

Hydrogène : filières nouvelles de production et applications

Rapport final

BRGM/RP-52764-FR

juillet 2004

Étude réalisée dans le cadre du projet
de recherche ENER 09

**F. Battaglia-Brunet, F. Bodéan, M.-C. Dictor, D. Guyonnet,
C. Michel, C. Nowak, S. Touzé**
Avec la collaboration de
de P. Gallé, E. Proust



Géosciences pour une Terre durable

brgm

Mots clés : Hydrogène, Déchets industriels, Déchets ménagers, Hydrogénases, Nitrogénases, Fermentation, Acidogénèse.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Battaglia-Brunet F., Bodéan F., Dictor M.C., Guyonnet D., Michel C., Nowak C., Touzé S.
(2004) - Hydrogène : filières nouvelles de production et applications. BRGM/RP-52764-FR,
111 p., 29 fig., 9 tabl., 7 pl., 2 ann.

© BRGM, 2004, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

L'hydrogène est un vecteur énergétique propre, dont l'utilisation devrait connaître un développement important à moyen et long termes. Bien que marginale en comparaison des grandes voies de synthèse industrielle, l'utilisation de la biomasse ou des déchets comme source d'hydrogène pourrait s'avérer intéressante localement. Le projet ENER 09, financé à 100 % en 2003 par le budget de recherche du BRGM, avait pour objectif d'identifier les voies de production d'hydrogène à la fois prometteuses et en accord avec les missions du BRGM. Un volet du projet s'intéressait aux applications environnementales de l'hydrogène.

Un état de l'art a été réalisé sur le thème des enzymes impliquées dans la production biologique d'hydrogène, processus très répandu dans le monde microbien. Les principales voies enzymatiques sont détaillées, ainsi que leur rôle métabolique.

Les différentes tentatives de développement de procédés de production biologique d'hydrogène à l'échelle du laboratoire ont été considérées. Aucune de ces expériences n'a pour l'instant été extrapolée à grande échelle. Les voies de production utilisant l'énergie lumineuse par l'intermédiaire des systèmes photosynthétiques sont séduisantes du point de vue théorique. Cependant, leur développement est actuellement limité par des obstacles technologiques : les organismes sont incapables de convertir efficacement l'énergie solaire à forte intensité lumineuse, et la complexité des photobioréacteurs amoindrit l'intérêt économique potentiel des procédés envisagés. Les voies de production par fermentation obscure paraissent plus simples : elles sont réalisables dans des digesteurs de type classique. Cependant, la conversion du substrat organique en hydrogène est incomplète. Une partie de l'énergie initialement contenue dans la biomasse est « gaspillée » sous forme de sous-produits, acides organiques ou alcools. Le principal défi à relever dans ce domaine est l'obtention de rendements de conversion plus élevés, par la sélection d'organismes performants et la manipulation des conditions opératoires.

La gestion des déchets est un des domaines dans lesquels le BRGM possède une expérience reconnue. Les déchets, industriels ou d'origine agroalimentaire, peuvent contenir un potentiel énergétique chimique ou biochimique. L'étude de la bibliographie a permis d'établir une liste des procédés de synthèse d'hydrogène à partir des déchets, par des voies thermiques, chimiques ou biologiques. L'analyse des données disponibles révèle l'intérêt prépondérant des déchets organiques et dans une moindre mesure celle des métaux. La filière aluminium pourrait être une piste à poursuivre, même si les tonnages ne peuvent être que minoritaires vis-à-vis des potentialités de la biomasse.

À la lumière des résultats de l'analyse bibliographique, et en tenant compte des priorités thématiques du BRGM, il semblerait judicieux de s'orienter vers l'optimisation d'un procédé de fermentation obscure pour générer de l'hydrogène à partir de la fraction organique des déchets ménagers.

Une première expérience a été réalisée au laboratoire en s'inspirant des indications d'un brevet. L'application d'un courant électrique dans un bioréacteur réalisant la fermentation méthanogène d'un déchet permet de stabiliser le système bio-électrochimique dans une phase de production active d'hydrogène. La réaction ne s'accompagne pas d'un dégagement de CO₂ en phase gaz : le carbone inorganique semble piégé dans le bioréacteur sous forme de carbonates.

Ces résultats doivent être confirmés et complétés par des expériences dont les objectifs seront les suivants :

- établir le bilan énergétique du système pour différentes intensités de courant électrique ;
- comparer les vitesses de maturation d'un déchet par méthanogénèse et par fermentation génératrice d'hydrogène ;
- élucider le mécanisme de stabilisation en phase de production d'H₂ ;
- tester d'autres méthodes que l'injection de courant électrique pour stabiliser la production d'H₂ ;
- optimiser les conditions de fermentation afin d'obtenir le meilleur rendement possible de conversion en hydrogène de l'énergie contenue dans le déchet.

Dans le projet ENER 09, un module était consacré aux utilisations environnementales de l'hydrogène. Des expériences de laboratoire ont été effectuées avec un polymère d'acide lactique et de glycérol nommé HRC® (Hydrogen Releasing Compound), dont la fermentation génère de l'hydrogène *in situ*. Ce substrat doit activer les processus de dépollution impliquant des réactions de réduction, pour le Cr(VI) ou les molécules organochlorées. Les résultats obtenus en 2003 montrent que le HRC® est plus efficace que l'acide lactique non polymérisé pour la réduction du Cr(VI) en présence de bactéries. Ces données seront exploitables dans le cadre de projets futurs impliquant la mise en œuvre de procédés biologiques *in situ* (barrières perméables réactives, sols pollués).

Sommaire

1. Introduction	11
2. Production chimique et électrochimique d'H₂. Réactions générant de l'hydrogène et exemples d'actions R&D à partir de déchets	13
2.1. INTRODUCTION.....	13
2.2. RÉACTIONS GÉNÉRANT DE L'HYDROGÈNE.....	14
2.2.1. Les combustibles fossiles et les ressources alternatives	14
2.2.2. Attaque des métaux et des hydrures	14
2.2.3. Électrolyse.....	15
2.2.4. Source naturelle	16
2.3. PRODUCTION D'HYDROGÈNE À PARTIR DE DÉCHETS	16
2.3.1. Développement de procédés innovants.....	16
2.3.2. Cas d'une décharge de déchets industriels	17
2.3.3. Évaluation de la filière de l'aluminium	17
2.3.4. Échantillons riches en fer	18
2.4. CONCLUSION.....	18
3. État de l'art sur la production directe d'hydrogène en bio-réacteurs	21
3.1. LES PROCÉDÉS UTILISANT L'ÉNERGIE LUMINEUSE	21
3.1.1. Algues Eucaryotes	23
3.1.2. Cyanobactéries	23
3.1.3. La photo-fermentation : bactéries pourpres et bactéries vertes	24
3.2. LA FERMENTATION OBSCURE	25
3.2.1. Théorie de la fermentation obscure	25
3.2.2. Obtention d'une culture produisant de l'H ₂	27
3.2.3. Paramètres opératoires de la fermentation.....	27
3.2.4. Utilisation des sous-produits	29
3.3. MICRO-AÉROPHILIE.....	29
3.4. CONCLUSION.....	30

