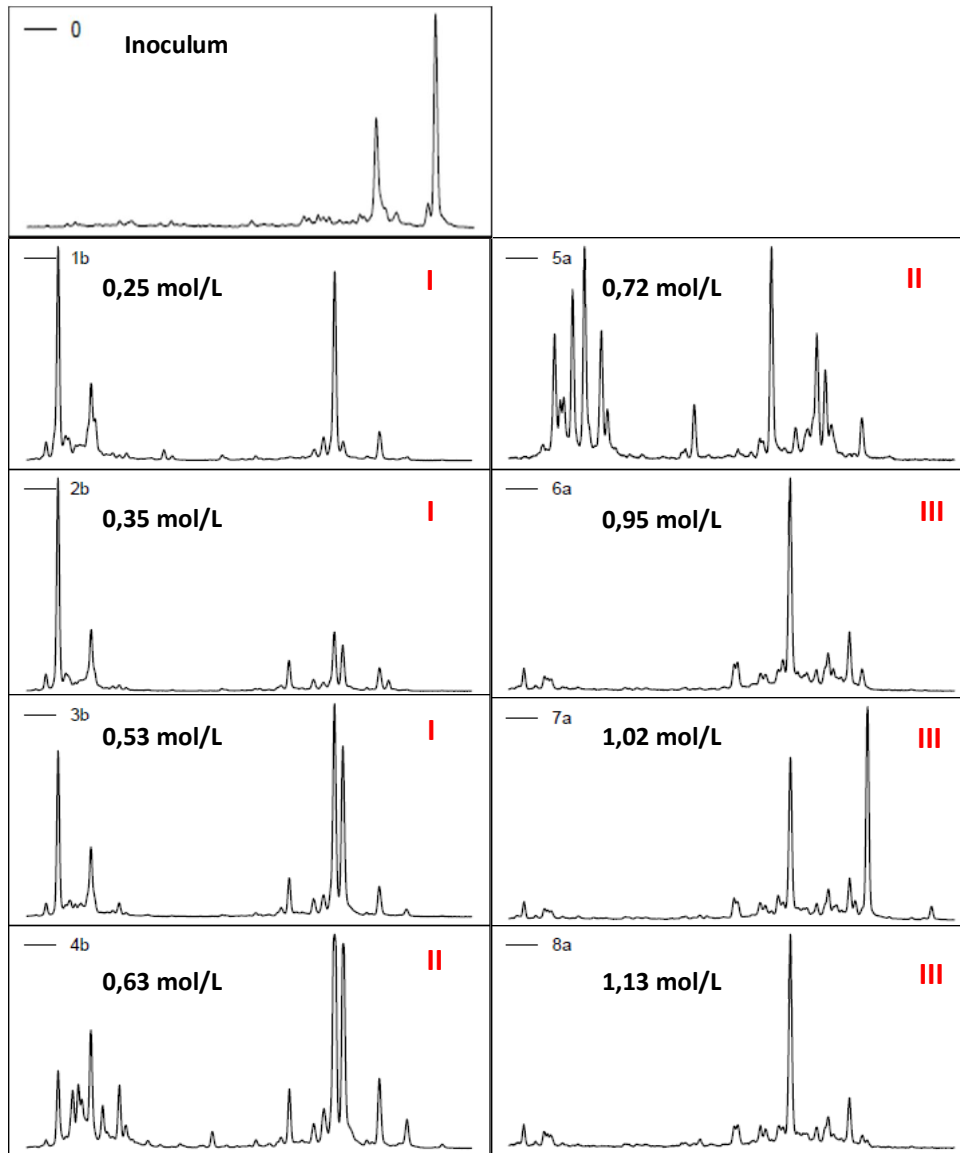


Figure 28 : Evolution de la structure des communautés microbiennes en fonction des différentes concentrations en force ionique présentes dans le milieu avec la solution Azote-Chlorure

Un séquençage a alors été effectué lors de l'expérience Azote-Chlorure sur plusieurs valeurs de la force ionique afin de comparer les microorganismes présents. Des différences dans l'abondance des ordres de populations microbiennes ont ainsi été mises en évidence (Tableau 24).

Tableau 24 : Abondance relative (en %) de la communauté microbienne (familles) présente dans chaque milieu en fonction de la concentration en ions avec la solution Azote-Chlorure

| Famille | Concentration en ions | | | | | | | |
|--------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0,25 mol/L | 0,35 mol/L | 0,53 mol/L | 0,63 mol/L | 0,72 mol/L | 0,95 mol/L | 1,02 mol/L | 1,13 mol/L |
| Clostridiaceae | 40 | 47 | 31 | 13 | 9 | - | - | - |
| Enterococcaceae | 34 | 30 | 53 | 44 | 31 | - | - | - |
| Pseudomonadaceae | 5 | 5 | 4 | 5 | 2 | 31 | 28 | 32 |
| Lachnospiraceae | 1 | 1 | 2 | 8 | 19 | - | - | - |
| Defluviitaleaceae | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| Oceanospirillaceae | - | - | - | - | - | 11 | 3 | 3 |
| Halomonadaceae | - | - | - | - | - | 10 | 9 | 12 |
| Alcaligenaceae | - | - | - | - | - | 5 | 3 | 4 |
| Carnobacteriaceae | - | - | - | - | - | - | 28 | 1 |

Les deux espèces majoritaires à une force ionique de 0,25, 0,35 et 0,53 mol/L sont les *Clostridiaceae* et les *Enterococcaceae*. Dans les milieux possédant les deux plus faibles forces ioniques (0,25 et 0,35 mol/L), les microorganismes de la famille des *Clostridiaceae* sont les plus abondants avec une proportion de 40 et 47% suivi par les *Enterococcaceae* (34 et 30% respectivement). D'après les résultats de la littérature les espèces du genre *Clostridium* appartenant à la famille des *Clostridiaceae* sont généralement retrouvées en proportion majoritaire dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène par voie fermentaire [29,30]. D'après Cabrol et al. (2017) les *Clostridium* sont considérés comme les plus abondants et les plus efficaces pour la production d'hydrogène ce qui est en lien avec la production d'hydrogène élevée observée lors de cette gamme de force ionique ($24,9 \pm 4,4$ mLH₂/gMV) [68]. La famille des *Enterococcaceae*, observée de façons importantes à de faibles forces ioniques, est quant à elle référencée comme étant une famille appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* dont certaines sont capables d'hydrolyser la matière organique complexe [68]. Les bactéries minoritaires correspondant à la famille des *Lachnospiraceae* sont connues comme étant productrices de butyrate ce qui est en lien avec l'accumulation de butyrate observé lors des différentes expériences [191].

L'augmentation de la force ionique (0,53 mol/L) a entraîné une légère modification de l'abondance relative avec comme famille majoritaire les *Enterococcaceae* (53 %) suivis par les *Clostridiaceae* (31%).

La deuxième zone caractérisée par une forte variabilité sur le rendement en hydrogène, représentée par les forces ioniques de 0,63 et 0,72 mol/L. montre une forte diminution des *Clostridiaceae* avec des abondances relatives de seulement 13 et 9 % respectivement. La forte variabilité de la production d'hydrogène est donc fortement corrélée à une modification de la communauté microbienne notamment des *Clostridiaceae* qui montre la faible adaptabilité de ces bactéries à partir d'une force ionique de 0,63 mol/L. Au vue de la faible production d'hydrogène entre 0,63 et 0,72 mol/L, ces résultats suggèrent que les *Clostridiaceae* sont les principales productrices d'hydrogène. Dans ce sens, leurs diminutions vont engendrer une diminution du rendement et causer une forte variabilité dans la production d'hydrogène.

A partir de 0,95 mol/L, une absence de *Clostridiaceae* et d'*Enterococcaceae* a été observée avec comme bactéries majoritaires les *Pseudomonadaceae*. D'après la littérature, les *Pseudomonas* sp. sont connus pour hydrolyser la matière lignocellulosique [192]. De plus cette famille a déjà été observé dans un réacteur de fermentation mais cependant est rapidement lessivé du milieu [193]. De plus, de nouvelles familles apparaissent à de fortes forces ioniques telles que les *Oceanospirillaceae*, les *Halomonadaceae*, les *Alcaligenaceae* et les *Carnobacteriaceae*. Avec une forte abondance de cette dernière (qui sont répertoriées comme bactéries hydrolytiques) lors du test effectué avec une force ionique de 1,02 mol/L [38]. La famille des *Halomonadaceae* a été répertoriée comme se développant dans des milieux salins, dans notre cas, le lixiviat possède initialement une forte concentration en Na^+ ($2,55 \pm 0,60$ g/L) et en Cl^- ($2,73 \pm 0,58$ g/L) ce qui peut favoriser le développement de ce type de bactéries. Cette observation met en avant que la pression osmotique (exprimée via le calcul de la force ionique) pourrait être le facteur d'inhibition de la communauté microbienne fermentaire.

D'après ces résultats la charge ionique dans la solution entraîne donc une modification significative de la communauté microbienne présente dans le milieu de réaction avec une absence des familles *Clostridiaceae* et d'*Enterococcaceae* à de fortes forces ioniques et confirme de l'effet toxique de la pression osmotique notamment sur les bactéries productrices d'hydrogène.

2.3.4. Suivi de la fermentation sombre par mesure de la conductivité

D'après les résultats précédents, l'augmentation de la force ionique, quels que soient les ions en solution, entraîne systématiquement une baisse du rendement en hydrogène, de la production de métabolites et un shift de la communauté microbienne. De plus, une zone de déséquilibre (groupe II) montre qu'à partir d'une certaine valeur (entre 0,59 et 1,08 mol/L), le rendement en hydrogène diminue fortement. La force ionique qui est le phénomène créant cette variabilité peut être calculée suivant la concentration des ions dans le milieu. En effet, la force ionique peut-être exprimée d'après l'équation 19:

$$I = \frac{1}{2} \times \sum C_i Z_i^2 \quad \text{(Equation 19)}$$

Avec I la force ionique exprimée en mol.l⁻¹, Z_i la charge de l'ion et C_i la concentration de l'ion (mol.l⁻¹).

Il s'agit d'une mesure indirecte de l'activité des ions en solution aqueuse, qui nécessite de connaître la concentration de chaque ion présent dans la solution. Lors des différentes expérimentations réalisées et présentées ci-dessus, la force ionique a été estimée via les concentrations mesurées des ions contenus dans chaque réacteur.

Cependant, une voie plus directe d'estimation de la présence d'ions en solution consiste à mesurer la conductivité. La conductivité est la capacité d'une solution, d'un métal ou d'un gaz à faire passer un courant électrique. Dans une solution, ce sont les anions et les cations qui transportent le courant. Cette mesure peut être définie par l'équation 20 :

$$\sigma = \sum_i z_i \cdot \gamma_i \cdot C_i \quad \text{(Equation 20)}$$

Avec σ la conductivité exprimée en mS/cm, Z_i la charge de l'ion et C_i la concentration de l'ion (mol.l⁻¹) et γ_i la conductivité molaire ionique (mS.cm⁻¹.l.mol⁻¹).

L'avantage de cette donnée est qu'elle peut être déterminée expérimentalement, la conductivité est une grandeur facilement accessible, car elle peut être mesurée grâce à un conductimètre facile d'utilisation. En effet, il n'y a pas besoin de connaître précisément la concentration de chaque ion comme le nécessite le calcul de la force ionique.

Lors de chaque expérimentation réalisée précédemment, la mesure de la conductivité a ainsi été réalisée et est présentée dans le paragraphe ci-dessous.

2.3.5. Etude du seuil critique de la conductivité

La Figure 29 représente le rendement en hydrogène (axe à gauche) et le pourcentage de baisse par rapport au témoin (axe à droite) en fonction de la conductivité mesurée dans chaque solution. Afin d'améliorer la visibilité sur la figure, les valeurs ont été regroupées par groupes de trois possédant des conductivités semblables.

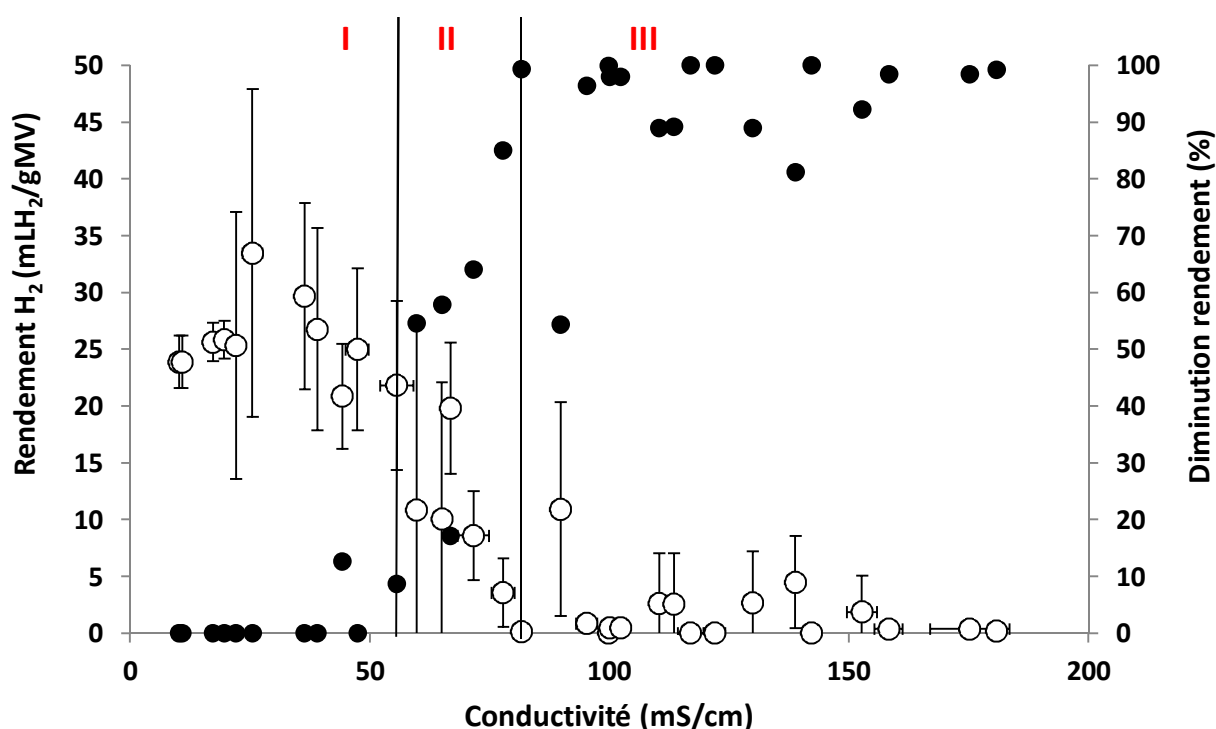


Figure 29 : Etude du seuil critique sur le rendement en hydrogène en fonction de la conductivité

D'après les résultats, entre une conductivité de 10,2 et 55,6 mS/cm, un plateau est observé sur le rendement en hydrogène. Puis au-delà de ce seuil, la production d'hydrogène diminue de 50% par rapport au rendement observé lors du témoin. Cette baisse de rendements de 50% correspond à la zone possédant une forte variabilité (groupe II) comme observé précédemment. En effet, après 55,6 mS/cm, on constate une forte variabilité de la production d'hydrogène avec une faible reproductibilité entre chaque expérience pour une même conductivité. D'après cette figure, un seuil critique a donc été fixé arbitrairement lorsqu'une baisse du rendement de plus de 50% a été observée c'est-à-dire au-dessus de 55,6 mS/cm.

Une analyse des variances ANOVA (p -valeur $< 0,05$) a été effectuée sur trois groupes de conductivité [10 – 55,6], [55,6 – 82,60] et [82,60 – 181,4] mS/cm et est présentée dans le Tableau 25. Un rendement en hydrogène entre une conductivité de 10 et 55,6 mS/cm correspond à un rendement maximal avec une valeur moyenne de $25,7 \pm 2,4$ mLH₂/gMV. Par la suite, une valeur de la conductivité plus élevée entrainera une forte baisse du rendement en hydrogène ($7,6 \pm 6,9$ mLH₂/gMV) avec une forte variabilité (déviation standard : 8,56). Enfin un derniers groupe (groupe III) correspondant à une faible production d’hydrogène a été observée ($1,8 \pm 2,6$ mLH₂/gMV). Ces résultats confirment donc que les conclusions restent identiques en utilisant la mesure de la conductivité et la force ionique. Ceci met donc en avant la possibilité d’utiliser la conductivité pour s’assurer de rester sous le seuil critique d’inhibition.

Tableau 25: Etude statistique de différentes phases observées sur le rendement en hydrogène

| Groupe statistique (mS/cm) | Volume d’hydrogène moyen (mLH ₂ /gMV) | Déviation standard (mLH ₂ /gMV) |
|----------------------------|--|--|
| [10 - 55,6] | $25,7 \pm 2,4$ | 6,94 |
| [55,6 – 82,60] | $7,6 \pm 6,9$ | 8,56 |
| [82,60 – 181,4] | $1,8 \pm 2,6$ | 3,91 |

2.4. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en avant le caractère inhibiteur de la force ionique sur l’activité microbienne en culture mixte lors de la fermentation sombre de déchets ménagers reconstitués. En effet, l’ajout d’une forte concentration en ions a entraîné une instabilité de la production d’hydrogène. Globalement, l’accumulation d’ions dans le milieu, quelle que soit la nature des ions, a entraîné systématiquement une inhibition de la production d’hydrogène et de métabolites, en lien de la diminution de l’abondance relative des microorganismes de la famille des *Clostridiaceae* et des *Enterococcaceae*.

Néanmoins, l’ajout d’azote ammoniacal peut être potentiellement bénéfique à de faibles concentrations [0 – 3,5/6,2] gTAN/L pour le rendement en hydrogène, ce qui est positif dans notre cas sachant qu’une concentration de $4,02 \pm 0,79$ gTAN/L dans le lixiviat initial est en moyenne observée.

En pratique, la charge totale des ions présents en solution peut être estimée par le calcul de la force ionique quand l'ensemble des concentrations en ions sont connues, ce qui nécessite une analyse fine au préalable. Ainsi, comme présenté sur la Figure 29, la conductivité constitue une bonne alternative bien plus facile à mettre en place au niveau industriel. Ce travail a permis de déterminer un seuil critique à 55,6 mS/Cm au-delà duquel une diminution minimale du rendement d'hydrogène de 50 % est observée. La mesure de conductivité électrique d'un milieu de fermentation serait par conséquent un moyen simple et efficace pour réaliser un suivi du réacteur, qui pourrait permettre d'anticiper une réduction potentielle du rendement en hydrogène liée à une inhibition par accumulation d'ions.

3. Evaluation des conditions optimales pour la fermentation sombre

3.1. Introduction

En fermentation sombre, une large gamme de conditions opératoires a déjà été rapportée comme étant favorable à la production d'hydrogène pour le pH, la température et le taux de matières sèches.

Tout d'abord, la gamme de pH utilisée est très étendue, allant de 4,5 à 8 [93,94]. Cette gamme large de pH peut notamment être expliquée par la grande variété de substrats et d'inocula utilisés dans les différents travaux [95]. En effet, pour des sucres simples comme le glucose, Lie et al. (2008) ont rapporté un rendement optimal en hydrogène à un pH de 6 (1,83 molH₂/mol) [96]. Dans un réacteur continu alimenté avec du glucose, Fang et Liu (2002) ont également trouvé un pH optimal de 5,5 avec un temps de séjour hydraulique de 6 heures [97]. Avec un substrat complexe comme des déchets alimentaires (lactosérum de fromage), De Gioannis et al. (2014) ont montré que le pH optimal se situait entre 6,5 et 7,5 (171,3 NmLH₂/g_{TOC}) en réacteur batch avec une régulation continue du pH [98].

Autre paramètre d'importance, la température, qui varie dans les différentes études. Néanmoins trois gammes de températures sont principalement décrites pour la fermentation sombre : les températures mésophiles (autour de 35°C), thermophiles (env. 55°C) et hyperthermophiles (> 65°C) [95]. Ces gammes de températures correspondent aux températures optimales de fonctionnement et de croissance des micro-organismes.

Enfin, la siccité (taux de matières sèches) est un paramètre pouvant impacter la production d'hydrogène et a été très étudiée notamment au niveau industriel sur les réacteurs de méthanisation. Les réacteurs sont de type soit voie liquide (siccité < 10%) soit voie solide (>20 %) avec un intermédiaire appelé semi-solide (siccité : 10-20 %) [194]. En fermentation sombre, de récentes études se sont intéressées à ce paramètre avec des gammes allant notamment jusqu'à 35 %, bien que globalement des taux de matières sèches faibles restent plus favorables à la production d'hydrogène [2,40].

Les gammes très étendues de ces trois paramètres dans la littérature mettent en évidence que la production d'hydrogène peut être réalisée sur une large plage de conditions opératoires. Cependant, le point optimal de production d'hydrogène dépend du type de substrat et de la communauté microbienne utilisée. Dans le cas d'une culture mixte issue d'environnements naturels (boue d'épuration, lixiviat) et d'un substrat complexe tels que les déchets ménagers, les conditions opératoires à fixer sont généralement spécifiques à chaque cas d'étude car le milieu initial peut fortement varier. Par exemple, l'étude de Danko et al. (2008) a consisté à étudier la production d'hydrogène et d'AGVs à partir de deux inocula (boues granulaires et boues en suspension) en faisant varier la température (37, 60 et 70°C) dans des réacteurs batchs avec un pH initial non régulé de 6,5. Ce travail a montré que l'augmentation de la température impactait différemment la fermentation sombre en fonction du type d'inoculum : pour les boues granulaires, une augmentation de température jusqu'à 60°C était plutôt favorable à la production d'hydrogène alors que la boue en suspension était sévèrement affectée par l'augmentation de la température avec une forte diminution de la production d'hydrogène et d'AGVs [108].

Afin de connaître de façon précise les valeurs de ces différents paramètres pour obtenir une optimisation du réacteur de fermentation sombre, il est donc important de réaliser une étude propre aux ressources disponibles. Par conséquent, et dans l'optique de réaliser un réacteur de fermentation sombre à l'échelle industrielle avec les ressources de Trifyl (FFOM et lixiviat), il était nécessaire de connaître avec précision la gamme des conditions opératoires propices à la production d'hydrogène. Pour certains paramètres tels que la température ou la siccité, cette étude a été réalisée afin de connaître avec précision la valeur initiale à fixer pour une production maximale d'hydrogène. De plus, la siccité est un paramètre important au niveau industriel car elle modifie le dimensionnement du réacteur via la quantité d'eau à ajouter [194]. Pour le pH, la valeur est dépendante du milieu et des métabolites produits, une régulation étant peu envisageable pour des FFOM. En effet, dans notre cas, le pH doit idéalement ne pas être régulé afin de réduire les coûts du procédé de fermentation. Enfin, et d'après l'étude précédente « *Etude de l'effet inhibiteur du TAN et de la force ionique* » (Chapitre III.1), l'azote ammoniacal peut être un paramètre permettant soit une amélioration du rendement en hydrogène à de faibles concentrations (<5 gTAN/L)

soit une inhibition, il était donc important de le prendre en compte comme paramètre à optimiser.

Cette partie a donc pour objectif d'estimer les conditions idéales pour un rendement en hydrogène optimal suivant les paramètres pouvant impacter la fermentation sombre à savoir le pH, la température, la siccité et l'azote ammoniacal. De plus, le but de la thèse étant de coupler un réacteur de fermentation à un réacteur de méthanisation, la forte production de métabolites et notamment d'AGVs dans le réacteur de fermentation est également une donnée à prendre en compte. En effet, dans un procédé à deux étapes, la fermentation sombre peut permettre une première hydrolyse des composés en AGVs, ce qui peut entraîner des cinétiques de production de méthane plus rapides dans le second réacteur de méthanisation, et donc réduire son temps de séjour.

Dans l'optique de répondre à cet objectif, un plan d'expérience a été réalisé. Lors de ce plan d'expérience, les variables étudiées ont été la siccité, le pH, la concentration en azote ammoniacal et la température.

3.2. Déroulement de l'étude

Toutes les expériences ont été réalisées dans des réacteurs batchs de volume utile de 500 mL. Dans chaque réacteur, des FFOMs et du lixiviat préalablement traité par stripping ont été ajoutés. Un plan d'expérience à 4 facteurs a été réalisé. Les quatre facteurs étudiés ont été le pH, la siccité, la concentration en azote ammoniacal et la température. Trois niveaux ont été utilisés (-1, 0, 1) pour les facteurs pH, siccité et concentration en azote ammoniacal, alors que seulement deux niveaux ont été utilisés (-1, 1) pour la température pour les raisons expliquées ci-dessus (Tableau 26).

Tableau 26 : Niveau fixé pour chaque facteur

| Niveau | -1 | 0 | +1 |
|-------------|------|------|------|
| Siccité (%) | 3 | 11,5 | 20 |
| pH | 5 | 6,5 | 8 |
| TAN (g/l) | 1 | 3 | 5 |
| Température | 37°C | - | 55°C |

Au total, ce plan d'expérience est composé de 26 expériences dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 27. Chaque condition expérimentale a été réalisée en duplicata.

Tableau 27 : Caractéristique de chaque test suivant le plan d'expérience fixé

| N°exp | Siccité | [NH ₄ ⁺] (g/l) | pH | Température |
|-------|---------|---------------------------------------|---------|-------------|
| 1 | 11,5 | 1 | 5 | 37°C |
| 2 | 20 | 3 | 5 | |
| 3 | 11,5 | 5 | 5 | |
| 4 | 3 | 3 | 5 | |
| 5 | 3 | 1 | 6,5 | |
| 6 | 20 | 1 | 6,5 | |
| 7 | 20 | 5 | 6,5 | |
| 8 | 3 | 5 | 6,5 | |
| 9 | 11,5 | 1 | 8 | |
| 10 | 20 | 3 | 8 | |
| 11 | 11,5 | 5 | 8 | |
| 12 | 3 | 3 | 8 | |
| 13 | 11,5 | 3 | 6,5 | |
| 14-26 | «... » | «... » | « ... » | 55°C |

Une analyse des AGVs et une analyse microbiologique ont été réalisées à la fin des expérimentations et la production d'hydrogène a été mesurée par micro-GC multiplexée toutes les 4 heures.

Les bornes du plan d'expérience ont été choisies de la manière suivante :

- Siccité : lors de l'étude précédente « *Etude de l'effet inhibiteur du TAN et de la force ionique* », une siccité de 3% avait été utilisée. Cette valeur provenait d'études réalisées précédemment au cours de travaux antérieurs au doctorat. Cependant, d'un point de vue industriel, une siccité élevée est plus favorable pour minimiser l'apport en eau dans le milieu et se rapprocher des conditions imposées dans les

méthaniseurs à la suite de la fermentation. C'est dans cette optique que le niveau haut de la siccité a été choisi de 20%. De plus, une étude préalable (voir Annexe I) a montré qu'au-dessus de 20 % de siccité, la production d'hydrogène pouvait être négligeable.

- pH : selon les études bibliographiques, le pH optimal pour la production d'hydrogène se situe entre 5 et 8. Afin de s'assurer de trouver le point optimal de la production d'hydrogène, un point central a été fixé à un pH_{initial} de 6,5. Le niveau haut ($pH_{\text{initial}} = 8$) correspond à la valeur moyenne du pH du lixiviat initial. Dans l'optique de ne pas réguler le pH du lixiviat, il est donc important de l'inclure dans les conditions. Le niveau bas du pH a été fixé à 5, car d'après la littérature, le phénomène de solvantogénèse se produit en dessous de cette valeur où une absence de production d'hydrogène est généralement observée. Durant ces expérimentations, il est important de préciser que le pH n'a été ni tamponné ni régulé et donc, le pH fixé est le pH initial du lixiviat.
- Azote ammoniacal : concernant la concentration en azote ammoniacal, d'après l'étude précédente (voir Chapitre III, section 2.3.1.), une augmentation du rendement en hydrogène a été observée pour des valeurs en TAN comprises entre 1 et 5 g/L, qui correspondent aux bornes du domaine (concentration de 3 g/L au point central).
- Température : les températures réalisables à l'échelle industrielle pour un procédé de production de biohydrogène sont essentiellement soit mésophiles soit thermophiles. La température hyperthermophile n'a pas été retenue, car elle est largement plus difficile à mettre en place au niveau industriel du fait des difficultés techniques qu'elle peut engendrer et de la forte instabilité des réacteurs de fermentation à cette température.

3.3. Résultats du plan d'expérience

3.3.1. Effet sur le rendement en hydrogène

Les Tableau 28 représentent les valeurs du rendement, du temps de latence ainsi que de la cinétique maximale de production en hydrogène obtenue pour chaque expérience opérée à la température de 37°C et 55°C (modélisation de Gompertz).

Chapitre III : Optimisation de la fermentation sombre

Tableau 28 : Résultats de la production d'hydrogène en termes de rendement, de temps de latence et de cinétique ainsi que la conductivité de milieu pour les expériences du plan d'expérience effectuées à 37°C et 55°C

| Exp | | | | 37°C | | | | 55°C | | | |
|-----|-------------|-----------|-----|--|--|---|----------------------|--|--|---|----------------------|
| | Siccité (%) | TAN (g/L) | pH | Rendement H ₂ (mLH ₂ /gMV) | Temps de latence H ₂ (heures) | Vitesse maximale H ₂ (mLH ₂ /gMV/h) | Conductivité (mS/cm) | Rendement H ₂ (mLH ₂ /gMV) | Temps de latence H ₂ (heures) | Vitesse maximale H ₂ (mLH ₂ /gMV/h) | Conductivité (mS/cm) |
| 1 | 11,5 | 1 | 5 | 36,1±1,6 | 13,3±0,1 | 2,5±0,1 | 13,0 | 39,3±2,9 | 6,4±1,7 | 1,1±0,3 | 13,2 |
| 2 | 20 | 3 | 5 | 20,0±0,4 | 16,6±2,2 | 0,8±0,4 | 24,6 | 20,7±3,8 | 8,8±0,8 | 0,9±0,2 | 24,5 |
| 3 | 11,5 | 5 | 5 | 32,0±6,9 | 15,7±1,9 | 1,7±0,8 | 37,2 | 42,3±0,5 | 16,5±1,8 | 2,1±0,2 | 37,9 |
| 4 | 3 | 3 | 5 | 25,2±0,7 | 15,5±0,4 | 1,4±0,2 | 31,3 | 22,0±1,4 | 15,0±3,5 | 0,9±0,2 | 24,7 |
| 5 | 3 | 1 | 6,5 | 19,9±0,1 | 14,3±1,2 | 2,2±1,4 | 12,7 | 15,7±0,7 | 7,3±0,3 | 1,6±0,4 | 13,0 |
| 6 | 20 | 1 | 6,5 | 22,8±0,3 | 17,0±0,6 | 2,0±0,4 | 12,9 | 27,5±0,8 | 6,3±0,1 | 0,7±0,1 | 20,0 |
| 7 | 20 | 5 | 6,5 | 25,9±2,9 | 16,8±0,4 | 1,4±0,3 | 37,5 | 29,2±2,9 | 9,9±2,4 | 0,7±0,1 | 37,4 |
| 8 | 3 | 5 | 6,5 | 25,2±1,8 | 14,7±0,3 | 1,8±0,2 | 37,3 | 26,2±1,3 | 6,9±3,8 | 1,6±0,2 | 37,4 |
| 9 | 11,5 | 1 | 8 | 36,4±4,8 | 14,0±0,4 | 3,0±0,1 | 12,4 | 33,4±9,3 | 5,9±3,4 | 1,2±0,8 | 12,7 |
| 10 | 20 | 3 | 8 | 23,5±3,3 | 11,9±1,7 | 1,0±0,5 | 24,1 | 27,3±0,5 | 6,9±1,0 | 0,8±0,1 | 24,2 |
| 11 | 11,5 | 5 | 8 | 28,3±6,2 | 15,4±0,4 | 1,6±1,3 | 43,2 | 36,4±1,7 | 10,1±0,2 | 1,1±0,1 | 37,2 |
| 12 | 3 | 3 | 8 | 19,5±6,0 | 11,8±4,7 | 1,4±1,3 | 24,0 | 27,5±2,4 | 4,9±0,3 | 1,8±0,1 | 24,3 |
| 13 | 11,5 | 3 | 6,5 | 35,0±2,7 | 13,2±0,2 | 2,0±0,1 | 24,2 | 36,6±3,0 | 5,9±0,1 | 0,9±0,1 | 24,4 |

- Lors de l'étude effectuée à la température de 37°C, le rendement en hydrogène fluctuait entre $19,5 \pm 6,0$ mLH₂/gMV (expérience 12 ; siccité : 3 %, TAN : 3 g/L, pH : 8) et $36,4 \pm 4,8$ mLH₂/gMV (expérience 9 ; siccité : 11,5%, TAN : 1 g/L, pH : 8).

Le temps de latence en hydrogène était compris entre $11,8 \pm 4,7$ heures (expérience 12) et $17,0 \pm 0,6$ heures (expérience 6 ; siccité : 20%, TAN : 1 g/L, pH : 6,5). La vitesse maximale de production d'hydrogène correspond à des valeurs comprises entre $0,8 \pm 0,4$ mLH₂/gMV/h (siccité : 20%, TAN : 3 g/L et pH 5) et $3,0 \pm 0,1$ mLH₂/gMV/h (expérience 9).

Lors des différentes expériences opérées à cette température, la conductivité mesurée était toujours inférieure au seuil critique observé dans l'étude précédente (<55,6 mS/cm). La conductivité était fortement corrélée à la quantité d'azote ammoniacal ajoutée avec une moyenne de $12,8 \pm 0,2$ mS/cm pour un TAN de 1 g/L, $25,6 \pm 2,3$ mS/cm pour un TAN de 3,0 g/L et enfin $38,8 \pm 2,2$ mS/cm pour 5,0 gTAN/L.

- Lors des expériences effectuées à une température de 55°C, une plus large gamme de rendement en hydrogène a été observé avec un rendement minimal de $15,7 \pm 0,7$ mLH₂/gMV (expérience 5 ; Siccité : 3%, TAN : 1 g/L et pH : 6,5) et un rendement maximale de $42,3 \pm 0,5$ mLH₂/gMV (Siccité : 11,5 %, TAN : 5 g/L et pH : 5).

Le temps de latence était globalement plus court à 55°C par rapport à 37°C, et compris entre $4,9 \pm 0,3$ heures (Siccité : 3%, TAN : 3 g/L et pH : 8) et $16,5 \pm 1,8$ heures (siccité : 11,5 %, TAN : 5 g/L et pH : 5).

Concernant les cinétiques maximales de production d'hydrogène à 55°C, celles-ci étaient également plus faibles que celles à 37°C et comprises entre $0,7 \pm 0,1$ mLH₂/gMV/h (expérience 6 et 7) et $2,1 \pm 0,2$ mLH₂/gMV/h (expérience 3).

La conductivité a suivi la même logique que lors de l'expérience à 37°C avec $14,7 \pm 2,6$ mS/cm pour un TAN de 1 g/L, $24,4 \pm 0,1$ mS/cm pour un TAN de 3 g/L et $37,5 \pm 0,2$ mS/cm pour un TAN de 5 g/L.

Le pH final également mesuré pour les températures de 37 et 55 °C sont présentés dans le Tableau 29. D’après les résultats obtenus, sans ajout de tampon ou de régulation du pH, et quels que soit le pH initial ou la température, le pH final était relativement proche, avec une moyenne de 5,3±0,1 et 5,6±0,2 pour la température de 37 et 55°C respectivement.

Tableau 29 : pH final mesuré à la fin de chaque expérience pour les températures de 37 et 55°C

| | | | 37°C | 55°C |
|-------------|-----------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Siccité (%) | TAN (g/L) | pH _{initial} | pH _{final} | pH _{final} |
| 11,5 | 1 | 5 | 5,1 | 5,7 |
| 20 | 3 | 5 | 5,4 | 5,2 |
| 11,5 | 5 | 5 | 5,5 | 5,7 |
| 3 | 3 | 5 | 5,2 | 5,4 |
| 3 | 1 | 6,5 | 5,2 | 5,4 |
| 20 | 1 | 6,5 | 5,3 | 5,6 |
| 20 | 5 | 6,5 | 5,5 | 5,3 |
| 3 | 5 | 6,5 | 5,2 | 5,7 |
| 11,5 | 1 | 8 | 5,2 | 5,7 |
| 20 | 3 | 8 | 5,4 | 5,3 |
| 11,5 | 5 | 8 | 5,7 | 6,0 |
| 3 | 3 | 8 | 5,4 | 5,5 |
| 11,5 | 3 | 6,5 | 5,4 | 5,9 |

Ainsi, à partir de l’ensemble de ces rendements en hydrogène, il a été possible de résoudre une équation quadratique permettant ainsi de connaître les valeurs de paramètres impactant le plus la production d’hydrogène parmi la température, la siccité, l’azote ammoniacal et le pH initial. L’Equation 21 représente l’équation quadratique utilisée lors de ce plan d’expérience.

$$y = a_0 + \sum a_n x_n + \sum a_{nm} x_n x_m + \sum a_{nm} x_n^2 \quad \text{(Equation 21)}$$

Les résultats de cette équation sont exploitables, seulement si le coefficient a0 du centre du modèle possède une p-valeur significatif au minimum de 0,05. La résolution de l’équation quadratique a permis d’obtenir une p-valeur de 1,1x10⁻⁴ ce qui signifie que le résultat de l’équation est statistiquement significatif (Tableau 30).

Tableau 30 : Résultats de la résolution de l'équation du plan d'expérience sur le rendement en hydrogène

| Terme | Coefficient | | Valeur | Valeur-p |
|------------------|-----------------|---------------------------------|--------|----------|
| Centre du modèle | a0 | | 34,35 | *** |
| Linéaire | a1 | Siccité | 0,02 | |
| | a2 | [NH ₄ ⁺] | 4,20 | *** |
| | a3 | pH | 1,45 | |
| | a4 | Temp | 0,46 | |
| Interaction | a1 : a2 | | -1,01 | |
| | a1 : a3 | | -2,19 | |
| | a1 : a4 | | 2,39 | |
| | a2 : a3 | | -1,15 | |
| | a2 : a4 | | -1,38 | |
| | a3 : a4 | | -2,74 | |
| Quadratique | a1 ² | | -8,40 | *** |
| | a2 ² | | -0,62 | |
| | a3 ² | | 1,21 | |

*** : valeur-p < 0,001, ** : valeur-p < 0,01

D'après les coefficients de l'équation, il a alors été possible de déterminer que seuls deux facteurs ont eu un impact significatif sur le rendement en hydrogène dans le domaine d'étude fixé. Le premier est la concentration en azote ammoniacal qui était significatif sur le terme linéaire avec un coefficient a_2 de 4,20. Cette donnée signifie que l'augmentation de la concentration en TAN de 1 à 5g/L a permis d'augmenter le rendement en hydrogène. Le deuxième paramètre significatif est la siccité qui a été identifié comme paramètre influent sur le terme quadratique avec un coefficient de -8,40. Ce résultat signifie qu'un optimum de la production d'hydrogène a été repéré sur la valeur centrale (11,5 %) avec une baisse du rendement pour les valeurs limites (3 et 20%).

Concernant l'azote ammoniacal, cette donnée est en accord avec l'étude précédente « *Etude de l'effet inhibiteur du TAN et de la force ionique* » qui a montré qu'entre 0 et 5 g/L en TAN, un effet positif a été observé sur le rendement en hydrogène. De plus, cette observation est en lien avec la littérature, en effet l'étude de Ramao et al. (2014) a mis en évidence que l'ajout d'ammonium sous forme (NH₄)₂SO₄ à une concentration de 1,5 g/L pouvait favoriser la production d'hydrogène jusqu'à 4,13 molH₂/mol_{lactose} dans un réacteur de fermentation sombre à un pH de 7 et une température de 35°C. Dans le cas de l'utilisation des ressources présentes sur le site de Trifyl, la valeur initiale de l'azote ammoniacal dans le lixiviat est de

$4,02 \pm 0,79$ gTAN/L. Cette concentration est donc proche du point optimal obtenu lors de cette étude et permet donc un rendement élevé en hydrogène.