4. Enzymes bactériennes impliquées dans le métabolisme de l'hydrogène : biochimie et génétique de la bio-production d'hydrogène	31
4.1. LES NITROGÉNASES.....	31
4.1.1. Biochimie et génétique des nitrogénases	32
4.1.2. Activité de production d'hydrogène par les nitrogénases	33
4.2. LES HYDROGÉNASES.....	35
4.2.1. Les hydrogénases des bactéries sulfato-réductrices (BSR).....	36
4.2.2. Les hydrogénases des cyanobactéries	37
4.2.3. Production d'hydrogène par les enzymes impliquées dans la fermentation	40
4.3. STRATÉGIES POUR AMÉLIORER LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE PAR LES CYANOBACTÉRIES	42
4.3.1. Augmentation de la production d'hydrogène par biologie moléculaire	42
4.3.2. Augmentation de la production d'hydrogène par modification des conditions de croissance	43
4.4. CONCLUSION	45
5. Production d'hydrogène à partir d'ordures ménagères en bioréacteur contrôlé	47
5.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS	47
5.2. ÉTAT DES LIEUX RÉALISÉ PAR L'ÉTUDE EXPLORATOIRE MATUTA-H ₂	48
5.2.1. État des lieux sur l'hydrogène.....	48
5.2.2. Rappel sur le gaz de décharge.....	48
5.2.3. Gisement de biogaz.....	49
5.2.4. Intérêt d'associer le gaz de décharge et l'hydrogène	49
5.2.5. Voies potentielles de production d'hydrogène	49
5.2.6. Valorisation de l'hydrogène	50
5.2.7. Cas répertoriés	51
5.2.8. Conclusion	51
5.3. GAZ DE DÉCHARGE	51
5.3.1. Processus de dégradation de la matière organique	51
5.3.2. Production de gaz au sein d'une décharge	52
5.4. BLOCAGE DE LA MÉTHANOGENÈSE PAR APPLICATION D'UN COURANT ÉLECTRIQUE ; BREVET DE ROYCHOWDHURY.....	54
5.4.1. Principe et conditions initiales requises	54
5.4.2. Essais en laboratoire présentés par le brevet	55

5.5. EXPÉRIMENTATION EN LABORATOIRE AU BRGM.....	57
5.5.1. Objectifs	57
5.5.2. Matériel et Méthodes.....	58
5.5.3. Résultats	63
5.5.4. Discussion.....	77
5.5.5. Conclusion	78
5.6. LES TRAVAUX 2004.....	79
5.6.1. Lancement de nouveaux essais.....	79
5.6.2. Améliorations du système de l'essai et acquisition de matériel.	81
5.6.3. Perspectives.....	82
6. Applications environnementales de l'hydrogène : réduction biologique du Cr(VI)	83
6.1. INTRODUCTION.....	83
6.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	84
6.2.1. Préparation des inocula	84
6.2.2. Conditions expérimentales	85
6.3. RÉSULTATS	86
6.3.1. Consommation de lactate et production d'acétate	86
6.3.2. Réduction du Cr(VI)	90
6.3.3. Croissance bactérienne	91
6.3.4. Production d'hydrogène gaz	93
6.4. CONCLUSIONS	94
7. Conclusion générale	95
Bibliographie	97

Liste des figures

Fig. 1 - Voies métaboliques possibles chez les bactéries anaérobies strictes (type Clostridium),	26
Fig. 2 - Schéma de l'organisation de la nitrogénase conventionnelle.....	34
Fig. 3 - Structure tridimensionnelle de la nitrogénase.....	34
Fig. 4 - Structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à Nickel/Fer.....	36
Fig. 5 - Schéma de l'organisation de l'hydrogénase à Nickel/Fer de <i>Desulfovibrio gigas</i> (Cammack, 1995).	37
Fig. 6 - Schéma de l'organisation de l'«uptake» hydrogénase des cyanobactéries.....	39
Fig. 7 - Schéma de l'organisation de l'hydrogénase bidirectionnelle.....	39
Fig. 8 - Production d'hydrogène par fermentation microbienne : production enzymatique d'hydrogène à partir du saccharose.....	41
Fig. 9 - Les 3 phases successives de la dégradation de la matière organique.....	52
Fig. 10 - Schéma typique de génération de biogaz sur une décharge d'ordures ménagères (d'après Farquhar et Rovers, 1973, modifié).....	53
Fig. 11 - Procédé de production d'H ₂ et d'inhibition de la méthanogénèse à partir de matériau décomposé de façon anaérobie en présence d'un courant électrique (d'après Roychowdhury, 2000).	56
Fig. 12 - Expérience en bouteille de 800 mL sur des boues digérées issues de digesteur primaire (d'après Roychowdhury, 2000).	55
Fig. 13 - Expérience en bouteille de 800 mL sur du compost de déchets ménagers municipaux (d'après Roychowdhury, 2000).	56
Fig. 14 - Expérience réalisée dans un fermenteur de 6 litres sur du matériel de décharge (d'après Roychowdhury, 2000).	57
Fig. 15 - Schéma du système adopté pour l'expérience « Réacteur 5 litres ».....	62
Fig. 16 - Volume cumulé du gaz produit au cours de l'essai.....	65
Fig. 17 - Composition du gaz au cours des 5 périodes de l'essai.....	67
Fig. 18 - Comparaison du volume d'hydrogène mesuré par rapport au volume théoriquement produit par électrolyse à chaque pesée des électrodes.....	69
Fig. 19 - Variations de l'intensité et de la tension du courant électrique appliqué au cours de l'essai.....	70
Fig. 20 - Variation de l'intensité et du pH au sein du réacteur.....	73
Fig. 21 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en lactate.....	87
Fig. 22 - Cultures sur HRC®, évolution des concentrations en lactate.....	87
Fig. 23 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.....	88
Fig. 24 - Cultures sur HRC®, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.....	88

Fig. 25 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.	89
Fig. 26 - Cultures sur HRC®, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.	89
Fig. 27 - Évolution des concentrations en Cr(VI). Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.	91
Fig. 28 - Concentration bactérienne après 1 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. D : <i>D. norvegicum</i> ; M : Métalbio.	92
Fig. 29 - Concentrations bactériennes après 3 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. D : <i>D. norvegicum</i> ; M : Métalbio.	93

Liste des tableaux

Tabl. 1 - Tonnages de la production d'aluminium primaire et recyclé (1 ^{ère} et 2 ^{ème} fusions) en France et des déchets associés d'après Fédération des Minerais et métaux, 2002 ; Ademe, 1998 ; Observatoire des matières premières, 1999.....	19
Tabl. 2 - Production microbienne d'hydrogène (d'après Nandi and Sengupta, 1998).....	22
Tabl. 3 - Comparaison de rendements de production d'hydrogène par fermentation obscure.	27
Tabl. 4 - Caractéristiques des hydrogénases isolées des <i>Desulfovibrio</i> et <i>Desulfomicrobium</i>	38
Tabl. 5 - Propriétés des hydrogénases bidirectionnelles et « uptake » des cyanobactéries.....	40
Tabl. 6 - Volume de gaz produit sur les 5 périodes de l'essai.	63
Tabl. 7 - Les débits moyens de gaz au cours des 5 périodes de l'essai.	66
Tabl. 8 - Synthèse des essais envisagés pour 2004.	81
Tabl. 9 - Conditions expérimentales. Au total, 28 fioles ont été préparées.	85

Liste des planches

Pl. 1 - Échantillonnage de déchets à la pelle mécanique sur la décharge de Mézières-les-Cléry (Loiret).	59
Pl. 2 - Zoom sur l'échantillon de déchets prélevés.	59
Pl. 3 - Broyage du déchet.....	60
Pl. 4 - Système mis en œuvre permettant la maturation accélérée du déchet et la mesure du volume de gaz en continu.....	64
Pl. 5 - Réacteur de 5 litres équipé de deux électrodes et d'une sonde pH, T°.....	64
Pl. 6 - Corrosion de l'anode et dépôt sur la cathode.....	68

Pl. 7- La gelée blanche et la couleur rouille apparues au cours du test Bilan Bilan énergétique	74
--	----

Liste des annexes

Annexe 1 - Composition du milieu utilisé.....	105
Annexe 2 - Résultat de l'analyse DRX du dépôt de la cathode	109

1. Introduction

L'hydrogène est un vecteur énergétique propre dont la combustion ne génère que de la vapeur d'eau. Une utilisation croissante de l'hydrogène pour diverses applications est prévue par les gouvernements de divers pays et par les organisations internationales. Il est cependant nécessaire de développer des procédés de production d'hydrogène qui ne dégagent pas de gaz à effet de serre. En terme de quantité d'hydrogène produit, les voies de synthèse à partir des combustibles fossiles avec séquestration du CO₂ à la source seront certainement très majoritaires. La conversion des énergies nucléaire ou renouvelables (géothermie, solaire, hydro-électricité, éolien) en hydrogène est également envisagée. La biomasse, énergie solaire stockée sous forme de matière organique par la photosynthèse, peut également être convertie en hydrogène par des procédés thermo-chimiques ou biologiques. Enfin, les déchets de toute nature (municipaux, industriels, agricoles, effluents agro-alimentaires, eaux usées, boues de stations d'épuration) contiennent soit de la biomasse, soit des matériaux renfermant un potentiel chimique énergétique. Le projet 2003 ENER-09 s'est intéressé aux filières potentielles de génération d'hydrogène à partir des déchets.

Les réactions biologiques de consommation ou de production de l'hydrogène correspondent à divers rôles physiologiques (génération d'énergie via une respiration aérobie ou anaérobie, consommation des électrons lors d'une fermentation anaérobie, fixation de l'azote...). Depuis plusieurs dizaines d'années, de nombreuses équipes travaillent à la mise au point de procédés biologiques qui permettraient de convertir l'énergie solaire ou la biomasse en hydrogène. Un des objectifs du projet ENER 09 était de dégager, à partir d'une abondante littérature, des voies de production d'hydrogène à la fois prometteuses et en synergie avec les thématiques de recherche du BRGM.

La gestion des déchets est un des domaines dans lesquels le BRGM est impliqué depuis plusieurs années, à travers de nombreux projets complémentaires : filières de tri et de traitement, stockage, gestion des lixiviats, maturation et production de biogaz. Cette expérience multidisciplinaire est un atout pour la conception de procédés de conversion des déchets en hydrogène. La Directive Européenne sur le stockage des déchets (Directive 99/31 CE) fixe des objectifs de limitation de la part fermentescible qui peut être admise en décharge. Cette législation aura pour effet une augmentation significative de la part des déchets traités dans des digesteurs réalisant leur conversion en méthane et CO₂. D'autres voies de conversion biologique des déchets fermentescibles peuvent conduire à la production d'hydrogène. Dans le cadre du projet ENER 09, les différentes voies enzymatiques et les récentes avancées technologiques dans le domaine de la production biologique d'hydrogène ont été examinées. Une première expérience de laboratoire visant à produire de l'hydrogène à partir d'un déchet riche en matière organique a été effectuée. Les résultats de cette expérience, discutés dans le présent rapport, ouvrent des perspectives intéressantes mises en relief par l'éclairage de l'étude bibliographique.

Un des modules du projet ENER 09 avait pour objectif d'examiner les applications environnementales de l'hydrogène. En effet, cette source d'énergie propre peut être utilisée dans divers procédés de dépollution *in situ* nécessitant des conditions réductrices : réduction du Cr(VI) ou du NO₃, dégradation des composés organochlorés, précipitation des métaux par le sulfure d'hydrogène d'origine biologique. En 2003, un composé permettant de libérer lentement de l'hydrogène *in situ* a été testé au laboratoire avec un polluant modèle : le Cr(VI).

2. Production chimique et électrochimique d'H₂. Réactions générant de l'hydrogène et exemples d'actions R&D à partir de déchets

2.1. INTRODUCTION

Actuellement, le dihydrogène H₂ est principalement utilisé comme produit chimique de base dans la pétrochimie, l'alimentation, l'électronique, et les procédés de métallurgie mais il joue un rôle émergeant dans la recherche de solutions énergétiques propres dans la mesure où sa combustion ne dégage pas de CO₂.

Après des études et des développements complémentaires, H₂ devrait jouer un rôle de plus en plus important dans notre société en devenant une nouvelle source d'énergie pour générer de l'électricité, alimenter des véhicules à moteur... Cependant son utilisation comme combustible, du fait de sa faible enthalpie volumique comparée à d'autres combustibles (énergie libérée lors de la combustion d'un litre) passe par des solutions parallèles en terme de stockage. L'utilisation d'hydrogène liquide, cher à refroidir et à stocker et nécessitant de grands réservoirs comparé à l'essence, n'est pas une solution idéale. Par contre, des composés tels que les hydrures (FeTiH₂, CaH₂...) qui se décomposent en formant de l'hydrogène sont des candidats potentiels au stockage de H₂.

		Enthalpie volumique kJ/L, P = 1atm, T = 20°C
Dihydrogène	H ₂	13
Méthane	CH ₄	40
Octane	C ₈ H ₁₈	3,8 10 ⁴

Les technologies présentant un potentiel intéressant dans la production d'hydrogène concernent la thermochimie (procédé du steam reforming pour produire H₂ à partir du gaz naturel, du charbon, du méthanol... et la gazéification ou la pyrolyse de biomasse), l'électrochimie (électrolyse de l'eau grâce à un courant), la photo électrochimie (illumination d'un semi-conducteur immergé) et la photobiologie (photosynthèse de bactéries ou d'algue verte).

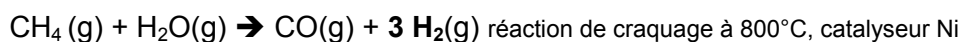
L'hydrogène constitue un grand volet de recherche d'applications notamment autour de la pile à combustible, dans laquelle l'oxygène et l'hydrogène se transforment en eau tout en générant de l'électricité.

Cette partie du rapport liste les voies classiques de production chimique, électrochimique et photochimique d'hydrogène ainsi que quelques voies en cours de développement à partir de déchets.

2.2. RÉACTIONS GÉNÉRANT DE L'HYDROGÈNE

2.2.1. Les combustibles fossiles et les ressources alternatives

La majorité de l'hydrogène commercialisé provient de la transformation des hydrocarbures de petite masse moléculaire, fourni par le gaz naturel, selon deux réactions catalytiques (steam reforming) :



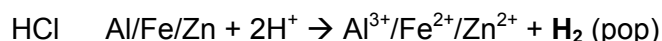
Le charbon et le pétrole lourd sont également des sources d'hydrogène.