Le second facteur impactant significativement le rendement en hydrogène est la siccité. D'après la résolution du plan d'expérience, un point optimal pour le rendement en hydrogène a été observé à une siccité de 11,5 %. Une siccité plus faible ou plus élevée va entraîner une diminution du rendement en hydrogène. En comparant avec la littérature, l'étude de Robledo-Narvaez et al. (2013) a montré, lors d'un plan d'expérience faisant varier la siccité (15–35%) et le pH (tamponné) de 6,5 à 7,5, des résultats proches avec une production maximale en hydrogène à une siccité de 18% et un pH de 6,5 ($3 \text{ mmolH}_2/\text{g}_{\text{substrat dégradé}}$) en utilisant des déchets alimentaires comme substrat [196]. L'étude de Motte et al. (2014) a montré que sur trois groupes statistiques de siccité ([10-14%], [19%] et [25-34%]), la production d'hydrogène était maximale à une siccité comprise entre 10 et 14% ($15,3 \pm 1,6 \text{ NmLH}_2/\text{g}_{\text{TS}}$) puis diminuait avec l'augmentation de la siccité ce qui est en lien avec nos observations [195].

La Figure 30 représente la courbe du rendement en hydrogène (mLH_2/gMV) par rapport aux deux facteurs significatifs à savoir la concentration en TAN (g/L) et la siccité (%), les autres facteurs étant fixés sur le point central.

Si les conditions opératoires sont fixées de façon optimale, c'est-à-dire une siccité de 11,5% et un TAN de 5g/L, alors une amélioration du rendement de 52% est observée par rapport au rendement du témoin de l'étude précédente « *Etude de l'effet inhibiteur du TAN et de la force ionique* » (siccité : 3 %, TAN : 0 g/L, pH : 6).

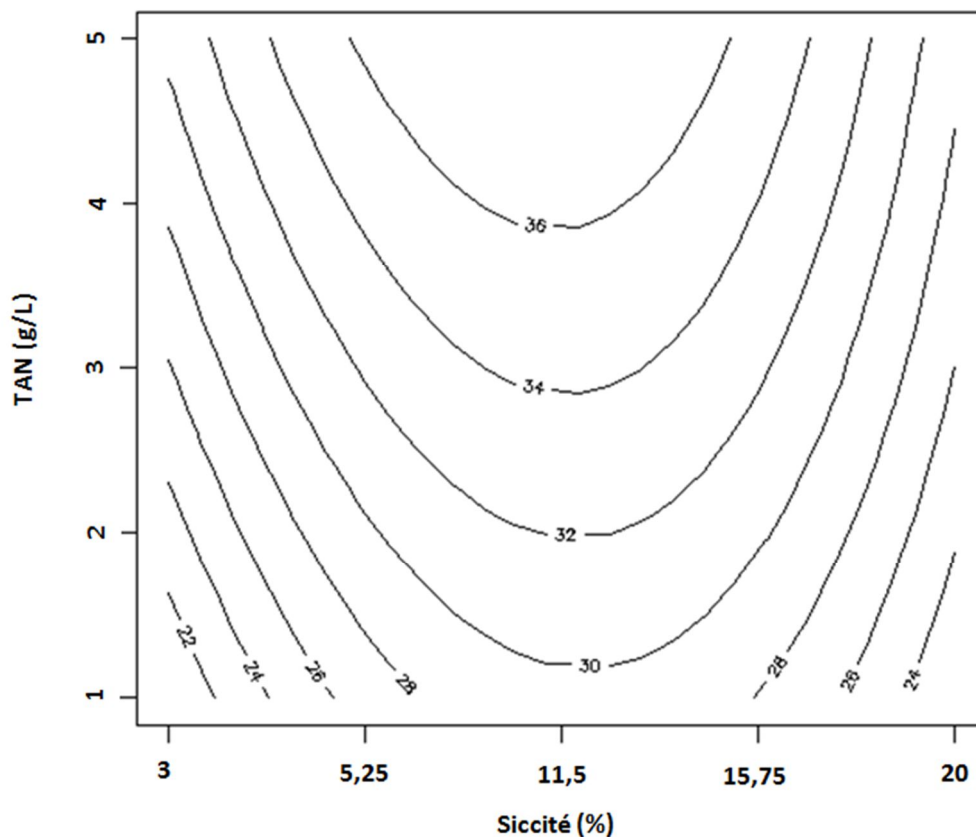


Figure 30 : Rendement d'hydrogène (mLH₂/gMV) en fonction de la concentration en azote ammoniacal et la siccité

D'après la Figure 30 afin d'obtenir un rendement optimal en hydrogène, supérieur à 36 mLH₂/gMV, la concentration en azote ammoniacal doit donc être supérieure à 4 g/L et la siccité autour de la valeur 11,5% comprise entre le niveau 7,25 et 15,75%.

Cependant, la résolution de l'équation nous indique également que la température et le pH n'ont pas eu d'impact significatif sur le rendement en hydrogène avec des valeurs-p de 0,62 et 0,17 respectivement donc non significatives. De plus, d'après ces résultats, aucun impact d'interaction entre deux paramètres n'a été observé ce qui met en évidence que tous les paramètres étudiés dans les gammes choisies n'ont pas d'impacts communs sur le rendement en hydrogène.

Concernant le pH initial du milieu de fermentation, les résultats du plan d'expérience indiquent donc que dans nos conditions, pour un rendement maximal en hydrogène, la gamme optimale est comprise au moins entre 5 et 8. Cette donnée met en évidence une grande flexibilité du procédé. Cependant, l'absence d'impact du pH initial sur le rendement

en hydrogène est fortement lié au fait que le pH n'est ni tamponné et régulé ; par conséquent, une variation du pH a été observée entre le début et la fin de chaque expérimentation. En effet, quel que soit le pH initial du milieu, le pH final moyen est de $5,3 \pm 0,1$ et $5,6 \pm 0,2$ pour les températures de 37 et 55°C, respectivement ce qui montre le fort pouvoir tampon du milieu (Tableau 29). D'après la littérature, la gamme de pH optimale pour la production d'hydrogène utilisant des déchets alimentaires comme substrat est compris entre 5,0 et 6,0 [57]. Dans notre cas, le pH final du milieu est donc propice à la production d'hydrogène. De plus, la fermentation étant un procédé rapide, comme le suggèrent les temps de latence d'hydrogène obtenus (entre 5 et 17 heures), le pH peut diminuer rapidement jusqu'à atteindre la gamme de pH optimale à la production d'hydrogène. Cette étude a donc permis de mettre en évidence que le pH initial du milieu (entre 5 et 8) n'a pas d'impact sur le rendement en hydrogène car dans tous les cas, une stabilité du pH final propice à la production d'hydrogène a été observée, ce qui met en avant la robustesse du procédé. Cependant, ayant fixé les conditions entre 5 et 8, cette étude ne permet pas de connaître l'impact de pH à des valeurs inférieures ou supérieures. Par exemple, l'étude de Liu et al. (2006) a montré qu'avec un pH inférieur de 5, une forte diminution de la production d'hydrogène était observée [72]

Il est également important de noter que les tests réalisés avec un pH initial de 5 ont vu leurs pH augmenter autour de la valeur moyenne observée lors de la fermentation, malgré la production d'AGV. Ce phénomène est causé par les déchets types cartons, papiers qui ont un fort pouvoir tampon et permet ainsi de réguler le pH car seul le lixiviat a subi une régulation du pH [197].

Enfin, la température a été observée comme n'ayant pas d'impact significatif sur le rendement en hydrogène à 37 et 55°C avec des moyennes de $26,9 \pm 6,2$ et $29,5 \pm 7,8$ mLH₂/gMV, respectivement. Cela peut être expliqué par une bonne acclimatation des microorganismes fermentaires producteurs d'hydrogène aux deux températures étudiées. Ce résultat est cependant en contradiction avec la littérature qui montre en général une production d'hydrogène plus importante en conditions thermophiles que mésophiles [6,21]. En effet, d'après la littérature, une augmentation de la température permet d'améliorer le potentiel d'hydrolyse et donc d'améliorer le rendement en hydrogène lors de l'utilisation de substrats difficilement dégradables [57].

3.3.2. Effet de la modification des conditions opératoires sur le temps d'apparition de la production de méthane

Lors de cette étude, aucun traitement thermique sur l'inoculum n'a été effectué au préalable, la présence de méthane a de ce fait été observée dans certaines expériences au bout d'un certain temps de fermentation. Dans le cas d'une apparition de méthane, le Tableau 31 présente les rendements en méthane à la fin de l'expérience (7,5 jours) ainsi que le temps de latence lié à l'apparition de la production de méthane.

Tableau 31 : Résultats de la production de méthane en termes de rendement, de temps de latence pour les expériences du plan d'expérience effectuées à 37 et 55°C

| 37°C | | | | | 55°C | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|---------|---|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------|---|---------------------------------|
| Conditions expérimentales | | | Production CH ₄ (mLCH ₄ /gMV) | Temps avant CH ₄ (j) | Conditions expérimentales | | | Production CH ₄ (mLCH ₄ /gMV) | Temps avant CH ₄ (j) |
| pH | [NH ₄ ⁺] | siccité | | | pH | [NH ₄ ⁺] | siccité | | |
| 5 | 5 | 11,5 | 0,97 | 7,43 | 5 | 5 | 11,5 | 0,57 | 6,56 |
| 5 | 3 | 3 | 1.91 | 5,82 | 5 | 3 | 3 | 9,85 | 2,83 |
| | | | | | 5 | 1 | 11,5 | 5,22 | 5,80 |
| | | | | | 6,5 | 1 | 3 | 13,5 | 2,96 |
| | | | | | 6,5 | 1 | 20 | 4,34 | 4,60 |
| 6,5 | 5 | 3 | 12,0 | 3,34 | 6,5 | 5 | 3 | 9,88 | 2,60 |
| | | | | | 6,5 | 3 | 11,5 | 8,67 | 5,28 |
| | | | | | 8 | 1 | 11,5 | 0,40 | 6,62 |
| 8 | 5 | 11,5 | 7,02 | 5,50 | 8 | 5 | 11,5 | 3,05 | 5,38 |
| 8 | 3 | 3 | 3,50 | 5,76 | 8 | 3 | 3 | 22,4 | 1,90 |

Pour les tests effectués à une température de 37°C, cinq conditions expérimentales ont abouti à l'apparition d'une production de méthane avec un temps de latence le plus court de 3,3 jours pour l'expérience réalisée à une siccité de 3%, un TAN de 5 g/L et un pH de 6,5 (Expérience 8). Lors de cette expérience, la production en méthane a été de 12,0 mLCH₄/gMV. Seules les conditions possédant une siccité de 20 % et/ou une concentration en TAN de 1 g/L présentent une fermentation sans production de méthane à 37°C. Les expériences effectuées à une température de 55°C ont montré une apparition plus fréquente de méthane (dix expériences sur les treize réalisées). Lors de la production de méthane à 55°C, le temps de latence lié à l'apparition de méthane le plus rapide (2,60 jours) a été observé pour l'expérience 21 (siccité de 3 %, un TAN de 5 g/L et un pH de 6,5).

D'après les résultats de l'étude, une apparition plus fréquente de méthane a donc été observée pour une température de 55°C (10 occurrences sur les 13 conditions), par rapport à une température de 37°C (5 occurrences sur les 13 conditions). De plus, le temps de latence avant apparition du méthane était globalement inférieur lorsqu'une température thermophile était appliquée (1,90 jours pour le plus rapide). Dans ce sens, l'étude de Li et al. (2016) a en effet montré une production plus importante et plus rapide de méthane avec des températures thermophiles (737 mLCH₄ en 15 jours) que mésophiles (498 mLCH₄ en 21 jours) dans des réacteurs batchs de 0,5 L en utilisant du lisier de bovin et des déchets de culture de champignon, le pH tamponné étant compris entre 6,15 et 6,01 [198]. Une autre étude a montré que la vitesse de production de méthane était 1,5 fois plus rapide en conditions thermophiles que mésophiles [199]. Cette étude a mis notamment en avant qu'en conditions thermophiles l'étape d'hydrolyse, qui consiste à décomposer les substrats complexes en monomères, était plus rapide et plus efficace (améliore le potentiel d'hydrolyse de 37,0 à 49,2%) ce qui permet donc des cinétiques globales plus rapides. Ce phénomène peut expliquer, dans notre étude, l'apparition plus fréquente du méthane et de la diminution de son temps d'apparition à une température de 55°C. Concernant les expériences effectuées à une température de 37°C, le temps avant apparition de méthane est toujours supérieur à 3,34 jours lorsqu'il est produit. Sachant que l'hydrogène est produit seulement durant les trois premiers jours de fermentation, l'impact de l'apparition de méthane sur la production d'hydrogène est donc moindre à 37°C. Ces résultats suggèrent l'importance d'un prétraitement sur l'inoculum notamment à 55°C, pour éviter le développement des archées méthanogènes, ce qui n'a pas été effectué dans cette étude.

3.3.3. Etude de la production de métabolites suivant une modification des conditions opératoires

Une analyse des métabolites, et notamment des AGVs, a été effectuée pour chaque expérience en fin de fermentation (7,5 jours). La Figure 31 présente notamment le rendement en gDCO/gMV de l'acétate, du butyrate, de l'hydrogène et du méthane ainsi que d'autres AGVs produits en plus faibles quantités (propionate, valérate, caproate).

D'après cette figure, le rendement de production de métabolite le plus élevé a été observé à une température de 37°C, à une siccité de 3%, un TAN de 3 g/L et un pH de 8. Lors de cette

expérience, le rendement total était de 420 ± 30 mgDCO/gMV, avec un rendement de 140 ± 10 et 220 ± 10 mgDCO/gMV pour l'acétate et le butyrate respectivement. Le plus faible rendement en métabolites de 140 ± 10 mgDCO/gMV a été observé à 55°C lorsque la siccité appliquée était de 20%, la concentration en azote ammoniacal de 5 g/L et le pH de 6,5. Globalement, toutes les expériences effectuées à 37°C ont produit plus de métabolites qu'à 55°C . Seule l'expérience effectuée avec une siccité de 11,5%, un TAN de 5 g/L et un pH initial fixé à 8 a montré un rendement plus important à 55°C 280 ± 20 mgDCO/gMV par rapport à 230 ± 10 mgDCO/gMV à 37°C).

Dans toutes les expériences, le butyrate a été le produit majoritaire avec un ratio Butyrate/Total_{métabolites} entre 66% observé à 55°C (siccité : 20%, TAN : 1 g/L, pH : 8) et 39% obtenu à 37°C (siccité : 11,5 %, TAN : 3 g/L, pH : 6,5). Globalement, ce ratio varie en fonction de la température avec un ratio moyen de 48 ± 3 % et de 56 ± 8 % pour les températures de 37 et 55°C , respectivement. Enfin, une forte variation sur la production d'acétate entre les différentes conditions a été observée. En effet, à 55°C , le rendement en acétate produit a été observé entre une valeur de 13 ± 3 mgDCO/gMV (siccité : 11,5 %, TAN : 1 g/L et pH : 8) et 120 ± 10 mgDCO/gMV (siccité : 11,5, TAN : 5 et pH : 8).

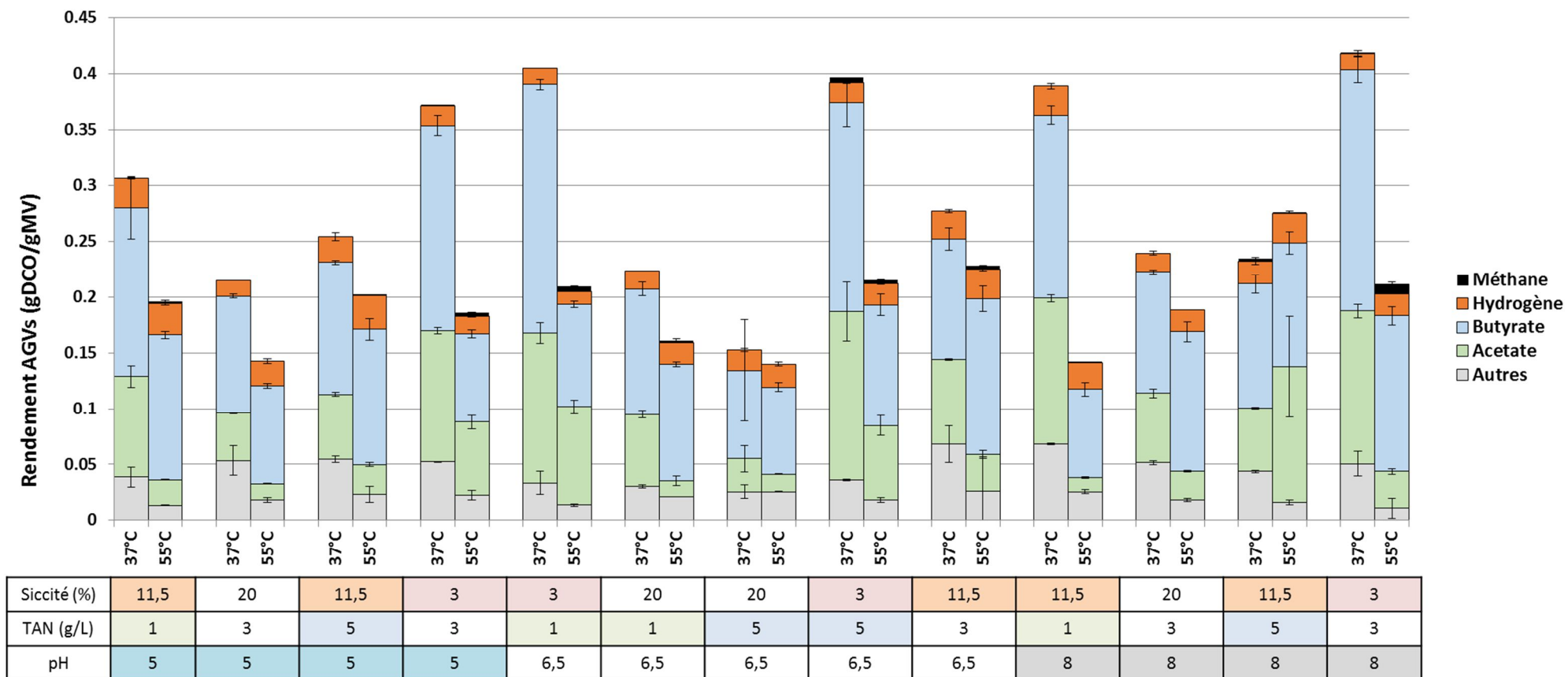


Figure 31 : Etude de la production de métabolites suivant les différentes conditions du plan d'expérience (siccité, TAN et pH) à la température de 37 et 55°C

La résolution de l'équation quadratique a alors été réalisée en prenant comme réponse le rendement en métabolites et notamment sur les acides gras volatils produits (mgDCO/gMV). Le coefficient du centre du modèle (a0) a été calculé et a permis d'obtenir une p-valeur de $3,31 \times 10^{-10}$ ce qui signifie que le résultat de l'équation est statistiquement significatif (Tableau 32).

Tableau 32 : Résultats de la résolution de l'équation du plan d'expérience sur le rendement en AGVs

| Terme | Coefficient | | Valeur | Valeur-p |
|------------------|-----------------|---------------------------------|--------|----------|
| Centre du modèle | a0 | | 0,228 | *** |
| Linéaire | a1 | Siccité | -0,060 | *** |
| | a2 | [NH ₄ ⁺] | -0,019 | |
| | a3 | pH | 0,014 | |
| | a4 | Temp | -0,054 | *** |
| Interaction | a1 : a2 | | 0,002 | |
| | a1 : a3 | | -0,012 | |
| | a1 : a4 | | 0,020 | |
| | a2 : a3 | | 0,009 | |
| | a2 : a4 | | 0,019 | |
| | a3 : a4 | | -0,008 | |
| Quadratique | a1 ² | | -0,004 | |
| | a2 ² | | -0,014 | |
| | a3 ² | | 0,002 | |

*** : valeur-p < 0,001, ** : valeur-p < 0,01

D'après les résultats, le rendement en AGVs est significativement impacté par les paramètres siccité et température avec des valeur-p inférieure à 0,001 respectivement. En effet, la siccité possède un impact sur le rendement en AGVs avec comme coefficient linéaire $a_1 = -0,060$: le terme linéaire négatif signifie qu'une diminution de la siccité va entraîner une augmentation du rendement en AGVs. En effet, lorsqu'une siccité de 3 % est appliquée à 37°C, le rendement en AGVs est maximale avec une moyenne de 380 ± 20 mgDCO/gMV qui est 30% supérieure aux AGVs produits à une siccité de 11,5 et 50% supérieure au rendement observé à 20%. D'après ces observations et celles sur le rendement d'hydrogène, la siccité est donc un facteur important dans le procédé de fermentation qui impacte à la fois le rendement en hydrogène et le rendement en AGVs.

La température est également un facteur impactant le rendement en AGVs avec un coefficient a_4 de -0,054 ce qui signifie que l'augmentation de la température va entraîner

une diminution du rendement en AGVs. D'après ces derniers résultats, une température de 37°C semble donc privilégiée pour la production d'AGVs.

En utilisant les concentrations en acétate et en butyrate produits, le ratio (Bu/Ac) des différentes concentrations en ions ont été déterminées (Figure 32) suivant les deux températures fixées (37 et 55°C). Un ratio théorique, permettant de déterminer les voies métaboliques utilisées pour la production d'hydrogène a également été calculé (Figure 33). Une valeur égale à 1 indique que l'hydrogène a été produit seulement via les voies butyrate et acétate. Si la valeur est inférieure à 1, cela signifie qu'une partie de l'hydrogène a potentiellement été consommée.

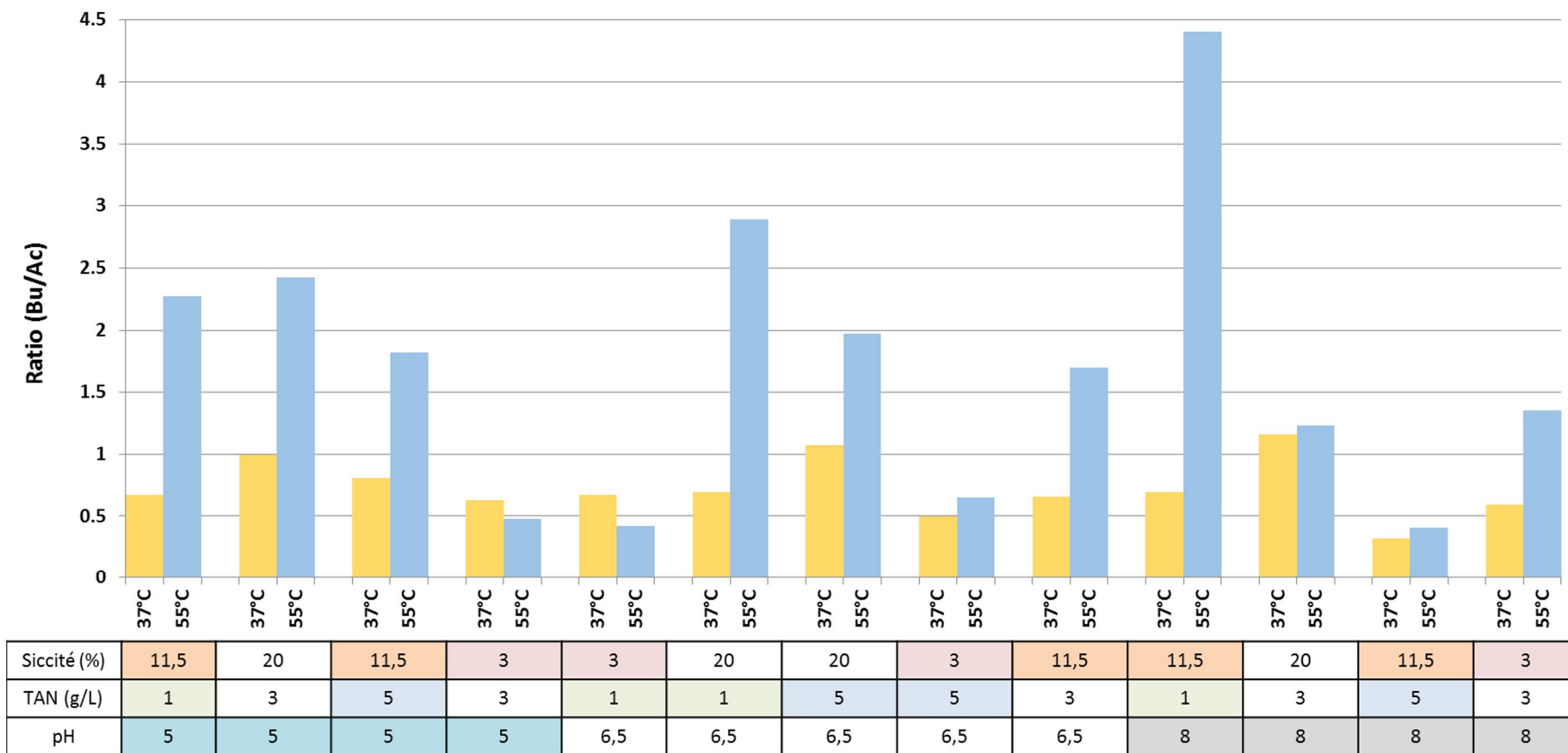


Figure 32 : Etude du ratio Bu/Ac (mol/mol) pour les différentes conditions opératoires (siccité, TAN, pH) pour la température de 37 et 55°C

D'après la Figure 32, une forte différence est observée entre 37 et 55°C. En effet, lorsqu'une température de 55°C est appliquée, alors le ratio Bu/Ac est supérieur à 1 et fortement variable avec une moyenne de $1,69 \pm 1,15$. De plus, une siccité à 3% à 55°C semble réduire ce ratio avec une moyenne de $0,49 \pm 0,11$. Alors qu'à 37°C ce ratio reste inférieur à 1 et stable entre les siccités avec une moyenne de $0,66 \pm 0,17$ (excepté pour l'expérience 7 et 11 avec des ratios de 1,07 et 1,16 respectivement). Ceci met en évidence qu'à 37°C, l'acétate est produit de façon majoritaire, alors qu'à 55°C c'est le butyrate.

Pour l'ensemble des données, les ratios $H_2/[2x(Bu+Ac)]$ présentes sur la Figure 33, à 37°C sont faibles avec une moyenne de $0,32 \pm 0,10$ montrant la forte consommation d'hydrogène. Ce ratio est plus élevé à 55°C ($0,64 \pm 0,21$) ce qui montre une plus faible consommation de l'hydrogène à cette température. Ce ratio, pour les deux températures ne semble pas être impacté par les autres paramètres où aucune réelle tendance n'est observée. Ceci montre que les paramètres sélectionnés ne vont pas modifier les voies métaboliques utilisées par la communauté microbienne mais une réduction de l'activité microbienne comme observée sur la Figure 31.

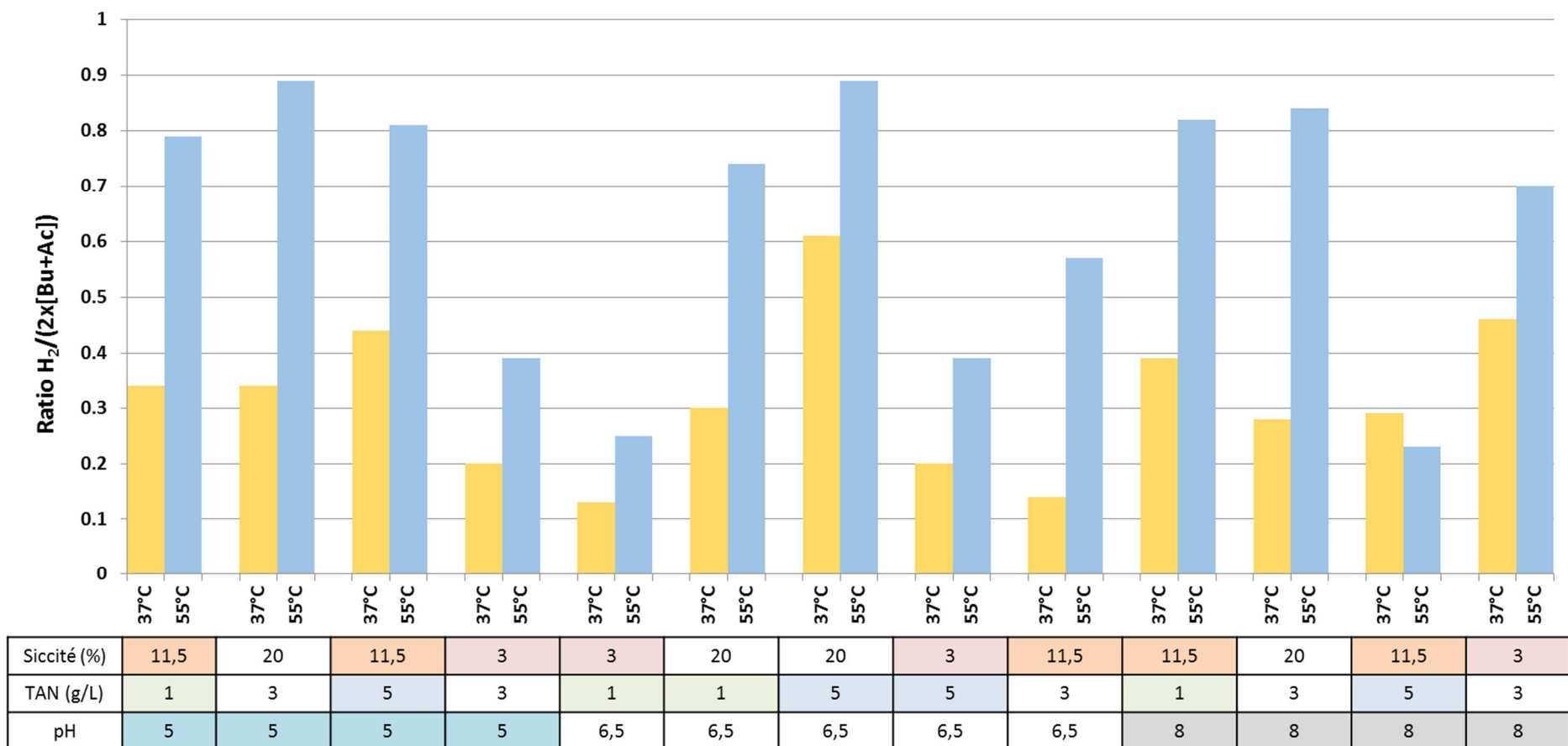


Figure 33 : Etude du ratio de H₂/(2 x[Bu + Ac]) pour les différentes conditions opératoires (siccité, TAN, pH) pour la température de 37 et 55°C

Ces résultats ont donc montré que le rendement en AGVs dans un réacteur de fermentation sombre était fortement impacté par la température. Globalement, ces résultats ont mis en avant que l'augmentation de la température était corrélée avec la diminution du rendement en AGVs.

Cependant, l'augmentation de la production d'AGVs à une température de 37°C et notamment de l'acétate et du butyrate aurait dû être en lien avec une augmentation du rendement en hydrogène. Néanmoins, la quantité d'hydrogène produite était identique pour les deux températures (26,9±6,2 et 29,5±7,8 mLH₂/gMV pour la température de 37 et 55°C respectivement). Une des hypothèses serait de dire que ce phénomène peut être expliqué par la forte présence de bactéries homoacétogènes à 37°C, qui va dans ce sens diminuer le rendement en hydrogène et augmenter le rendement en acétate. En effet, d'après le calcul du ratio $(H_2)/[2x(Bu+Ac)]$, des valeurs éloignées de 1 ont été observées et notamment à 37 °C (0,32±0,10) ce qui suggère une forte consommation d'hydrogène par les microorganismes. De plus, d'après Latrille et al. (2011), certaines espèces telles que les *Clostridium aceticum* sont capables de réaliser la réaction d'homoacétogénèse [45]. Comme montré par Saady et al. (2013), jusqu'à 11% de l'hydrogène produit peut être consommé par homoacétogénèse dans un réacteur de fermentation sombre dans le but de produire de l'hydrogène [53]. De plus, Luo et al. (2011) ont également mis en évidence que l'activité des bactéries homoacétogènes pouvait être inhibée sous conditions thermophiles à un faible pH (5,5) ce qui peut expliquer que le ratio $(H_2)/[2(Bu+Ac)]$ ait été plus élevé dans notre étude à 55°C (0,64±0,21) dont les conditions étaient proches de l'étude de Luo et al. (2011).

Dans notre cas, bien que l'homoacétogénèse semble moins impacter le procédé de fermentation à 55°C, l'efficacité globale du procédé n'en est pas améliorée comparée à la fermentation effectuée à la température de 37°C.

3.3.4. Evolution des communautés microbiennes en fonction des conditions opératoires appliquées

Pour mettre en évidence la différence de communauté entre les expériences, la distance de Bray-Curtis ou indice de dissimilarité a été calculée pour les températures de 37 et 55°C. Cet indice permet d'évaluer les dissimilarités entre les différents échantillons : si l'indice est proche de 1, cela signifie que la communauté microbienne entre les échantillons comparés est similaire ; s'il est proche de 0, alors les échantillons sont dissimilaires [173]. La Figure 34 regroupe la moyenne des indices de Bray-Curtis mesuré à 37°C, ainsi qu'à 55°C sur les différents échantillons. Enfin une comparaison entre les échantillons à 37 et 55°C a également été effectuée.

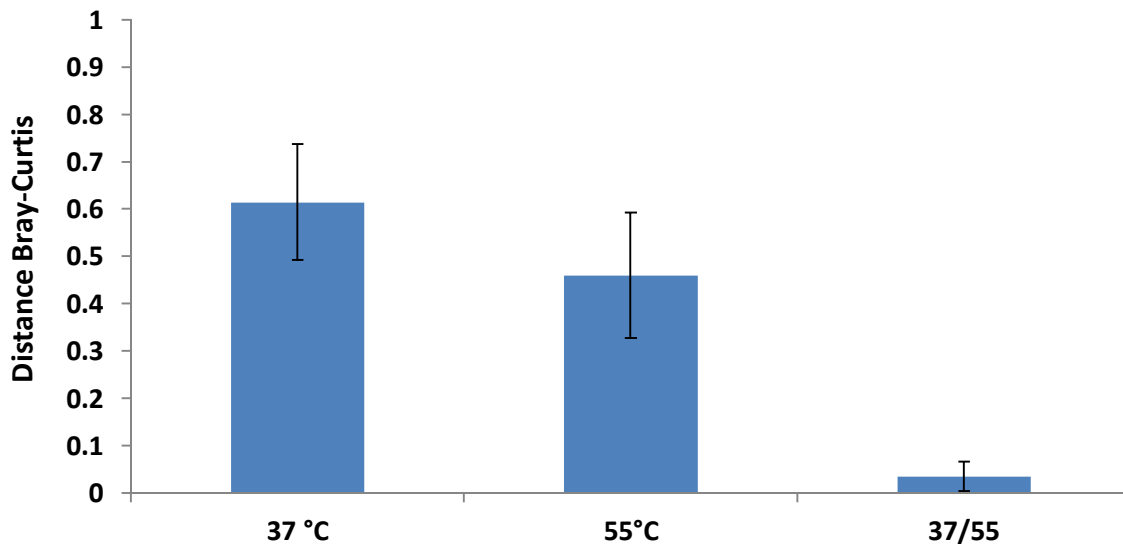


Figure 34 : Comparaison de la dissimilarité entre différents échantillons aux deux températures étudiées

D'après cette figure, on peut observer que pour les expériences réalisées à 37°C, une forte similarité a été observée entre les échantillons avec une distance de Bray-Curtis moyenne de $0,61 \pm 0,10$. Un indice de 0,46 a été observée lorsque l'on compare la communauté microbienne des échantillons à 55°C ce qui montre une plus faible similarité. Néanmoins, lorsque l'on compare la distance de Bray-Curtis entre les échantillons à 37 et 55°C, on constate que celle-ci est proche de 0 ($0,035 \pm 0,022$) et montre une très forte différence de communauté entre les deux paramètres opératoires. Une modification de la communauté microbienne a donc été observée entre les deux températures.

Un séquençage a par la suite été effectué à 37°C et 55°C afin de déterminer les modifications d'abondance relative des communautés microbiennes présentes dans le milieu en fonction des conditions opératoires appliquées (Tableau 33 et Tableau 34). Pour réaliser ces analyses, nous avons sélectionné des conditions opératoires qui correspondaient aux expériences ayant abouti à un rendement en hydrogène élevé. C'est la raison pour laquelle une majorité d'expérience possédant une siccité de 11,5% ont été retenue. Pour toutes les expériences à 37°C, deux microorganismes majoritaires ont été observés appartenant aux ordres des *Clostridiales* et des *Enterobacteriales* avec une abondance relative moyenne de 72±7% et de 24±5% respectivement. Ce résultat est en accord avec la littérature. En effet, Laothanachareon et al. (2014) ont montré que les espèces majoritaires (abondance de 80%) après 35 heures de fermentation étaient des *Clostridium* spp. dans le cas de la production d'hydrogène à partir des déchets alimentaires en conditions mésophiles.

De plus, d'autres microorganismes ont été observés de façons minoritaires telles que les *Lactobacillales*. Concernant les *Pseudomonadales*, seuls 4 échantillons contenaient ce microorganisme et les *Bacteroidales* ont été observés sur deux échantillons.

Tableau 33 : Abondance relative des microorganismes observés dans les expériences opérées à une température de 37°C

| Siccité (%) | 11,5 | 11,5 | 3 | 11,5 | 20 | 11,5 | 11,5 |
|--------------------------|------|------|-----|------|-----|------|------|
| TAN (g/L) | 1 | 5 | 3 | 1 | 3 | 5 | 3 |
| pH | 5 | 5 | 5 | 8 | 8 | 8 | 6,5 |
| <i>Clostridiales</i> | 71% | 64% | 61% | 82% | 74% | 74% | 76% |
| <i>Enterobacteriales</i> | 25% | 24% | 33% | 17% | 23% | 22% | 22% |
| <i>Lactobacillales</i> | 2% | 4% | 4% | 1% | 3% | 3% | 1% |
| <i>Pseudomonadales</i> | 1% | 3% | 2% | | | | 1% |
| <i>Bacteroidales</i> | 1% | 4% | | | | | |

Pour la température de 55°C, une plus faible diversité de la communauté microbienne a été observée avec une forte abondance des *Clostridiales* autour de 91±8 % excepté pour les conditions de siccité de 11,5%, de TAN de 5 g/L et du pH de 8 où l'abondance relative des *Clostridiales* était de seulement 76%. Pour les deux températures, les *Clostridiales* sont donc les espèces majoritairement présentes. Ces résultats sont en accord avec la littérature, en effet, d'après l'étude de Puhakka et al. (2012), les *Clostridium* spp. sont dominantes aux températures de 37 et 55°C et la diversité microbienne diminue avec la température la plus

élevée ce qui confirme nos observations [200]. Cependant, la forte différence observée à l'aide de la distance Bray-Curtis ($0,035 \pm 0,022$) met en évidence que les *Clostridiales* qui se développent entre les deux températures ne sont probablement pas les mêmes avec notamment des espèces thermophiles qui se sont potentiellement développées à 55°C [88].

De plus, par rapport à 37°C, de nouvelles communautés apparaissent. En effet, une occurrence de 4% des bactéries thermophiles du genre *Thermoanaerobacterium* a également été observée à 55°C (siccité : 11,5, TAN : 5 g/L, pH 8). L'étude d'Elsharnouby et al. (2013) a déjà mis en avant ces bactéries comme étant productrices d'hydrogène et qui permettent notamment l'hydrolyse de composés complexes (lignocellulose)[201]. De plus, certaines *Bacillales*, présentes à 4% dans le consortium thermophile (siccité 11,5, TAN : 1 g/L, pH : 5), sont connues comme permettant d'hydrolyser la matière difficilement dégradable comme les *Bacillus subtilis* [39,40,55]. D'après ces résultats, les bactéries propices à l'hydrolyse privilégient donc une température de 55°C comparée à 37°C. Cette observation est en lien avec la littérature qui montre que l'hydrolyse des composés complexes est fortement favorisée à une température thermophile [95].