Aux USA, une équipe travaille avec succès sur des ressources alternatives comme les plastiques et les textiles (Czenik et *al.*, 2002). Des résultats préliminaires de pyrolyse et reformage sont disponibles sur Internet :

http://www.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/hydrogen/pdfs/2_nrel_stefan_czernik.pdf.

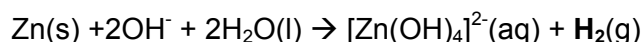
2.2.2. Attaque des métaux et des hydrures

En laboratoire, l'attaque en milieu acide dilué des métaux (Zn, Al, Fe) ayant un potentiel de réduction négatif permet de produire de l'hydrogène.

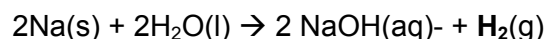


Notons, que des métaux tels que Cu et Ag nécessitent un oxydant puissant comme HNO_3 ; il y a formation de NO_2 et non de H_2 .

Zn et Al sont des métaux amphotères. Ils réagissent avec les acides mais aussi les bases



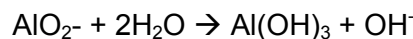
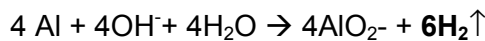
Pour les métaux réducteurs du groupe I le contact avec de l'eau suffit à produire de l'hydrogène. La réaction avec Li est douce, celle avec K plus vive et avec Rb et Cs il y a risque d'explosion.



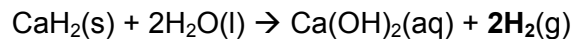
Les éléments du groupe II (Mg, Ca, Sr, Ba, Ra), sauf Be, réduisent l'eau. Ca réagit même à froid.



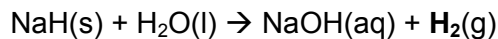
L'aluminium métal se dissout en milieu oxydant à pH élevé (> 10), avec émission d'hydrogène gazeux et formation de gel alumineux. Lorsque le pH diminue entre 9 et 10, au cours d'une carbonatation par exemple, se forme un hydroxyde d'aluminium amorphe expansif Al(OH)_3



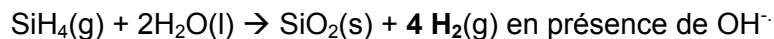
Les hydrures, qui se décomposent en formant de l'hydrogène, sont des candidats potentiels au stockage de H_2 .



Cette réaction est utilisée pour le remplissage des ballons sondes météorologiques.

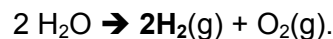
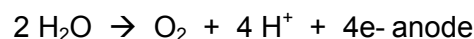


Les hydrures salins ainsi que les hydrures métalliques sont potentiellement utilisables comme source transportable d'hydrogène.



2.2.3. Électrolyse

L'électrolyse de l'eau permet de produire de l'hydrogène selon :



Mais, du fait du coût de l'électricité le processus n'est pas économiquement rentable.

L'électrolyse de saumures dans des cellules à diaphragme, gros consommateur d'électricité, est utilisée pour produire NaOH et Cl_2 . Il y a également dégagement de H_2 .



D'autre part la décomposition photochimique, c'est-à-dire utilisant la lumière comme source d'énergie, n'est pas spontanée. Des travaux de recherche sont en cours pour identifier un catalyseur de la réaction.

2.2.4. Source naturelle

Le volcanisme est une source de libération naturelle d'hydrogène. L'activité volcanique se traduit par des dégagements de cendres et de gaz. Ces derniers sont principalement de la vapeur d'eau, mais aussi du dioxyde de carbone (CO₂) et du dioxyde de soufre (SO₂). Les volcans rejettent également des petites quantités d'autres gaz, notamment l'hydrogène sulfuré (H₂S), l'hydrogène (H₂), le monoxyde de carbone (CO), le chlorure d'hydrogène (HCl), le fluorure d'hydrogène (HF), et l'hélium (He). Des teneurs volumiques de 0,5 à 1,4 % pour H₂ sont données par Symonds et *al.* (1994).

Un des facteurs qui aurait favorisé l'origine de la vie est l'abondance d'hydrogène permettant des conditions atmosphériques réduites (théorie genèse abiotique).

2.3. PRODUCTION D'HYDROGÈNE À PARTIR DE DÉCHETS

Un certain nombre de déchets est potentiellement utilisable pour générer de l'énergie sous forme d'hydrogène. La ressource énergétique peut venir de déchets solides ou de boues, d'effluents liquides ou gazeux. Ces déchets proviennent de la grande famille des « biomasses » (résidus de récoltes, résidus agroalimentaires, déchets d'animaux, décharges de déchets municipaux, déchets de forêts, boues résiduaires urbaines,...) ou sont d'autres déchets industriels (hydrogène sulfuré, plastiques, textiles...). Les procédés permettant de récupérer de l'hydrogène mettent en œuvre des voies thermiques, chimiques mais aussi des voies biologiques prometteuses. Pour illustrer ces points, quelques actions R&D récentes sont détaillées ci-dessous.

2.3.1. Développement de procédés innovants

Une équipe américaine décrit un procédé de pyrolyse puis de gazéification à haute température et haute pression (Wallman, 1998). Leur étude économique montre que la source du procédé doit pouvoir fournir au minimum 25 MJ/Kg, ce qui l'oriente vers des déchets type huiles de moteur, déchets plastiques ou pneus.

L'hydrogène sulfuré H₂S est un polluant produit au cours de procédés industriels variés. Des procédés ont été mis au point pour **récupérer du soufre et de l'hydrogène à partir de l'hydrogène sulfuré**. L'Argonne National Laboratory utilise un plasma et les micro-ondes dans leur procédé Microwave-Induced Sulfur and Hydrogen Autolysis (<http://www.techtransfer.anl.gov/highlights/9-1/misha.html>).

Une équipe de recherche en Grande-Bretagne (Dr. Bhattacharya, Warwick Process Technology Group) a développé une méthode d'extraction d'hydrogène à partir de **boues et déchets de papeterie** (sewage and paper mill waste). Le déchet libère du méthane, de l'eau, du monoxyde et dioxyde de carbone, et un peu d'hydrogène. L'originalité du procédé consiste à extraire en continu l'hydrogène du méthane et de

l'eau grâce à une **membrane spécifique pour l'hydrogène** ; ainsi les conditions d'équilibre ne sont pas atteintes et la production d'hydrogène pur peut se poursuivre.
http://www.earthvision.net/ColdFusion/News_Page1.cfm?NewsID=20491 (avril 2003).

Une nouvelle membrane zéolitique (ZSM-5, SAPO-34) a été préparée pour récupérer l'hydrogène de flux pétrochimique et chimique (Universités de Tokyo et du Colorado, 1996-1999) <http://www.nedo.go.jp/itd/grant-e/jitu/96gp1-e.htm>

Dans le 5^{ème} PCRD (Energy, Environment and Sustainable Development <http://www.nf-2000.org/secure/FP5/S1177.htm>), les projets relatifs à la production de H₂ concernent essentiellement le développement de procédés de transformation de la biomasse par voie thermique :

ENK5-2002-00634 Efficient and clean production of electricity from **biomass** via **pyrolyses** oil and hydrogen utilizing fuel cells (CNRS impliqué) ;

ENK6-2001-00555 **Biomass** and Waste Conversion in **Supercritical Water** for the Production of Renewable Hydrogen (Pays-Bas, Allemagne, Grande Bretagne) ;

ENK5-2001-30010 Hydrogen fuel gas from **Supercritical Water** Gasification of **Wine Grape Residues** (Pays-Bas, Allemagne, Irlande).

2.3.2. Cas d'une décharge de déchets industriels

La liste des réactions générant de l'hydrogène met en évidence la possibilité que des stockages de déchets industriels soient potentiellement une source de H₂. Un seul cas a été identifié au cours de cette recherche bibliographique.

Il s'agit d'un stockage de résidus d'un procédé métallurgique de recyclage de l'aluminium près de Barcelone (Espagne). Les conditions réductrices du procédé de recyclage ont généré en plus de Al les sous-produits Al₂S₃, AlN, et AlH₃. Dans le stockage, l'action de l'eau d'infiltration sur Al métal, sur les nitrures et les hydrures a généré NH₃ et H₂ dans un rapport 1/10 en % volumique (Feliubadalo, 1998).

2.3.3. Évaluation de la filière de l'aluminium

Il ressort de l'exemple précédent que la filière aluminium peut être considérée comme une source éventuelle de production de H₂ même si l'Aluminium est largement recyclé (tabl. 1). 90 000 t de scories salines sont actuellement mises en décharge. Elles contiennent 36 000 t de sels (KCl, NaCl) et 18 000 t d'insolubles (métal, carbures, nitrures) susceptibles d'être oxydés avec dégagement en proportions inconnues de H₂ mais aussi de CH₄ et NH₃. Dans l'hypothèse de 1/3 de ces insolubles constitués par du Al exploitable pour la production d'hydrogène, il serait possible de récupérer théoriquement 444 tonnes de H₂. Reste les 95 000 t de scories mises en décharges pour lesquelles aucune donnée n'a été trouvée.

2.3.4. Échantillons riches en fer

Les corps broyants en acier utilisé dans l'industrie de traitement du minerai génère de l'hydrogène en milieux aqueux ou alcoolique (Yokoyama, 1992). Les poudres de fer en général sont une source d'hydrogène potentielle. À ce stade aucune recherche de gisements potentiels n'a été réalisée.

2.4. CONCLUSION

La liste des réactions produisant de l'hydrogène met en évidence à côté de la source principale constituée par les hydrocarbures, l'importance de la biomasse et dans une moindre mesure celle des métaux. La filière aluminium pourrait être une piste à poursuivre même si les tonnages ne pourront être que minoritaires vis-à-vis des potentialités de la biomasse.

Production minière (France)				
Opérations	Qté kt/an	Déchets	Classement	Qté kt/an
Extraction bauxite	-			
Production alumine Al ₂ O ₃	600	boues rouges (Bauxaline)	non dangereux* dépôt en mer**	310
Production Al primaire	461			
Chiffres boues rouges Aluminium Pechiney (leader)				
Récupération (France)				
Opérations	Qté kt/an	Déchets		Qté kt/an
Récupération déchets	-			
Production Al 2ème fusion	408	scories salines 380Kg/t Al	déchets dangereux	155 : traitement sté 95 CET1 courant Foucault 60 traité
Al métal traitement scories salines	3	saumures et insolubles	-	36 2/3 NaCl, 1/3 KCl utilisés 18 oxydation carbures, nitrures, Al ⁺ donne CH ₄ , NH ₃ , H ₂

* catégorie 01 03 09 du décret du 18/04/2002

** pratique est amenée à disparaître : 250kt/an de rejet maxi en 2005 et 0 en 2015

Tabl. 1 - Tonnages de la production d'aluminium primaire et recyclé (1^{ère} et 2^{ème} fusions) en France et des déchets associés d'après Fédération des Minerais et métaux, 2002 ; Ademe, 1998 ; Observatoire des matières premières, 1999

3. État de l'art sur la production directe d'hydrogène en bio-réacteurs

La production d'hydrogène par les micro-organismes est connue depuis plus d'un siècle, et des travaux de recherches sont menés depuis 25 ans dans l'objectif de récupérer de l'hydrogène d'origine biologique en tant que vecteur énergétique.

L'hydrogène est un vecteur de stockage « intermédiaire » d'énergie, des électrons excédentaires générés lors de divers mécanismes métaboliques, comme la photosynthèse, la fermentation ou la fixation de l'azote, étant combinés avec des protons par des hydrogénases ou des nitrogénases. Si ces réactions sont très répandues dans le monde vivant (tabl. 2), la production massive d'hydrogène ou son accumulation dans le milieu seraient des aberrations pour les systèmes biologiques (correspondant à un gaspillage d'énergie). Les enzymes productrices d'hydrogène sont donc inhibées par leur produit. Il n'existe pas, pour l'instant, de moyen simple permettant de convertir très efficacement l'énergie solaire ou la biomasse en hydrogène. Le présent chapitre passe en revue les tentatives de développement de procédés dans ce domaine, et les limitations propres à chaque voie de production.

3.1. LES PROCÉDÉS UTILISANT L'ÉNERGIE LUMINEUSE

La nature diffuse de l'énergie solaire et la faible densité d'énergie qui en résulte impose des restrictions économiques sévères aux procédés photo-biologiques de production de l'hydrogène. Par exemple, l'irradiation moyenne annuelle dans une région ensoleillée peut s'élever à 5 kWh par m² et par jour. Considérant un rendement de conversion énergétique de la lumière en hydrogène de 10 % (chiffre très optimiste), et en se basant sur la valeur-guide de l'hydrogène utilisée dans les programmes de Recherche & Développement américains, le procédé produirait au mieux 10 \$ d'hydrogène par m² et par an (Hallenbeck and Benemann, 2002). Ce constat impose de sévères contraintes au coût global du procédé, qui lui-même consommera de l'énergie, au moins pour les étapes de récupération et de purification du gaz. En dépit de ces considérations, peu de rapports sur la production photo-biologique d'hydrogène évaluent l'efficacité de conversion de leurs systèmes, et les valeurs d'efficacité publiées sont généralement inférieures à 1 % (c'est-à-dire moins de 1 \$ d'hydrogène par m² et par an). La conversion de l'énergie lumineuse est limitée par la vitesse de transfert des électrons entre les deux photosystèmes (PSII et PSI), qui est à peu près dix fois plus faible que la vitesse de capture de la lumière par les pigments photosynthétiques (par exemple la chlorophylle). Lorsque les organismes sont exposés à une intensité lumineuse solaire maximale, 90 % des photons capturés par le système sont perdus sous forme de chaleur ou de fluorescence. Cet effet de saturation explique les difficultés rencontrées lorsque l'on essaie d'extrapoler les résultats de laboratoires, obtenus généralement en condition de faible intensité lumineuse, à une échelle plus proche de l'application réelle. Diverses stratégies, élégantes mais peu convaincantes du point de vue technique et économique, ont été proposées : mélange ultra-rapide des cultures, séries de photobioréacteurs verticaux, utilisation de fibres optiques.