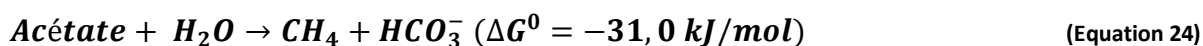
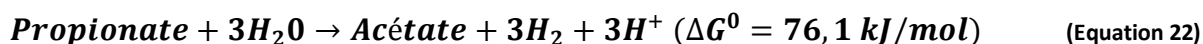
Tableau 34 : Abondance relative des microorganismes observés dans les expériences opérées à une température de 55°C

| Siccité (%) | 11,5 | 11,5 | 3 | 11,5 | 20 | 11,5 | 11,5 |
|-------------------------------|------|------|-----|------|-----|------|------|
| TAN (g/L) | 1 | 5 | 3 | 1 | 3 | 5 | 3 |
| pH | 5 | 5 | 5 | 8 | 8 | 8 | 6,5 |
| <i>Clostridiales</i> | 84% | 97% | 95% | 97% | 99% | 76% | 98% |
| <i>Enterobacteriales</i> | 1% | | | | | | |
| <i>Thermoanaerobacterales</i> | 2% | 2% | 4% | 2% | 2% | 17% | 2% |
| <i>Bacillales</i> | 13% | 1% | 1% | 1% | 4% | 7% | |

3.3.5. Evaluation du biohythane théorique produit

La fermentation sombre permet de réaliser une première étape d'hydrolyse des substrats complexes en composés facilement dégradables. Ces composés tels que l'acétate, le propionate et le butyrate peuvent être utilisés pour produire du méthane dans un second réacteur. Dans le but de coupler un réacteur de fermentation à un réacteur de méthanisation, les équations de transformation du propionate et du butyrate en acétate

puis en méthane ont été utilisées afin de connaître la production théorique de méthane issu des coproduits de fermentation sombre (Equation 22, 23, 24 et 25).



La Figure 35 présente la production d'hydrogène obtenue via le plan d'expérience et la production de méthane théorique calculé à partir des équations 22, 23, 24 et 25 pour toutes les expériences réalisées à 37 et 55°C après 7,5 jours de réaction.

La production de méthane théorique calculée montre une forte variabilité entre les conditions. Globalement, la production de méthane théorique est plus élevée à 37°C avec un maximum de 141,2 mLCH₄/gMV (siccité : 3 %, TAN : 1g/L, pH 6,5) tandis que la valeur maximale à 55°C est plus faible et a été observée à 99,1 mLCH₄/gMV (siccité : 11,5, TAN : 5 g/L et pH : 8). La production d'AGVs (pour une même durée de réaction) étant plus faible à une température de 55°C d'après la résolution du plan d'expérience, cela explique les valeurs inférieures de méthane théoriques obtenues à 55°C.

De plus, la siccité joue un rôle sur le méthane théorique produit grâce aux coproduits de fermentation sombre. En effet, d'après les résultats, une augmentation de la siccité va entraîner une baisse de la production de méthane théorique avec des valeurs de 118,6±28,4 de 95,4±18,0 et de 74,8±18,0 mLCH₄/gMV pour les siccités de 3, 11,5 et 20% respectivement. Cette observation est également en lien avec la résolution du plan d'expérience sur la production de métabolites qui a montré un impact négatif de l'augmentation de la siccité sur le rendement en métabolites.

Une autre étude réalisée et présentée en annexe (Annexe II) a mis en évidence que la production maximale de méthane à partir des déchets utilisés (FFOM reconstitué) était de 355,8±16,1 mLCH₄/gMV ce qui met en évidence que 33, 27 et 22 % du potentiel méthane du substrat se trouve sous forme de molécule facilement dégradable à la suite de l'étape de fermentation suivant les siccités de 3%, 11,5% et 20% respectivement.

En moyenne, la proportion $H_2/(H_2+CH_{4\text{théorique}})$ est comprise entre 13% (siccité : 3% et 11,5%, TAN : 1 et 3 g/L, pH : 6,5) et 37 % (siccité : 20 %, TAN : 5g/L, pH 6,5) à la température de 37°C. A cette température, la moyenne de la proportion de $H_2/(H_2+CH_{4\text{théorique}})$ a été observée à 24 ± 8 %. Alors qu'à une température de 55°C, le ratio a été observé entre 21 % (siccité : 11,5%, TAN : 5g/L, pH : 8) et 45 % (siccité : 20%, TAN : 3g/L, pH : 8) avec une moyenne de 36 ± 10 % en lien avec la faible valeur de méthane théorique calculée.

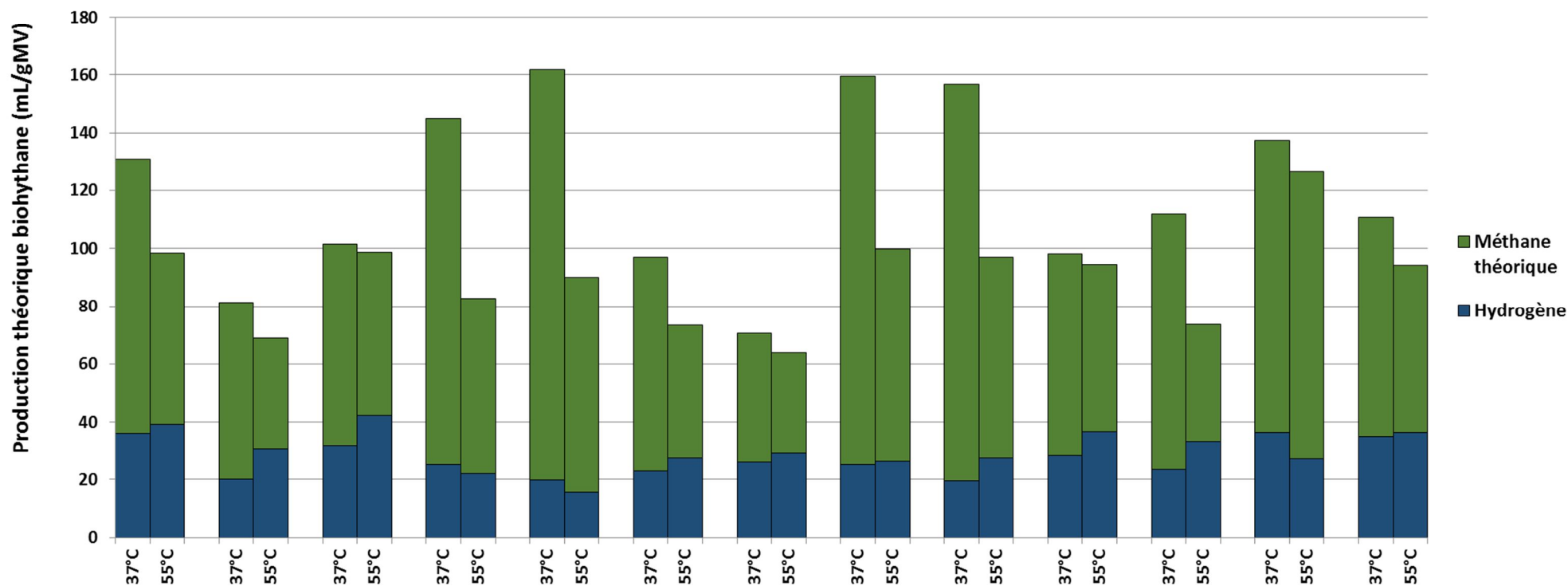
D'après le calcul de la production de méthane théorique, l'amélioration de la production de métabolites à 37°C comparé à 55°C va permettre de produire rapidement une plus grande quantité de méthane avec un ratio $H_2/(H_2+CH_{4\text{théorique}})$ plus faible. La première dégradation du substrat se produisant dans le réacteur de fermentation pourrait également permettre d'améliorer le procédé de méthanisation notamment au niveau de la vitesse de production de méthane. En effet, Liu et al. (2006) ont montré que le rendement en méthane était supérieur dans un procédé en deux étapes comparé à un procédé à une étape lorsque le temps de séjour dans le réacteur de méthanisation était fixé à 15 jours. Dans cette étude, le rendement en méthane était amélioré de 21% dans des conditions mésophiles en utilisant des déchets ménagers comme substrat [72]. Cette étude a mis en avant une meilleure efficacité de dégradation du substrat dans un procédé en deux étapes (86 %) comparé à un procédé unique de méthanisation (79,3 %), pour un temps de réaction donné. Nasr et al. (2012) ont également observé une augmentation de 18,5% du rendement global d'énergie avec un procédé de production de biohydrogène utilisant des résidus de distilleries comme substrat sous une température mésophile [168]. Cette amélioration est liée à augmentation de la vitesse de production de méthane et de dégradation de la matière organique ($3,88\pm 0,26$ mLCH₄/heure et 333 mLCH₄/gCOD_{dégradé}) comparé à un méthaniseur classique ($2,82\pm 0,16$ mLCH₄/heure et 268 mLCH₄/gCOD_{dégradé}) pour un temps de réaction de 104 jours. En conclusion, ces auteurs ont montré que 1 L de résidu de distillation dans un réacteur de méthanisation de type continu produisait 38,5 L de méthane alors que la même quantité de substrat dans un réacteur à deux étapes pouvait produire 19,5 L d'hydrogène et 38,7 L de méthane.

Dans notre étude, une siccité fixée à 11,5 % permettrait ainsi de produire théoriquement $95,4\pm 18,0$ mLCH₄/gMV via les métabolites produits lors de la fermentation sombre. Ce qui

correspond à environ 27 % du potentiel méthane de la fraction fermentescible des ordures ménagères issu du MODECOM de Trifyl.

Chapitre III : Optimisation de la fermentation sombre

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| $H_2/(H_2+CH_4)$ | 37°C | 28 | 25 | 32 | 17 | 13 | 24 | 37 | 16 | 13 | 29 | 22 | 26 | 32 |
| | 55°C | 40 | 44 | 43 | 27 | 18 | 38 | 45 | 26 | 28 | 39 | 45 | 21 | 39 |



| | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------|----|------|---|-----|-----|-----|-----|------|------|----|------|---|
| Siccité (%) | 11,5 | 20 | 11,5 | 3 | 3 | 20 | 20 | 3 | 11,5 | 11,5 | 20 | 11,5 | 3 |
| TAN (g/L) | 1 | 3 | 5 | 3 | 1 | 1 | 5 | 5 | 3 | 1 | 3 | 5 | 3 |
| pH | 5 | 5 | 5 | 5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 8 | 8 | 8 | 8 |

Figure 35 : Production de biohydrothane à partir de l'hydrogène mesuré expérimentalement et du méthane théorique calculé à la suite des métabolites produits pour les différentes conditions opératoires à 37 et 55°C

3.4. Conclusion

Le plan d'expérience utilisé a mis en évidence que le procédé de fermentation sombre utilisant les ressources de Trifyl à savoir le lixiviat et des déchets reconstitués issus du MODECOM caractérisant la FFOM collecté par Trifyl présentait une grande robustesse. En effet, les conditions opératoires telles que le pH initial et la température (dans les gammes testées) n'ont pas eu d'impact significatif sur le rendement en hydrogène. De plus, le lixiviat de Trifyl possède une concentration en azote ammoniacal de $4,0 \pm 0,8$ g/L qui se situe dans la plage de fonctionnement optimale. Seule la siccité a été identifiée comme un paramètre impactant fortement le rendement en hydrogène : ce paramètre est donc à prendre en compte pour la réalisation d'un procédé de fermentation sombre. En effet, pour permettre une production optimale d'hydrogène, la siccité doit être aux alentours de 11,5 %. Une siccité supérieure peut être appliquée (jusqu'à 20%), en fonction de contraintes industrielles, mais avec une baisse moyenne de rendement de près de 27%.

Enfin, concernant la température de réaction, bien que le rendement en hydrogène soit proche pour des températures de 37 et 55°C, plusieurs différences peuvent être soulignées :

- 1) L'analyse microbiologique montre qu'une majorité de *Clostridiales* a été observée dans les deux températures ce qui met en évidence que les conditions opératoires fixées créent un environnement favorable pour le développement de bactéries productrices d'hydrogènes.
- 2) Une absence de traitement sur le lixiviat en amont de la fermentation peut engendrer le développement des archées méthanogènes. La production de méthane liée à la croissance d'archées méthanogènes peut altérer le rendement en hydrogène. La présence de méthane est principalement observée à 55°C qui présente de fortes probabilités d'apparition pour des temps de réaction très courts (jusqu'à seulement 1,90 jour). Pour limiter ce phénomène, il est donc plus intéressant d'opérer la fermentation à 37°C. De plus, cette observation met en évidence l'importance d'un traitement sur l'inoculum afin de sélectionner les microorganismes sporulants et éliminer les archées méthanogènes.

- 3) Concernant le rendement en AGVs, celui-ci est favorisé à faible siccité et à température de 37°C. En effet, une nette diminution du rendement de production d'AGVs a été observée lorsque la température de 55°C était appliquée ce qui met en évidence que le lixiviat utilisé est sensible à la température de fermentation. Dans l'optique de créer un procédé à deux étapes pour la production de biohythane, un rendement élevé en composés plus facilement dégradables (AGVs) permettant d'améliorer l'efficacité dans le réacteur de méthanisation doit également être pris en compte. La température de 37°C est donc également à privilégier.

D'après cette étude, les conditions idéales pour optimiser un procédé de fermentation sombre, en utilisant les ressources de Trifyl (lixiviat et FFOM reconstitués) sont donc une température de 37°C avec une siccité aux alentours de 11,5 %. De plus, une variation du pH initial dans une gamme de 5 à 8 n'a pas d'impact significatif sur le rendement en hydrogène. Enfin, d'après les caractéristiques du lixiviat, l'azote ammoniacal présent dans le lixiviat initial se situe proche de la concentration propice à une forte production d'hydrogène.

4. Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre

Outre les paramètres précédemment étudiés, la composition du déchet peut également impacter la production d'hydrogène. D'après la reconstitution de la fraction fermentescible des ordures ménagères, 44% de cette ressource correspond à des déchets alimentaires et 56% à des déchets de type papiers, cartons et déchets de jardin. Or, les déchets alimentaires sont caractérisés par un fort potentiel de production d'hydrogène. En effet, les déchets alimentaires sont globalement composés d'éléments relativement faciles d'accès pour les microorganismes. En effet, d'après la littérature, ce type de déchets tels que la salade, le chou, les carottes, les pommes de terre ou le riz, présentent des potentiels hydrogène élevés (50, 62, 71, 106 et 134 mLH₂/gMV respectivement) [55]. Globalement, une étude a montré que le potentiel hydrogène augmentait en suivant l'ordre: déchets alimentaires > déchets agricoles > déchets d'élevage [57].

Les déchets de type papiers, cartons et déchets de jardin sont caractérisés comme des substrats plus complexes composés notamment d'éléments de type lignocellulose. Les composés contenant une forte proportion en matière lignocellulosique (par exemple, les végétaux, le bois, la paille) sont régulièrement cités comme produisant une faible quantité d'hydrogène car ils possèdent une structure limitant l'accessibilité de la cellulose et de l'hémicellulose pour les microorganismes [54]. Par exemple, il a été référencé un faible potentiel hydrogène pour la paille de blé, de maïs ou de l'herbe (1-68, 3-57 et 6-16 mLH₂/gMV respectivement). Ces déchets à faible potentiel en hydrogène, dont la composition est proche de celle du papier et du carton utilisés dans cette étude, peuvent néanmoins faire dans notre cas l'objet d'autres valorisations comme la valorisation de matière (recyclage) ou énergétique par voie thermique (CSR, incinération...).

L'objectif de cette étude sera donc d'étudier l'impact d'une modification de la composition du substrat sur le rendement en hydrogène et notamment les composés de type papiers, cartons et déchets de jardin afin d'étudier la pertinence de la présence de ce type de déchets dans un réacteur de fermentation.

4.1. Déroulement de l'étude

Lors de cette étude, des tests ont été effectués dans des réacteurs fermés de type batch de volume total de 500 mL. Une série de 64 réacteurs a été opérée lors de cette étude. La température a été fixée à 37°C, sans régulation du pH et le lixiviat a été préalablement traité thermiquement (90°C pendant 30 min) pour éviter le développement des microorganismes consommateurs d'hydrogène. Comme expliqué dans le Chapitre 2 « *Matériel et Méthodes* » et afin d'étudier l'effet des déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin (appelés dans la suite du document déchets « PCJ »), différentes quantités en PCJ ont été introduites dans chaque réacteur (0, 8,9, 17,7, 26,2, 35,0 et 43,8 g). Ces quantités correspondent à une proportion de 0%, 21%, 35%, 44%, 51% et 56% de PCJ dans la fraction fermentescible des ordures ménagères. Les tests à 56% de déchets PCJ correspondent aux proportions réelles utilisées lors de la reconstitution de la fraction fermentescible des ordures ménagères issues du MODECOM de Trifyl. Un blanc, composé uniquement de déchets PCJ, a été réalisé pour évaluer le potentiel hydrogène de celui-ci. La siccité dans les réacteurs a été fixée à 15% : bien que d'après l'étude précédente, la siccité optimale a été observée à 11,5%, un compromis a été effectué entre les conditions réalisables à l'échelle industrielle et les conditions optimales. En effet, une faible siccité entraîne un coût supplémentaire du procédé. La siccité de 15% a donc été fixée car cette valeur reste proche de la condition optimale et permet de s'orienter vers un réacteur type voie solide (ou semi-solide).

Une mesure de la conductivité et du pH, ainsi qu'une analyse des métabolites ont été effectuées avant et à la fin de chaque expérimentation. La production d'hydrogène a été suivie par micro-GC toutes les 4 heures.

4.2. Résultats de la modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre

4.2.1. Modification de la composition du substrat sur le rendement en hydrogène

Dans l'ensemble des conditions testées, aucune production de méthane n'a été observée. Ainsi les variations de production d'hydrogène n'étaient pas liées à sa consommation par les archées méthanogènes. Le Tableau 35 présente les résultats de la production d'hydrogène sur les différentes proportions en PCJ dont les expériences ont duré jusqu'à une absence d'hydrogène soit en moyenne 7,5 jours. D'après le Tableau 35, le rendement le plus faible a été observé pour le témoin sans ajout de déchets alimentaires (Blanc) avec une valeur de $0,5 \pm 0,5$ mLH₂/gMV. Cela s'explique par le fait que ces types de déchets (papiers et cartons) sont notamment composés de fibres lignocellulosiques végétales (chaînes linéaires de molécules de glucose) et le fait que ce déchet se présente sous forme de polymère, sa dégradation est plus lente. En effet, comme observé par Chatellard et al. (2016) un temps latence de la production d'hydrogène est d'environ $12,1 \pm 0,5$ jours lors de l'utilisation de la cellulose comme substrat [82]. En présence de ce genre de composé, les différentes études utilisent une étape de prétraitement telle que l'hydrolyse acide afin de rendre plus accessible le substrat [205]. Dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude (durée d'environ 7,5 jours), ce type de déchets ne permet donc pas de produire de l'hydrogène. De ce fait, lors de cette étude et afin d'observer l'effet réel de la modification de la composition du substrat sur le rendement en hydrogène, seule la matière volatile (la matière dégradable) des déchets alimentaires (appelé biodéchet) a été prise en compte dans le rendement en hydrogène calculé.

Tableau 35 : Résultats de la production d'hydrogène en termes de rendement (mLH₂/gMV), de temps de latence (heures) et de cinétique (mLH₂/gMV/h) pour les différentes proportions en PCJ ajoutées dans le substrat

| | Rendement H ₂ (mLH ₂ /gMV _{biodéchet}) | Temps de latence H ₂ (heures) | Cinétique H ₂ (mLH ₂ /gMV _{biodéchet} /h) |
|-------|---|--|---|
| 0% | 15,7±7,9 | 6,8±4,0 | 0,53±0,30 |
| 21% | 42,9±16,4 | 17,4±6,7 | 0,66±0,43 |
| 35% | 46,5±14,4 | 16,3±11,1 | 0,57±0,27 |
| 44% | 48,0±18,1 | 15,3±8,8 | 0,65±0,29 |
| 51% | 44,1±10,5 | 18,2±11,1 | 0,84±0,47 |
| 56% | 40,8±10,4 | 15,3±5,4 | 0,84±0,46 |
| Blanc | 0,5±0,5 | 16,6±2,3 | 0,01±0,01 |

Pour l'expérience réalisée avec uniquement des déchets alimentaires (sans PCJ), un rendement H₂ de 15,7±7,9 mLH₂/gMV_{biodéchet} a été observé. Néanmoins, lorsque les déchets alimentaires sont mélangés à des déchets PCJ, alors une augmentation significative du rendement a été observée quelle que soit la proportion de déchets PCJ ajoutées (valeur-p : 0,0003). Globalement, les rendements en hydrogène observés sur les expériences possédant des déchets de types PCJ sont tous statistiquement identiques d'après une analyse des variances, et ce quelle que soit la proportion présente, avec un rendement moyen de 44±14 mLH₂/gMV_{biodéchet}.

D'un point de vue du temps de latence avant apparition d'hydrogène, une valeur moyenne a été observée à 16,5±1,1 heures pour toutes les expériences à l'exception du test sans ajout de déchets PCJ (0 %) dont le temps de latence en hydrogène a été obtenu à 6,8±4,0 heures.

Concernant la vitesse maximale de production d'hydrogène, l'analyse de variance n'a pas montré de différence significative entre les différentes expériences (valeur-p : 0,52) hormis pour les tests contenant seulement du PCJ (Blanc). La cinétique maximale moyenne lors des différentes expériences a été observée à 0,68±0,39 mLH₂/gMV_{biodéchet}/h.

D'après l'ensemble des résultats de cette étude, et même si les déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin ont un potentiel nul de production d'hydrogène, ils jouent un rôle majeur dans la stabilisation de la fermentation sombre. En effet, l'ajout de PCJ dans le milieu va améliorer le rendement d'hydrogène de 72% en moyenne quelle que soit la proportion en PCJ utilisée. En digestion anaérobie (méthanisation), Fonoll et al. (2016) a

également montré l'impact positif de l'ajout d'une proportion des déchets de types papiers, cartons dans les FFOMs. En effet, une proportion en déchets papiers et cartons de 15 et 30% dans la FFOM n'avait pas d'impact sur le rendement en méthane. Cependant lorsqu'aucun déchet de ce type n'est ajouté, alors le rendement en méthane était réduit de 15% [182].

La Figure 36 correspond une représentation de la distribution statistique du pH final du milieu de fermentation en fonction des différentes proportions en déchets PCJ. Cette figure, en boîte à moustache permet de présenter la médiane (il existe autant de valeurs supérieures qu'inférieures à cette valeur), les bords inférieurs et supérieurs du rectangle représentant les quartiles. Le quartile inférieur signifie qu'un quart des expérimentations ont eu des valeurs plus petites, et le quartile supérieur qu'un quart ont des valeurs plus grandes. La bande supérieure et inférieure représente les valeurs extrêmes observées.

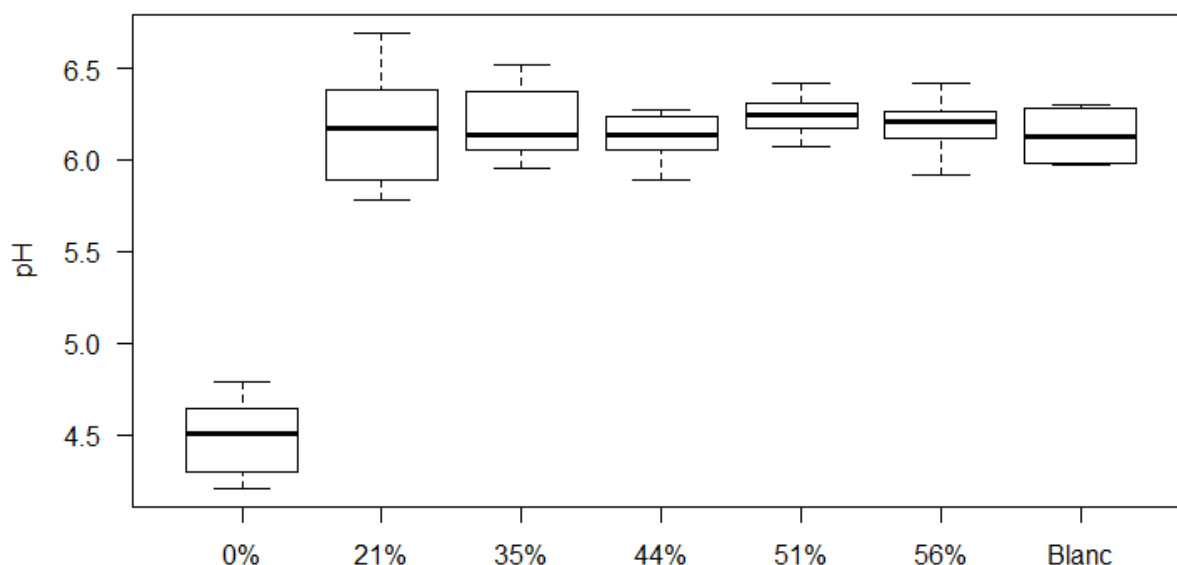


Figure 36 : pH final observé par rapport à la quantité de déchets flottants dans les déchets ménagers reconstitués

Le pH initial n'étant pas régulé, il est grandement influencé par le pH du lixiviat qui était de $9,0 \pm 0,2$ lors de cette étude. Lorsqu'aucun déchet PCJ n'est ajouté, le pH final du milieu est de l'ordre de $4,6 \pm 0,3$ alors que lorsque des déchets PCJ sont ajoutés, des valeurs proches de $6,2 \pm 0,2$ ont été observées quelle que soit la proportion en PCJ. L'expérience sans déchets alimentaires (Blanc) a également obtenu une valeur proche des expériences contenant différentes proportions en PCJ (6,13).

D'après ces résultats, on remarque que les déchets de types PCJ vont permettre de maintenir le pH à une valeur propice à la production d'hydrogène et donc augmenter la production d'hydrogène. Ce résultat met en évidence que les déchets de types PCJ permettent vraisemblablement d'éviter une chute de pH trop importante qui pourrait favoriser la production de lactate et donc engendrer un faible pH du milieu. Les PCJ permettent donc d'aboutir à un pH optimal permettant de favoriser la production d'hydrogène. En effet, un pH trop faible entraîne une diminution importante de la production d'hydrogène. D'après l'étude réalisée par De Gioannis et al. (2014) dans un fermenteur sombre portant sur la production d'hydrogène à partir de déchets industriels (fromage), si le pH était inférieur à 5,5, aucune production d'hydrogène n'a été observée [98]. De plus, cette étude a mis en évidence que le pH optimal pour une production maximale d'hydrogène était compris entre 6,0 et 6,5. Dans un réacteur batch utilisant du glucose comme substrat, l'étude de Li et al. (2008) a également montré une production d'hydrogène plus faible lorsque le pH initial était de 5,0 [96].

Les mesures de conductivité finale effectuées sur l'ensemble des conditions expérimentales montrent une valeur moyenne de $24,2 \pm 5,5$ mS/cm, et une valeur maximale de 32,9 mS/cm. Ce niveau se situe en dessous du seuil d'inhibition reporté précédemment. Par conséquent, la force ionique n'est pas la cause de la différence observée sur le rendement en hydrogène entre l'expérience contenant seulement des déchets alimentaires et ceux avec des déchets PCJ.

4.2.2. Impact de la modification de la composition du substrat sur la production de métabolites

L'analyse de tous les métabolites produits a été effectuée en fin d'expérimentation (7,5 jours), et est présentée sur la Figure 37. Lors de cette étude, l'expérience dont le substrat est composé seulement des déchets de types PCJ (Blanc) n'a pas été échantillonnée car le faible volume de lixiviat utilisé (64 mL) afin de correspondre aux conditions fixées (siccité de 15 %) a été absorbé dans sa totalité par les déchets de type papiers et cartons qui possèdent un fort pouvoir absorbant. De plus lors de ces analyses, et comme effectué dans le paragraphe précédent du fait de la faible dégradation des déchets PCJ, seulement la matière volatile

provenant des déchets alimentaires a été utilisée pour calculer les rendements en métabolites produits.

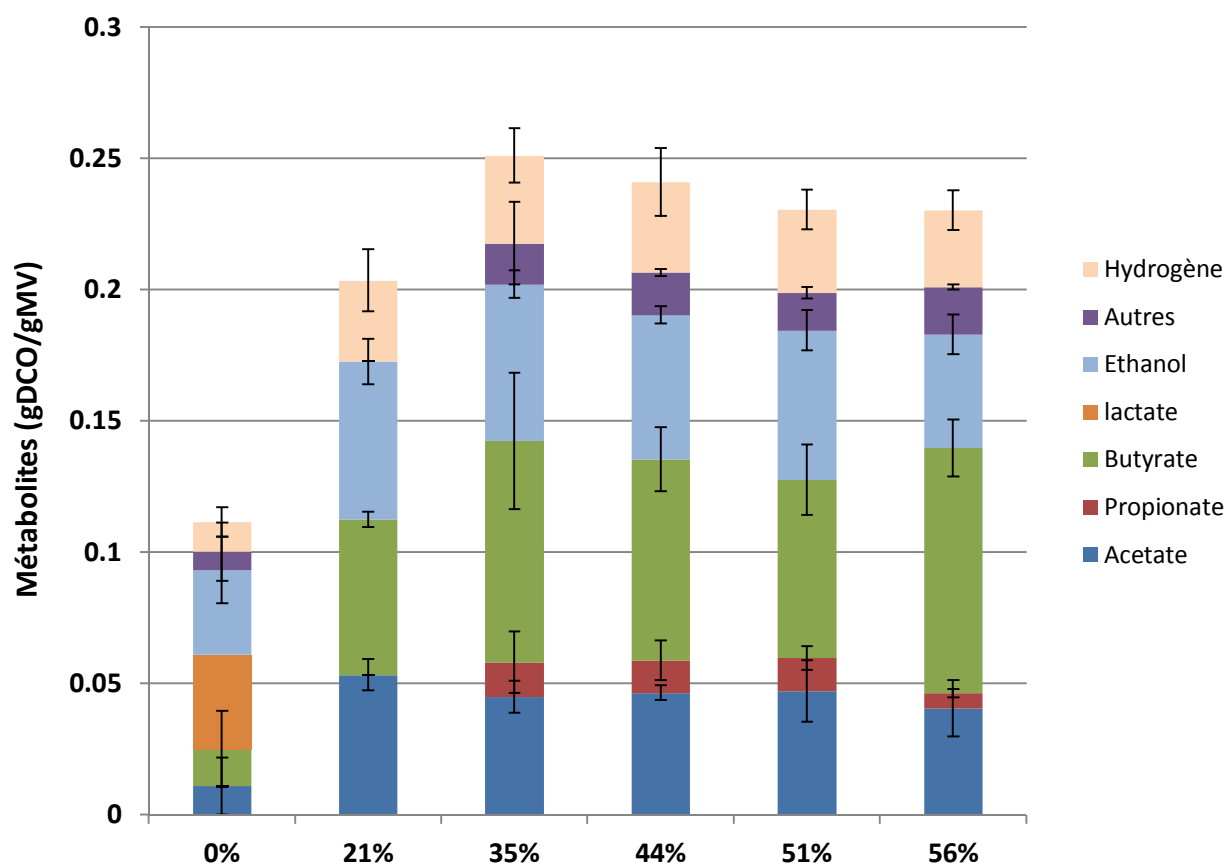


Figure 37 : Etude de la production de métabolites suivant les différentes proportions de PCJ (0%, 21%, 35%, 44%, 51% et 56%) dans le substrat

D'après la Figure 37, la production la plus faible en métabolites a été observée pour l'expérience sans déchets PCJ avec une valeur de 120 ± 20 mgDCO/gMV. Lors de ce test, une importante production de lactate a été observée qui a été le produit majoritaire de cette fermentation (36 ± 22 mgDCO/gMV) ce qui représente 60 % de la production totale de métabolites. Le lactate est un métabolite intermédiaire dont les voies réactionnelles utilisées pour sa production ne sont pas productrices d'hydrogène. Outre le fait que sa voie de production soit concurrente à la production d'hydrogène, les espèces telles que *Lactobacillus*, productrice de lactate, ont également tendance à sécréter des bactériocines dans le milieu qui peuvent être stressantes pour les clostridies et engendrer une modification des voies réactionnelles avec une diminution de la production d'hydrogène. En effet, l'étude de Gioannis et al. (2014) a montré qu'une absence d'hydrogène a été observée

lorsque une forte concentration en lactate était produite à faible pH (5,5) dans un réacteur de fermentation [98].

Une augmentation de la production totale des métabolites a par la suite été observée avec l'ajout de déchets PCJ avec un maximum à 250 ± 10 mgDCO/gMV pour l'expérience dont la proportion en PCJ était de 35%. D'après une ANOVA, le rendement de métabolites est stable pour les expériences contenant de 35 à 56 % de PCJ (p-valeur = 0,05) avec une moyenne de 240 ± 10 mgDCO/gMV. Lors de ces expériences les métabolites majoritaires ont été l'acétate (45 ± 3 mgDCO/gMV), le butyrate (81 ± 11 mgDCO/gMV) et l'éthanol (55 ± 7 mgDCO/gMV). Une étude a mis en avant que les types de fermentations caractérisées par le type de métabolite majoritaire produit sont corrélés notamment au pH de la solution [206]. En effet, une fermentation de type butyrique correspond à une production majoritaire de butyrate et d'acétate est observée à un pH supérieur à 6, une fermentation de type éthanol correspond à une production majoritaire d'éthanol est quant à elle observée à un pH inférieur à 4,5. Cette étude a mis en évidence que la fermentation de type éthanol permettait une production optimale d'hydrogène. Curieusement, dans notre étude, l'éthanol est produit de façon majoritaire lorsque le pH de la solution est au-dessus de 6 avec une répartition quasi similaire entre les trois métabolites majoritaires. L'étude de Chen et al. (2015) a mis en avant qu'il était possible d'obtenir un mélange du type de fermentation avec une production importante en acétate, butyrate et éthanol avec comme produit majoritaire l'acétate dans un réacteur de fermentation à un pH compris entre 4,2 et 4,7 [207]. Dans notre cas, d'après l'analyse des métabolites, la fermentation réalisée lorsque des déchets PCJ sont ajoutés s'apparente fortement à un mélange du type de fermentation bien que le pH soit favorable pour une fermentation de type butyrate. Une apparition de propionate a également été observée seulement dans cette gamme de proportion en PCJ (35 à 56%).

La présence des déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin va donc avoir un impact sur la production totale de métabolites. En effet, l'ajout de PCJ va entraîner une modification des métabolites produits avec comme produits majoritaires présents dans ces conditions l'acétate, le butyrate et l'éthanol.

4.2.3. Analyse des produits issus de la fermentation pour la production de biohythane

L'analyse des métabolites a permis de calculer le ratio Bu/Ac et le ratio $H_2/[2x(Bu+Ac)]$ (Tableau 36). De plus, le méthane théorique a également été calculé via l'équation de transformation de l'acétate, du butyrate et du propionate en méthane (Equation 22, 23, 24 et 25). Ce calcul a également pris en compte la quantité d'éthanol et de lactate produit d'après les équations 26 et 27.

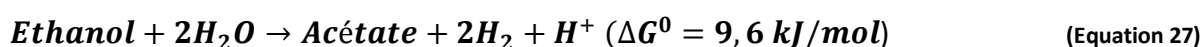


Tableau 36: Calcul des ratios Bu/Ac, $H_2/(2x[Bu+Ac])$ et $H_2/(H_2+CH_{4\text{théorique}})$ pour les expériences contenant différentes proportions en PCJ dans le milieu de fermentation

| | Bu/Ac (mol) | $H_2/(2x[Ac+Bu])$ (mol/mol) | $H_2/(H_2+CH_{4\text{théorique}})$ (%) |
|-----|-------------|--------------------------------|---|
| 0% | 0,83 | 0,86 | 25 |
| 21% | 0,44 | 0,83 | 46 |
| 35% | 0,75 | 0,75 | 41 |
| 44% | 0,66 | 0,83 | 44 |
| 51% | 0,58 | 0,82 | 43 |
| 56% | 0,92 | 0,78 | 46 |

D'après le Tableau 36, un ratio Bu/Ac élevé a été observé dans les expériences contenant 0% et 56 % de PCJ avec des valeurs de 0,83 et 0,92 respectivement ce qui met en avant une production proche entre le butyrate et l'acétate. Pour les autres expériences, l'acétate est produit de façon plus importante que le butyrate avec un ratio allant de 0,75 avec 35 % de PCJ et jusqu'à un ratio Bu/Ac de 0,44 pour l'expérience contenant 21 % de PCJ.

De manière intéressante, le ratio $H_2/(2x[Ac+Bu])$ reste stable entre chaque expérience avec une moyenne de $0,81 \pm 0,04$ ce qui est en accord avec les rendements stables en hydrogène observés avec l'ajout des déchets PCJ avec une moyenne de $44 \pm 14 \text{ mLH}_2/\text{gMV}$. Cependant la valeur du ratio inférieure à 1 met en évidence une consommation de l'hydrogène. Aucune production de méthane n'a été observée lors de cette étude, la consommation d'hydrogène peut donc potentiellement être causée par l'homoacétogénèse, ce qui est corrélé avec une forte production d'acétate et un ratio Bu/Ac inférieur à 1.

Le ratio $H_2/(H_2+CH_{4\text{théorique}})$ a également été calculé pour les différentes proportions en déchets de types PCJ. D'après ce calcul, le ratio a été observé à une valeur de 25 % lorsqu'aucun déchet de type PCJ n'a été ajouté au substrat. Puis, l'ajout de PCJ va améliorer ce ratio avec une moyenne qui a été observée à $44\pm 2\%$.

La Figure 38, permet de mettre en évidence la production totale (mL/gMV) d'hydrogène et de méthane théorique calculé suivant les métabolites produits lors de la fermentation sombre. D'après cette Figure, l'ajout de PCJ dans le milieu de fermentation permet d'augmenter la production de biohythane. En effet sans ajout de PCJ, la production totale théorique de biogaz a été calculée à 15,7 mL H_2 /gMV pour l'hydrogène et 38,1 mL CH_4 /gMV pour le méthane théorique alors que l'ajout, même d'une faible quantité de PCJ (21%), va entraîner une amélioration de la production d'hydrogène et de méthane théorique de 42,9 et 55,5 mL/gMV respectivement.

De plus, d'après cette Figure, l'augmentation de la proportion en déchets PCJ dans le milieu de fermentation ne va pas améliorer la production de méthane théorique qui reste statistiquement identique ($58\pm 3\text{mL}CH_4/\text{gMV}$) et qui est corrélée avec la production de métabolite observée sur la Figure 37.

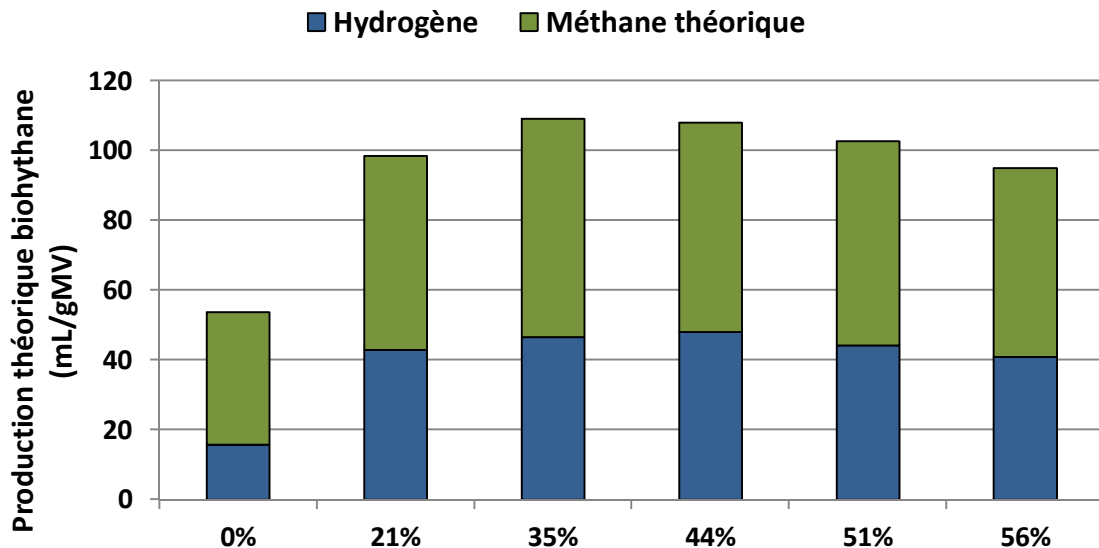


Figure 38 : Production de biohythane pour les différentes expériences contenant plusieurs proportions en PCJ dans le substrat

4.3. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en avant l'impact positif lié aux déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin sur la fermentation sombre.