Organisme	Conditions de croissance	Système enzymatique impliqué	Substrat	Quantité d'hydrogène produite
<i>Clostridia butyricum</i> et <i>welchii</i>	Anaérobie	Ferrédoxine-oxydo-réductase + Hydrogénase	Glucose	0,63 mol H ₂ /mol glucose
<i>C. pasteurianum</i>	Anaérobie	idem	Glucose	1,5 mol H ₂ /mol glucose
<i>C. beijerinchi</i> AM21B	Anaérobie	idem	Glucose ou amidon	1,8-2 mol H ₂ /mol
<i>C. beijerinchi</i> AM21B	Anaérobie	idem	Arabinose, cellobiose, fructose, galactose, lactose, sucrose et xylose	15,7-19 mmol H ₂ /g de substrat
Autres Clostridies sp.	Anaérobie	idem	xylose, arabinose, glucose	13,7 mg H ₂ /mol ; 14,55 mmol/g ; 11,07 mmol/g
<i>Methylomonas albus</i>	Anaérobie	FDH NAD-dépendante + hydrogénase	Formate	2,45 μmol H ₂ /μmole
<i>Methylorinus trichosporium</i>	Anaérobie	FDH NAD-dépendante + hydrogénase	Formate	0,61 μmol/μmol
<i>Ruminococcus albus</i>	Anaérobie		Glucose, pyruvate	59 mmol/100mol; 0,8mol/mol
<i>E. coli</i> (différentes souches)	Anaérobie facultative	FHL (formate hydrogène lyase) + hydrogénase	glucose	0,72 à 0,91 mol H ₂ /mol glucose
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Anaérobie facultative		glucose	1 mol H ₂ /mol glucose
<i>Enterobacter</i> : souche acide	Anaérobie facultative		glucose, galactose, fructose, mannose, dextrin	1 mol H ₂ /mol glucose
<i>Bacillus licheniformis</i>	Aérobie		Glucose	1,5 mol H ₂ /mol glucose
Cyanobactéries	Bactéries photosynthétiques	Nitrogénase + hydrogénase bidirectionnelle		

Tabl. 2 - Production microbienne d'hydrogène (d'après Nandi and Sengupta, 1998).

Une autre voie consiste à sélectionner des souches mutantes, déficientes en pigments photorécepteurs. Ces organismes modifiés capteraient moins de lumière que les souches sauvages, de façon à limiter le gaspillage d'énergie (Nakajima et al., 2001).

3.1.1. Algues Eucaryotes

Les algues vertes sont les seuls organismes eucaryotes possédant des hydrogénases associées à la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques.

L'algue verte commune *Chlamydomonas reinhardtii* produit, en l'absence de soufre, de l'hydrogène et non du CO₂ au cours de la photosynthèse (2000, University of California, at Berkeley). Le processus se rapproche de l'électrolyse de l'eau avec production majeure de H₂ et N₂. Mais 60 % des photons sont non utilisés.

Des obstacles importants seraient à surmonter avant de pouvoir produire de l'hydrogène par photolyse de l'eau avec les algues. Outre le « gaspillage » d'énergie capturée par les photorécepteurs à forte intensité lumineuse, l'hydrogénase à fer présente dans les algues est extrêmement sensible à l'oxygène et elle est inhibée par l'hydrogène. Il est possible de faire produire de l'hydrogène aux algues en leur imposant un cycle aérobie/anaérobie sans soufre. Dans la phase aérobie, les cellules produisent de la biomasse en fixant le CO₂. En absence de soufre, la photosynthèse est inhibée et les cellules consomment la faible quantité d'oxygène produite et se retrouvent en milieu anaérobie. Dans ces conditions, les sucres accumulés durant la phase aérobie sont convertis en H₂ (Mellis et Happe, 2001). Ce concept n'a pour l'instant pas dépassé l'échelle du laboratoire.

Un procédé complexe nommé bio-photolyse indirecte a été proposé afin de contourner les obstacles rencontrés par la photolyse directe (Hallenbeck and Benemann, 2002). Il est composé des étapes suivantes (cas idéal) :

- production de biomasse dans des lagunes ouvertes, à 10 % d'efficacité d'utilisation de l'énergie solaire ;
- récupération et concentration des cellules ;
- utilisation de cette biomasse dans un digesteur produisant 4 H₂ et 2 acétates par molécule de glucose ;
- conversion de l'acétate en H₂ dans un photobioréacteur par des algues en anaérobiose.

Le procédé comprenait également un digesteur de méthanisation pour éliminer la biomasse non digérée dans la phase acidogène, un réacteur produisant de l'inoculum, et un système de récupération et de séparation des gaz (le CO₂ étant ré-injecté dans la lagune pour stimuler la photosynthèse).

Ce procédé est purement conceptuel (non testé), et son coût théorique s'élèverait à environ 20 \$/Gj d'H₂.

3.1.2. Cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des bactéries unicellulaires (procaryotes, ce qui les différencie des algues eucaryotes qui ont un noyau) qui réalisent la photosynthèse. En théorie, les

cyanobactéries possèdent un avantage par rapport aux algues eucaryotes pour la production d'hydrogène. En effet, elles sont composées de deux types de cellules différents : des cellules qui réalisent la photosynthèse et produisent de l'oxygène, et des cellules qui produisent de l'hydrogène, les hétérocystes, par la voie de la nitrogénase. Les activités produisant de l'hydrogène ou de l'oxygène sont spatialement séparées. L'enzyme produisant de l'hydrogène est donc un peu protégée de l'effet inhibiteur de l'oxygène. Toutes les cyanobactéries ne forment pas d'hétérocystes.

La production d'hydrogène par les cyanobactéries a été étudiée au laboratoire et en conditions d'extérieur (Hallenbeck et *al.*, 1978 ; Miyamoto et *al.*, 1979). Cependant, différents facteurs limitent la production d'hydrogène : des limitations inhérentes au système hydrogénase, la sensibilité à l'oxygène, le besoin en ATP du système nitrogénase, les dépenses énergétiques associées aux étapes de différenciation et de maintenance des hétérocystes. De plus, les taux de conversion de l'énergie les plus élevés sont obtenus à faible intensité lumineuse, et les cyanobactéries, comme les algues, sont incapables d'utiliser pleinement l'énergie solaire.

3.1.3. La photo-fermentation : bactéries pourpres et bactéries vertes

Les bactéries photosynthétiques sont capables de produire de l'hydrogène par l'action de leur nitrogénase. Les nitrogénases nécessitent un apport d'énergie sous forme d'ATP. Ces bactéries ont donc besoin à la fois d'une source d'énergie lumineuse **et** d'une source d'énergie chimique (acides organiques ou soufre réduit). Les bactéries photosynthétiques sont capables de produire de l'hydrogène à partir de divers acides organiques issus de déchets ou d'effluents. Certains auteurs ont donné des valeurs de conversion de l'énergie lumineuse par les bactéries photosynthétiques proches de 100 %, mais ces estimations ignorent généralement l'apport énergétique du substrat organique, et la perte d'efficacité aux fortes intensités lumineuses.

Dans le cadre des 5^{ème} et 6^{ème} PCRD, un grand projet coordonné par les Pays-Bas (Agrotechnological Research Institute, Wageningen) a été proposé pour combiner la fermentation obscure et la photosynthèse des bactéries. Un pilote industriel serait construit pour fermenter un déchet agricole en réacteur anaérobie, en présence d'une bactérie extrémophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. L'acétate produit serait transformé en CO₂ et H₂ par photosynthèse de bactéries de l'espèce *Rhodospseudomonas*. L'objectif est d'atteindre un rendement de conversion du déchet qui atteindrait 60 %. Dans le cadre du 5^{ème} PCRD, ce programme se nommait « Biohydrogen ». De nombreuses études ont été réalisées avec des bactéries pourpres, sur divers substrats et dans des configurations de réacteurs variées (Barbosa et *al.*, 2001 ; Zhu et *al.*, 2002). Les bactéries vertes sulfureuses (Warthmann et *al.*, 1992) tirent leur énergie de la lumière et de l'oxydation du soufre réduit (S⁰, soufre, thiosulfate). Elles sont moins intéressantes que les bactéries pourpres, car elles ne consomment pas d'acides organiques : leur source d'énergie n'est pas assimilable à de la biomasse. A priori, les stocks de soufre ne justifient pas la mise en œuvre de procédés pour la production d'H₂. Par contre, il serait en théorie envisageable de les utiliser dans un procédé couplant le traitement d'un drainage minier par les BSR (générateur d'H₂S) à la production d'H₂ pour alimenter les BSR en énergie.