En effet, tout d'abord, le faible pH observé sans ajout de déchets PCJ est corrélé avec une forte production de lactate et une diminution importante de la production d'hydrogène. Cependant, l'ajout de PCJ va permettre de stabiliser le pH autour de $6,2 \pm 0,2$ qui, d'après l'étude précédente, est dans une gamme idéale pour la production d'hydrogène. Ces déchets jouent donc un rôle important notamment en évitant vraisemblablement une chute de pH favorisant la production de lactate et permettent de rester dans une gamme de pH optimale pour la production d'hydrogène.

De plus, l'apport des déchets PCJ dans le milieu a permis d'améliorer la production de métabolites (240 ± 10 mgDCO/gMV) avec un mélange de types de fermentation butyrate et éthanol propice à la production d'hydrogène.

Globalement, pour un procédé de fermentation sombre robuste, il est nécessaire d'apporter une proportion en PCJ d'au moins de 21% dans la fraction fermentescible des ordures ménagères. Une quantité plus importante en PCJ ne va pas impacter la fermentation sombre dans son ensemble.

5. Conclusion de l'optimisation de la fermentation sombre dans le but de créer un procédé à deux étapes pour la production de biohythane

Au cours de ce chapitre, il a été montré que le rendement d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte était clairement influencé par de nombreux facteurs physico-chimiques. En effet, chaque facteur étudié (azote ammoniacal, force ionique, température, pH, siccité, composition des déchets) a permis d'évaluer l'impact qu'ils pouvaient avoir sur le procédé de fermentation sombre. Dans le but de réaliser un procédé industriel de production de biohythane, l'optimisation de la fermentation sombre doit être étudiée soigneusement afin d'améliorer de façon conséquente le rendement en hydrogène et en métabolites produits tout en réduisant au minimum le coût de production.

Durant la première étude, il a été démontré que la force ionique du milieu de fermentation jouait un rôle important sur l'inhibition de la production d'hydrogène. Contrairement à ce qui est généralement étudié, nous avons montré que l'ensemble des ions pouvaient jouer un rôle global sur l'inhibition de l'activité microbienne. De plus, afin de faciliter cette analyse au niveau industriel, nous avons mis en évidence que la conductivité était un moyen facile et peu coûteux pour identifier cette inhibition. Un seuil critique d'inhibition de la production d'hydrogène correspondant à une baisse du rendement de 50% a été détecté à 55,6 mS/cm, permettant ainsi de suivre et d'anticiper l'état de fonctionnement du réacteur de fermentation.

A l'aide d'un plan d'expérience, une deuxième étude a permis de connaître la gamme des conditions opératoires à fixer pour optimiser le rendement en hydrogène et en métabolites. Cette étude a mis en évidence que, sur les différents facteurs étudiés (température, pH, TAN et siccité) dans les gammes fixées, seules la siccité et la concentration en azote ammoniacal avaient un impact significatif sur le rendement en hydrogène. Pour une production d'hydrogène optimale, il a été montré qu'une siccité et une concentration en azote ammoniacal aux alentours de 11,5% et 5 g/L devaient être initialement fixées. La concentration initiale en azote ammoniacal dans le lixiviat étant de l'ordre de $4,0 \pm 0,8$ g/L, cela permet donc d'être dans une gamme privilégiée pour un rendement optimal d'hydrogène. Il a également été montré une forte robustesse du procédé vis-à-vis du pH

initial, avec un rendement en hydrogène identique pour un pH initial de 5, 6,5 ou 8 notamment causé par une chute rapide du pH aux alentours de 5,5 quel que soit le pH initial fixé. Concernant la température, le plan d'expérience n'a montré aucune différence sur le rendement en hydrogène. Cependant, à 55°C une forte probabilité de production de méthane a été observée. De plus, l'analyse des AGVs produits a mis en évidence qu'une diminution de la production de métabolites est en lien à une augmentation de la température de fermentation. Une température de 37°C est donc privilégiée pour un meilleur rendement en AGVs.

Enfin, la troisième étude a permis de montrer que la proportion de déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin dans la fraction fermentescible des ordures ménagères (21, 35, 44, 51 et 56%) ne permettait pas d'augmenter directement le rendement en hydrogène mais jouait un rôle de tampon afin de stabiliser le pH autour d'une valeur propice à la production d'hydrogène $6,2 \pm 0,2$. En effet, sans ce type de déchets dans l'alimentation, le pH de la solution chute ($4,6 \pm 0,3$) et une production importante de lactate est observée causant un faible rendement en hydrogène. Le calcul du biohythane produit grâce au procédé de fermentation sombre a montré une valeur moyenne à $58 \pm 3 \text{ mL CH}_4/\text{gMV}$ avec un $\text{H}_2/(\text{H}_2 + \text{CH}_{4\text{théorique}})$ de $44 \pm 2\%$.

Lors de ces différentes études, l'analyse des résultats a montré que l'hydrogène pouvait potentiellement être consommé par le phénomène d'homoacétogénèse. En effet, en moyenne, les ratios $\text{H}_2/(2x[\text{Bu} + \text{Ac}])$ pour les conditions optimales de la fermentation sombre ont été observés à $0,38 \pm 0,17$ ce qui nous fait penser qu'une partie de l'hydrogène est consommée. Cependant, ce phénomène a relativement peu d'impact au final car l'acétate potentiellement produit va permettre, à terme, de produire rapidement du méthane dans un second réacteur.

Les conditions opératoires optimales ayant été étudiées, il est néanmoins nécessaire d'intégrer ce réacteur de fermentation dans un procédé plus complet, se rapprochant du procédé à deux étapes pour la production de biohythane. Dans cette optique, le chapitre suivant va consister à étudier la robustesse et la stabilité du procédé de fermentation dans un contexte de couplage.

Chapitre IV : Robustesse et stabilité du procédé de fermentation dans le cadre d'un couplage avec un réacteur de méthanisation

1. Problématique et objectif du chapitre

Dans l'objectif de réaliser un procédé de production de biohydrogène à l'échelle industrielle, le procédé de fermentation doit être étudié dans sa globalité. Dans ce sens, une étude plus poussée du procédé de fermentation en prenant en compte notamment la recirculation de l'effluent a été mise en œuvre et est présentée dans ce chapitre.

En effet, la recirculation de l'effluent dans le réacteur de fermentation permettrait un apport d'eau ainsi que d'une communauté microbienne adaptée au substrat pour une production optimale d'hydrogène. L'étude de Zhang et al., (2007) a notamment montré le bénéfice de la recirculation d'effluents issus d'un méthaniseur sur un réacteur d'hydrolyse, qui permettait d'améliorer l'activité des enzymes excrétées par les microorganismes hydrolytiques [86]. Cependant, la recirculation de l'effluent peut également entraîner l'accumulation de plusieurs composés inhibiteurs, comme les AGVs de divers ions ou encore le développement de microorganismes consommateurs d'hydrogène (homoacétogènes, archées méthanogènes). Concernant la présence d'archées méthanogènes, celle-ci a déjà été révélée dans le chapitre précédent et nous incite à penser qu'une recirculation de l'effluent peut favoriser la consommation de l'hydrogène accumulé. Dans cette partie, la sélection d'un traitement thermique optimal dans un procédé de recirculation de l'effluent a été étudiée en essayant de trouver un compromis entre l'efficacité du traitement thermique et le coût d'un tel traitement.

De plus, le changement d'échelle peut être un facteur limitant la production d'hydrogène notamment en lien avec la configuration du réacteur. En effet, la variation l'espace de tête ou le moyen de réguler la pression dans le réacteur et notamment la pression partielle en hydrogène peut entraîner une diminution de la production d'hydrogène [208]. La modification de la configuration du réacteur est donc un facteur à prendre en compte pour passer d'une échelle laboratoire à une échelle pilote puis industrielle.

Ce chapitre va donc s'intéresser dans une première partie, à l'étude de la recirculation de l'effluent dans le réacteur de fermentation avec une attention particulière sur le traitement thermique et la stabilité du procédé dans le temps. Une deuxième étude sera présentée

dans ce chapitre consistant à observer l'impact d'un changement d'échelle sur la production d'hydrogène et notamment via la configuration du réacteur.

2. Etude de la recirculation de l'effluent afin de réaliser des fermentations successives

2.1. Problématique et objectif

Le chapitre précédent a permis de déterminer les conditions opératoires optimales pour la production d'hydrogène. Dans l'optique d'optimiser la production de biohythane dans un système en 2 étapes, le procédé de fermentation choisi a dû être étudié dans sa globalité (voir Figure 39) : Dans ce mode de fonctionnement, le lixiviat issu de la percolation des bioréacteurs (digestion anaérobie) sur l'installation de Trifyl est introduit dans un réacteur de fermentation avec des déchets ménagers frais. A la fin de la fermentation, la fraction solide « prétraitée » est séparée de la fraction liquide (effluent). L'effluent subit alors une recirculation pour être réutilisé dans un nouveau cycle de fermentation. L'effluent est ainsi récupéré puis mélangé avec du lixiviat afin d'ajuster le volume total pour atteindre la siccité désirée dans le réacteur, et le tout est réintroduit dans le fermenteur avec de nouveaux déchets ménagers.

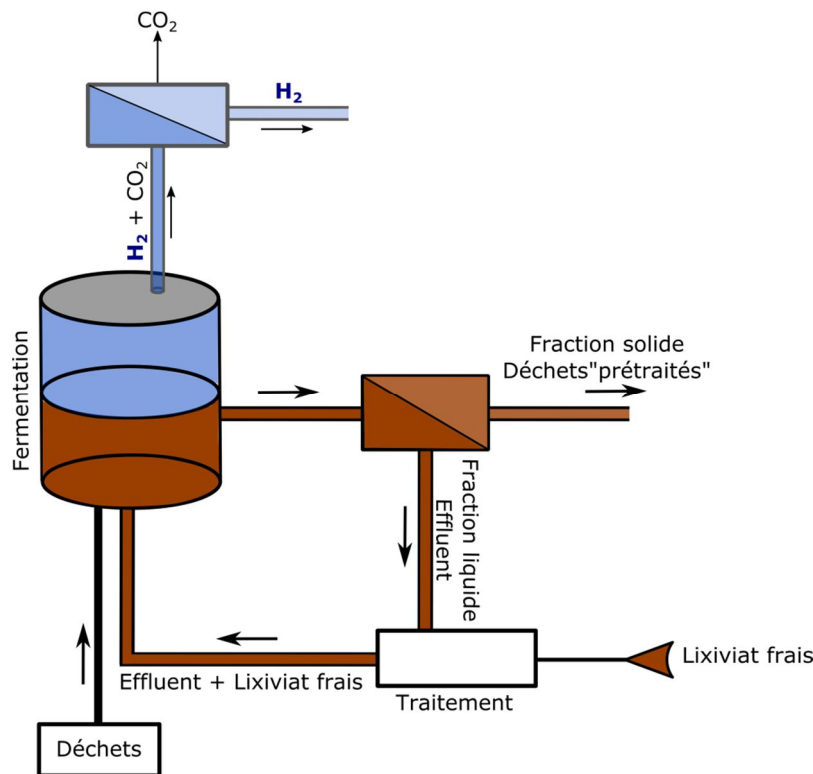


Figure 39 : Schéma du procédé de fermentation possédant une boucle de recirculation de l'effluent

Recycler de la fraction liquide (effluent) récupérée lors de l'étape de fermentation pour démarrer le batch suivant présente de nombreux avantages : En plus de la nécessité d'apporter une phase liquide aux déchets frais afin d'assurer une siccité optimale, la recirculation de l'effluent permet d'une part de sélectionner peu à peu des microorganismes fermentaires et hydrolytiques adaptés au substrat et, d'autre part, d'ajuster le pH pour stabiliser la production d'hydrogène dans le temps. Dans la littérature, la recirculation de l'effluent dans le réacteur de fermentation a déjà été rapporté comme bénéfique. Zhang et al. (2007) ont montré que la recirculation d'effluents issus d'un méthaniseur sur un réacteur d'hydrolyse permettait d'améliorer l'activité des enzymes excrétées par les microorganismes hydrolytiques [86]. L'étude de Bilgili et al. (2007) a montré quant à elle que la recirculation du lixiviat pouvait permettre d'ajuster le pH et d'accélérer le taux de dégradation du substrat de type FFOM dans un méthaniseur [209]. Zuo et al. (2013) ont également mis en avant le bénéfice d'un procédé de recirculation de l'effluent issu d'un réacteur de méthanisation dans un fermenteur pour améliorer la productivité en hydrogène et réguler le pH [210].

Cependant, la recirculation de l'effluent peut aussi entraîner l'accumulation de plusieurs inhibiteurs au cours des cycles. En effet, le processus de fermentation sombre entraîne une production importante d'AGVs, qui engendre une diminution du pH du milieu réactionnel et causer après plusieurs cycles une forte perturbation de la production d'hydrogène [51]. La recirculation de l'effluent peut aussi entraîner une accumulation d'azote ammoniacal liée à la dégradation de l'azote organique des déchets, causant alors une augmentation de la force ionique et donc à terme une inhibition de l'activité microbienne. Pour illustrer ce dernier point, Chinellato et al. (2013) ont montré, dans un réacteur continu de fermentation en utilisant des déchets alimentaires avec un procédé de recirculation de l'effluent, une accumulation d'azote ammoniacal jusqu'à 3,3 g/L. Lors de cette étude, un réacteur à deux étapes pour la production de biohydrogène a été utilisé, et l'effluent en sortie du méthaniseur était recirculé dans le réacteur de fermentation afin de réguler le pH aux alentours de 5,5 [2]. Plus globalement et comme observé dans le chapitre précédent, « *Impact de l'azote ammoniacal et de la force ionique sur la fermentation sombre* », la recirculation d'un effluent pourrait causer une augmentation de la charge totale des ions présents dans le milieu réactionnel, et donc engendrer une inhibition de la force ionique sur la production d'hydrogène.

Enfin, la recirculation de l'effluent peut entraîner des limitations d'ordre biologique. En effet, comme il a été rapporté dans le chapitre précédent, les microorganismes réalisant l'homoacétogénèse semblent se développer au cours de la fermentation sombre, ce qui peut avoir un impact négatif sur le rendement final d'hydrogène. De plus, la présence d'archées méthanogènes observée dans le chapitre précédent peut être détectée après seulement quelques jours de fermentation. Par conséquent, si une recirculation de l'effluent est appliquée dans le but de réaliser un réacteur semi-continu, alors ces microorganismes consommateurs d'hydrogène peuvent potentiellement se développer et ainsi accroître leurs impacts négatifs sur le rendement en hydrogène. Toutefois, plusieurs prétraitements sont possibles afin de diminuer l'impact des archées méthanogènes et donc d'éviter la production de méthane comme un choc de pH, un prétraitement thermique ou un traitement chimique. La régulation du pH ou l'ajout de composés chimiques dans le milieu n'est pas favorable à l'échelle industrielle, donc le prétraitement thermique reste la méthode la plus convenable et la plus utilisée dans la littérature, ce traitement engendrant néanmoins un surcoût à l'échelle industrielle (surcoût qu'il est nécessaire de réduire au maximum).

Dans l'objectif d'élaborer un fonctionnement robuste et stable dans le temps (Figure 39), la problématique de ce chapitre a été d'étudier l'impact de la recirculation de l'effluent pour des fermentations successives avec une attention particulière sur la robustesse/stabilité du procédé et l'accumulation d'inhibiteurs connus (AGVS, ions). Plusieurs stratégies de recirculation des effluents ont alors été testées :

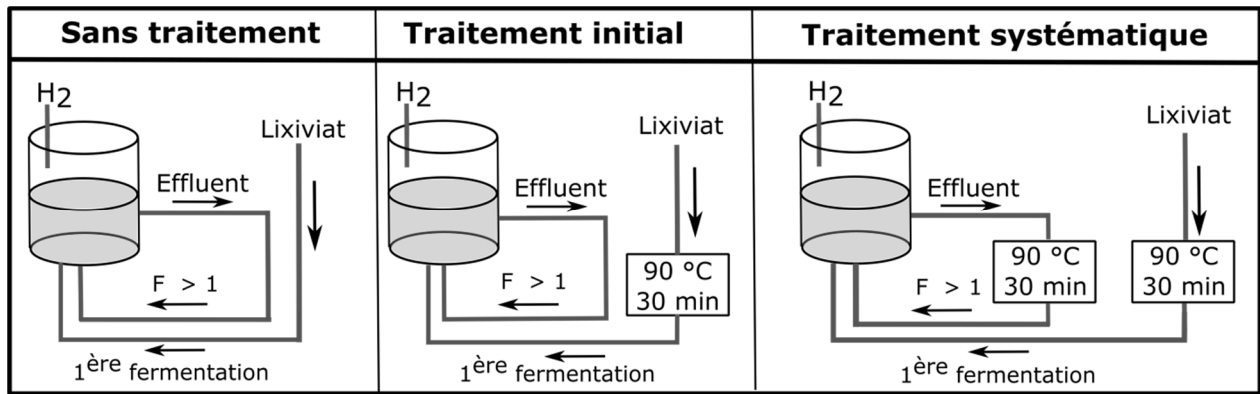
- 1/ recirculation directe de l'effluent (sans traitement),
- 2/ traitement thermique initial du lixiviat puis arrêt du traitement lors des cycles suivants, et
- 3/ traitement thermique systématique du lixiviat et de l'effluent en début de chaque cycle.

2.2. Déroulement de l'étude

Toutes les expériences ont été réalisées dans un réacteur de 6 litres. Chaque fermentation a été réalisée en mélangeant 3 litres d'inoculum (lixiviat frais ou mélange de lixiviat + effluent) et 663,6 g de déchets reconstitués (équivalent à 420,7 gMV) afin d'obtenir une siccité de 15% qui est proche de la valeur optimale (11,5 %) observée suite aux résultats précédents sur l'« *Etude des conditions optimales pour le procédé de fermentation sombre* », et qui permet un bon compromis avec un réacteur réalisable à l'échelle industrielle. Dans l'optique de réaliser des batchs successifs, l'effluent correspondant à la fraction liquide du digestat issue du fermenteur précédent a été collecté. A la fin de chaque fermentation, une quantité d'effluents se retrouvent absorbés par la FFOM, et l'effluent collecté n'est pas suffisant pour diluer la FFOM jusqu'à une siccité de 15% : il était donc nécessaire à chaque nouveau batch d'ajouter également du lixiviat, pour réajuster le volume d'inoculum à 3 litres. En effet, environ 50% de liquide introduit sont retenus à la fin de la fermentation par le substrat. La forte absorption de liquide par le substrat est notamment liée à la fraction de déchet de types papiers et cartons (présent à hauteur de 56% dans la FFOM utilisée) qui possèdent un fort pouvoir absorbant. Pour démarrer une fermentation, une dilution de 50% a donc été effectuée par l'ajout de lixiviat.

En accord avec les résultats présentés dans le Chapitre III, la température a été fixée à 37°C et aucune régulation du pH n'a été effectuée.

Tout d'abord, un réacteur témoin a été mis en œuvre et consistait à une recirculation de lixiviat frais et d'effluent, sans aucun prétraitement thermique de cet inoculum. Comme détaillé sur la Figure 40, deux modes de prétraitements thermiques ont par la suite été réalisés. Le premier mode de traitement (traitement initial) a consisté à traiter thermiquement le lixiviat une seule fois pour lancer le premier réacteur de fermentation. Puis, aucun traitement thermique n'a été effectué lors de la recirculation du mélange effluent et lixiviat frais. Enfin, le deuxième mode (traitement systématique) a consisté à traiter thermiquement la phase liquide avant chaque fermentation. Tous les traitements thermiques ont été réalisés à une température de 90°C pendant 30 minutes.



F > 1 : Recirculation de l'effluent pour les fermentations successives

Figure 40 : Schéma de l'étude de la recirculation de l'effluent par différentes méthodes de traitement thermique (90°C, 30 min)

Six réacteurs batchs consécutifs ont été mis en œuvre pour les expériences « sans traitement » et avec « traitement initial », ce qui correspond à 5 recirculations de l'effluent. Concernant l'expérience avec un « traitement systématique », 16 batchs consécutifs ont été réalisés (soit l'équivalent de 15 recirculations de l'effluent).

2.3. Résultats de la robustesse et stabilité de la recirculation de l'effluent

2.3.1. Impact de la recirculation de l'effluent sans traitement

La première partie de cette étude a consisté à étudier l'effet de la recirculation de l'effluent sur des fermentations successives sans traitement de l'inoculum.

2.3.1.1. Production d'hydrogène

La Figure 41 représente les rendements en hydrogène obtenus pour les 6 batchs successifs. Le rendement maximal en hydrogène a été observé lors de la première fermentation avec une valeur de 18,8 mLH₂/gMV. Une forte variabilité a ensuite été observée lors de la 2^{ème} et 3^{ème} fermentation avec un rendement de 10,8 mLH₂/gMV et 15,9 mLH₂/gMV, respectivement. Enfin, à partir du 4^{ème} batch (3^{ème} recirculation de l'effluent), une diminution du rendement en hydrogène a été observée jusqu'à la 6^{ème} fermentation (0,43 mLH₂/gMV).

D'après ces résultats, l'absence d'un traitement thermique de l'inoculum a conduit à une diminution graduelle et rapide du rendement en hydrogène. Il peut en être alors conclu que ce mode de fonctionnement ne permettait pas une production stable d'hydrogène au cours des cycles. En effet, le meilleur rendement a été observé lors de la première fermentation (18,8 mLH₂/gMV). En comparaison avec la littérature, cette valeur est sensiblement plus faible que celle reportée par Pan et al. (2008) ou Elbeshbishy et al. (2011) qui ont utilisé des réacteurs batchs sans prétraitement thermique et un pH fixé à 5,5 (39 et 40 mLH₂/gMV, respectivement), ces performances dépendant toutefois de la composition du substrat et de l'inoculum utilisé [107,211].

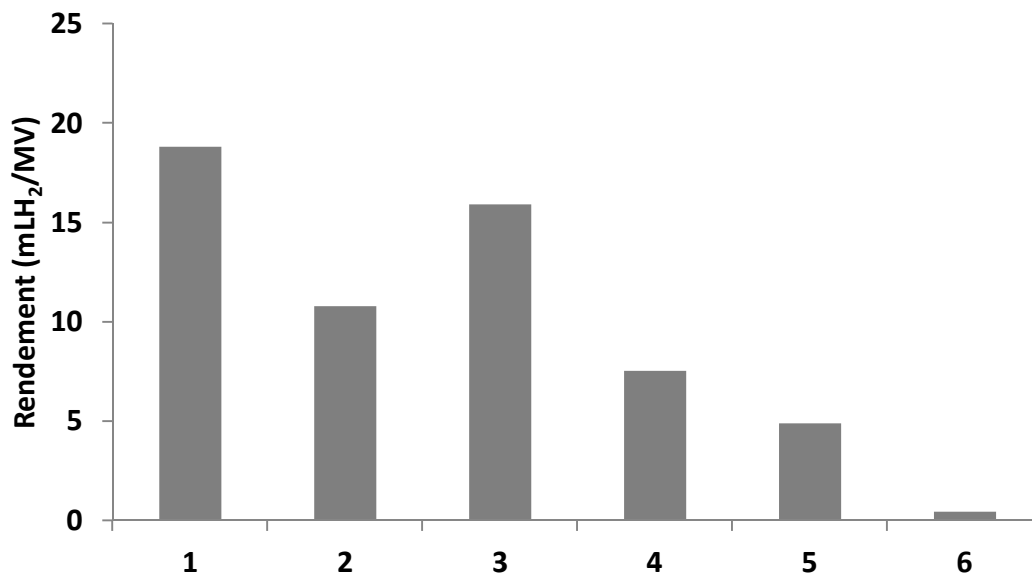


Figure 41 : Rendement en hydrogène obtenu lors des différentes fermentations avec recirculation de l'effluent sans traitement thermique

Le Tableau 37 présente des informations sur la production d'hydrogène et de méthane : le temps de latence correspondant au début de la production d'hydrogène, le temps pour atteindre le point de production maximale d'hydrogène, la vitesse de production maximale d'hydrogène et le temps de latence correspondant au début de la production de méthane. En effet, lors de cette expérience sans traitement thermique, une production de méthane a été observée.

Tableau 37 : Analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production maximale) et de méthane (temps de latence)

| | Temps de latence H ₂ (heures) | Temps production maximale H ₂ (heures) | Vitesse de production (mLH ₂ /gMV/h) | Temps d'apparition de CH ₄ (heures) |
|---|--|---|---|--|
| 1 | 22,4 | 29,7 | 0,79 | 50,7 |
| 2 | 8,03 | 22,8 | 0,57 | 79,8 |
| 3 | 6,98 | 15,1 | 1,23 | 42,1 |
| 4 | 7,55 | 14,7 | 0,68 | 17,7 |
| 5 | 4,47 | 12,0 | 0,20 | 12,0 |
| 6 | 8,98 | 20,1 | 0,03 | 8,1 |

D'après ce tableau, le temps de latence avant le début de production d'hydrogène est le plus élevé lors de la première fermentation (22,4 heures) ; puis, pour les fermentations suivantes, le temps de latence en hydrogène est plus court avec une moyenne de $7,2 \pm 1,7$ heures (le rendement lors de la dernière fermentation étant proche de 0, celui-ci n'a pas été pris en compte). Le temps le plus long avant d'atteindre la production maximale en hydrogène a également été observé pour la première fermentation (29,7 heures), puis cette valeur a tendance à diminuer jusqu'à atteindre 12,0 heures pour la 5^{ème} fermentation. Cette observation met en évidence un effet d'adaptation au substrat par l'enrichissement de microorganismes adaptés au milieu et productrices d'hydrogène. Ce temps de latence est plus faible que les valeurs reportées dans la littérature ce qui montre l'influence d'une recirculation sur la rapidité de production d'hydrogène sur la sélection de microorganismes spécifiques. En effet, Elbeshbishy et al. (2011) ont observé un temps de latence de 16,3 heures sans utiliser de prétraitements ; dans cette étude, le pH était non tamponné et initialement à 5,5 à une température de 37°C avec des déchets alimentaires comme substrat [211].

Concernant la vitesse de production d'hydrogène, celle-ci est variable au cours des fermentations avec un maximum observé à 1,23 mLH₂/gMV/h pour la fermentation 3 et atteint 0,03 mLH₂/gMV/h pour la fermentation 6 lorsqu'une très faible production d'hydrogène est observée.

Lors de cette expérience, le temps pour atteindre la production maximale d'hydrogène est également réduit lorsqu'une recirculation de l'effluent est effectuée. Il diminue de 29,7 heures (fermentation 1) à 12 heures (moyenne sur les fermenteurs 2 à 5) soit une baisse de 60% ce qui met en évidence une amélioration de la vitesse moyenne du temps de production. Cette donnée est intéressante d'un point de vue industriel, car la réduction du temps de réaction impacte sur le temps moyen passé dans le réacteur et donc le coût de production d'hydrogène.

Cependant une apparition de méthane a été observée dans chaque fermentation. Lors de la première fermentation, le temps de latence avant apparition de méthane a été observé à 50,7 heures soit 21 heures après le pic de production d'hydrogène. Curieusement, ce temps avant apparition de méthane augmente lors de la 2^{ème} fermentation avec un temps de 79,8 heures. Puis, pour les fermentations suivantes une diminution nette de cette valeur a été observée entre la 3^{ème} (42,1 heures) et la 6^{ème} fermentation (8,1 heures). Nous pouvons également noter que le temps de latence avant apparition du méthane est relativement proche du temps correspondant à la production maximale d'hydrogène à partir de la 4^{ème} fermentation où une différence de seulement 3 heures a été observée entre ces deux valeurs. Au cours de la 5^{ème} fermentation, ces deux temps sont confondus ce qui va avoir pour conséquence une forte consommation de l'hydrogène pour la production de méthane et donc engendrer un faible rendement en hydrogène comme observé dans notre étude. D'après ces premiers résultats, la diminution importante du rendement en hydrogène peut donc être corrélée avec l'apparition de méthane, ce qui confirme la nécessité d'effectuer un traitement thermique sur l'effluent [212].

2.3.1.2. Production de métabolites

La Figure 42 représente le rendement en métabolites (biogaz et composés solubles) mesurée à la fin de chaque fermentation (6 jours).

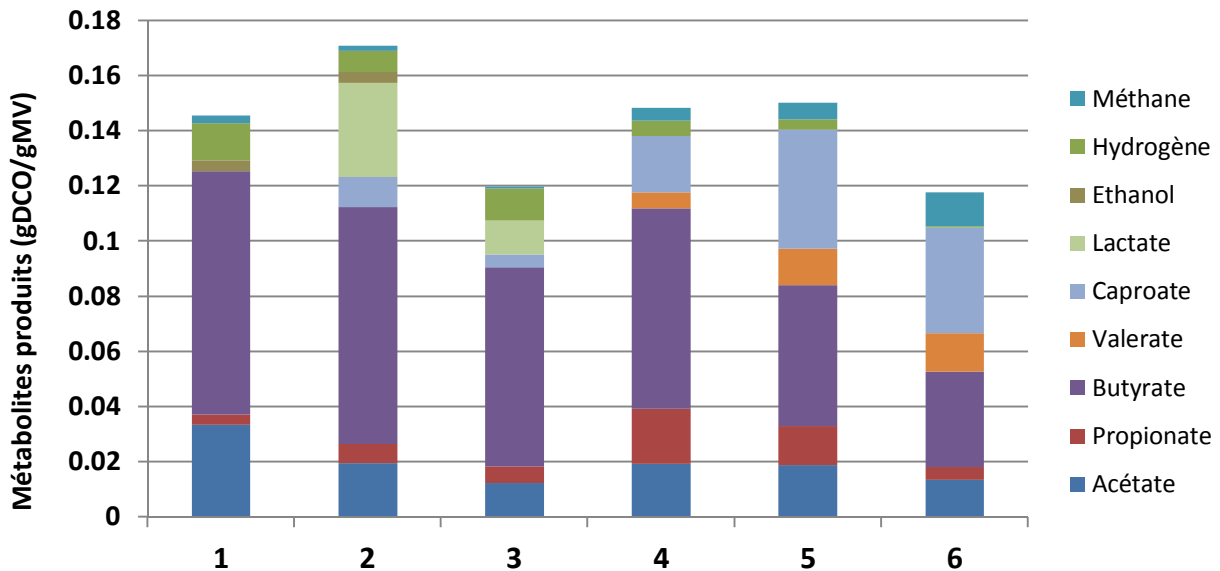


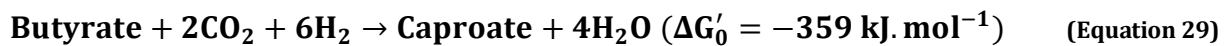
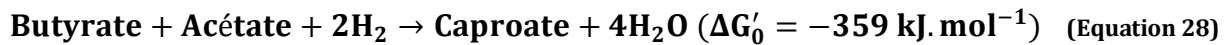
Figure 42: Rendement en métabolites (gDCO/gMV) observée dans chaque fermentation lors d'une recirculation de l'effluent sans traitement thermique

La quantité totale de métabolites la plus faible a été observée lors de la troisième fermentation avec une valeur de 130 mgDCO/gMV. De façon intéressante, suite à la première recirculation, le rendement en métabolites dans les différents réacteurs de fermentation reste stable avec une moyenne de 144 ± 20 mgDCO/gMV. Concernant la répartition des métabolites produits, le métabolite majoritaire observé a été le butyrate avec un maximum observé lors de la 1^{ère} fermentation (88 mgDCO/gMV), néanmoins à partir de la 4^{ème} fermentation, le rendement en butyrate diminue jusqu'à 34 mgDCO/gMV lors de la 6^{ème} fermentation.

De manière intéressante, lors des fermentations 2 et 3, une apparition importante de lactate a été observée avec des rendements de l'ordre de 30 mgDCO/gMV. Il est également possible de remarquer que la recirculation de l'effluent a tendance à faire augmenter le rendement de caproate et de valérate dans le milieu (valeur maximale de 40 et 14 mgDCO/gMV pour la 5^{ème} et 6^{ème} recirculation respectivement) et qui représentent jusqu'à 41% des métabolites

totaux produits lors de la 6^{ème} fermentation. De plus, lors de cette étude, après la 3^{ème} fermentation, c'est-à-dire la 4^{ème} recirculation de l'effluent, un shift a été observé avec une augmentation constante du caproate et du valérate et une diminution du rendement en butyrate

D'après la littérature, le valérate et le caproate utilisent des voies non productrices d'hydrogène et sont donc concurrentes à la production d'hydrogène [67]. De plus, la production de caproate peut également être effectuée via une voie de consommation d'hydrogène et de butyrate ce qui pourrait expliquer la diminution du butyrate observée (équation 28 et 29). Ce shift est également observé sur le rendement en hydrogène avec une diminution de celui-ci à partir de la 4^{ème} fermentation ce qui confirme nos observations.



D'après ces résultats, la recirculation de l'effluent sans traitement thermique semble donc être stable pour la production d'hydrogène mais seulement sur les trois premières fermentations. Puis la recirculation de l'effluent au-delà de la 3^{ème} recirculation va entraîner une baisse du rendement en hydrogène causée par un environnement limitant le rendement d'hydrogène par reconsommation de l'hydrogène produit.

Le Tableau 38 présente, pour l'ensemble des expériences, la conductivité finale, les pH initiaux et finaux ainsi que les ratios Bu/Ac et $\text{H}_2/(2x(\text{Bu}+\text{Ac}))$. Les ratios Bu/Ac et $\text{H}_2/(2x(\text{Bu}+\text{Ac}))$ ont été calculés à partir des métabolites produits lors de chaque fermentation, en réalisant un bilan matière entre les métabolites solubles mesurés en début et en fin d'expérience.

Tableau 38 : Analyse de la fermentation sombre sur la conductivité, le pH initial et final ainsi que le ratio Bu/Ac et $H_2/(2 \times [Bu+Ac])$

| | Conductivité (mS/cm) | pH _{initial} | pH _{final} | Bu/Ac (mol/mol) | $\frac{(H_2)}{(2 \times [Bu + Ac])}$ (mol/mol) |
|---|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---|
| 1 | 24 | 7,6 | 5,0 | 1,05 | 0,39 |
| 2 | 26 | 6,3 | 5,5 | 1,76 | 0,29 |
| 3 | 27 | 7,6 | 5,8 | 2,31 | 0,55 |
| 4 | 30 | 6,8 | 5,4 | 1,50 | 0,22 |
| 5 | 31 | 7,3 | 5,1 | 1,08 | 0,18 |
| 6 | 25 | 7,7 | 5,4 | 1,01 | 0,02 |

Tout d'abord, lors des 6 fermentations successives, la conductivité, le pH_{initial} et le pH_{final} sont restés stables avec des valeurs moyennes de $27,2 \pm 2,8$ mS/cm, $7,2 \pm 0,6$ et $5,4 \pm 0,3$ respectivement.

D'après les résultats du ratio Bu/Ac, la 1^{ère}, 5^{ème} et 6^{ème} fermentation présente un ratio proche de 1 (1,05, 1,08 et 1,01 respectivement) ce qui correspond à une production égale de butyrate et d'acétate. Cependant, pour les autres réacteurs, une production plus importante de butyrate que d'acétate a été observée avec une valeur moyenne de $1,86 \pm 0,40$.

Concernant le ratio $H_2/(2x[Bu+Ac])$, celui-ci possède une valeur moyenne de $0,28 \pm 0,18$ mol/mol (ratio inférieur à 1), ce qui suggère que si l'hydrogène est produit seulement via les voies acétate et butyrate, alors celui-ci est consommé au cours de la fermentation. De plus, le procédé de recirculation va avoir tendance à faire diminuer ce ratio. En effet, ce ratio passe de 0,39 à la 1^{ère} fermentation à 0,02 à la fermentation 6 ce qui suggère une augmentation de la consommation de l'hydrogène au cours des recirculations successives. Cette observation peut être en partie expliquée par l'apparition de plus en plus rapide de méthane. Toutefois les ratios calculés sont difficiles à interprétés. En effet, lors de la fermentation, d'autres voies de consommations peuvent être empruntées comme la voie de production de caproate ,comme discuté précédemment, ou encore par homoacétogénèse (accumulation d'acétate) ce qui va faire réduire le ratio $H_2/(2x[Bu+Ac])$. Cependant, dans les études précédentes, lorsque le phénomène d'homoacétogénèse semblait être observé (pas de méthane ou caproate), alors le ratio Bu/Ac montrait une forte proportion d'acétate (ratio significativement inférieur à 1) ce qui confirmait notre hypothèse. Or, dans cette étude, le

ratio Bu/Ac reste supérieur à 1 ce qui suggère que la consommation d'hydrogène semble bien être liée à la production de méthane

D'après ces résultats, la production de métabolites dans les différentes fermentations avec une recirculation de l'effluent sans traitement thermique a été observé comme stable dans le temps sans diminution de l'activité microbienne, sur les trois premiers cycles. Cependant, à partir de la 4^{ème} fermentation un shift dans les métabolites produits a été observé ce qui explique la diminution du rendement en hydrogène observée précédemment. Un procédé de recirculation de l'effluent sans traitement thermique ne semble donc pas efficace pour obtenir une production d'hydrogène continue.

2.3.2. Impact de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique initial

La première partie de cette étude a donc montré, une diminution du rendement en hydrogène liée à une apparition de méthane et une modification des métabolites produits quand le lixiviat et l'effluent n'étaient pas traités thermiquement. La deuxième partie de l'étude a donc consisté à étudier l'effet de la recirculation de l'effluent sur des fermentations successives en réalisant un traitement thermique (90°C pendant 30 min) initial du lixiviat (inoculum) avant la première fermentation, et ce afin de limiter le traitement thermique et donc réduire le surcoût engendré par un tel procédé.

2.3.2.1. Production d'hydrogène

La Figure 43 présente le rendement en hydrogène mesuré lors des fermentations successives. Le rendement en hydrogène le plus élevé a été observé lors de la première fermentation (10,5 mLH₂/gMV). Cette valeur est inférieure mais du même ordre de grandeur que le rendement maximal obtenu lors de l'expérience précédente sans traitement thermique (18,8 mLH₂/gMV). En comparaison, Favaro et al. (2013) ont rapporté une production de 23,4 mLH₂/gMV en utilisant un traitement thermique (100°C pendant 4 heures) à pH 7 et de la fraction fermentescible des ordures ménagères comme substrat dans le cas d'une fermentation dans un batch unique [71]. Au cours des fermentations suivantes,

une diminution graduelle du rendement en hydrogène a été observée jusqu'à seulement 2,6 mLH₂/gMV lors de la 6^{ème} fermentation. Ce résultat met en avant le faible bénéfice d'un traitement thermique initial unique car les tendances sont proches de celles du mode de fonctionnement sans traitement thermique.

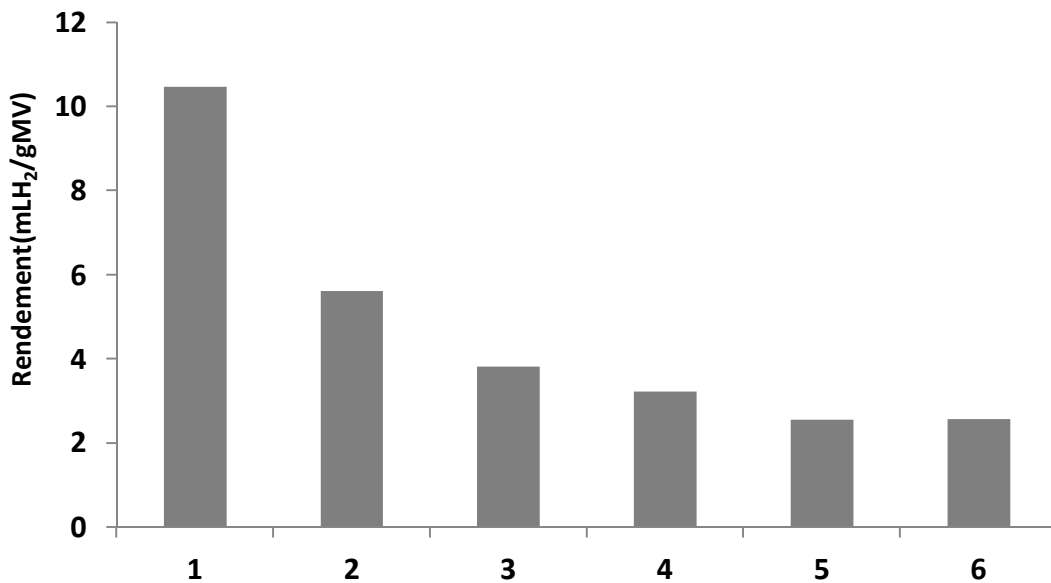


Figure 43 : Rendement en hydrogène obtenu lors des différentes fermentations avec recirculation de l'effluent subissant un traitement thermique seulement avant la 1^{ère} fermentation

Le Tableau 39 présente des informations sur la production d'hydrogène et de méthane : le temps de latence correspondant au début de la production d'hydrogène, le temps pour atteindre le point de production maximale d'hydrogène, la vitesse de production maximale d'hydrogène et le temps correspondant au début de la production de méthane. En effet, lors de cette expérience sans traitement thermique, une production de méthane a également été observée.

Tableau 39 : Analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production) et de méthane (temps de latence)

| | Temps de latence H ₂ (heure) | Temps production maximal H ₂ (heure) | Vitesse de production (mLH ₂ /gMV/h) | Temps d'apparition CH ₄ (heure) |
|---|---|---|---|--|
| 1 | 25,3 | 31,9 | 0,36 | 127,9 |
| 2 | 7,0 | 16,0 | 0,36 | 12,3 |
| 3 | 4,3 | 12,0 | 0,33 | 16,0 |
| 4 | 6,8 | 16,0 | 0,25 | 16,0 |
| 5 | 10,3 | 16,0 | 0,20 | 12,0 |
| 6 | 10,0 | 16,0 | 0,27 | 12,0 |

Le temps de latence avant la production d'hydrogène le plus long a été observé lors de la première fermentation : il est égal à 25,3 heures, ce qui est proche du temps mesuré lors de la première expérience sans traitement de l'inoculum (22,4 heures) ce qui met en évidence le faible impact du traitement thermique sur l'activité microbienne initiale.

Comme dans le cas de la stratégie de recirculation précédente, le temps correspondant à la production maximale d'H₂ diminue avec le nombre de recirculation. En effet, lors de la première fermentation, ce temps caractéristique est de 31,9 heures puis diminue jusqu'à atteindre une moyenne de 15,2±1,8 heures à partir de la deuxième fermentation. Cette observation montre un effet d'adaptation au substrat par l'enrichissement de microorganismes adaptés au milieu et productrice d'hydrogène comme observé précédemment.

Concernant la vitesse maximale de production d'hydrogène, la valeur semble diminuer avec le nombre de recirculations : la vitesse maximale est de 0,36 mLH₂/gMV/h pour les 1^{ère} et 2^{ème} fermentations, puis diminue jusqu'à 0,20 mLH₂/gMV/h pour la fermentation 5.

Lors de la première fermentation, l'apparition de méthane est observée plus tardivement que le temps observé pendant la première fermentation de l'expérience précédente sans traitement thermique (127,9 heures contre 50,7 heures) : ce résultat met en évidence que le traitement thermique possède un impact important sur la communauté méthanogène. Le traitement thermique appliqué (90°C pendant 30 min) a ainsi permis, comme attendu, de sélectionner les microorganismes sporulantes et perturber le développement des microorganismes non-sporulantes productrices de méthane [70].

Néanmoins, suite aux recirculations, le temps de latence avant apparition de méthane diminue pour atteindre des valeurs de 12 à 16 heures. Par conséquent, dès la 2^{ème} fermentation, les temps de production maximale d'hydrogène et d'apparition de la production de méthane sont proches voire identiques. En effet, une production de méthane est observée très tôt dès le deuxième batch (23,3 heures), ce qui démontre que la méthode du traitement unique n'a pas eu d'impact sur les archées méthanogènes sur les fermentations suivantes. Luo et al. (2010) ont déjà montré que le traitement thermique (90°C pendant 1 heure) ne présentait que des effets à court terme sur la production d'hydrogène ce qui est en accord avec les résultats de cette expérience [80].

2.3.2.2. Production de métabolites

La Figure 44 représente le rendement en métabolites mesuré à la fin des différentes fermentations. Ces résultats montrent que la répartition des métabolites a évolué avec une tendance identique en lien avec les recirculations successives exceptée pour la fermentation 5. Tout d'abord, à la fin de la première fermentation, les deux métabolites majoritaires sont l'acétate (60 mgDCO/gMV) et le butyrate (80 mgDCO/gMV), et correspondent à 86% de l'ensemble des métabolites produits. Ensuite, la recirculation de l'effluent entraîne une diminution de la concentration en acétate et butyrate avec une baisse de 50 % entre la 1^{ère} et la 4^{ème} fermentation. A contrario, une accumulation de lactate a été observée jusqu'à atteindre un maximum de 60 mgDCO/gMV lors de la 4^{ème} fermentation.

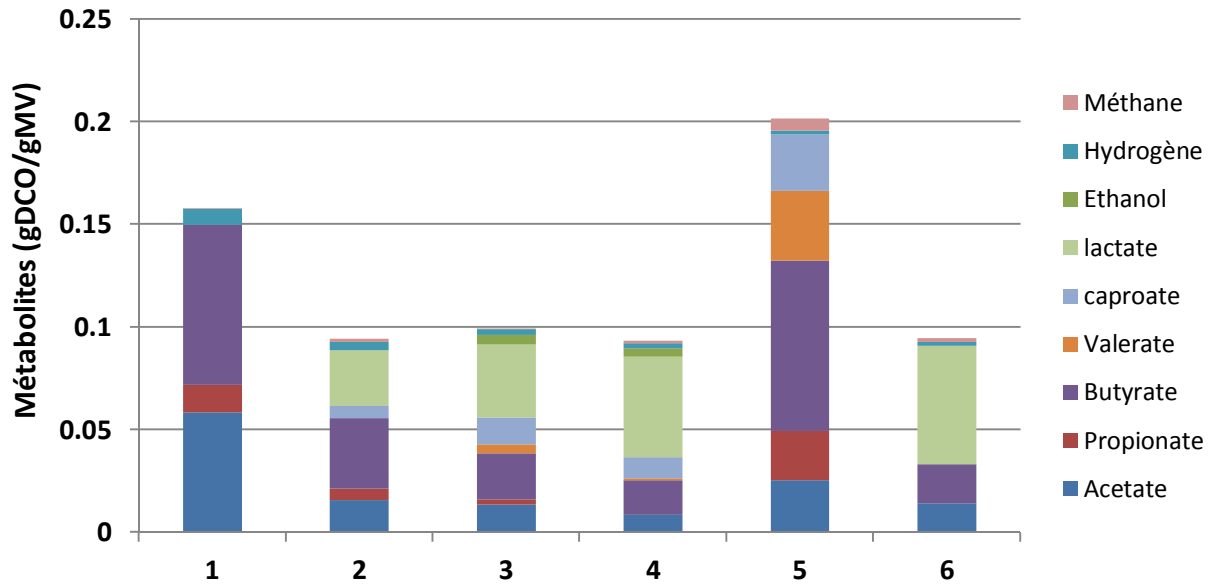


Figure 44 : Concentration en métabolites (gDCO/gMV) observée dans chaque fermentation lors d'une recirculation de l'effluent avec un traitement thermique seulement avant la 1^{ère} fermentation

L'analyse des métabolites présents en fin de la 5^{ème} fermentation montre une forte différence avec une augmentation importante de butyrate (80 mgDCO/gMV), de valérate (30 mgDCO/gMV) et de caproate (40 mgDCO/gMV). L'analyse de la 5^{ème} fermentation, bien que réalisée plusieurs fois peut être potentiellement expliquée par une erreur soit d'analyse soit d'échantillonnage. Par la suite, l'analyse des métabolites en fin de 6^{ème} fermentation montre une tendance identique aux fermentations 1 à 4 avec une forte concentration en acétate, butyrate et lactate. Comme observé précédemment, la diminution du rendement en butyrate, qui est une voie privilégiée pour la production d'hydrogène, est en lien avec la diminution du rendement en hydrogène ce qui confirme nos observations. De plus, le rendement en lactate augmente suivant les recirculations de l'effluent. Le lactate est connu comme un métabolite intermédiaire dont les voies réactionnelles utilisées pour sa production ne sont pas productrices d'hydrogène : la production de lactate est cependant régulièrement observée lors de la fermentation sombre [68]. Ce métabolite est essentiellement produit par les lactobacilles regroupant les membres des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ou encore *Lactococcus*. Outre le fait que sa voie de production est concurrente à la production d'hydrogène, les espèces telles que *Lactobacillus* ont tendance à sécréter des bactériocines dans le milieu qui peuvent être stressantes pour les clostridies et

engendrer une modification des voies réactionnelles avec une diminution de la production d'hydrogène [69].

Le Tableau 40 présente pour l'ensemble des expériences, la conductivité finale, les pH initiaux et finaux ainsi que les ratios Bu/Ac et $H_2/(2x(Bu+Ac))$. D'après ce tableau, la conductivité, les pH initiaux et finaux sont stables dès la 2^{ème} fermentation, et les valeurs moyennes (22 ± 3 mS/cm, $7,3\pm 0,8$ et $5,4\pm 0,5$, respectivement) sont proches de celle de l'expérience précédente. Le pH initial élevé correspond au pH du lixiviat frais utilisé lors de cette étude.

Tableau 40: Analyse de la fermentation sombre sur la conductivité, le pH initial et final ainsi que le ratio Bu/Ac et $(H_2)/(2x[Bu+Ac])$

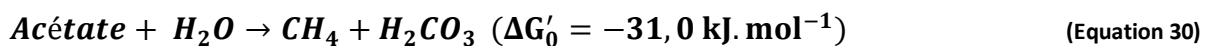
| | Conductivité (mS/cm) | pH _{initial} | pH _{final} | Bu/Ac (mol/mol) | $\frac{(H_2)}{(2 \times [Bu + Ac])}$ (mol/mol) |
|---|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---|
| 1 | 29 | 8,9 | 6,3 | 0,53 | 0,17 |
| 2 | 22 | 7,1 | 5,3 | 0,88 | 0,27 |
| 3 | 21 | 6,8 | 5,1 | 0,66 | 0,24 |
| 4 | 20 | 6,8 | 5,0 | 0,78 | 0,30 |
| 5 | 22 | 6,7 | 5,7 | 1,30 | 0,06 |
| 6 | 21 | 7,3 | 5,2 | 0,46 | 0,41 |

Pour estimer les ratios Bu/Ac et $(H_2)/(2x(Bu+Ac))$, seuls les métabolites effectivement produits lors des fermentations ont été pris en compte. Concernant le ratio Bu/Ac, seule la 4^{ème} fermentation a observé un ratio supérieur à 1 (1,30) ce qui met en évidence une production supérieure en butyrate lors de cette fermentation. Cependant, pour les autres fermentations, l'acétate est majoritairement produit par rapport au butyrate avec une moyenne de $0,59\pm 0,29$ ce qui est à l'opposé du résultat obtenu lors de l'expérience précédente avec un ratio Bu/Ac moyen de $1,45\pm 0,52$.

Lors de cette expérience, des ratios $(H_2)/(2x(Bu+Ac))$ très faibles ont été mesurés (valeur moyenne de $0,24\pm 0,12$) en lien avec la faible production d'hydrogène. Cette valeur est proche du ratio observé dans l'étude précédente ($0,28\pm 0,18$) ce qui montre une consommation constante d'hydrogène avec ou sans traitement thermique initial dans un procédé de recirculation. La production de méthane peut expliquer en partie le faible ratio observé. De plus, la forte proportion en acétate suggère qu'une consommation de

l'hydrogène par homoacétogénèse se soit produite notamment lors de la 1^{ère} fermentation qui possède un faible ratio Bu/Ac (0,53). Luo et al. (2011) ont en effet expliqué que 43% de l'acétate produit pouvait provenir de la voie consommatrice d'hydrogène après cinq batchs consécutifs [213]. Le traitement thermique effectué (90°C pendant 30 min) a ainsi permis de limiter la production de méthane lors de la 1^{ère} fermentation mais pas la consommation d'hydrogène par homoacétogénèse. D'après Alibardi et al. (2012) un traitement thermique à 100°C pendant 1 heure n'inhibe, en effet, pas complètement les groupes homoacétogènes et méthanogènes [214].

Entre la 2^{ème} et la 4^{ème} fermentation, le ratio $(H_2)/(2x(Bu+Ac))$ reste stable aux alentours de $0,27 \pm 0,03$. Lors de ces fermentations, une faible production de butyrate et une apparition de caproate a été observée ce qui suggère une consommation de l'hydrogène par la voie caproate. De plus, lors de ces fermentations, le ratio Bu/Ac est plus élevé que lors de la 1^{ère} fermentation ce qui peut être expliqué par une activité des homoacétogènes plus faible et donc corrélé à une production d'acétate plus faible que pendant la 1^{ère} fermentation. Une autre hypothèse serait de soulever le fait que l'acétate peut être consommé par méthanogénèse ce qui expliquerait également le faible ratio Bu/Ac (Equation 30).



Ces résultats mettent donc bien en évidence que la recirculation de l'effluent avec un seul traitement ne modifie pas le développement de la communauté consommatrice d'hydrogène mais peut néanmoins retarder l'apparition de méthane.

Un traitement unique au début du procédé de recirculation semble donc efficace sur les archées méthanogènes seulement lors de la première fermentation comme expliqué ci-dessus. Cette tendance est accentuée par le fait qu'une quantité importante de lixiviat frais est rajoutée à chaque nouvelle fermentation, causé par l'absorption élevée de l'effluent dans les déchets. Dans cette étude, la séparation en fin de fermentation entre la phase solide et la phase liquide (effluent) a été réalisée à l'aide d'un tamis. Cependant, une séparation plus poussée (exemple : centrifugation) pourrait permettre de récupérer une plus grande quantité d'effluents à recirculer, et ainsi réduire l'apport de lixiviat frais et donc d'archées méthanogènes dans le milieu. Cependant cette technique engendrerait un coût supérieur au niveau industriel. Une autre solution envisagée serait de traiter thermiquement

à chaque recirculation afin de potentiellement s'affranchir de l'inhibition causée par les archées méthanogènes.

2.3.3. Impact de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique

Un traitement thermique unique permet d'éviter l'apparition de méthane seulement lors de la première fermentation mais n'est pas efficace lors d'une recirculation de l'effluent comme observé dans l'étude précédente. La troisième partie de l'étude a donc consisté à étudier l'effet de la recirculation de l'effluent sur des fermentations successives en réalisant un traitement thermique systématique (90°C pendant 30 min) sur l'effluent et le lixiviat frais ajouté lors de chaque cycle de recirculation.

2.3.3.1. Production d'hydrogène

La Figure 45 représente le rendement en hydrogène obtenu au cours de 16 fermentations successives (soit 15 recirculations). De manière globale, aucune diminution significative du rendement en hydrogène n'a été observée dans ce cas, même avec l'augmentation du nombre de recirculations ce qui montre la nécessité d'un traitement thermique systématique. Au cours de ces fermentations successives, une production continue d'hydrogène a été observée avec une moyenne du rendement de $17,3 \pm 3,7$ mLH₂/gMV. Toutefois, le rendement en hydrogène fluctue entre 10,1 et 24,5 mLH₂/gMV. Koskinen et al. (2007) ont déjà rapporté que l'instabilité de la production d'hydrogène dans un réacteur continu pouvait être causée par la variation de la communauté microbienne et donc une modification des voies métaboliques utilisées [215]. Dans les réacteurs batch successifs, ce phénomène peut également expliquer la fluctuation observée entre les différentes fermentations. A titre de comparaison, le rendement minimal mesuré au cours de cette expérience est proche du rendement maximal observé lorsqu'un traitement thermique est appliqué uniquement pour lancer la 1^{ère} fermentation (10,5 mLH₂/gMV).

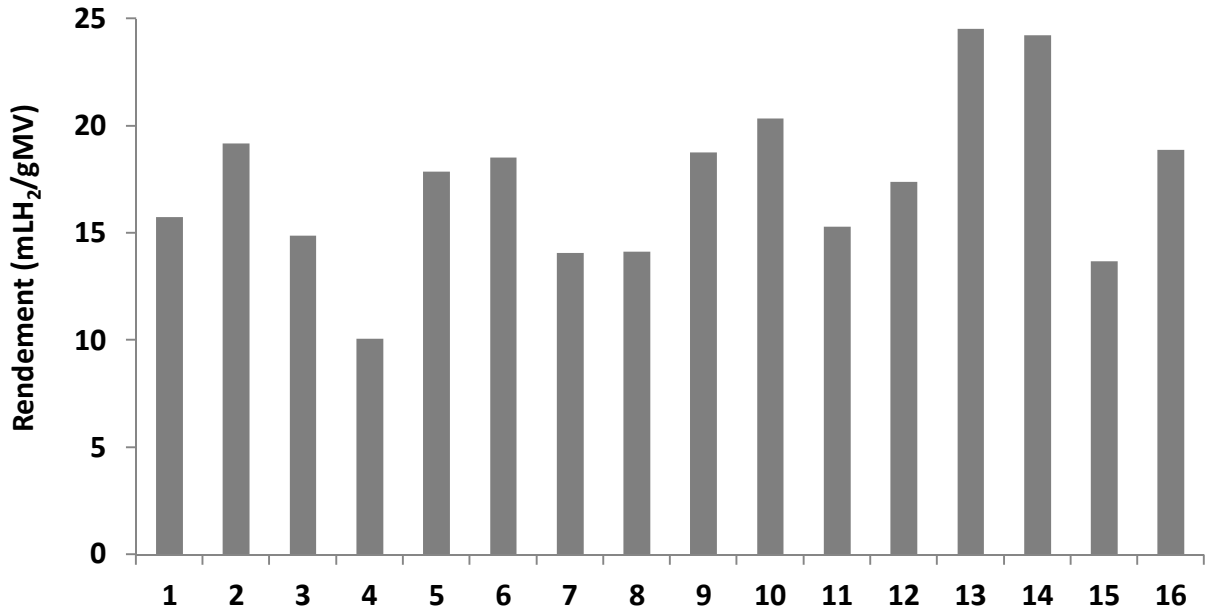


Figure 45 : Rendement en hydrogène obtenu lors des différentes fermentations avec recirculation de l'effluent subissant un traitement thermique systématique

Le Tableau 41 présente l'analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production) sur les différentes fermentations réalisées dans le but d'étudier l'effet d'un traitement thermique systématique sur le procédé de recirculation de l'effluent. Tout d'abord, lors de cette étude aucune production de méthane n'a été observé ce qui met en évidence l'efficacité du traitement thermique systématique sur les archées méthanogènes.

Tableau 41 : Analyse des données de production d'hydrogène (temps de latence, temps de production maximale, vitesse de production))

| | Temps de latence H ₂ (heure) | Temps production maximal H ₂ (heure) | Vitesse de production (mLH ₂ /gMV/h) |
|----|---|---|---|
| 1 | 10,1 | 26,0 | 0,35 |
| 2 | 12,5 | 16,6 | 0,70 |
| 3 | 4,2 | 10,0 | 0,69 |
| 4 | 11,5 | 14,1 | 1,09 |
| 5 | 8,5 | 15,0 | 1,10 |
| 6 | 8,0 | 15,0 | 1,01 |
| 7 | 9,1 | 18,0 | 0,81 |
| 8 | 14,5 | 24,0 | 1,20 |
| 9 | 9,7 | 21,1 | 1,82 |
| 10 | 8,1 | 12,7 | 1,48 |
| 11 | 10,1 | 15,8 | 1,46 |
| 12 | 6,2 | 12,0 | 1,46 |
| 13 | 8,1 | 13,9 | 1,58 |
| 14 | 6,2 | 12,0 | 1,87 |
| 15 | 8,4 | 24,1 | 0,91 |
| 16 | 5,7 | 12,0 | 1,55 |

Lors des différentes fermentations, le temps de latence avant apparition d'hydrogène a été en moyenne de $8,9 \pm 2,6$ heures. Néanmoins, la première fermentation ne présente pas un temps de latence plus élevé que les autres fermentations. Ce qui est en contradiction avec les valeurs observées dans les études précédentes lors des 1^{ères} fermentations (22,4 et 25,3 heures pour l'étude sans traitement et avec un traitement unique respectivement). Cependant, pour les fermentations suivantes, le temps de latence moyen observé dans cette étude est proche des études précédentes ($7,2 \pm 1,7$ et $7,9 \pm 2,4$ heures pour l'étude sans traitement et avec un traitement unique respectivement) ce qui met en évidence la régularité de l'apparition d'hydrogène dans un procédé de recirculation de l'effluent, avec une adaptation et un enrichissement rapide des microorganismes. Concernant le temps avant apparition du pic de production de l'hydrogène, celui-ci a été observé en moyenne à $18,3 \pm 9,0$ heures ce qui est proche des études précédentes ($19,1 \pm 6,5$ et $15,2 \pm 1,8$ heures pour l'étude sans traitement et avec un traitement unique respectivement). De plus, une tendance identique a été observée lors des trois études avec un temps plus élevé pour atteindre le pic de production lors de la 1^{ère} fermentation (26,0, 29,7 et 31,9 heures). Enfin, la vitesse maximale de production d'hydrogène a été observée en moyenne à $1,09 \pm 0,52$ mLH₂/gMV/h avec peu de variabilité ce qui met en évidence une stabilité dans la production

globale d'hydrogène. Cette valeur est plus élevée que celles observées lors des études précédentes ($0,58 \pm 0,43$ et $0,29 \pm 0,06$ mLH₂/gMV/h) ce qui peut être expliqué par la faible production d'hydrogène dans les études précédentes.

Un traitement thermique systématique semble donc efficace pour éviter la production de méthane et ainsi permettre une production d'hydrogène continue. De plus, le temps pour atteindre la production maximale d'hydrogène est similaire dans le cas du traitement systématique et sans traitement ($18,3 \pm 9,1$ et $19,1 \pm 6,5$ heures respectivement). Ces résultats clarifient l'impact minimum du traitement thermique sur l'activité des microorganismes producteurs d'hydrogène.

2.3.3.2. Production de métabolites

La Figure 46 représente la quantité totale de métabolites (rapporté à la quantité initiale de MV du substrat) produits au cours de chaque fermentation. Ce calcul a été réalisé en effectuant un bilan matière entre le début et la fin de chaque fermentation. D'après cette figure, la production totale de métabolites fluctuait entre 185 mgDCO/gMV pour la 1^{ère} fermentation et 70 mgDCO/gMV pour la fermentation 11. Ces résultats mettent en avant la forte variabilité de production de métabolites au cours des fermentations successives, autour d'une moyenne de 133 ± 30 mgDCO/gMV.

Lors des différentes fermentations, une production systématique d'acétate et de butyrate a été observée avec une moyenne de $14,7 \pm 7$ et $63,6 \pm 22$ mgDCO/gMV respectivement. Néanmoins, la variabilité observée sur le rendement total est fortement liée à la concentration de butyrate mesurée qui a été observée entre 35 mgDCO/gMV pour la 9^{ème} fermentation et 107 mgDCO/gMV pour la 4^{ème} fermentation.

De plus, le lactate a également été observé régulièrement, mais sa production est très variable. En effet, un rendement inférieur à 10 mgDCO/gMV a été mesuré à la fin des fermentations 1, 4, 6, 7, 10 et 15 alors que, pour les fermentations 2, 3, 8, 9 et 12, elle était supérieure à 30 mgDCO/gMV : elle représentait par exemple jusqu'à 37 % des métabolites totaux en fin de la 2^{ème} fermentation. De plus, dans chaque fermentation, une proportion en éthanol a été détectée avec une moyenne de 13 ± 9 mgDCO/gMV.

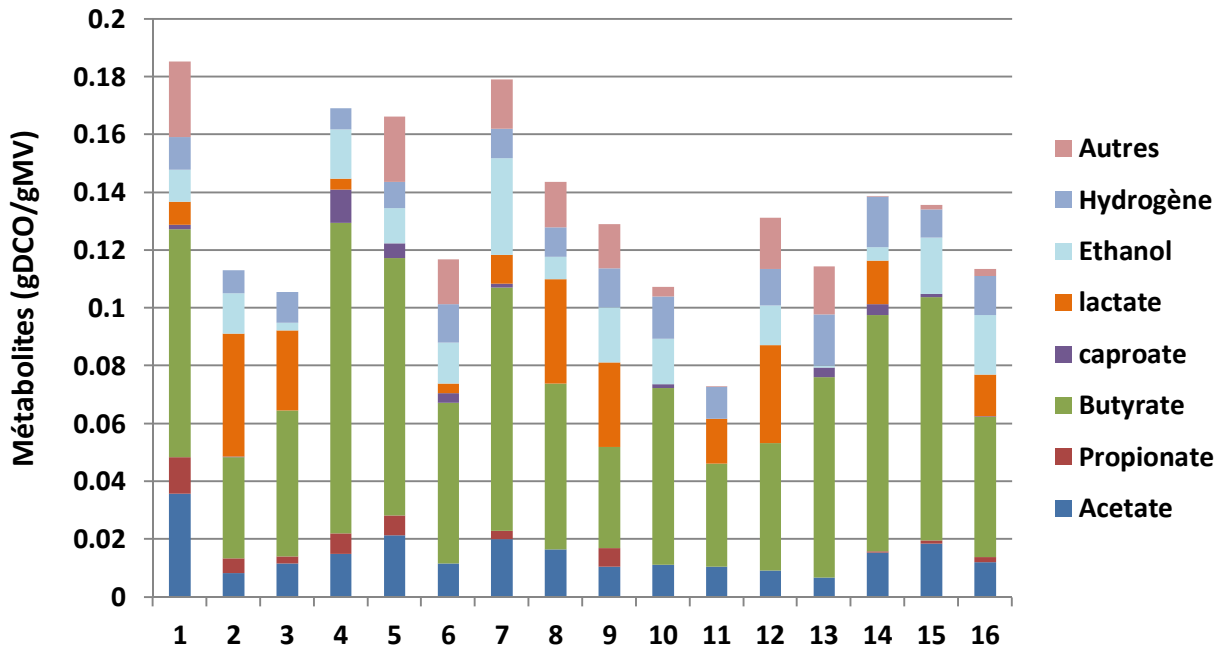


Figure 46 : Concentration en métabolites (gDCO/gMV) observée dans chaque fermentation lors d'une recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique

Le Tableau 42 présente les ratios Bu/Ac et $H_2/(2x[Bu+Ac])$ estimés à partir des métabolites produits au cours de chaque fermentation..

Comme observé lors de la recirculation de l'effluent sans traitement thermique, la majorité des fermentations montrent un ratio Bu/Ac supérieur à 1 avec un maximum de 2,87 pour la 4^{ème} fermentation. Ceci montre une plus forte production du butyrate par rapport à l'acétate. De plus, de façon plus surprenante, lors de la fermentation 13 un ratio Bu/Ac a été négatif (-3,11) et a montré notamment que la concentration en acétate en fin de fermentation était inférieure à celle observée en début de fermentation.

Tableau 42 : ratio Bu/Ac et $H_2/(2x[Bu+Ac])$

| | Bu/Ac (mol/mol) | $\frac{H_2}{(2 \times [Bu + Ac])}$ (mol/mol) |
|----|--------------------|---|
| 1 | 0,88 | 0,34 |
| 2 | 1,69 | 1,24 |
| 3 | 1,73 | 0,67 |
| 4 | 2,87 | 0,25 |
| 5 | 1,71 | 0,24 |
| 6 | 1,89 | 0,78 |
| 7 | 1,68 | 0,38 |
| 8 | 1,40 | 0,51 |
| 9 | 1,32 | 1,10 |
| 10 | 2,17 | 0,82 |
| 11 | 1,33 | 0,88 |
| 12 | 1,90 | 0,93 |
| 13 | -3,11 | 1,87 |
| 14 | 0,14 | 4,21 |
| 15 | 1,82 | 0,81 |
| 16 | 1,59 | 1,84 |

De plus, une forte fluctuation du ratio $H_2/(2x[Bu+Ac])$ a été observée, puisqu'il varie entre 0,24 (fermentation 5) et 4,21 (14). Aucune tendance entre les différentes fermentations n'a été observée. Par conséquent, ces résultats mettent en avant la forte variabilité des voies de production et/ou de consommation d'hydrogène, d'acétate et de butyrate au cours des fermentations successives.

Comme observé pour les expériences sans traitement thermique le ratio Bu/Ac a été observé comme supérieur à 1 ce qui met en évidence la forte concentration en butyrate par rapport à l'acétate. Cependant, cette observation n'a pas été observée lors des autres études qui montrent en général un ratio inférieur à 1 et suggère une consommation de l'hydrogène par homoacétogénèse.

2.3.3.3. Evolution de la communauté microbienne

Afin de mieux comprendre la variabilité des métabolismes observés, la structure de la communauté bactérienne a été analysée à la fin des fermentations (3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 et 16) et dans l'inoculum initial. La Figure 47 présente l'abondance relative des bactéries pour ces prélèvements. Dans l'inoculum, les *Clostridiales* sont majoritaires avec

une abondance relative de 54%, et nous pouvons également remarquer une proportion élevée de *Bacteroidales* (30 %). Dans notre cas, le lixiviat possède initialement une forte concentration en Na^+ ($2,55 \pm 0,60$ g/L) et en Cl^- ($2,73 \pm 0,58$ g/L) ce qui pourrait favoriser le développement de ce type de bactéries. L'étude de Pierra et al. (2013) a en effet mis en évidence que dans un milieu halophile modéré (38 gNaCl/L) des microorganismes de l'ordre des *Bacteroidales* c'étaient développés avec une abondance de 43%. Les analyses réalisées sur les fermentations successives montrent que la recirculation de l'effluent permet de fortement sélectionner les communautés bactériennes. En effet, dans les jus de fermentations, deux communautés largement majoritaires ont été identifiées. Tout d'abord, les *Clostridiales* possèdent une abondance relative qui varie entre 37% (fermentation 8) et 63% (fermentation 4) avec une abondance relative moyenne de $45,8 \pm 0,1\%$. Une autre espèce de l'ordre des *Lactobacillales* a été observée en forte abondance en fin des fermentations successives avec une abondance relative de $51 \pm 1\%$. Il est intéressant de noter également que la structure de la communauté bactérienne reste relativement stable au cours des différentes fermentations.

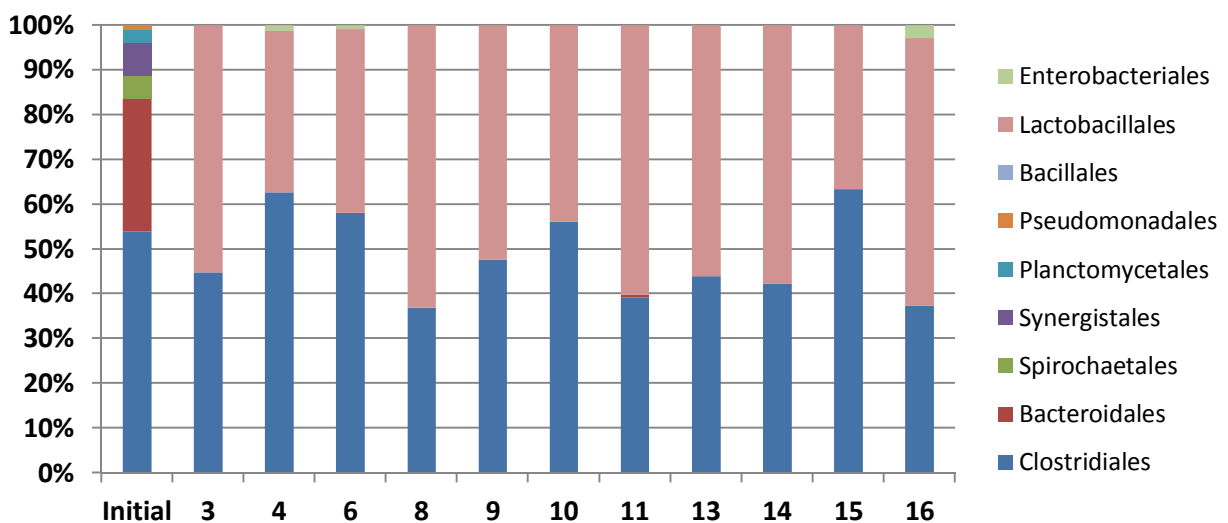


Figure 47 : Abondance relative de la communauté microbienne (ordre) en fin de chaque fermentation lors de l'étude de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique

Alors que les *Clostridiales* sont connues comme des microorganismes pouvant produire ou consommer (homoacétogénèse) l'hydrogène par homoacétogénèse, la recirculation de l'effluent a également entraîné la sélection de *Lactobacillales* (bactéries productrices de lactate).

Une analyse plus précise des *Clostridiales* et *Lactobacillales* à l'aide d'un blast a été réalisée permettant ainsi de comparer la similitude des séquences d'ADN dans nos échantillons avec la littérature afin d'identifier les espèces potentiellement présentes (Tableau 43).

Tableau 43 : Analyse réalisée par blast sur les microorganismes d'ordre *Clostridiales* et *Lactobacillales* observés dans cette étude

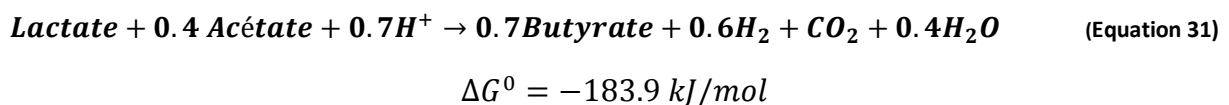
| Ordre | | Espèce | Similitude séquence ADN | Abondance moyenne |
|------------------------|----|---------------------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>Clostridiales</i> | ou | <i>Clostridium butyricum</i> | 97 % | 42±8 % |
| | | <i>Clostridium beijerinckii</i> | 97 % | |
| <i>Lactobacillales</i> | ou | <i>Lactobacillus mucosae</i> | 98 % | 17±12 % |
| | | <i>Lactobacillus spicheri</i> | 98 % | |
| | | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 100% | 13±8 % |
| | ou | <i>Lactobacillus paracasei</i> | 100 % | 6±5 % |
| | | <i>Lactobacillus casei</i> | 100 % | |

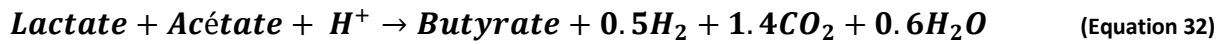
De façon intéressante, seule une espèce largement majoritaire a été observée chez les *Clostridiales* avec une abondance moyenne de 42±8 % qui, d'après une analyse par blast, s'apparente soit à l'espèce *Clostridium butyricum* ou *Clostridium beijerinckii* cependant, la similitude des séquences comparées reste faible et peut donc correspondre à d'autres organismes (similitude de 97 % par rapport à notre échantillon). Ces deux espèces sont connues comme fortement productrices d'hydrogène [216]. En effet, Liu et al. (2011) ont montré une production d'hydrogène élevée pour les espèces de types *Clostridium butyricum* (1,77 mmol/mmol_{glucose}) et *Clostridium beijerinckii* (1,72 mmol/mmol_{glucose}) [216]. Les *Clostridium butyricum* sont notamment connus comme fortement producteur de butyrate ce qui pourrait expliquer la forte production en butyrate observée [193]. De plus, l'étude de Rafrafi et al. (2013) ont observé un ratio Bu/Ac supérieur à 1 (1,56) lorsque l'espèce *Clostridium butyricum* était observé ce qui confirmerait également les résultats observés dans notre étude [217].

Concernant les *Lactobacillales*, une plus grande diversité semble se développer avec trois espèces majoritaires dont l'abondance est supérieure à 5% dans le milieu. D'après un blast de la séquence, l'espèce la plus abondante (17±12%) serait soit *Lactobacillus mucosae*, soit *Lactobacillus spicheri* (similitude de la séquence d'ADN de 98%). Ces deux espèces sont

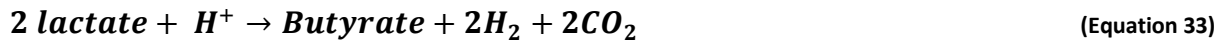
connues comme productrices de lactate [21,22]. L'espèce *Lactobacillus plantarum* (similitude : 100%) semble également se développer dans le milieu avec une abondance moyenne de 13±8%. Cette espèce a notamment été rapportée comme étant une bactérie anaérobie facultative consommant le lactate pour produire de l'acétate et du CO₂ [220]. Enfin une dernière espèce appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* a été identifiée avec une abondance moyenne de 6±5% et est proche de l'espèce *Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus casei* qui sont également productrices de lactate [221].

La présence de *Lactobacillales* n'est cependant pas corrélée à une augmentation de la concentration en lactate. Une des hypothèses serait d'expliquer ce phénomène par le fait que d'autres microorganismes peuvent consommer le lactate produit. En effet, d'après Balow et al. (1992), le lactate en présence d'acétate peut être fermenté en butyrate, CO₂ et H₂ via la bactérie *Clostridium tyrobutyricum* (Equation 31, 32 et 33) [222]. De plus, la conversion du lactate en butyrate est énergétiquement favorable. En utilisant une culture pure de *Clostridium tyrobutyricum* dans un réacteur continu alimenté avec du lactate et de l'acétate, une étude a également montré une productivité en hydrogène de 7,2 LH₂/L/j [223]. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'importante concentration en butyrate et la faible proportion en acétate observée dans nos travaux. De plus, le rendement en hydrogène en utilisant ces voies de production sont plus faible que les voies acétate et butyrate (une mole d'acétate ou de butyrate produit 2 moles d'hydrogène) ce qui pourrait expliquer les faibles ratios H₂/(2x[Bu+Ac]) observés. Enfin, comme mentionné précédemment, le pH en fin de fermentation (5,5±0,3) est proche des conditions favorables à une fermentation de type lactique. Bien que l'analyse par blast n'ait pas mentionné cette espèce (*Clostridium tyrobutyricum*) cette hypothèse reste probable du fait des faibles similitudes observées lors des analyses par blast avec les espèces *Clostridium butyricum* ou *Clostridium beijerinckii* (similitude de 97%).





$$\Delta G^0 = -59.4 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^0 = -64.1 \text{ kJ/mol}$$

La production d'hydrogène pourrait donc être corrélée avec les voies directes de production d'acétate et de butyrate lors des premières fermentations comme observé dans les études précédentes, mais la recirculation de l'effluent avec ou sans traitement thermique à chaque cycle semble favoriser le développement des *Lactobacillales* qui va correspondre à une réaction intermédiaire de production de lactate pour être, par la suite, transformé en butyrate et en hydrogène par certaines espèces de *Clostridium*.

La présence de lactate observée lors de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique initial unique montre donc qu'un seul traitement va permettre de sélectionner les *Lactobacillales*.

2.3.3.4. Stabilité du procédé

D'après les résultats précédents, une production continue d'hydrogène a été observée lors de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique. Dans les paragraphes suivants, cette étude c'est focalisée sur la stabilité du procédé en termes de production de biohythane et sur les différents paramètres mesurés (conductivité, pH) afin d'observer la stabilité globale du procédé de recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique.

- **Production de biohythane**

La Figure 48 présente la quantité de biohythane théorique exprimée en volume d'hydrogène et de méthane par quantité de MV apportée par le substrat.