En fait, les procédés utilisant la photofermentation présentent des inconvénients difficiles à surmonter dans la perspective d'applications à grande échelle : (1) l'implication de la nitrogénase et de son incontournable consommation d'énergie (ATP) ; (2) la faible efficacité de conversion de l'énergie solaire (même problème qu'avec les algues et les cyanobactéries) ; et (3) comme pour les autres procédés dépendants de la lumière, la nécessité d'utiliser des photo-bioréacteurs complexes.

En conclusion, la production d'hydrogène par des bio-procédés utilisant l'énergie lumineuse est encore un concept de laboratoire séduisant, mais dont la possibilité d'extrapolation à des systèmes en taille réelle ne pourrait être envisagée que si des progrès scientifiques significatifs (manipulations génétiques ?) étaient réalisés.

3.2. LA FERMENTATION OBSCURE

Les processus de fermentation peuvent utiliser soit de la biomasse produite par photosynthèse (plantes supérieures ou algues), soit des déchets (effluents agro-alimentaires, déchets agricoles, déchets ménagers, eaux usées...).

Le très riche potentiel du métabolisme bactérien permettant de diriger un flux d'électrons pour produire de l'hydrogène n'est pas encore exploité (Nandi et Sengupta, 1998). Divers procédés sont actuellement en cours d'étude, mais aucun n'a pour l'instant été extrapolé à grande échelle.

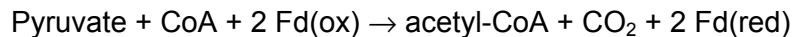
3.2.1. Théorie de la fermentation obscure

Les deux voies de production les plus connues sont liées au métabolisme anaérobie du pyruvate, formé au cours de la biodégradation de substrats variés. La dégradation du pyruvate est effectuée par l'un des deux systèmes enzymatiques suivants :

- La pyruvate : formate lyase, principalement trouvée chez les entérobactéries (anaérobies facultatives, *Enterobacter* par exemple) ;



- La pyruvate : ferredoxine (flavodoxine) oxydo-réductase, voie préférentielle chez les bactéries anaérobies strictes (*Clostridium* par exemple).



Dans ces systèmes biologiques, le pyruvate issu de la glycolyse est utilisé pour produire de l'acétyl-CoA, source d'ATP, et du formate ou de la ferredoxine réduite, à partir desquels de l'hydrogène peut être généré. Le rendement global de ces réactions est relativement faible : 1 ou 2 molécules d'H₂ par molécule de pyruvate. C'est la conséquence logique du fait que les fermentations n'ont pas pour but premier de fabriquer de l'hydrogène, mais de permettre la croissance des bactéries. Donc, une portion du substrat est utilisée pour former de l'ATP. Dans de nombreux organismes, le rendement est encore plus faible en raison de la ré-utilisation de l'hydrogène par des « uptake » hydrogénases.

Le principal défi à relever dans le domaine de la bio-production d'hydrogène à partir de biomasse est d'approcher le rendement maximal, c'est-à-dire l'obtention de **12 moles** d' H_2 par mole de glucose.

En théorie, les voies métaboliques associées à différents sous-produits sont classées de la façon suivante (fig. 1).

- les fermentations produisant de l'acétate, du butyrate ou de l'éthanol génèrent de l' H_2 (rendement maximum avec l'acétate) ;
- les fermentations produisant du propionate ou du lactate ne génèrent pas d' H_2 .

Il semblerait qu'une fermentation produisant de l'éthanol et de l'acétate soit plus stable et produise plus d'hydrogène qu'une fermentation produisant de l'acétate et du butyrate. D'après Ren et *al.* (2003), la production d'acétate et de butyrate conduit à une accumulation de $NADH_2$ qui déstabiliserait le système vers la voie du propionate (qui en consomme), alors que la production d'acétate et d'éthanol équilibre production et consommation de $NADH_2$. Cependant, cette dernière génère moins d'ATP pour les cellules, et serait donc moins favorable du point de vue énergétique.

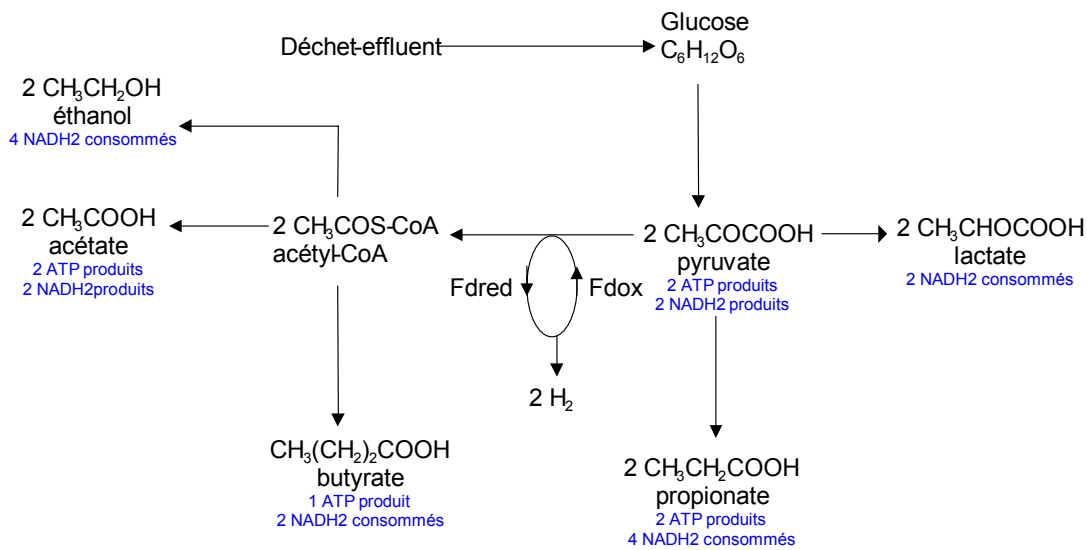


Fig. 1 - Voies métaboliques possibles chez les bactéries anaérobies strictes (type *Clostridium*).

Par les voies de fermentation citées ci-dessus, le meilleur rendement possible serait l'obtention de 4 moles d' H_2 et 2 moles d'acétate par mole de glucose. En pratique, les rendements obtenus sont beaucoup plus faibles (tabl. 3).

Substrat	Rendement maximum mol H ₂ / mol hexose	Référence
Effluent agro-alimentaire	2,14	Yu et al., 2002
Glucose	1,7	Lin and Chan, 1999
Glucose	0,7	Roychowdhury et al., 1988
Effluent agro-alimentaire	2,59	Ueno et al., 1996
Xylose	2,36	Taguchi et al., 1995
Glucose	2,3	Kataoka et al., 1997

Tabl. 3 - Comparaison de rendements de production d'hydrogène par fermentation obscure.