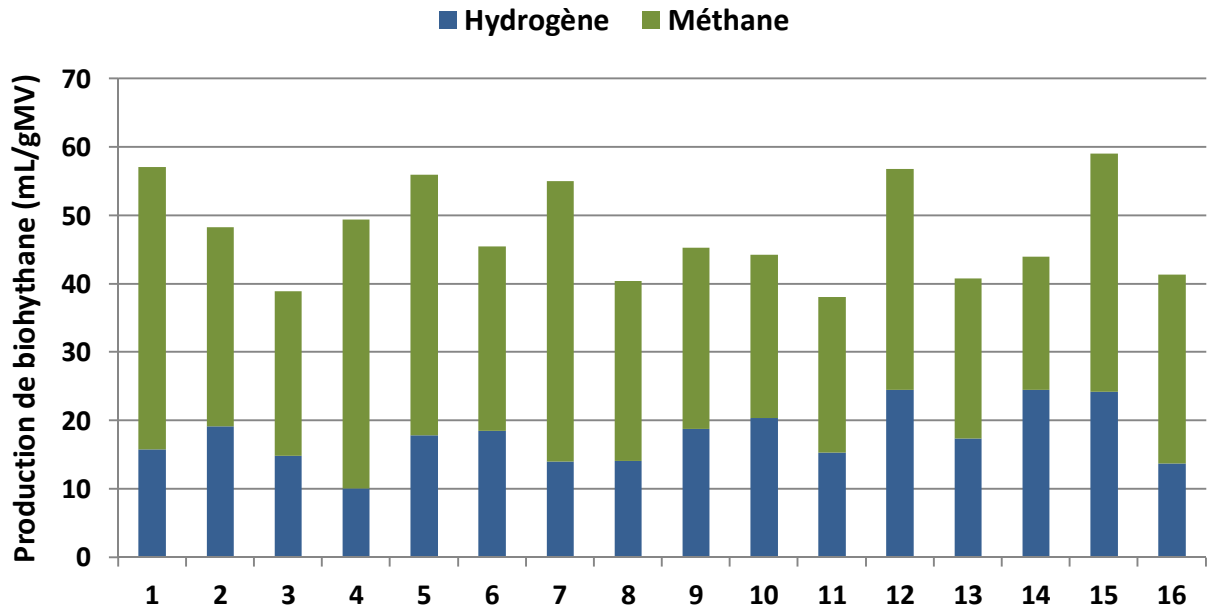


Figure 48 : Biohydrothane théorique produit à partir des produits issus des différentes fermentations lors de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique

Le rendement de méthane estimé varie entre 39,8 mLCH₄/gMV pour la 1^{ère} fermentation et 35,0 mLCH₄/gMV pour la 15^{ème} fermentation, avec une valeur moyenne de 29,7±6,9 mLCH₄/gMV. Globalement, le méthane théoriquement produit grâce aux métabolites issus de la fermentation est plus faible que lors des études précédentes qui étaient de 58±3mLCH₄/gMV lors de l'étude « *Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre* » (Chapitre III.4) avec les mêmes conditions. La recirculation de l'effluent semble donc globalement réduire le rendement en métabolite et donc la production théorique de méthane. Sachant que pour cette étude, le temps de réaction pour chaque fermentation était globalement plus faible comparé à l'étude du Chapitre III.4 (inférieur à 5 jours contre 7,5 jours) alors la production de métabolites peut dans ce sens être limitée, ce qui expliquerait nos observations.

Le Tableau 44 présente le ratio H₂/(H₂+CH₄ théorique), d'après ces résultats, le ratio a été observé entre 0,17 pour la fermentation 4 et jusqu'à 0,41 pour la fermentation 2. Globalement, le ratio reste aux alentours de 38 ±9 %, et ne semble pas être modifié au cours des différentes recirculations de l'effluent.

Tableau 44 : Ratio de biohythane théoriquement obtenu issu des produits de fermentation lors de l'étude de la recirculation de l'effluent avec un traitement thermique systématique

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| $\frac{H_2}{H_2 + CH_4_{théo}}$ | 28 | 39 | 38 | 20 | 32 | 41 | 26 | 35 | 41 | 46 | 40 | 43 | 43 | 56 | 41 | 33 |

D'après ces résultats, le procédé de fermentation utilisant un système de recirculation du lixiviat avec un traitement thermique à chaque cycle permet donc théoriquement une production de biohythane continue mais variable durant toute la durée de l'expérimentation soit sur un total de 16 fermentations (15 cycles de recirculation).

Cependant, d'un point de vue de la production finale de méthane, cela peut potentiellement avoir un impact réduit sur le procédé à deux étapes car le substrat en sortie du réacteur de fermentation (déchet « prédigéré ») devrait dans tous les cas être dégradé dans un méthaniseur. De plus, la dégradabilité anaérobie (rendement de méthane) des déchets FFOMs frais et des déchets « prétraités » récupérés en sortie du procédé de fermentation a été mesurée (Annexe I). La dégradabilité est identique pour ces deux substrats, ce qui met en évidence que le procédé de fermentation ne devrait pas altérer la production de méthane dans le second réacteur.

- **Stabilité du procédé**

La production d'hydrogène peut être fortement impactée par certains inhibiteurs comme les AGVs ou la force ionique. De plus, la recirculation de l'effluent peut engendrer une accumulation de ces inhibiteurs dans la phase liquide. Dans le cas du traitement systématique qui permet de stabiliser la production d'hydrogène, le pH et la conductivité ont été mesurés, en début et fin de fermentation sur 16 fermentations successives (Figure 49).

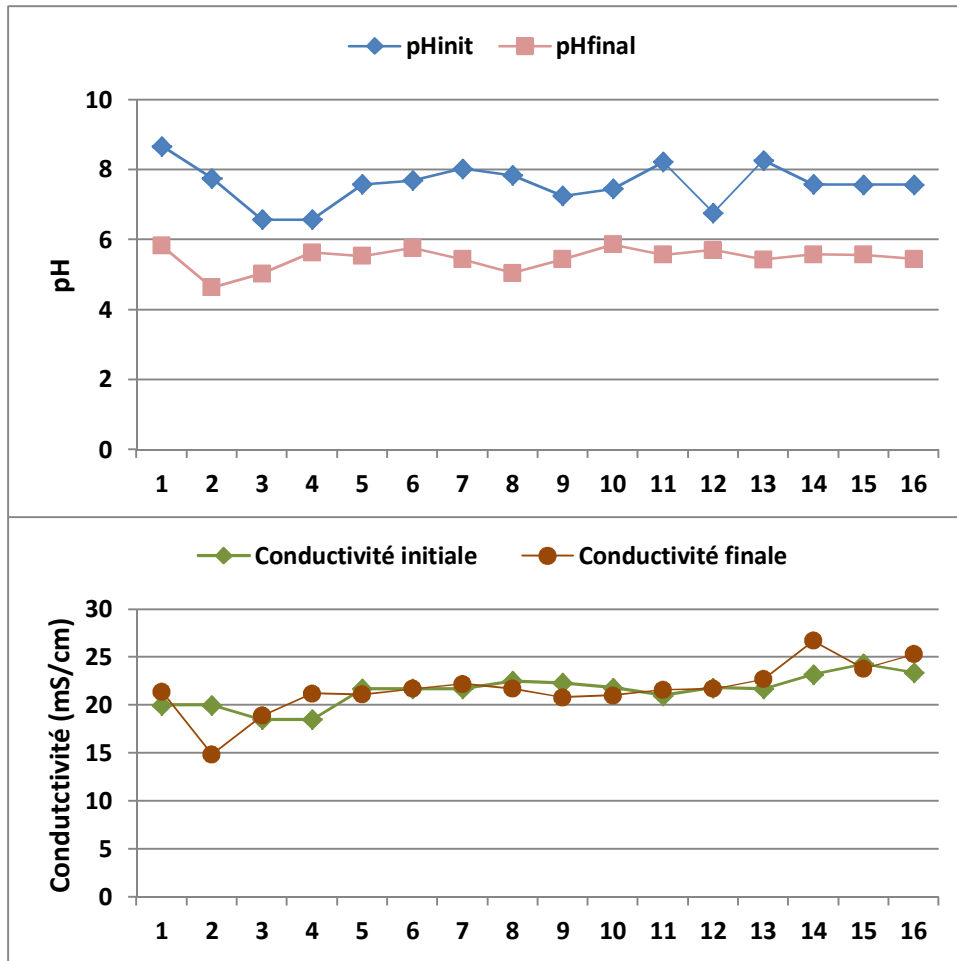


Figure 49: Etude de la variation du pH et de la force ionique lors d'un traitement systématique sur l'effluent

Le pH initial lors du lancement du premier fermenteur, lié uniquement au lixiviat frais utilisé comme inoculum, était de 8,7. Dès la première recirculation de l'effluent, le pH initial s'est rapidement stabilisé autour de $7,5 \pm 0,6$, alors que les pH mesurés en fin de fermentation se sont fixés aux alentours de $5,5 \pm 0,3$. Le pH final se trouve ainsi dans la gamme optimale de production d'hydrogène et ne descend pas en dessous de la valeur critique (5,0), comme nous l'avons observé dans l'étude « *Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre* » du chapitre précédent.

La conductivité, mesurée en début et fin de fermentations, reste également stable avec une valeur moyenne en fin de fermentation de $21,4 \pm 1,6$ mS/cm (valeur de 20,0 mS/cm dans le lixiviat frais). De plus, la valeur critique de 55,6 mS/cm n'est pas atteinte ce qui permet de ne pas être impacté par la force ionique lors de la fermentation.

L'absence d'accumulation d'inhibiteurs dans le milieu de fermentation est majoritairement causée par la dilution de la phase liquide par l'ajout de lixiviat frais au début de chaque fermentation. Par exemple, lors de l'étude de la recirculation avec un traitement systématique environ 47 ± 6 % du volume du lixiviat étaient absorbés par les déchets FFOMs en fin de fermentation. Cette absorption est notamment causée par la forte proportion en déchets de types papiers et cartons. Ce résultat montre encore une fois l'importance de ce type de déchets dans un procédé de fermentation sombre pour éviter l'accumulation d'inhibiteur et stabiliser le procédé de fermentation.

D'après les analyses précédentes, une stabilité de la communauté microbienne est également observée même si à chaque fermentation environ $47\pm 6\%$ de lixiviat frais est ajouté afin d'équilibrer le volume réactionnel.

2.4. Conclusion de l'étude de la recirculation de l'effluent afin de réaliser des fermentations successives

Cette étude a mis en évidence qu'un procédé de recirculation de l'effluent permettait d'améliorer la capacité à produire de l'hydrogène rapidement avec un temps de latence avant apparition d'hydrogène diminué quel que soit le traitement effectué sur l'inoculum. Cette donnée peut être un avantage au niveau industriel pour une production plus rapide d'hydrogène.

Cependant, pour une production continue d'hydrogène plusieurs conditions doivent être réunies. Tout d'abord et afin d'éviter le développement des archées méthanogènes, un traitement thermique est nécessaire. De plus, seul un traitement thermique systématique permet d'éviter la production de méthane et de stabiliser la production d'hydrogène au cours des différentes fermentations. L'absence d'accumulation d'autres inhibiteurs (AGVs et force ionique) est également fortement dépendante de la dilution de l'effluent causée par une absorption importante de la phase liquide dans les déchets de types papiers, cartons. Cette observation met encore une fois en évidence que la composition de la fraction fermentescible des ordures ménagères issues de Trifyl apparaît comme idéale notamment grâce à la proportion de papiers et cartons. En effet ces types de déchets ne jouent pas un rôle direct dans la production d'hydrogène mais un rôle majeur dans la stabilité du procédé.

Cependant, cette forte absorption peut être réduite si une technique efficace est utilisée (centrifugation) mais cela pourrait entraîner une augmentation du coût du procédé et potentiellement une accumulation d'AGVs et de force ionique dans le milieu qu'il est nécessaire d'évaluer.

3. Etude du changement d'échelle sur la fermentation sombre

3.1. Problématique et objectif

L'ensemble des résultats précédents ont montré un rendement en hydrogène proche sur les différentes expériences présentant des conditions opératoires identiques. En effet, lors de l'étude « *Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre* » (Chapitre III.4), un rendement de $9,7 \pm 2,5$ mLH₂/gMV_{tot} ($42,9 \pm 10,4$ mLH₂/gMV_{biodéchet} quand les Déchets Alimentaires étaient seulement pris en compte) a été obtenu. En comparaison, lors de l'étude « *Recirculation de l'effluent sur la fermentation sombre* » (Chapitre IV.1), les rendements de la première fermentation ont été de 10,5 mLH₂/gMV et 15,7 mLH₂/gMV respectivement pour les essais avec traitement thermique unique et systématique. Il est intéressant de noter que, lors de ces deux études, deux réacteurs différents ont été utilisés. En effet, la première étude a été réalisée avec des réacteurs en verre de volume total de 0,5 L (diamètre : 8 cm), alors que la deuxième étude a utilisé un réacteur cylindrique en PVC de volume total de 6 L (diamètre : 14 cm).

Toutefois, bien que le rendement en hydrogène ait atteint une valeur proche dans les deux cas, la configuration du réacteur et le changement d'échelle ont potentiellement pu impacter sur la fermentation sombre dans sa globalité. En effet, d'après la littérature, plusieurs paramètres sont déjà connus comme pouvant affecter significativement les performances du procédé et qui ne sont que peu considérés à petite échelle, comme le mode de stockage du substrat, le maintien des conditions anaérobies, le traitement des sorties de réacteurs, la récupération de l'hydrogène produit, le maintien d'un pH homogène dans le fermenteur, la gestion des odeurs ou encore la configuration du réacteur [142]. Plus particulièrement, ce dernier paramètre peut fortement modifier le rendement en hydrogène en fonction, par exemple, de la surface d'échange qui va permettre un transfert liquide/gaz de l'hydrogène plus ou moins facilité ou encore la régulation de la pression dans le réacteur qui peut induire une pression partielle en hydrogène élevée et donc générer des modifications voire des inhibitions métaboliques [57].

Il serait donc intéressant de travailler à échelle plus grande (pilote) avec une configuration similaire mais adaptée afin d'évaluer les performances dans ce réacteur pilote et l'effet du changement d'échelle.

Dans la littérature, plusieurs études sont disponibles sur les performances à une échelle pilote. Par exemple, Lin et al. (2010) ont utilisé un fermenteur agité de 400 L et ont contrôlé la température (35°C), la pression et la concentration en hydrogène. L'inoculum a été prétraité thermiquement (100°C pendant 45 minutes) et un substrat simple (sucrose, 20 gDCO/L) a été utilisé. La stratégie de démarrage du pilote était de réaliser une première étape en mode batch de deux jours, pour ensuite se placer en mode continu pendant 30 jours (TSH de 12 jours) afin d'adapter initialement la communauté microbienne issue de boue (*Clostridium butyricum* et *Clostridium pasteurianum*) [142]. La productivité maximale a été observée à une valeur de 0,256 L/L/h et un rendement de 1,01 molH₂/mol_{sucrose}. Cavinato et al. (2012) ont également réalisé un procédé à deux étapes avec un réacteur de fermentation suivi d'un réacteur de méthanisation tous les deux en continu (TSH : 3,3 et 12,6 jours respectivement) d'un volume de 200 et 760 L, respectivement [128]. Lors de cette étude, une productivité de 0,042 L/L/h a été observée et un rendement de 66,7±14,66 mLH₂/gMV en utilisant des déchets alimentaires comme substrat. Cependant, ses études ont toutes travaillé sur des réacteurs continus et mélangés et donc la comparaison avec notre propre étude reste limitée. De manière générale, les performances observées à l'échelle pilote sont plus faibles que les performances référencées à une échelle laboratoire. A titre de comparaison, une étude réalisée par Ren et al. (2010) en réacteur CSTR à une échelle laboratoire a, en effet, observé une productivité maximale plus élevée (0,405 L/L/h) en utilisant de la molasse comme substrat, une température mésophile (35°C) et un temps de séjour hydraulique de 6 heures [224]. Une autre étude à l'échelle laboratoire a montré une productivité d'hydrogène de 0,200 L/L/h en utilisant des déchets alimentaires comme substrat, une température de 37°C et un pH entre 5 et 6 [225].

L'objectif de ce chapitre a donc été de réaliser un changement d'échelle pour étudier le rendement d'hydrogène sujet aux modifications de la configuration du réacteur. Pour cela, afin d'avoir une première idée de l'impact du dimensionnement sur la production d'hydrogène, le mode de fonctionnement a été identique, en réalisant des essais dans un réacteur pilote de type batch et non mélangé. Cette étude nous a permis de comparer la

production d'hydrogène avec les essais en fioles de 0,5 litre et de 6 litres comme présentés précédemment.

3.2. Déroulement de l'étude

Le fermenteur utilisé était un réacteur pilote avec un volume total et un volume de travail de 60 et 20 L, respectivement (Figure 50). Les caractéristiques sont présentées dans le chapitre 2 «*Matériel et Méthodes* ». Une température mésophile (37°C) et une siccité de 15% ont été appliquées, sans régulation de pH. Un traitement thermique a préalablement été réalisé sur l'inoculum (90°C pendant 30 minutes). Le volume total de biogaz produit a été mesuré quotidiennement et la composition du biogaz a été analysée par GC. Deux expériences identiques ont été réalisées avec un temps de réaction de 7 jours. Ces deux expériences correspondent à des réplicats. Le substrat était identique à celui utilisé dans les autres études, à savoir la fraction fermentescible des ordures ménagères reconstitué issu du MODECOM réalisé chez Trifyl.

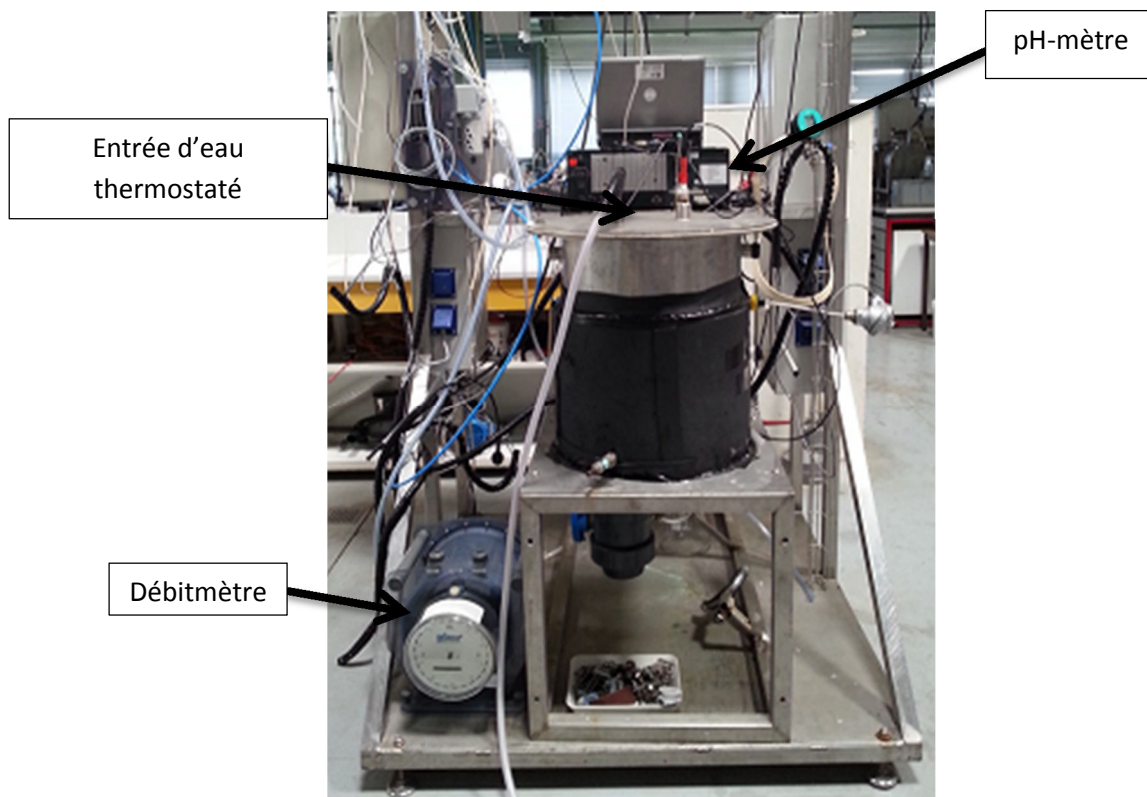


Figure 50 : Réacteur pilote

3.3. Résultats de l'étude du changement d'échelle

3.3.1. Etude de la fermentation sombre sur un réacteur pilote

La Figure 51 représente la composition du biogaz en fonction du temps pour les deux réacteurs. Lors de la phase de production d'hydrogène (1-3 jours), le biogaz est composé de 34,5% et 65,5% d'hydrogène et de dioxyde de carbone, respectivement avec une tendance à diminuer entre le jour 1 et 3 (diminution de 17%). De plus, une apparition de méthane a été observée dans le biogaz après le 3^{ème} jour pour atteindre une proportion de 8,24 % au 7^{ème} jour.

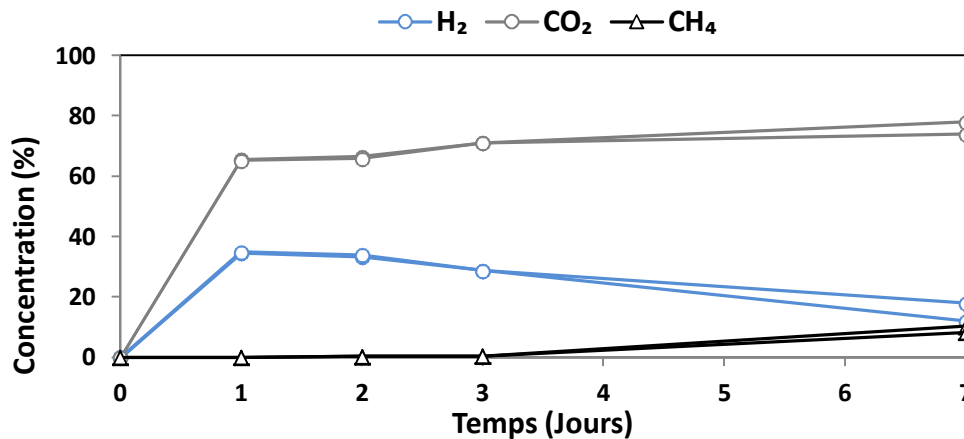


Figure 51 : Analyse du biogaz produit lors des fermentations

La Figure 52 représente la production cumulée d'hydrogène mesurée lors des deux expériences de fermentation. Une bonne reproductibilité a été observée entre les deux expériences. La production d'hydrogène augmente de façon importante les trois premiers jours, puis une faible production est observée jusqu'au 7^{ème} jour. Ce résultat met en évidence qu'une fermentation de 3 jours est suffisante pour produire entre 83 et 89% de l'hydrogène total.

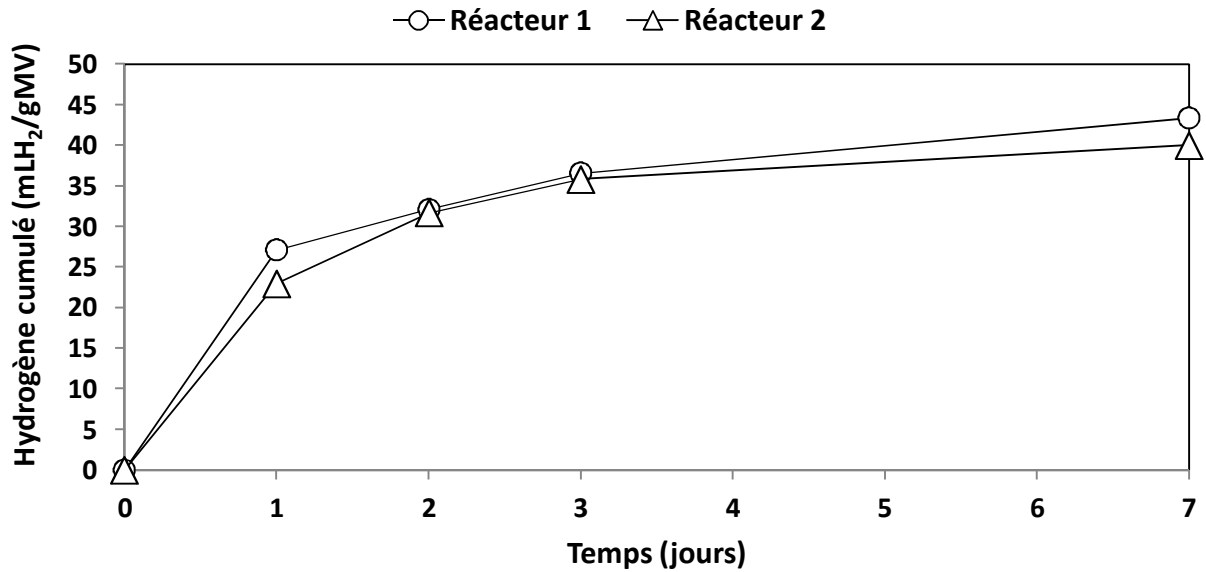


Figure 52 : Suivi de la production d'hydrogène cumulé pour la fermentation réalisée en duplicata

Le Tableau 45 représente les paramètres liés à la production d'hydrogène à savoir le rendement en hydrogène, le volume total d'hydrogène produit, la vitesse maximale de production d'hydrogène et le temps de latence avant apparition d'hydrogène estimé à partir de l'équation modifiée de Gompertz.

Tableau 45 : Analyses liées à la production d'hydrogène pour les deux réacteurs de fermentation

| Expérience | Rendement en hydrogène | | Volume (L) | Vitesse de production maximale (mL/gMV/h) | Temps de latence H ₂ (heures) | Conductivité (mS/cm) |
|------------|------------------------|--|------------|---|--|----------------------|
| | mLH ₂ /gMV | LH ₂ /L _{réacteur} | | | | |
| Réacteur 1 | 38,7 | 3,8 | 75,7 | 1,16 | 1,3 | 20,8±2,8 |
| Réacteur 2 | 37,7 | 3,5 | 69,9 | 0,98 | 1,7 | |

Le rendement en hydrogène est proche pour les deux expériences avec un rendement moyen de 38,2±0,7 mLH₂/gMV et une vitesse maximale moyenne de 1,07±0,13 mLH₂/gMV/h. Cette valeur est nettement plus élevée que celle observée dans les études précédentes comme le montre le Tableau 46 qui s'élevait à 9,7±2,5 et à 10,5 et 15,8 mLH₂/gMV pour l'étude du Chapitre III.4 et IV.1 respectivement. Néanmoins, cette valeur est proche de l'étude de Liu et al. (2006) qui ont obtenu un rendement de 43 mLH₂/gMV à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères en utilisant une culture mixte à température mésophile (37°C) [72].

Concernant le temps de latence, celui-ci est faible, avec un début de production d'hydrogène dès 1,3 et 1,7 heure après le lancement du réacteur. Le volume d'hydrogène produit cumulé au bout de 7 jours a été de 75,7 et 69,9 Litres, ce qui correspond à un volume d'hydrogène produit par volume de réacteur de 3,8 et 3,5 $\text{LH}_2/\text{L}_{\text{réacteur}}$.

Si les résultats observés sont comparés avec les deux expériences réalisées à l'échelle du laboratoire dans des conditions identiques, alors des différences peuvent être relevées (Tableau 46).

Tableau 46: Comparaison des résultats de la production d'hydrogène sur trois études avec les conditions identiques (siccité : 15%, pH non régulé, T°C : 37°C, traitement thermique)

| Etude | Rendement H_2 ($\text{mLH}_2/\text{gMV}_{\text{tot}}$) | Vitesse max de production ($\text{mLH}_2/\text{gMV}/\text{h}$) | Latence H_2 (heures) | Temps avant CH_4 (heures) |
|---|--|---|----------------------------------|--|
| Modification substrat (Chapitre III.4) | 9,7 \pm 2,5 | 0,84 \pm 0,46 | 15,3 \pm 5,4 | 0 |
| Recirculation effluent (Chapitre IV.1) | 10,5 - 15,8 | 0,35 – 1,09 \pm 0,52 | 10,1 – 25,3 | 127,9 - 0 |
| Réacteur pilote | 38,2 \pm 0,7 | 1,07 \pm 0,13 | 1,5 \pm 0,3 | 72 |

Comme expliqué précédemment, une nette différence a été observée entre cette étude et les études précédentes. En effet, lors de cette étude, le rendement est environ 4 fois plus élevé que le meilleur rendement mesuré à l'échelle du laboratoire. Cependant, contrairement à la littérature comme cité précédemment (Chapitre IV - 2.1), les performances en hydrogène sont plus élevées à l'échelle pilote qu'à l'échelle laboratoire ce qui pourrait signifier que la configuration du réacteur a potentiellement joué, dans notre cas, un rôle majeur sur les résultats observés.

De plus, le temps de latence évolue en fonction des études, et en particulier le temps de latence de l'hydrogène qui est très court dans le cas de la fermentation à l'échelle pilote (1,5 \pm 0,3 heures) : ce temps est beaucoup plus court, de l'ordre d'un facteur dix, par rapport aux expériences à l'échelle du laboratoire. Enfin, l'apparition de méthane a été observée dans cette étude et dans l'étude « *Recirculation de l'effluent sur la fermentation sombre* » après 72 et 127,9 heures de réaction, respectivement. L'apparition rapide de méthane au cours de l'expérience à l'échelle pilote met en évidence la difficulté d'inhiber les archées méthanogènes productrices de méthane même après traitement thermique. La faible

efficacité du traitement thermique peut être liée au volume de lixiviat traité (15 L) à l'échelle du laboratoire, ce qui rend plus difficile d'obtenir une bonne homogénéité de traitement. Cette étude montre donc qu'à une échelle pilote, le traitement thermique doit être mieux maîtrisé afin de le rendre efficace.

Lors de cette étude, la vitesse maximale observée ($1,07 \pm 0,13$ mLH₂/gMV/h) était identique à la vitesse maximale obtenue lors de l'étude du Chapitre IV.1 lorsqu'une production continue en hydrogène avait été observée (traitement systématique) avec une valeur de $1,09 \pm 0,52$ mLH₂/gMV/h. De plus la vitesse maximale obtenue lors de l'étude du Chapitre III.1 ($0,84 \pm 0,46$ mLH₂/gMV/h) est également assez proche ce qui met en évidence que même si le rendement en hydrogène varie, la productivité reste identique quelle que soit l'étude.

Le pH a également été mesuré au cours du temps pour les deux expériences (Figure 53). On remarque que celui-ci diminue très fortement les 3 premiers jours jusqu'à 5,3 (initialement à 8,8), en lien avec la dégradation biologique. Par la suite, une faible diminution du pH est observée qui passe de 5,6 au 3^{ème} jour à 5,3 au jour 7. Ce phénomène met en évidence que les AGVs, qui engendrent une diminution du pH lors de leurs accumulations, sont donc majoritairement produits les trois premiers jours de fermentation, c'est-à-dire, en même temps que l'hydrogène. En comparant avec les données des autres études, on remarque que cette valeur est proche de l'étude du Chapitre IV.1 ($5,5 \pm 0,3$) et un peu plus éloigné de l'étude Chapitre III.4 ($6,2 \pm 0,2$). Mais la tendance reste la même avec une stabilisation du pH dans une gamme optimale pour la production d'hydrogène [57].

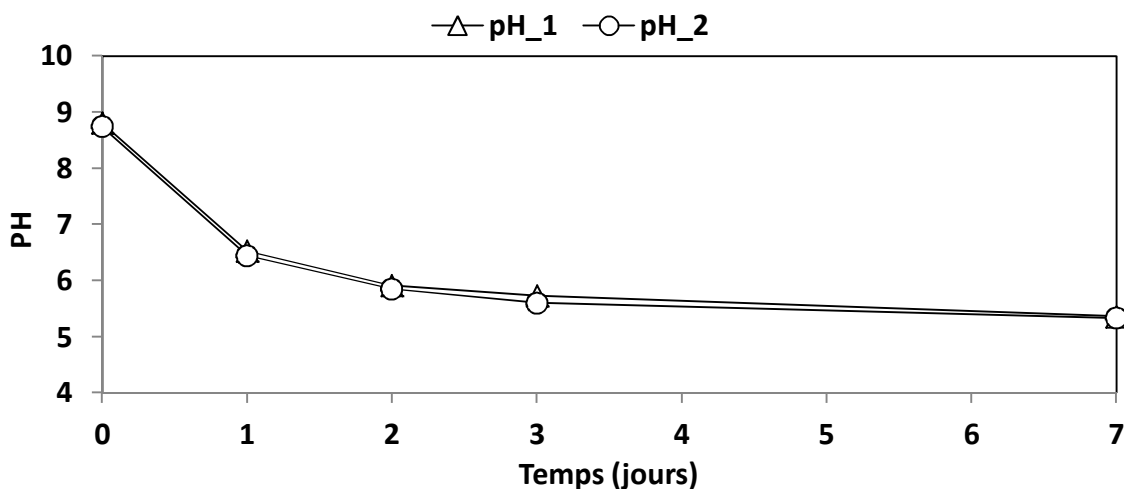


Figure 53 : Suivi du pH pour la fermentation réalisée en duplicata

Le Tableau 47 représente le rendement des métabolites produits lors de la fermentation dans le réacteur pilote. Lors de cette étude, le rendement total a été observé à une valeur de 470 ± 100 mgDCO/gMV. De plus, les produits majoritaires étaient le butyrate (150 ± 30 mgDCO/gMV) et l'acétate (110 ± 30 mgDCO/gMV). Cette étude n'a pas montré la présence de lactate dans le milieu.

Tableau 47 : Analyses des composés majoritaires en fin de fermentation

| Composé | Concentration (mgDCO/gMV) |
|------------------------|---------------------------|
| Total DCO (mgDCO/gMV) | 470 ± 100 |
| Acétate (mgDCO/gMV) | 110 ± 30 |
| Propionate (mgDCO/gMV) | 30 ± 10 |
| Butyrate (mgDCO/gMV) | 150 ± 30 |
| Ethanol (mgDCO/gMV) | 10 ± 20 |

Le Tableau 48 permet de comparer les données sur la production des métabolites entre les différentes études. D'après ce tableau, on peut observer que le rendement des métabolites a été plus important, d'un facteur 2 environ, dans le cas du réacteur pilote (470 ± 100 mgDCO/gMV) par rapport à l'échelle du laboratoire. Bien que le rendement en métabolite soit supérieur lors de cette étude, aucune modification des voies métaboliques empruntées n'a été observée comparé aux études précédentes. En effet, les produits majoritaires étaient le butyrate et l'acétate et représentaient 55% des métabolites totaux lors de l'étude avec le réacteur pilote ainsi que 57 et 62% pour l'étude du Chapitre III.4 et IV.1 respectivement.

Tableau 48 : Comparaison de la fermentation sombre sur les différentes études

| Etude | Bu/Ac (mol/mol) | Métabolites (mgDCO/gMV) | Méthane théorique (mLCH ₄ /gMV) |
|---|-----------------|-------------------------|--|
| Modification du substrat (Chapitre III.4) | 0,92 | 230 ± 10 | 58 ± 3 |
| Recirculation de l'effluent (Chapitre IV.1) | 0,88 - 0,53 | 190 – 170 | $29,7 \pm 6,9$ |
| Réacteur pilote | 0,55 | 470 ± 100 | 86,5 |

De plus, d'après les valeurs du ratio Bu/Ac (mol/mol), la fermentation effectuée à l'échelle pilote a montré une production d'acétate largement supérieure par rapport au butyrate (0,55). Ce ratio a été le plus faible obtenu alors que l'étude du Chapitre III.4 a montré le ratio le plus élevé (0,92). Cependant, dans tous les cas une production d'acétate est dominante par rapport à la production de butyrate. L'étude de Lin et al. (2010) travaillant sur une échelle pilote (400 L) dans un réacteur de type continu et agité a également observé un ratio Bu/Ac proche avec une valeur de 0,78 [142].

Enfin, la production de méthane théoriquement produit par la dégradation des métabolites issus de l'étape de fermentation a été calculée lors de cette étude et atteint près de 86,5 mLCH₄/gMV. Cette valeur est supérieure à la valeur moyenne observée dans l'étude du Chapitre IV.1 qui était de 29,7±6,9 CH₄/gMV ainsi que celle observée lors de l'étude du Chapitre III.4 où, avec les mêmes conditions, la production de méthane théorique a été observée à 58±3 mLCH₄/gMV.

Ces résultats montrent encore une fois une variabilité de la fermentation sur des expériences possédant des conditions opératoires identiques avec un dimensionnement différent. Ce qui conforte l'hypothèse de l'impact du changement d'échelle sur la fermentation sombre. Cependant, les causes de cette variation peuvent être multiples (pression partielle en hydrogène, hauteur du milieu, difficulté technique de traitement à grande échelle...).

Afin d'émettre des premières hypothèses sur la cause de ces variations le Tableau 49 regroupe les données du dimensionnement des différents réacteurs utilisés afin de pouvoir les comparer. D'après ce tableau, on constate que pour chaque réacteur, le volume de l'espace de tête différait. En effet, un espace de tête de 0,1 L a été observé lors de l'étude du Chapitre III.4, alors que pour l'étude du Chapitre IV.1, celui-ci était de 3L. L'espace de tête le plus grand a été observé lors de l'étude à l'échelle pilote avec un volume de 40 L. De plus, la méthode de régulation de pression était différente avec une régulation effectuée par la micro-GC toutes les 4 heures lors de l'étude du Chapitre III.1 alors qu'un débitmètre avait été utilisé pour l'étude du Chapitre IV.1 et pour le réacteur pilote ce qui permettait de rester à la pression atmosphérique. Concernant la hauteur du milieu qui est caractérisée par le ratio surface d'échange sur le volume de réaction, celle-ci a été observée comme la plus

élevée pour l'étude « Impact de la recirculation de l'effluent sur la fermentation sombre » (Chapitre IV.1) (24 cm) et la plus faible pour l'étude « Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre » (Chapitre III.4) (8 cm).

Tableau 49 : Dimensionnement des réacteurs utilisés

| Etude | Paramètres du réacteur | Régulation de Pression | Espace de tête | Hauteur du milieu | Rendement H ₂ (mLH ₂ /gMV) |
|---|---------------------------------|------------------------|----------------|-------------------|--|
| Modification du substrat (Chapitre III.4) | Vol : 0,4 L Diamètre : 8 cm | Micro-GC | 0,1 L | 8 cm | 9,7±2,5 |
| Recirculation de l'effluent (Chapitre IV.1) | Vol : 3,7 L Diamètre : 14 cm | Débitmètre | 3 L | 24 cm | 10,5 - 15,8 |
| Réacteur pilote | Vol : 20 L Diamètre : 37 cm | Débitmètre | 40 L | 18 cm | 38,2±0,7 |

Les modifications observées dans les différentes configurations des réacteurs peuvent être potentiellement une des raisons des variations dans les rendements en hydrogène et métabolites observées. En effet, dans ce sens certaines hypothèses peuvent être soulevées. Tout d'abord pour l'étude du Chapitre III.4 des réacteurs batchs ont été utilisés et connectés à une micro-GC qui permettait de réaliser une dépressurisation toutes les 4 heures du réacteur (Figure 54).

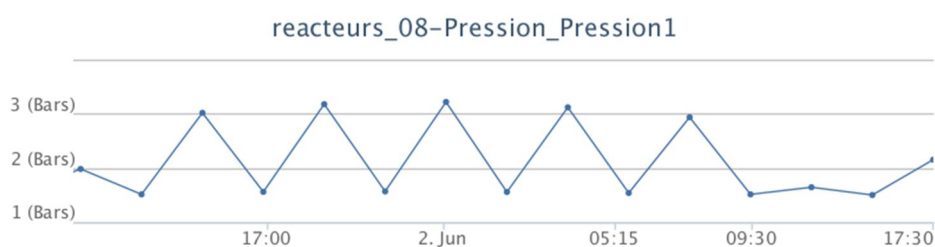


Figure 54 : Régulation du pH des réacteurs batch lors de l'étude « Modification de la composition du substrat sur la fermentation sombre »

Cependant, d'après les résultats collectés, la production d'hydrogène est très rapide (les trois premiers jours), et une pression élevée notamment en hydrogène était observée avant chaque dépressurisation (supérieure à 3 bars) soit une pression partielle en hydrogène dans l'espace de tête de 0,9 bar. D'après la littérature, la pression partielle en hydrogène est un élément inhibiteur qui peut perturber la production d'hydrogène. En effet, de fortes

concentrations en hydrogène dissous dans le réacteur peuvent rendre thermodynamiquement défavorable la conversion du NADH en hydrogène effectuée par les hydrogénases [114]. Les hydrogénases sont impliquées dans l'oxydation et la réduction de la ferredoxine et si la concentration en hydrogène augmente dans le milieu, alors l'oxydation de la ferredoxine devient moins favorable et entraîne une diminution de la production d'hydrogène [95]. De plus, Bastidas-Oyanedel (2012) ont indiqué qu'à partir d'une pression partielle en hydrogène de 0,4 bar cette réaction devient défavorable [226]. Ce qui pourrait expliquer, en partie, le faible rendement en hydrogène observé lors de cette étude.

Cependant, la différence observée sur les rendements en hydrogène entre le réacteur pilote ($38,2 \pm 0,7$ mLH₂/gMV) et l'étude du Chapitre IV.1 (10,5 - 15,8 mLH₂/gMV), qui ont utilisés le même système de régulation de pression (débitmètre), reste néanmoins encore à être élucidée et peut faire l'objet d'une étude future.

3.4. Conclusion

La suivi de la production d'hydrogène dans un réacteur batch pilote non mélangé a permis de mettre en évidence que la fermentation est essentiellement réalisée sur les 3 premiers jours. En effet, $87 \pm 3\%$ de l'hydrogène est produit les 3 premiers jours. De plus, augmenter le temps de réaction au-delà de 3 jours va entraîner une potentielle apparition de méthane et un faible gain de production d'hydrogène. Afin d'optimiser un réacteur de fermentation, il n'est donc pas nécessaire de fixer un temps de séjour plus élevé que 3 jours.

L'apparition de méthane après 3 jours de fermentation a néanmoins mis en évidence la difficulté de réaliser un traitement thermique efficace lorsqu'un volume important en lixiviat est utilisé. Cependant en utilisant du matériel adapté, cette problématique peut être solutionnée.

L'étude du changement d'échelle a permis de mettre en évidence que le dimensionnement du réacteur joue un rôle important sur le rendement en hydrogène. En effet, l'espace de tête ou encore la régulation de la pression dans le réacteur peut impacter le rendement final en hydrogène et métabolites. Cette étude a donc soulevé la problématique de l'impact du dimensionnement sur la production d'hydrogène qui reste encore à être étudié en détail.

4. Conclusion du chapitre portant sur la robustesse et stabilité du procédé de fermentation dans le cadre d'un couplage avec un réacteur de méthanisation

Ces deux études ont permis d'améliorer la compréhension du procédé de fermentation envisagé sur le site de Trifyl, et de dresser des recommandations quant aux conditions opératoires et au dimensionnement du réacteur de fermentation.

Dans une première étude, l'importance d'un traitement thermique systématique sur la phase liquide lors de chaque recirculation de l'effluent a été prouvée. Bien que cela ait un coût supplémentaire sur le procédé, il est nécessaire d'effectuer ce type de traitement afin d'éviter la production de méthane dans le réacteur de fermentation. En effet, l'apparition rapide de méthane dans le procédé de recirculation sans traitement ou avec un traitement thermique unique a confirmé la nécessité d'incorporer cette étape dans un procédé industriel.

Avec ce mode de fonctionnement du procédé, la production d'hydrogène est stable au cours des batchs successifs. La teneur en composés potentiellement inhibiteurs dans l'effluent se situe en dessous du seuil d'inhibition (<55,6 mS/cm), et le pH reste dans une gamme optimale pour la production d'hydrogène: la stabilisation de ces valeurs est principalement liée à la dilution de l'effluent par l'ajout de lixiviat frais, nécessaire pour contrer le pouvoir adsorbant des déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin. Ces résultats mettent encore une fois en avant l'importance de ce type de déchets pour le maintien des conditions idéales pour une fermentation optimale.

Cette étude a également mis en avant que la recirculation de l'effluent va entraîner un changement des communautés microbiennes fermentaires, et en particulier le développement des *Lactobacillales* et des *Clostridiales*.

La deuxième étude, portée sur la réalisation de la fermentation sombre à une échelle pilote a permis d'améliorer la compréhension et les limites de la fermentation sombre liées au changement d'échelle ainsi qu'à la configuration du réacteur. En effet, tout d'abord, cette étude a mis en évidence que le temps optimal pour la production d'hydrogène est de 3 jours, une plus longue durée de réaction pouvant entraîner un risque d'apparition de

méthane par le développement d'archées méthanogènes. Si le temps de réaction est poussé à 7 jours, la majorité de l'hydrogène produit est réalisée les 3 premiers jours (de 83 à 89%). Cependant, cette étude a soulevé la problématique de l'impact du dimensionnement sur la production d'hydrogène qui reste encore à être étudié en détail (régulation de la pression partielle en hydrogène, hauteur du milieu de réaction).

Conclusion et Perspectives

La nécessité de valoriser les déchets ménagers couplée à l'intérêt porté sur l'utilisation de l'hydrogène dans le secteur des transports répond aux enjeux de développer une société plus durable basée sur une économie dite circulaire pour réduire notre impact environnemental et notre dépendance énergétique. Ce contexte général a encouragé Trifyl en collaboration avec l'INRA (LBE) de réaliser cette thèse soutenue financièrement par l'ADEME. L'objectif principal de ce doctorat a été d'optimiser un procédé en deux étapes pour la production de biohydrogène (H_2/CH_4) à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères dans le but, à terme, d'intégrer ce procédé dans les solutions industrielles pour la valorisation des déchets ménagers. La méthanisation étant un procédé déjà mature, ce travail de thèse s'est plus particulièrement intéressé au procédé de fermentation sombre permettant de produire de l'hydrogène par voie biologique, et correspondant à la première étape du procédé envisagé.

Durant cette thèse, afin de se rapprocher des conditions réelles, une FFOM reconstituée ainsi que du lixiviat initialement utilisé pour la percolation des bioréacteurs implantés sur le site de Trifyl (syndicat de traitement des déchets ménagers du Tarn) ont été utilisés. Le lixiviat présente un double intérêt qui est d'une part, d'apporter la communauté microbienne productrice d'hydrogène et d'autre part, d'apporter la quantité d'eau indispensable pour une production optimale d'hydrogène. Le choix de réaliser le travail expérimental avec un substrat modèle issu de la reconstitution du MODECOM de Trifyl a permis d'utiliser non seulement un substrat proche des conditions réelles mais aussi un substrat homogène et stable dans le temps, afin de pouvoir comparer les expériences réalisées au cours des 3 années du doctorat. De plus, durant cette thèse, le procédé envisagé afin d'étudier les conditions optimales pour la production d'hydrogène était de type batch non mélangé.

Dans ce contexte, la thèse s'est focalisée dans un premier chapitre sur l'optimisation de la production d'hydrogène par fermentation sombre. Pour ce faire, une première partie s'est intéressée à la présence d'inhibiteurs régulièrement cités comme problématiques lors de l'utilisation de lixiviat et de FFOM, à savoir l'azote ammoniacal et plus particulièrement l'ammoniac. Cette étude s'est ensuite penchée sur une inhibition plus globale causée par la force ionique liée à la charge de la solution. Nous avons montré que l'effet inhibiteur

observé sur le rendement en hydrogène provenait principalement de la force ionique et non de l'ammoniac présent dans le milieu, tel qu'il l'avait été préalablement décrit dans la littérature. Cette étude a permis dans un premier temps de mettre en évidence que la force ionique de la solution pouvait impacter négativement l'activité globale des microorganismes et notamment des bactéries de types *Clostridiaceae* et *Enterococcaceae*. La force ionique de la solution étant un paramètre difficile à mesurer dans une unité industrielle, nous avons également montré que la conductivité électrique, qui est un moyen rapide et peu coûteux à mettre en place sur un site en exploitation, est une mesure fiable pour identifier cette inhibition. L'étude de l'utilisation de la conductivité pour prédire l'inhibition du rendement en hydrogène a permis de fixer un seuil critique équivalent à 55,6 mS/cm représentant une diminution de 50% du rendement en hydrogène comparé au test témoin sans ajout d'ions dans le milieu. Par conséquent, la mesure en ligne de la conductivité peut être une solution fiable pour le suivi d'un procédé industriel. De plus, l'avantage d'une telle mesure est qu'elle ne pourrait dépendre ni du substrat, ni d'un ion spécifique et donc peut être potentiellement utilisée dans n'importe quel type de fermentation. Les résultats de cette étude ont également mis en évidence une diminution du rendement en métabolites en fonction de la force ionique ce qui peut signifier que cette technique est potentiellement applicable sur d'autres procédés de fermentation comme, par exemple, des réacteurs d'hydrolyse.

Dans une deuxième partie du chapitre consacré à l'optimisation de la production d'hydrogène par fermentation sombre, l'évaluation de l'effet des paramètres pouvant impacter la fermentation sombre a été réalisée. Il a été décidé de se focaliser plus particulièrement sur les paramètres liés au contexte industriel : température, taux de matière sèche (siccité), pH, concentration en azote ammoniacal et caractéristique du substrat.

Tout d'abord, un plan d'expérience a été réalisé sur quatre facteurs (pH initial, température, siccité et concentration en azote ammoniacal). Il a été mis en avant que le rendement en hydrogène était identique sur la gamme de pH initial utilisée (5 – 8) ce qui montre une grande liberté d'action par rapport à ce facteur. En effet, en fin de fermentation le pH tend vers une valeur de $5,5 \pm 0,2$ qui est reportée comme optimale pour la production

d'hydrogène. Le pH n'ayant pas besoin d'être régulé dans la partie fermentation sombre du procédé, cela va a priori diminuer les coûts du procédé. D'un point de vue statistique, seules la siccité et la concentration en azote ammoniacal possèdent un impact significatif sur le rendement en hydrogène. Sur la gamme étudiée en azote ammoniacal (1 – 5 g/L), l'augmentation de la concentration améliore le rendement en hydrogène : ce résultat permet de conforter l'utilisation du lixiviat présent sur le site de Trifyl, qui possède une concentration initiale en azote ammoniacal de $4,0 \pm 0,8$ g/L. De plus, d'après ce plan d'expérience, le rendement en hydrogène est optimal pour une siccité autour de 11,5%. Enfin, grâce à cette étude, nous avons observé que l'utilisation d'une température mésophile et thermophile n'avait pas d'impact significatif sur le rendement en hydrogène. Cependant, une différence significative a été mise en évidence tant sur la production d'AGVs que sur l'apparition de méthane. En effet, une apparition plus fréquente de méthane a été observée à 55°C ce qui peut altérer les performances du réacteur. De plus, concernant le rendement en AGVs, nous avons montré qu'à 55°C, le rendement en AGVs était plus faible qu'à 37°C, ce qui met en évidence que l'inoculum utilisé était moins adapté à une fermentation à 55°C. Dans le but de coupler le procédé de fermentation à un procédé de méthanisation, l'amélioration du rendement en AGVs et donc l'amélioration de la dégradation du substrat dans l'étape de fermentation est bénéfique et par conséquent, la température de 37°C est fortement conseillée.

Dans une dernière partie de ce chapitre, nous avons démontré que les déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin étaient nécessaires pour obtenir un rendement optimal en hydrogène. En effet, sans ce type de déchets, l'acidogénèse va induire un pH inférieur à 5 qui est en dehors de la gamme optimale pour la production d'hydrogène. Un changement de voie métabolite est également observé avec une production majoritaire de lactate. L'ajout déchets de types papiers, cartons et déchets de jardin va donc améliorer le rendement en hydrogène en stabilisant le pH autour d'un seuil optimal (6,2) en évitant une chute drastique du pH quelle que soit la proportion en papiers, cartons et déchets de jardin introduits. De plus, la proportion de papiers, cartons et déchets de jardin n'a pas d'impact sur le rendement en métabolites, ni sur les voies utilisées lorsque cette proportion est comprise entre 35 et 56% du substrat frais.

Le premier chapitre de résultats, centré sur l'optimisation de la fermentation sombre, a donc permis d'acquérir une meilleure connaissance des conditions opératoires favorables pour un rendement en hydrogène optimal. Dans une deuxième partie, l'intégration de ces connaissances à une étude sur la robustesse et stabilité du procédé de fermentation dans le cadre d'un couplage avec un réacteur de méthanisation a été effectuée. Les travaux réalisés dans ce chapitre nous ont permis d'appréhender la mise en place d'un réacteur de fermentation dans un procédé global et donc d'étudier les limites d'un tel procédé.

Pour cela, une première partie a consisté à étudier un procédé de recirculation de l'effluent au cours de fermentations successives. L'intérêt d'un tel procédé est qu'il permet d'une part de sélectionner peu à peu des microorganismes fermentaires et hydrolytiques adaptés au substrat et, d'autre part, d'ajuster le pH pour ainsi stabiliser la production d'hydrogène dans le temps. Cependant, la recirculation de l'effluent peut entraîner l'accumulation de plusieurs inhibiteurs comme les AGVs, la force ionique ou encore le développement de microorganismes consommateurs d'hydrogène et notamment les archées méthanogènes. L'objectif de cette étude a donc été d'étudier l'impact de la recirculation de l'effluent pour des fermentations successives avec une attention particulière sur l'accumulation des inhibiteurs et la robustesse/stabilité du procédé. Dans ces travaux, plusieurs stratégies de recirculation des effluents ont été testées : recirculation directe de l'effluent (sans traitement), traitement thermique initial du lixiviat puis arrêt du traitement lors des cycles suivants, et traitement thermique systématique du lixiviat et de l'effluent en début de chaque cycle.

Cette étude a permis de mettre en évidence que pour une production stable d'hydrogène au cours du temps, plusieurs conditions devaient être réunies. En effet, afin d'éviter le développement des archées méthanogènes, un traitement thermique préalable de la phase liquide est nécessaire. Nous avons démontré que seul un traitement thermique systématique permettait d'éviter la production de méthane au cours des différentes fermentations. De plus, l'absence d'accumulation d'autres inhibiteurs (AGVs et force ionique) était fortement dépendante de la dilution de l'effluent causée par une absorption importante de la phase liquide dans les déchets de types papiers, cartons. La recirculation de l'effluent avec un traitement systématique a montré une sélection de la communauté

microbienne avec deux microorganismes majoritaires qui sont les *Clostridiales* et les *Lactobacillales*. L'absence de lactate dans certaines fermentations met en évidence que celui-ci semble être consommé (avec l'acétate) pour produire de l'hydrogène et du butyrate. De plus, une recirculation de l'effluent pour des fermentations successives montre une production de métabolites fortement variable dans le temps, ce qui met en évidence la difficulté de stabiliser un tel procédé.

La difficulté à stabiliser le rendement en hydrogène ou en métabolites au cours des études réalisées avec différents réacteurs a mis en avant que la configuration du réacteur pouvait jouer un rôle non négligeable dans les performances de la fermentation sombre. Dans ce sens, une dernière série d'expérience a été consacrée à la production d'hydrogène dans un réacteur pilote permettant ainsi de s'intéresser à la problématique de l'impact du changement d'échelle sur la fermentation sombre. Lors de cette étude, la mesure de pH et de la production d'hydrogène dans le réacteur pilote durant 7 jours a permis montrer que la fermentation était essentiellement réalisée sur les 3 premiers jours avec $87\pm 3\%$ de l'hydrogène produit. Augmenter le temps de réaction au-delà de 3 jours va entraîner une apparition de méthane et un faible gain de production d'hydrogène. Afin d'optimiser un réacteur de fermentation, il n'est donc pas nécessaire de fixer un temps de séjour plus élevé que 3 jours. De plus, durant cette expérience, la fermentation sombre a montré un rendement plus élevé que les études précédentes (Chapitre III.4 et Chapitre IV.1), en hydrogène et autres métabolites avec une amélioration moyenne de 74% et 58%, respectivement. Ce travail a donc permis d'observer que le dimensionnement du réacteur pouvait jouer un rôle primordial sur le rendement en hydrogène. En effet, le procédé de régulation du biogaz dans le réacteur ou encore la hauteur du milieu qui peut impacter le transfert liquide/gaz de l'hydrogène pouvait potentiellement avoir un effet sur les variations du rendement observées. Cette étude a donc soulevé la problématique de l'impact du dimensionnement sur la production d'hydrogène qui reste encore à être étudié en détail.

Le travail expérimental réalisé au cours de cette thèse a donc permis de faire ressortir les conditions opératoires propices pour un rendement optimal en hydrogène tant du point de vue du milieu de fermentation que du procédé global mettant en lien les conditions idéales avec les conditions réalisables à l'échelle industrielle. Ces conclusions ont

montré que la fermentation sombre était robuste sur plusieurs points tels que le pH, la concentration en azote ammoniacal, la proportion de papiers, cartons et déchets de jardin dans les FFOMs ou encore la stabilité du procédé de recirculation avec un traitement thermique systématique. Cependant au niveau du dimensionnement du réacteur, des points restent néanmoins à être élucidés afin de comprendre une telle variation des résultats.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, les principales perspectives de recherches et industrielles qui pourraient être mises en œuvre sont décrites ci-dessous.

Dans un premier temps, il serait intéressant d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes liés au procédé de fermentation, c'est-à-dire en culture mixte avec un substrat complexe (fraction fermentescible des ordures ménagères).

Tout d'abord, une hypothèse régulièrement soulevée lors de cette thèse a été de dire que les bactéries homoacétogènes pouvaient être la cause de la consommation d'une partie de l'hydrogène produit. D'après la littérature, l'homoacétogénèse est souvent citée comme un des facteurs principaux limitant le rendement final en hydrogène (consommation de 11 à 43% de l'hydrogène produit) [53,90,213,227]. Cependant peu de solutions existent à l'heure actuelle pour éviter le développement des homoacétogènes. En effet l'élimination des homoacétogènes reste plus difficile à réaliser que les méthanogènes du fait de leurs diversités phylogénétiques [53]. Une étude poussée sur la compréhension du mécanisme de consommation de l'hydrogène par homoacétogénèse permettrait de cibler de façon précise ce type de bactéries dans nos conditions (déchets FFOM, lixiviat). Il sera ainsi plus aisé d'étudier leurs capacités à consommer l'hydrogène et enfin d'étudier une solution pour limiter voire éviter cette consommation pour, à terme, améliorer le rendement final en hydrogène.

De plus, ayant étudié un procédé global sur un substrat modèle, il serait intéressant d'élargir la nature des matières organiques utilisées afin d'observer les variations sur la fermentation sombre. En effet, d'après la littérature, le potentiel hydrogène est propre à chaque substrat et est fonction de la complexité de leur composition [57]. Lors des travaux

de thèse, les conditions idéales ont été fixées afin d'optimiser la fermentation sombre sur un substrat de type FFOM en utilisant toujours le même inoculum (lixiviat). Cependant, une étude intéressante à réaliser serait d'observer si une modification du substrat (biodéchets, déchets alimentaires, ordures ménagères brutes) entraîne une modification des conditions opératoires optimales et de la communauté microbienne qui se développe dans le milieu de fermentation [228]. Enfin, il serait intéressant, dans un procédé de recirculation de l'effluent, d'observer l'impact de l'utilisation de différents substrats en modifiant ou non les conditions opératoires (température, siccité) à chaque recirculation pour obtenir un rendement optimal en hydrogène. Ainsi, cette étude permettrait de mieux appréhender la flexibilité et la robustesse d'un tel procédé de fermentation en fonction de la variation du substrat.

D'un point de vue du procédé, plusieurs perspectives plus appliquées sur l'étude de l'amélioration des performances seraient également intéressantes à approfondir. En effet, il semble nécessaire d'élucider l'origine de la variabilité du rendement en hydrogène observé lors des différentes expériences menées au cours du doctorat. En effet, d'un point de vue industriel, un procédé de fermentation stable dans le temps est un avantage conséquent qui permet de faciliter grandement le contrôle du procédé et donc la maîtrise de son coût.

Comme soulevé dans le dernier chapitre, cette variabilité peut provenir du dimensionnement du réacteur (régulation de la pression du réacteur, transfert d'hydrogène liquide/gaz). Le transfert liquide/gaz est notamment un phénomène qui a déjà été étudié dans une thèse précédente (Cazier, 2015) qui a mis en évidence qu'en digestion anaérobie avec de fortes teneurs en matière sèche (supérieures à 15%), une inhibition était observée due à une diminution du transfert interfacial gaz/liquide au sein du milieu. De plus, cette diminution du transfert engendrerait par conséquent des accumulations locales d'inhibiteurs et notamment d'hydrogène (pression partielle en hydrogène) qui va en résulter une inhibition de l'hydrolyse [229].

Le transfert de gaz entre la phase liquide et l'espace gazeux de tête doit donc faire l'objet d'une étude plus approfondie. En effet, ce transfert peut être amélioré si la surface d'échange entre la phase liquide et l'espace de tête est augmentée. En ce sens, il serait

intéressant d'étudier avec des conditions opératoires identiques (pH, température, lixiviat, siccité, régulation de pression...) plusieurs réacteurs dont le diamètre varie sans modification de la hauteur du milieu de réaction. Si une modification du rendement est observée, alors il sera plus facile de faire une corrélation entre l'impact du dimensionnement du réacteur et le rendement en hydrogène. De plus, une étude des métabolites produits ainsi que de la communauté microbienne se développant permettrait d'étudier la fermentation dans sa globalité et d'observer les tendances notamment au niveau des microorganismes permettant l'hydrolyse des déchets.

Dans l'idée de comprendre de façon précise l'impact de la hauteur du milieu de réaction sur le rendement en hydrogène, une autre étude pourrait être effectuée. En effet, comme montrée dans la thèse de Cazier (2015), en digestion anaérobie et avec une teneur élevée en matière sèche, l'augmentation de la hauteur du milieu va entraîner une réduction du transfert liquide/gaz et donc induire une baisse des performances [230]. De plus, à fortes teneurs en matière sèche, des hétérogénéités du milieu (au niveau du cm) peuvent être observées comme par exemple le pH et peuvent donc accentuer localement les inhibitions [231]. Dans notre cas, l'hypothèse soulevée, en lien avec les recherches précédentes, serait de dire que si l'on réduit la hauteur du milieu de réaction alors ce transfert est moins limité et réduit les inhibitions causées par ce phénomène. Comme dans l'étude décrite précédemment, il serait donc intéressant de faire varier la hauteur du milieu sans modifier les autres paramètres (siccité, pH, température, diamètre du réacteur) ce qui nous permettrait de confirmer ou non cette hypothèse.

Dans un objectif de réaliser un procédé à 2 étapes pour la production de biohythane, il semble important d'évaluer l'impact du procédé de fermentation sur le procédé de méthanisation. En effet, un couplage des procédés est indispensable pour évaluer l'effet du substrat (déchets prédigérés et AGVs) issu d'un fermenteur sur le fonctionnement du méthaniseur et sur ses performances. Comparé aux déchets frais, le déchet prédigéré issu de la fermentation aura subi une étape d'hydrolyse qui va permettre d'une part d'hydrolyser les composés difficilement dégradables et d'autre part de produire des composés facilement assimilables pour la communauté microbienne productrice de méthane dans un second réacteur. D'après la littérature, certaines études ont montré qu'une amélioration du

rendement en méthane était observée dans un procédé à deux étapes par rapport à un méthaniseur simple [72]. Dans ce sens, une étude avec les conditions opératoires optimisées au cours de la thèse pourrait être effectuée autour de cette problématique. L'objectif serait d'analyser d'une part l'impact d'un déchet prédigéré sur la production de méthane et d'autre part d'étudier les avantages concrets de réaliser un procédé en 2 étapes (gain d'énergie totale, réduction globale du temps de réaction, amélioration du rendement en méthane). L'étude pourrait donc se porter sur la comparaison de la production de méthane sur deux réacteurs en parallèle, l'un alimenté en déchets frais et l'autre alimenté en déchets prédigérés issu du réacteur de fermentation. Lors de cette étude, l'analyse de la cinétique de production de méthane, de la productivité et de la communauté microbienne nous permettrait d'observer de façon précise l'impact de l'utilisation d'un tel substrat sur la un réacteur de digestion anaérobie. De plus, cette étude pourrait permettre d'observer si le temps de dégradation du déchet « prédigéré » issu d'un fermenteur est plus faible que pour un déchet frais et ainsi permettrait de réduire le temps de séjour pour obtenir un même rendement.

Enfin, afin de passer à une échelle industrielle, il est primordial de réaliser des tests à une échelle plus grande en se basant sur les connaissances accumulées au cours du doctorat. Il serait alors intéressant de réaliser les tests de fermentation en conditions réelles avec des déchets provenant de Trifyl et destinés initialement à la méthanisation. Nous pourrions ainsi obtenir des valeurs de rendement en hydrogène proche du contexte industriel, et ainsi de réaliser une étude technico-économique fiable qui est primordiale pour envisager une application industrielle. Cette étude technico-économique doit prendre en compte le coût complet du fermenteur (fonctionnement, amortissement, traitement thermique, analyse/séparation de gaz, valorisation de l'hydrogène...). Dans ce sens, une spécification technique du besoin (STB) a déjà été réalisée et elle est présentée en annexe (Annexe III et IV).

En conclusion, dans une vision globale des procédés biologiques utilisés pour la valorisation des ordures ménagères, l'intérêt se porte aujourd'hui sur le couplage de réacteur afin de créer une filière économiquement viable. En effet, si l'objectif est seulement de produire de l'hydrogène (par exemple), alors il sera très difficile de concurrencer la production

d'hydrogène par reformage du gaz naturel dont le prix s'élève à 3\$/kg ce qui est très faible. De plus, le procédé de fermentation ne dégrade qu'une petite partie de la matière organique [82]. C'est donc dans ce contexte qu'aujourd'hui l'idée du couplage du procédé est pertinente. Dans ce sens, le concept de bioraffinerie environnementale semble une bonne stratégie pour les biotechnologies. En effet, ce concept est un système qui va utiliser de façon intégrée la matière première afin de récupérer toutes les molécules à très fortes valeurs ajoutées (lactate, 1,3-propanediol, hydrogène, méthane...) issus de la dégradation de la matière organiques. Par exemple dans le procédé à deux étapes pour la production de biohythane, une étape après la fermentation peut être réalisée afin de récupérer des AGVs (acétate/butyrate) à l'aide d'une technique de séparation afin de les vendre comme composés purs. Cependant de nombreuses limitations techniques dans les bioprocédés ainsi que dans les techniques de séparation restent à être résolues avant d'envisager un procédé complet de bioraffinerie. L'avancement de la recherche dans ce domaine peut donc, à terme, créer une économie basée sur la bioraffinerie environnementale.

Annexes

Annexe I : Etude de la siccité sur le rendement en hydrogène

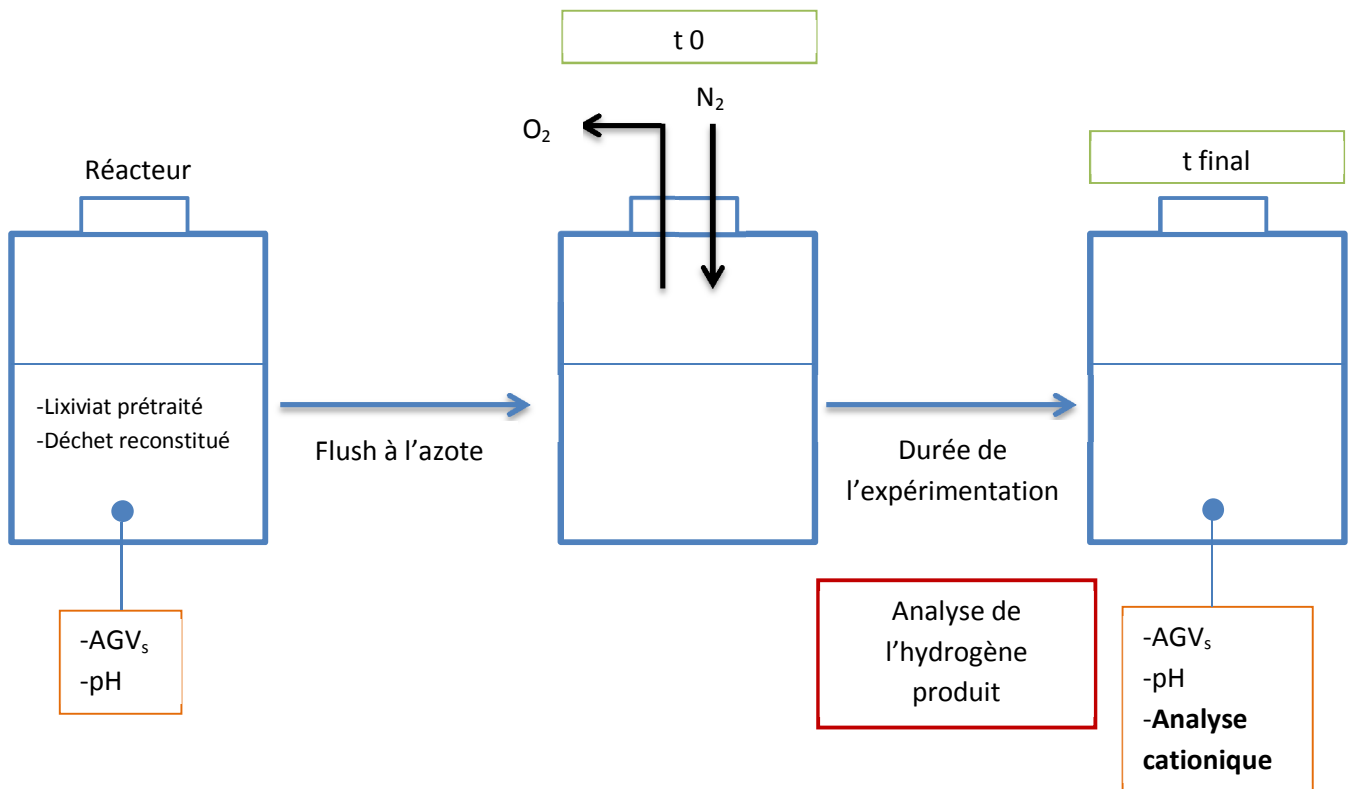
Objectif : -Observer la production d'hydrogène en fonction de la siccité du milieu

Principe :

Le réacteur de fermentation devra d'une part avoir des conditions permettant la production d'hydrogène et, d'autre part, des conditions qui pourront permettre le couplage avec un réacteur de méthanisation. Dans cette optique connaître la siccité maximale pour la production d'hydrogène est un paramètre clé pour le dimensionnement du premier réacteur

Schéma du réacteur de fermentation

Protocole :



Protocole :

Les tests vont être effectués dans des réacteurs fermés de types batch de volumes connus avec un volume de travail différent en fonction de la siccité. Les conditions opératoires sont répertoriées dans le Tableau 50.

Tableau 50 : Conditions opératoires de l'étude de la siccité sur la production d'hydrogène

| Conditions opératoires | |
|-------------------------|----------------------|
| pH | 6 avant mélange |
| Température (°C) | 37 |
| Siccité | 5-40% |
| Substrat | Déchets reconstitués |
| Nbre d'expérimentation | Duplicat |
| Prétraitement thermique | 90°C pendant 30 min |

Tableau 51 : Composition du milieu (substrat/inoculum) en fonction des siccités appliquées

| Siccité (%) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Msubstrat (g) | 14,6 | 14,6 | 14,6 | 14,6 | 14,6 | 14,6 | 14,6 | 14,6 |
| Minoc (g) | 332 | 115 | 66 | 43 | 31 | 23 | 17,2 | 13 |

Dans chaque fiole, une masse en substrat de 9,25 gMV, soit 14,6 g de déchets reconstitués et un volume de lixiviat préalablement calculé afin d'atteindre la siccité souhaitée seront introduits (Tableau 51). Le pH sera ajusté à 6 et un flush à l'azote sera effectué dans chaque bouteille pendant 5 minutes. Enfin, les batchs seront placés dans un bain thermostaté à 37°C. Une analyse GC du ciel gazeux sera effectuée tous les jours afin de calculer la production d'hydrogène au cours du temps.

Arrêt de l'expérimentation

Lorsqu'il n'y a plus de production d'hydrogène, l'expérimentation sera arrêtée et des analyses cationiques/anioniques et physico-chimiques seront effectuées. Le pH sera également mesuré à la fin de l'expérimentation pour chaque batch.

Résultats

La Figure 56 représente le rendement en hydrogène observé en fonction des siccités appliquées dans le milieu de réaction. D'après ces résultats, une augmentation du rendement en hydrogène est observée entre une siccité de 5 à 20% avec un rendement de $14,5 \pm 0,9$ mLH₂/gMV et $46,6 \pm 6,1$ mLH₂/gMV respectivement. Puis, au-dessus de cette valeur de siccité, le rendement en hydrogène diminue fortement jusqu'à une production quasi-nulle d'hydrogène lorsque la siccité est fixée à 25% ($1,1 \pm 0,9$ mLH₂/gMV). Enfin, entre une siccité de 25 et 40%, le rendement en hydrogène est proche avec une valeur moyenne très faible de $0,97 \pm 1,15$ mLH₂/gMV.

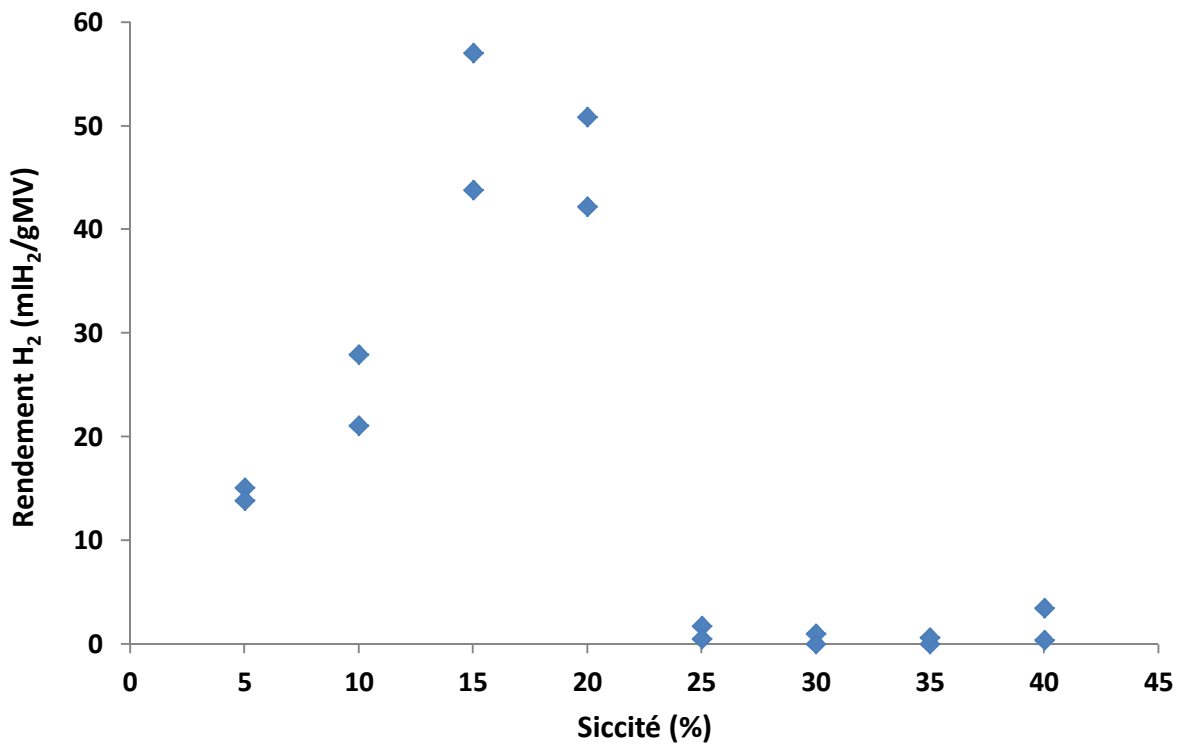


Figure 55 : Rendement en hydrogène obtenu en fonction de différentes siccités appliquées dans le milieu

Annexe II : Etude de la dégradation dans un méthaniseur d'un substrat pré-dégradé issu d'un fermenteur

Objectif : -Afin de connaître l'impact d'un réacteur de fermentation sur le substrat dans l'objectif de, par la suite, l'envoyer dans un méthaniseur. L'objectif de cette étude sera de réaliser un test BMP afin de connaître la dégradabilité d'un substrat issu d'un fermenteur et d'un substrat frais.

Principe :

Un test BMP permet la mesure du potentiel méthane et l'estimation de la biodégradabilité en milieu anaérobie. Ce test BMP a été effectué sur des substrats représentant la composition des FFOMs issues des déchets collectés par Trifyl ainsi que sur des substrats récupérés en sortie d'un réacteur de fermentation afin d'observer l'impact d'un tel fermenteur sur les FFOMs.

Protocole :

Le mode opératoire pour réaliser cette expérimentation va être identique pour les deux parties. Dans un premier temps, une solution dont les conditions opératoires sont définies dans le Tableau 52 va être effectuée.

Tableau 52 : Conditions opératoires pour réaliser le test BMP

| Conditions opératoires | |
|------------------------|------------|
| pH | Non régulé |
| Température (°C) | 37 |
| Volume de solution | 128 mL |

Le premier test correspond à l'utilisation d'un substrat frais reconstitué à l'aide du MODECOM de Trifyl et le 2^{ème} test sera effectué sur un substrat identique mais ayant subi une étape de fermentation (2-3 jours).

Réalisation d'un BMP :

Avant tout test, un broyage sera réalisé. Réaliser un test MS/MV sur ce même échantillon pour connaître précisément la valeur et observer l'homogénéité de notre échantillon. Des

boues de méthaniseur issus de Marseille ont été utilisées lors de ces tests. De plus la concentration dans les bouteilles est comprise entre 3 et 5 gMV/L.

- Préparation des bouteilles tests :
 - Le milieu de culture comprend :
 - Solution de macroéléments (N, P, Mg, Ca, K)
 - Solution de Na₂S
 - Solution oligoéléments
 - Tampon bicarbonate
 - Inoculum (concentration finale de 3 à 5 gMV/L)
 - L'échantillon (concentration finale de 0.5 gMS/gMV incoulée)

Cette étude s'est déroulée dans des réacteurs de type batch de 500 mL et la production de méthane a été suivie de façon continue à l'aide d'une micro-GC avec un intervalle d'analyse de quatre heures.

Résultats :

La Figure 57 représente le rendement en méthane à l'issue des tests BMP avec un substrat frais (AvF) et un substrat ayant subi au préalable une étape de fermentation (ApF). D'après les résultats une dégradabilité identique de la matière organique a été observée entre les deux substrats. En effet, pour le substrat frais (AvF) et le substrat ayant subi au préalable une étape de fermentation (ApF), le rendement de méthane a été de $355,8 \pm 16,1$ mLCH₄/gMV et $364,9 \pm 2,4$ mLCH₄/gMV. Ce résultat met en évidence le faible impact sur la dégradabilité du substrat et donc l'hydrogène produit lors de la fermentation est perçu comme un gain d'énergie.

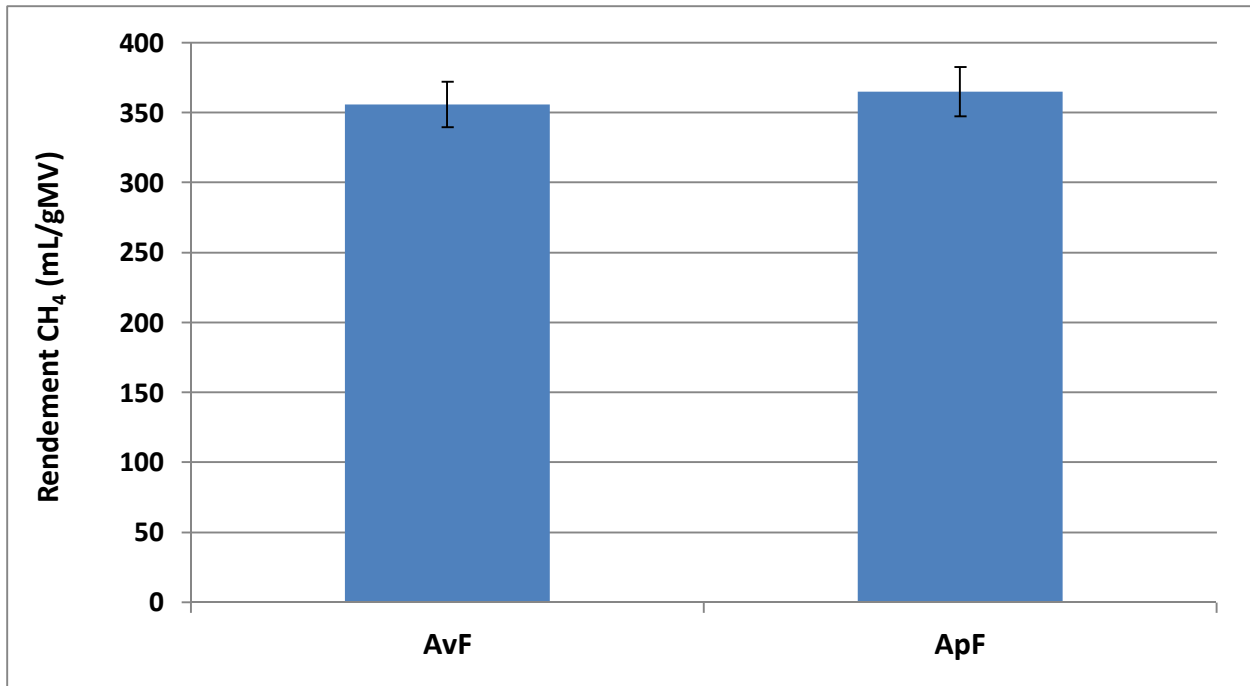


Figure 56 : Rendement en méthane sur un substrat reconstitué représentant la FFOM issu de Trifyl frais et un substrat ayant subi une étape de fermentation

Références

Références

- [1] Bhada-Tata P, Hoornweg D. What a waste : A global review of solid waste management. *Urban Dev Ser Knowledge Pap World Bank* 2012;15:1–116.
- [2] Chinellato G, Cavinato C, Bolzonella D, Heaven S, Banks CJ. Biohydrogen production from food waste in batch and semi-continuous conditions: Evaluation of a two-phase approach with digestate recirculation for pH control. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:4351–60. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.01.078.
- [3] Das L. Hydrogen engines: A view of the past and a look into the future. *Int J Hydrogen Energy* 1990;15:425–43. doi:10.1016/0360-3199(90)90200-I.
- [4] Meher Kotay S, Das D. Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:258–63. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.031.
- [5] Fulton J, Marmaro R., Egan G. Patent US : 7,721,682 B2, System for producing a hydrogen enriched fuel, 2010.
- [6] Jamal Y, Wyszynska M. Onboard Generation of Hydrogen-Rich Gaseous Fuels - A Review. *Int J Hydrogen Energy* 1994;19:557–72. doi:10.1016/0360-3199(94)90213-5.
- [7] Varde KS, Frame GM. A study of combustion and engine performance using electronic hydrogen fuel injection. *Int J Hydrogen Energy* 1984;9:327–32. doi:doi:10.1016/0360-3199(84)90085-5.
- [8] Blonskaja V, Menert A, Vilu R. Use of two-stage anaerobic treatment for distillery waste. *Adv Environ Res* 2003;7:671–8. doi:10.1016/S1093-0191(02)00038-2.
- [9] Pan J, Chen X, Sheng K, Yu Y, Zhang C, Ying Y. Effect of ammonia on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 38, Elsevier Ltd; 2013, p. 12747–54. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.093.
- [10] Gouillard S, Legendre A. Déchets ménagers. Collection. 2003.
- [11] Monteil M, Barberan S, Bel V, Hervé M-L. La ville et ses déchets dans le monde romain : rebuts et recyclages. *Colloq. Poitiers*, 2003, p. 121–31.
- [12] Béguin M. L'histoire des ordures : de la préhistoire à la fin du dix-neuvième siècle 2013. <https://vertigo.revues.org/14419#ftn2> (accessed May 21, 2017).
- [13] De Silguy C. Histoire des hommes et de leurs ordures, du moyen-âge à nos jours. Documents. 1996.
- [14] Christian D, Catherine M. Etat de l'art des technologies d'identification et de tri des déchets. 2013.
- [15] Radermacher W, Zhang Y, Eliason A, Faizal Yahya A, Pavone S. The EU in the world - eurostat Statistical books. 2015. doi:10.2785/35119.
- [16] Erwann F. ADEME : Campagne nationale de caractérisation des ordures ménagères. 2009.
- [17] ADEME. Déchets 2017, Les 10 chiffres-clés. 2017.
- [18] Hestin M, Guilcher S, Petit N. Bilan National Du Recyclage 2003-2012. 2015.
- [19] Pasquier S, Oberle S, Lucchitta JC, Favory B, Lizard Y, Chatry A, et al. Ademe, Eco-Emballages : Etude des perspectives d'évolution du tri par couleur du verre d'emballage en France (2000 -

- 2006). 2006.
- [20] Bertier AMB, Sureau S, Cote A, Drapeau P, France A, Jung C. Bilan national du recyclage 2005 - 2014. 2014.
- [21] Cewep. Confederation of European Waste-to-Energy Plants. 2010.
- [22] Commission Européenne - Bref : Incinération des déchets. 2006.
- [23] Montejo C, Costa C, Ramos P, Marquez M. Analysis and comparison of municipal solid waste and reject fraction as fuels for incineration plants. *Appl Therm Eng* 2011;31:2135–40. doi:10.1016/j.applthermaleng.2011.03.041.
- [24] Desplats R. Itom : Les Installations de traitement des ordures ménagères en France. 2010.
- [25] Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie. Valorisation biologique des déchets organiques : la méthanisation. 2013.
- [26] Leclerc B, Bouvard F, Gazeau G. Compostage : Les principes. 2012.
- [27] Soudi B. Compostage des déchets ménagers et valorisation du compost : cas des petites et moyennes communes au maroc. *H T E* 2001;121:32–56.
- [28] Martens J. Wet anaerobic digestion of MSW protects energy resources. 2005.
- [29] Vandevivere P, De Baere L, Verstraete W. Anaerobic digestion of solid waste : State of the art. *Water Sci Technol* 2000;41:283–90.
- [30] Karthikeyan OP, Visvanathan C. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2013;12:257–84. doi:10.1007/s11157-012-9304-9.
- [31] Nikolaidis P, Poullikkas A. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;67:597–611. doi:10.1016/j.rser.2016.09.044.
- [32] Kalinowski L, Pastor J-M. N° 1672 assemblée nationale 2014.
- [33] Goltsov VA, Veziroglu TN, Goltsova LF. Hydrogen civilization of the future - A new conception of the IAHE. *Int J Hydrogen Energy* 2006;31:153–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2005.04.045.
- [34] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today* 2009;139:244–60. doi:10.1016/j.cattod.2008.08.039.
- [35] AFHYPAC. Production et consommation d'hydrogène aujourd'hui. 2016.
- [36] Chaubey R, Sahu S, James OO, Maity S. A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. *Renew Sustain Energy Rev* 2013;23:443–62. doi:10.1016/j.rser.2013.02.019.
- [37] Dutta S. A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. *J Ind Eng Chem* 2014;20:1148–56. doi:10.1016/j.jiec.2013.07.037.
- [38] Megret O, Hubert L, Calbry M, Trably E, Carrere H, Bernet N. Production d'hydrogène à partir de déchets : Etat de l'art et potentiel d'émergence. 2015.
- [39] Hydrogen Council. How hydrogen empowers the energy transition. 2017.

Références

- [40] Yoshida T, Kojima K. Toyota MIRAI Fuel Cell Vehicle and Progress Toward a Future Hydrogen Society. *Interface Mag* 2015;24:45–9. doi:10.1149/2.F03152if.
- [41] AFHYPAC. L'union Européenne et l'hydrogène. 2016.
- [42] Ademe. L'hydrogène dans la transition énergétique. 2016.
- [43] Jentsch M, Trost T, Sterner M. Optimal Use of Power-to-Gas Energy Storage Systems in an 85% Renewable Energy Scenario. *Energy Procedia* 2014;46:254–61. doi:10.1016/j.egypro.2014.01.180.
- [44] Rafrafi Y. Impact des facteurs biotiques sur le réaseau métabolique des écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte. 2010.
- [45] Latrille E, Trably E, Larroche C. Production du Biohydrogène: voie fermentaire sombre. *Tech L'ingénieur* 2011;351:1–19. doi:BIO3351 v1.
- [46] Rosen M. A. Advances in hydrogen production by thermochemical water decomposition: A review. *Energy* 2010;35:1068–76. doi:10.1016/j.energy.2009.06.018.
- [47] Liu Z, Zhang C, Lu Y, Wu X, Wang L, Wang L, et al. States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresour Technol* 2013;135:292–303. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.027.
- [48] Das D, Veziroä TN. Hydrogen production by biological processes : a survey of literature 2001;26:13–28. doi:10.1016/S0360-3199(00)00058-6.
- [49] Manyi-Loh CE, Mamphweli SN, Meyer EL, Okoh AI, Makaka G, Simon M. Microbial anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10:4390–417. doi:10.3390/ijerph10094390.
- [50] Montero B, Garcia-Morales JL, Sales D, Solera R. Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 2008;99:3233–43. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.063.
- [51] Zhang S, Kim TH, Lee Y, Hwang SJ. Effects of VFAs concentration on bio-hydrogen production with *Clostridium bifermentans* 3AT-ma. *Energy Procedia* 2012;14:518–23. doi:10.1016/j.egypro.2011.12.968.
- [52] Amani T, Nosrati M, Sreekrishnan T. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environ Rev* 2010;18:255–78. doi:10.1139/A10-011.
- [53] Saady NMC. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:13172–91. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.122.
- [54] Monlau F, Sambusiti C, Barakat A, Guo XM, Latrille E, Trably E. Predictive Models of Biohydrogen and Biomethane Production Based on the Compositional and Structural Features of Lignocellulosic Materials. *Environ Sci Technol* 2012;46:12217–25. doi:10.1021/es303132t.
- [55] Dong L, Zhenhong Y, Yongming S, Xiaoying K, Yu Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:812–20. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.11.031.

- [56] De Sá LRV, Cammarota MC, De Oliveira TC, Oliveira EMM, Matos A, Ferreira-Leitão VS. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:2986–97. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.103.
- [57] Guo XM, Trably E, Latrille E, Carrre H, Steyer JP. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:10660–73. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.008.
- [58] Hawkes F, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes D. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:172–84. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.08.014.
- [59] Li C, Fang HHP. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2007;37:1–39. doi:10.1080/10643380600729071.
- [60] Xiao B-Y, Liu J. Effects of thermally pretreated temperature on bio-hydrogen production from sewage sludge. *J Environ Sci* 2006;18:6–12.
- [61] G. Cappai, G. D. Giannakis, A. Muntoni, A. Poletti, R. Pomi DS. Effect of inoculum to substrate ratio (ISR) on hydrogen production through dark fermentation of food waste. Fifteenth Int. Waste Manag. Landfill Symp., 2015. doi:10.13140/RG.2.1.3416.3929.
- [62] Romão BB, Batista FRX, Ferreira JS, Costa HCB, Resende MM, Cardoso VL. Biohydrogen production through dark fermentation by a microbial consortium using whey permeate as substrate. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;172:3670–85. doi:10.1007/s12010-014-0778-5.
- [63] Nissilä ME, Tähti HP, Rintala JA, Puhakka JA. Effects of heat treatment on hydrogen production potential and microbial community of thermophilic compost enrichment cultures. *Bioresour Technol* 2011;102:4501–6. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.072.
- [64] Hafez H, Nakhla G, El Naggar H. An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:5010–4. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.08.050.
- [65] Wang JL, Wan W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:2934–41. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.03.048.
- [66] Kannaiah Goud R, Sarkar O, Venkata Mohan S. Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:7572–86. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.10.046.
- [67] Motte J-C, Trably E, Escudé R, Hamelin J, Steyer J-P, Bernet N, et al. Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:164. doi:10.1186/1754-6834-6-164.
- [68] Cabrol L, Marone A, Tapia-Venegas E, Steyer JP, Ruiz-Filippi G, Trably E. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:158–81. doi:10.1093/femsre/fuw043.
- [69] Noike T, Takabatake H, Mizuno O, Ohba M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1367–71. doi:10.1016/S0360-3199(02)00120-9.

- [70] Mohan SV. Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: Influence of pretreatment and system operating conditions. *J Sci Ind Res (India)* 2008;67:950–61.
- [71] Favaro L, Alibardi L, Lavagnolo MC, Casella S, Basaglia M. Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:11774–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.137.
- [72] Liu D, Liu D, Zeng RJ, Angelidaki I. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res* 2006;40:2230–6. doi:10.1016/j.watres.2006.03.029.
- [73] Alzate-Gaviria LM, Sebastian PJ, Pérez-Hernández A, Eapen D. Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:3141–6. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.034.
- [74] Alibardi L, Cossu R. Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Manag* 2014;36:147–55. doi:10.1016/j.wasman.2014.11.019.
- [75] Zhu H, Béland M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int J Hydrogen Energy* 2006;31:1980–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.01.019.
- [76] Chen CC, Lin CY, Lin MC. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:224–8. doi:10.1007/s002530100814.
- [77] Chaganti SR, Kim DH, Lalman J a. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. *Renew Energy* 2012;48:117–21. doi:10.1016/j.renene.2012.04.015.
- [78] Yin Y, Hu J, Wang J. Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:13550–6. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.01.145.
- [79] Kan E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renew Energy* 2013;49:227–31. doi:10.1016/j.renene.2012.01.026.
- [80] Luo G, Xie L, Zou Z, Wang W, Zhou Q. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresour Technol* 2010;101:959–64. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.090.
- [81] Monlau F, Barakat A, Trably E, Dumas C, Steyer J-P, Carrère H. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2013;43:260–322. doi:10.1080/10643389.2011.604258.
- [82] Chatellard L, Trably E, Carrère H. The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresour Technol* 2016;221:541–9. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.084.
- [83] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int J Mol Sci* 2008;9:1621–51. doi:10.3390/ijms9091621.

Références

- [84] Pan C, Fan Y, Hou H, Pan C, Fan Y, Hou H. Fermentative Production of Hydrogen from Wheat Bran by Mixed Anaerobic Cultures Fermentative Production of Hydrogen from Wheat Bran by Mixed Anaerobic 2008;5812–8. doi:10.1021/ie701789c.
- [85] Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res* 2009;48:3713–29. doi:10.1021/ie801542g.
- [86] Zhang B, He PJ, Lü F, Shao LM, Wang P. Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Res* 2007;41:4468–78. doi:10.1016/j.watres.2007.06.061.
- [87] Show KY, Zhang ZP, Lee DJ. Design of bioreactors for hydrogen production. *J Sci Ind Res* 2008;67:941–9.
- [88] Argun H, Kargi F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36:7443–59. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.116.
- [89] Rittmann S, Herwig C. A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. *Microb Cell Fact* 2012;11:115. doi:10.1186/1475-2859-11-115.
- [90] Si B, Li J, Li B, Zhu Z, Shen R, Zhang Y, et al. The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). *Int J Hydrogen Energy* 2015;40:11414–21. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.04.035.
- [91] Zhang Z-P, Show K-Y, Tay J-H, Liang DT, Lee D-J, Jiang W-J. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem* 2006;41:2118–23. doi:10.1016/j.procbio.2006.05.021.
- [92] Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo HM. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew Sustain Energy Rev* 2009;13:1000–13. doi:10.1016/j.rser.2008.03.003.
- [93] Kim DH, Kim SH, Jung KW, Kim MS, Shin HS. Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. *Bioresour Technol* 2011;102:8646–52. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.030.
- [94] Xie GJ, Feng LB, Ren NQ, Ding J, Liu C, Xing DF, et al. Control strategies for hydrogen production through co-culture of *Ethanoligenens harbinense* B49 and immobilized *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:1929–35. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.138.
- [95] Ghimire A, Frunzo L, Pirozzi F, Trably E, Escudie R, Lens PNL, et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl Energy* 2015;144:73–95. doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.045.
- [96] Li Z, Wang H, Tang Z, Wang X, Bai J. Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:7413–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.09.048.
- [97] Fang HHP, Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol* 2002;82:87–93. doi:10.1016/S0960-8524(01)00110-9.
- [98] De Gioannis G, Friargiu M, Massi E, Muntoni a., Polettini a., Pomi R, et al. Biohydrogen

- production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:20930–41. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.10.046.
- [99] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:220–7. doi:10.1016/j.copbio.2007.04.002.
- [100] Jang YS, Han MJ, Lee J, Im JA, Lee YH, Papoutsakis ET, et al. Proteomic analyses of the phase transition from acidogenesis to solventogenesis using solventogenic and non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:5105–15. doi:10.1007/s00253-014-5738-z.
- [101] Logan BE. Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids 2005;39:9351–6. doi:10.1021/es0510515.
- [102] Khanal SK, Chen WH, Li L, Sung S. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:1123–31. doi:10.1016/j.ijhydene.2003.11.002.
- [103] Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour Technol* 2008;99:7928–40. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.044.
- [104] Karadag D, Puhakka J a. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:10954–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.07.070.
- [105] Valdez-Vazquez I, Ríos-Leal E, Esparza-García F, Cecchi F, Poggi-Varaldo HM. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrogen Energy* 2005;30:1383–91. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.09.016.
- [106] Fernández-Rodríguez J, Pérez M, Romero LI. Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis. *Chem Eng J* 2013;232:59–64. doi:10.1016/j.cej.2013.07.066.
- [107] Pan J, Zhang R, El-Mashad HM, Sun H, Ying Y. Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:6968–75. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.130.
- [108] Danko AS, Pinheiro F, Abreu ÂA, Alves MM. Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components. *Environ Eng Manag J* 2008;7:531–6.
- [109] Dong L, Zhenhong Y, Yongming S, Longlong M. Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:8234–40. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.058.
- [110] Romero Aguilar M a., Fdez-Güelfo L a., Álvarez-Gallego CJ, Romero García LI. Effect of HRT on hydrogen production and organic matter solubilization in acidogenic anaerobic digestion of OFMSW. *Chem Eng J* 2013;219:443–9. doi:10.1016/j.cej.2012.12.090.
- [111] Tyagi VK, Angérez Campoy R, Álvarez-Gallego CJ, Romero García LI. Enhancement in hydrogen production by thermophilic anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge--optimization of treatment conditions. *Bioresour Technol* 2014;164:408–

15. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.013.
- [112] Sreela-Or C, Imai T, Plangklang P, Reungsang A. Optimization of key factors affecting hydrogen production from food waste by anaerobic mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36:14120–33. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.136.
- [113] Angeriz-Campoy R, Álvarez-Gallego CJ, Romero-García LI. Thermophilic anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with food waste (FW): Enhancement of bio-hydrogen production. *Bioresour Technol* 2015;194:291–6. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.011.
- [114] Kim D, Han S, Kim S, Shin H. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2006;31:2158–69. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.012.
- [115] Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour Technol* 2000;73:59–65. doi:10.1016/S0960-8524(99)00130-3.
- [116] Aceves-Lara CA, Latrille E, Buffiere P, Bernet N, Steyer JP. Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chem Eng Process Process Intensif* 2008;47:1968–75. doi:10.1016/j.cep.2007.12.007.
- [117] Lee K-S, Tseng T-S, Liu Y-W, Hsiao Y-D. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:15556–62. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.039.
- [118] Liang TM, Cheng SS, Wu KL. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1157–65. doi:10.1016/S0360-3199(02)00099-X.
- [119] Elbeshbishy E, Dhar BR, Nakhla G, Lee H. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;79:656–68. doi:10.1016/j.rser.2017.05.075.
- [120] Ciranna A, Ferrari R, Santala V, Karp M. ScienceDirect Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer* : Kinetic , metabolic and transcription analyses. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:6391–401. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.047.
- [121] Van Niel EWJ, Claassen P a M, Stams a. JM. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol Bioeng* 2003;81:255–62. doi:10.1002/bit.10463.
- [122] Wang B, Wan W, Wang J. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:7013–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.09.027.
- [123] Kobayashi T, Xu K-Q, Li Y-Y, Inamori Y. Effect of sludge recirculation on characteristics of hydrogen production in a two-stage hydrogen–methane fermentation process treating food wastes. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:5602–11. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.12.123.
- [124] Nielsen HB, Angelidaki I. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Bioresour Technol* 2008;99:7995–8001. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.049.

- [125] Ramsay IR, Pullammanappallil PC. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: Derivation of stoichiometry. *Biodegradation* 2001;12:247–57. doi:10.1023/A:1013116728817.
- [126] Salerno MB, Park W, Zuo Y, Logan BE. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res* 2006;40:1167–72. doi:10.1016/j.watres.2006.01.024.
- [127] Wang B, Wan W, Wang J. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresour Technol* 2009;100:1211–3. doi:10.1016/j.biortech.2008.08.018.
- [128] Cavinato C, Giuliano a., Bolzonella D, Pavan P, Cecchi F. Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: A long-term pilot scale experience. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:11549–55. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.03.065.
- [129] González-Fernández C, García-Encina P a. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass and Bioenergy* 2009;33:1065–9. doi:10.1016/j.biombioe.2009.03.008.
- [130] Wang Q, Peng L, Su H. The effect of a buffer function on the semi-continuous anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 2013;139:43–9. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.006.
- [131] Benabdallah El Hadi T, Gali SAA, Mace S, Mata-Alvarez J. Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW. *Water Sci Technol* 2009;59:1153–8. doi:10.2166/wst.2009.100.
- [132] Lay J-J, Li Y-Y, Noike T. The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion processes. *Water Res* 1998;70:1075–82. doi:10.2175/106143098X123426.
- [133] Cavinato C, Bolzonella D, Fatone F, Cecchi F, Pavan P. Optimization of two-phase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for hydrogen and methane production through reject water recirculation. *Bioresour Technol* 2011;102:8605–11. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.084.
- [134] Ariunbaatar J, Scotto Di Perta E, Panico A, Frunzo L, Esposito G, Lens PNL, et al. Effect of ammoniacal nitrogen on one-stage and two-stage anaerobic digestion of food waste. *Waste Manag* 2015;38:388–98. doi:10.1016/j.wasman.2014.12.001.
- [135] Prochazka J, Dolejs P, Maca J, Dohanyos M. Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;93:439–47. doi:10.1007/s00253-011-3625-4.
- [136] Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol* 2008;99:4044–64. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057.
- [137] Lin L, Wan C, Lee D-J, Lei Z, Liu X. Ammonium assists orthophosphate removal from high-strength wastewaters by natural zeolite. *Sep Purif Technol* 2014;133:351–6. doi:10.1016/j.seppur.2014.07.010.
- [138] Serna-Maza a, Heaven S, Banks CJ. Ammonia removal in food waste anaerobic digestion using a side-stream stripping process. *Bioresour Technol* 2014;152:307–15. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.093.
- [139] Walker M, Iyer K, Heaven S, Banks CJ. Ammonia removal in anaerobic digestion by biogas stripping: An evaluation of process alternatives using a first order rate model based on experimental findings. *Chem Eng J* 2011;178:138–45. doi:10.1016/j.cej.2011.10.027.

Références

- [140] Abouelenien F, Fujiwara W, Namba Y, Kosseva M, Nishio N, Nakashimada Y. Improved methane fermentation of chicken manure via ammonia removal by biogas recycle. *Bioresour Technol* 2010;101:6368–73. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.071.
- [141] Liu L, Pang C, Wu S, Dong R. Optimization and evaluation of an air-recirculated stripping for ammonia removal from the anaerobic digestate of pig manure. *Process Saf Environ Prot* 2014;4–11. doi:10.1016/j.psep.2014.08.006.
- [142] Lin CY, Wu SY, Lin PJ, Chang JS, Hung CH, Lee KS, et al. Pilot-scale hydrogen fermentation system start-up performance. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:13452–7. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.11.123.
- [143] Lee Y-W, Chung J. Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen/methane fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:11746–55. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.08.093.
- [144] Tapia-Venegas E, Ramirez-Morales JE, Silva-Illanes F, Toledo-Alarcón J, Paillet F, Escudie R, et al. Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2015;14:761–85. doi:10.1007/s11157-015-9383-5.
- [145] Kalia VC, Purohit HJ. Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35:403–19. doi:10.1007/s10295-007-0300-y.
- [146] Das D, Veziroglu TN. Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:6046–57. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.098.
- [147] Su H, Cheng J, Zhou J, Song W, Cen K. Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:8846–53. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.09.001.
- [148] Marone A, Ayala-Campos OR, Trably E, Carmona-Martinez A a., Moscoviz R, Latrille E, et al. Coupling dark fermentation and microbial electrolysis to enhance. *Int J Hydrogen Energy* 2016;2. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.09.166.
- [149] Ueno Y, Fukui H, Goto M. Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environ Sci Technol* 2007;41:1413–9. doi:10.1021/es062127f.
- [150] Heet. Hydrogène et moteur a combustion interne : une technologie de transition réaliste vers l'économie hydrogène. 2006.
- [151] Bauer CG, Forest T. . Effect of hydrogen addition on the performance of methane-fueled vehicles . Part I : effect on S . I . engine performance. *Int J Hydrogen Energy* 2001;26:55–70. doi:10.1016/S0360-3199(00)00067-7.
- [152] Nagalingam B, Duebel F. Supplemented natural gas and hydrogen in AVL research engine. *Int J Hydrogen Energy* 1983;8:715–20. doi:10.1016/0360-3199(83)90181-7.
- [153] Dimopoulos P, Bach C, Soltic P, Boulouchos K. Hydrogen-natural gas blends fuelling passenger car engines: Combustion, emissions and well-to-wheels assessment. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:7224–36. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.012.
- [154] Das LM, Gulati R, Gupta PK. A comparative evaluation of the performance characteristics of a spark ignition engine using hydrogen and compressed natural gas as alternative fuels. *Int J*

- Hydrogen Energy 2000;25:783–93. doi:10.1016/S0360-3199(99)00103-2.
- [155] Burbano H, Amell a, Garcia J. Effects of hydrogen addition to methane on the flame structure and CO emissions in atmospheric burners. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:3410–5. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.04.020.
- [156] Patterson T, Esteves S, Dinsdale R, Guwy A, Maddy J. Life cycle assessment of biohydrogen and biomethane production and utilisation as a vehicle fuel. *Bioresour Technol* 2013;131:235–45. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.109.
- [157] Monlau F, Kaparaju P, Trably E, Steyer JP, Carrere H. Alkaline pretreatment to enhance one-stage CH₄ and two-stage H₂/CH₄ production from sunflower stalks: Mass, energy and economical balances. *Chem Eng J* 2015;260:377–85. doi:10.1016/j.cej.2014.08.108.
- [158] Luo G, Xie L, Zhou Q, Angelidaki I. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresour Technol* 2011;102:8700–6. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.012.
- [159] Han S-K, Shin H-S. Performance of an innovative two-stage process converting food waste to hydrogen and methane. *J Air Waste Manag Assoc* 2004;54:242–9. doi:10.1080/10473289.2004.10470895.
- [160] Wang X, Zhao Y. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:245–54. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.09.100.
- [161] Nathao C, Sirisukpoka U, Pisutpaisal N. Production of hydrogen and methane by one and two stage fermentation of food waste. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:15764–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.05.047.
- [162] Lee DY, Ebie Y, Xu KQ, Li YY, Inamori Y. Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresour Technol* 2010;101:S42–7. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.037.
- [163] Li D, Yuan Z, Sun Y, Ma L, Li L. Sequential Anaerobic Fermentative Production of Hydrogen and Methane from Organic Fraction of Municipal Solid Waste*. *Chinese J Applied Environ Biol* 2010;2009:250–7. doi:10.3724/SP.J.1145.2009.00250.
- [164] Antonopoulou G, Gavala HN, Skiadas I V, Angelopoulos K, Lyberatos G. Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresour Technol* 2008;99:110–9. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.048.
- [165] Kongjan P, O-Thong S, Angelidaki I. Performance and microbial community analysis of two-stage process with extreme thermophilic hydrogen and thermophilic methane production from hydrolysate in UASB reactors. *Bioresour Technol* 2011;102:4028–35. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.009.
- [166] O-Thong S, Suksong W, Promnuan K, Thipmune M, Mamimin C, Prasertsan P. Two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogenic process for biohythane production from palm oil mill effluent with methanogenic effluent recirculation for pH control. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41:21702–12. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.07.095.
- [167] Chu CF, Xu KQ, Li YY, Inamori Y. Hydrogen and methane potential based on the nature of food waste materials in a two-stage thermophilic fermentation process. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:10611–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.048.

- [168] Nasr N, Elbeshbishy E, Hafez H, Nakhla G, El Naggar MH. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. *Bioresour Technol* 2012;111:122–6. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.019.
- [169] Schievano A, Tenca A, Scaglia B, Merlino G, Rizzi A, Daffonchio D, et al. Two-Stage vs Single-Stage Thermophilic Anaerobic Digestion: Comparison of Energy Production and Biodegradation Efficiencies. *Environ Sci Technol* 2012;46:8502–10. doi:dx.doi.org/10.1021/es301376n.
- [170] Schievano A, Tenca A, Lonati S, Manzini E, Adani F. Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? *Appl Energy* 2014;124:335–42. doi:10.1016/j.apenergy.2014.03.024.
- [171] Grossin. Debattista J. Fractionnements isotopiques ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) engendrés par la méthanogénèse : apports pour la compréhension des processus de biodégradation lors de la digestion anaérobie - Application aux procédés anaérobies de traitements des déchets non dangereux. 2011.
- [172] Goupy J. Modélisation par les plans d'expériences. *Tech L'ingénieur* 2000:1–23.
- [173] Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the upland forest community of southern Wisconsin.pdf. *Ecol Monogr* 1957;27:325–349. doi:10.2307/1942268.
- [174] Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One* 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0007401.
- [175] Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5112–20. doi:10.1128/AEM.01043-13.
- [176] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7537–41. doi:10.1128/AEM.01541-09.
- [177] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011;27:2194–200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- [178] Akutsu Y, Lee DY, Li YY, Noike T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:5365–72. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.04.052.
- [179] Lay JJ. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng* 2001;74:280–7. doi:10.1002/bit.1118.
- [180] Müller T, Walter B, Wirtz A, Burkovski A. Ammonium toxicity in bacteria. *Curr Microbiol* 2006;52:400–6. doi:10.1007/s00284-005-0370-x.
- [181] Motte JC, Escudié R, Bernet N, Delgenes JP, Steyer JP, Dumas C. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 2013;144:141–8. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.057.
- [182] Fonoll X, Astals S, Dosta J, Mata-Alvarez J. Impact of paper and cardboard suppression on

- OFMSW anaerobic digestion. *Waste Manag* 2016;56:100–5. doi:10.1016/j.wasman.2016.05.023.
- [183] Banks CJ, Chesshire M, Heaven S, Arnold R. Anaerobic digestion of source-segregated domestic food waste: Performance assessment by mass and energy balance. *Bioresour Technol* 2011;102:612–20. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.005.
- [184] Zheng XJ, Zheng YM, Yu HQ. Influence of NaCl on Hydrogen Production from Glucose by Anaerobic Cultures. *Environ Technol* 2005;26:1073–80.
- [185] Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:799–811. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.11.015.
- [186] Gallert C, Winter J. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic waste: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;48:405–10.
- [187] Lefebvre O, Quentin S, Torrijos M, Godon JJ, Delgenès JP, Moletta R. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75:61–9. doi:10.1007/s00253-006-0799-2.
- [188] Pierra M, Trably E, Godon JJ, Bernet N. Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions. *Int J Hydrogen Energy* 2013;9:1–10. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.08.035.
- [189] Jolliffe LK, Doyle RJ, Streips UN. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 1981;25:753–63. doi:10.1016/0092-8674(81)90183-5.
- [190] Chapot-Chartier M. Les autolysines des bactéries lactiques 1996:91–109.
- [191] Scott KP, Martin JC, Duncan SH, Flint HJ. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;87:30–40. doi:10.1111/1574-6941.12186.
- [192] Cheng CL, Chang JS. Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol* 2011;102:8628–34. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.053.
- [193] Cheng CH, Hsu SC, Wu CH, Chang PW, Lin CY, Hung CH. Quantitative analysis of microorganism composition in a pilot-scale fermentative biohydrogen production system. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36:14153–61. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.05.023.
- [194] Abbassi-Guendouz A, Brockmann D, Trably E, Dumas C, Delgenès JP, Steyer JP, et al. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresour Technol* 2012;111:55–61. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.174.
- [195] Motte JC, Trably E, Hamelin J, Escudi R, Bonnafous A, Steyer JP, et al. Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. *Bioresour Technol* 2014;166:610–5. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.078.
- [196] Robledo-Narváez PN, Muñoz-Páez KM, Poggi-Varaldo HM, Ríos-Leal E, Calva-Calva G, Ortega-Clemente LA, et al. The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *J Environ Manage* 2013;128:126–37. doi:10.1016/j.jenvman.2013.04.042.
- [197] Capson-Tojo G, Trably E, Rouez M, Crest M, Steyer JP, Delgenes JP, et al. Dry anaerobic

Références

- digestion of food waste and cardboard at different substrate loads, solid contents and co-digestion proportions. *Bioresour Technol* 2017;233:166–75. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.126.
- [198] Li C, Liu H, Hao J, Zhang W, Ban L, Shi L. Influence of Temperature on Anaerobic Co-digestion of Dairy Manure and Edible Mushroom Cultivation Waste 2016:1006–10.
- [199] Li Q, Qiao W, Wang X, Takayanagi K, Shofie M, Li YY. Kinetic characterization of thermophilic and mesophilic anaerobic digestion for coffee grounds and waste activated sludge. *Waste Manag* 2015;36:77–85. doi:10.1016/j.wasman.2014.11.016.
- [200] Puhakka JA, Karadag D, Nissilä ME. Comparison of mesophilic and thermophilic anaerobic hydrogen production by hot spring enrichment culture. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:16453–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.121.
- [201] Elsharnouby O, Hafez H, Nakhla G, El Naggar MH. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:4945–66. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.032.
- [202] Wang CH, Lu W Bin, Chang JS. Feasibility study on fermentative conversion of raw and hydrolyzed starch to hydrogen using anaerobic mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:3849–59. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.05.009.
- [203] Kumar P, Patel SKS, Lee JK, Kalia VC. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 2013;31:1543–61. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.007.
- [204] Kotay SM, Das D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresour Technol* 2007;98:1183–90. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.009.
- [205] Eker S, Sarp M. Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations. *Int J Hydrogen Energy* 2017;42:2562–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.04.020.
- [206] Ren NQ, Chua H, Chan SY, Tsang YF, Wang YJ, Sin N. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresour Technol* 2007;98:1774–80. doi:10.1016/j.biortech.2006.07.026.
- [207] Chen X, Yuan H, Zou D, Liu Y, Zhu B, Chufo A, et al. Improving biomethane yield by controlling fermentation type of acidogenic phase in two-phase anaerobic co-digestion of food waste and rice straw. *Chem Eng J* 2015;273:254–60. doi:10.1016/j.cej.2015.03.067.
- [208] Stams A. Metabolic Interactions Between Anaerobic-Bacteria in Methanogenic Environments. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 1994;66:271–94. doi:10.1007/BF00871644.
- [209] Bilgili MS, Demir A, Özkaya B. Influence of leachate recirculation on aerobic and anaerobic decomposition of solid wastes. *J Hazard Mater* 2007;143:177–83. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.09.012.
- [210] Zuo Z, Wu S, Zhang W, Dong R. Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste. *Bioresour Technol* 2013;146:556–61. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.128.
- [211] Elbeshbishy E, Hafez H, Dhar BR, Nakhla G. Single and combined effect of various

- pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36:11379–87. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.02.067.
- [212] K. Thauer R. Biochemistry of methanogenesis : a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 1998;144:2377–406. doi:10.1099/00221287-144-9-2377.
- [213] Luo G, Karakashev D, Xie L, Zhou Q, Angelidaki I. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol Bioeng* 2011;108:1816–27. doi:10.1002/bit.23122.
- [214] Alibardi L, Favaro L, Lavagnolo MC, Basaglia M, Casella S. Effects of heat treatment on microbial communities of granular sludge for biological hydrogen production. *Water Sci Technol* 2012;66:1483 LP-1490.
- [215] Koskinen PEP, Kaksonen AH, Puhakka JA. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:742–58. doi:10.1002/bit.21299.
- [216] Liu IC, Whang LM, Ren WJ, Lin PY. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36:439–49. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.10.045.
- [217] Rafrafi Y, Trably E, Hamelin J, Latrille E, Meynial-Salles I, Benomar S, et al. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:4975–85. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.008.
- [218] Roos S, Karner F, Axelsson L, Jonsson H. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 1:251–8. doi:10.1099/00207713-50-1-251.
- [219] Meroth CB, Hammes WP, Hertel C. Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:151–9. doi:10.1078/072320204322881763.
- [220] Quatravaux S, Remize F, Bryckaert E, Colavizza D, Guzzo J. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J Appl Microbiol* 2006;101:903–12. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02955.x.
- [221] Hensel R, Mayr U, Fujiki H, Kandler O. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria.pdf 1977;3:83–92.
- [222] Balow A, Truper H., Dworkin M, Harder W. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag 1992;2:1800–39.
- [223] Jo JH, Lee DS, Park D, Park JM. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresour Technol* 2008;99:6666–72. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.067.
- [224] Ren NQ, Tang J, Liu BF, Guo WQ. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:2807–13. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.010.
- [225] Shi Y, Zhao X tao, Cao P, Hu Y, Zhang L, Jia Y, et al. Hydrogen bio-production through

Références

- anaerobic microorganism fermentation using kitchen wastes as substrate. *Biotechnol Lett* 2009;31:1327–33. doi:10.1007/s10529-009-0024-3.
- [226] Bastidas-Oyanedel JR, Mohd-Zaki Z, Zeng RJ, Bernet N, Pratt S, Steyer JP, et al. Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresour Technol* 2012;110:503–9. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.122.
- [227] Shanmugam SR, Chaganti SR, Lalman J a., Heath DD. Statistical optimization of conditions for minimum H₂ consumption in mixed anaerobic cultures: Effect on homoacetogenesis and methanogenesis. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:15433–45. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.07.143.
- [228] Alibardi L, Cossu R. Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Manag* 2016;47:69–77. doi:10.1016/j.wasman.2015.07.049.
- [229] Cazier E a., Trably E, Steyer JP, Escudie R. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 2015;190:106–13. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.055.
- [230] Cazier E. Rôle des gaz dissous dans la digestion anaérobie par voie sèche des déchets ligno-cellulosiques. 2015.
- [231] Staley BF, Los Reyes FL, Barlaz M a. Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:2381–91. doi:10.1128/AEM.02349-10.



OPTIMIZATION OF A TWO-STEP PROCESS FOR GENERATING A MIXTURE OF H_2/CH_4 (BIOHYTHANE) USING ORGANIC FRACTION OF MUNICIPAL SOLID WASTE

Two-step process producing biologically a mixture of H_2/CH_4 (5-20 % of H_2) so called biohythane can be used for organic fraction of municipal solid waste valorization (OFMSW). The first step consists of a dark fermentation reactor (hydrolysis/acidogenesis) which allows a partial degradation of organic matter into H_2 and simple molecules (volatile fatty acid, sugar, ethanol...). Then the outlet of the first reactor can be used in a second reactor for methane production ending organic matter degradation. However, only high efficiency of the dark fermentation step allows making this two-step process economically viable compared to a simple anaerobic digestion reactor. The aim of this thesis is to improve the knowledge of the dark fermentation process for optimizing hydrogen and metabolites productions. Experiments were achieved to better understanding the main factors limiting hydrogen production along with the operational conditions that could improve hydrogen yield. This thesis also shows the high stability and robustness of effluent recirculation for consecutive hydrogen batch reactor. Finally, several sizes of reactors were performed for a scale-up of the process in order to reach the real operational conditions in industrial scale. This thesis provides new knowledge of the dark fermentation process in mixed culture for creating an industrial two-step process for biohythane production using municipal solid waste.

DEFENDED ON 9TH NOVEMBER 2017 AT :



ADENE



Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie



WITH THE FINANCIAL SUPPORT OF :



INRA
SCIENCE & IMPACT

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Unité de recherche (UR0050) - Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

102, avenue des Etangs
F-11100 Narbonne
France

Tél. : +33 4 68 42 51 51
Courriel: lbe-contact@supagro.inra.fr
www.montpellier.inra.fr/narbonne