3.2.2. Obtention d'une culture produisant de l'H₂

La sélection d'un inoculum produisant de l'hydrogène par fermentation peut être obtenue par un traitement thermique ou chimique d'une boue de digesteur (produisant du méthane), de boues activées, de compost ou de sol. L'objectif du traitement est de tuer tous les micro-organismes présents, sauf ceux qui sont capables de sporuler. En effet, des bactéries anaérobies génératrices d'hydrogène, appartenant aux genres *Bacillus* ou *Clostridium*, sont sporulantes. Un autoclavage à 120 °C, suivi d'une incubation en présence d'un inhibiteur des méthanogènes (Sodium 2-bromoethanesulfonate) peut être effectué (Wang et al., 2003).

3.2.3. Paramètres opératoires de la fermentation

La plupart des études sont réalisées dans des réacteurs de laboratoire de petite taille (1 – 3 litres), bien que des expériences dans des volumes de 5 à 15 litres soient mentionnées dans la littérature (May et al., 1964 ; Suzuki et al., 1978 ; Brosseau et Zajic, 1982). L'agitation mécanique avec une hélice est généralement utilisée, mais un système de type UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*), permettant de recycler et de concentrer la biomasse dans le réacteur, semble plus efficace en terme de vitesse spécifique de production d'hydrogène (Yu et al., 2002).

Dans un bioréacteur fonctionnant en continu, divers paramètres opératoires peuvent influencer la vitesse et le rendement de conversion des sucres en hydrogène, et la nature des sous-produits organiques (acétate, propionate, butyrate, alcools...).

Le pH doit être légèrement acide (4 - 6), car pour des valeurs de pH plus élevées, des populations bactériennes consommatrices d'H₂ se développent : méthanogènes, sulfato-réductrices (Yu et al., 2002, Fang et Liu, 2002). Un temps de rétention

relativement faible (4 h – 12 h), en culture continue, permet également de maintenir la culture en phase de production d'H₂ (Hawkes et *al.*, 2002). Il est important d'éviter les interruptions de l'alimentation en continu du réacteur, qui induisent la sporulation des bactéries produisant l'H₂, et des changements dans la composition de la population bactérienne.

Divers substrats sont utilisables pour la génération d'H₂ par fermentation, mais ils doivent impérativement contenir des sucres ou polymères de sucres :

- les effluents d'industrie sucrière (Suzuki et *al.*, 1978 ; Ueno et *al.*, 1996 ; Ren et *al.*, 2003) ;
- les effluents d'industrie produisant du vin de riz (Yu et *al.*, 2002) ;
- des déchets agricoles, comme du blé impropre à la consommation (Kalia et *al.*, 1994) ;
- les produits de la dégradation de la cellulose (Tagushi et *al.*, 1995 ; Uneo et *al.*, 2001) ;
- les lixiviats de boues de stations d'épuration (Wang et *al.*, 2003) et les boues elles-mêmes (Yu et *al.*, 2003) ;
- la fraction organique de déchets ménagers (Lay et *al.*, 1999 ; Nielsen et *al.*, 2001).

Lorsque des substrats polymérisés tels que l'amidon ou la cellulose sont utilisés, l'apport d'une source d'azote complexe (extrait de levure ou peptone) peut s'avérer indispensable. Des ajouts de phosphate et de fer dans le milieu peuvent également stimuler la production d'H₂ (Dabrock et *al.*, 1992).

Une pression partielle d'hydrogène élevée dans la phase liquide inhibe la production d'H₂. Il est possible d'augmenter significativement la production d'H₂ en injectant un gaz inerte dans le bioréacteur afin de faire passer plus rapidement l'H₂ en phase gaz (Mizumo et *al.*, 2000). Cependant, ce procédé a pour inconvénient de diluer l'hydrogène produit. Diverses autres solutions ont été proposées, telles que l'utilisation de membranes submergées pour extraire le gaz (Voolapalli et Stuckey, 1998). Cependant, la formation d'un biofilm sur les membranes diminue rapidement leur efficacité.

Les fermentations productrices d'H₂ peuvent être réalisées en conditions mésophiles (30-40 °C) ou thermophiles modérées (50-65 °C). Une amélioration de la vitesse et du rendement de production d'H₂ par une augmentation de température jusqu'à 55 °C a été observée lors du traitement d'un effluent agro-alimentaire (Yu et *al.*, 2002). La concentration en H₂ dissous diminue avec la température, ce qui peut avoir un effet positif sur la production d'H₂.

A température élevée, des bactéries thermophiles seraient susceptibles d'utiliser l'énergie de réactions produisant de l'hydrogène par un processus de **respiration** (et non de fermentation) :

- $C_6H_{12}O_6 + 12 H_2O \rightarrow 6 HCO_3^- + 6 H^+ + 12 H_2$, à 60 °C et pour des pressions partielles d'hydrogène en solution inférieures à 50 Pa (très difficile à obtenir) ;

- $C_6H_{12}O_6 + 4 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 2 HCO_3^- + 4 H^+ + 4 H_2$, à 98 °C et pour des pressions partielles d'hydrogène en solution inférieures à 2 000 Pa (possible pour *Pyrococcus furiosus*, Ma et al., 1994).

Des études théoriques ont suggéré la faisabilité d'un procédé utilisant des bactéries thermophiles dans un bioréacteur à lit fixé non immergé (van Groenestijn et al., 2002). Dans ce bioréacteur, le support serait aspergé par un liquide chargé en sucres issu de la dégradation de déchets agricoles. Le système biologique serait maintenu à 70 °C et l'évaporation de l'eau entraînerait l'hydrogène dans la phase gazeuse. La consommation globale d'énergie du procédé serait minimisée par l'utilisation de compresseurs et d'échangeurs de chaleur, le bioréacteur étant couplé avec une pile à combustible à l'acide phosphorique, fonctionnant à 200 °C. Ce procédé demeure à l'état conceptuel.

3.2.4. Utilisation des sous-produits

Tous les types de fermentations obscures décrits jusqu'à présent génèrent, en plus de l'hydrogène, des sous-produits organiques (acides et alcools). Une seule voie métabolique connue permet en théorie de récupérer 12 moles d'H₂ par mole de glucose, sans aucun sous-produit : la voie oxydative du pentose phosphate (PPP). Cette réaction a été réalisée *in vitro* avec les enzymes de la voie PPP (Woodward et al., 2000). Cependant, ce processus n'est pour l'instant pas envisageable en réacteur, et les procédés de fermentation obscure applicables dans l'état actuel des connaissances doivent prendre en compte une étape de traitement des sous-produits. Deux options majeures sont actuellement proposées : une photofermentation productrice d'H₂, ou, de façon plus réaliste, une étape de méthanogénèse (Barbosa et al., 2001 ; Van Groenestijn et al., 2002 ; Hawkes et al., 2002).

Aux USA, des bactéries issues de sols ordinaires ont été introduites après traitement thermique (pour sélectionner les bactéries résistantes en milieu non favorable) dans des eaux industrielles de l'agroalimentaire. Le maintien de conditions acides permet de limiter la croissance de bactéries produisant du méthane et consommant de l'hydrogène (méthanogénèse). Il y a production de biogaz H₂ et CO₂ (60/40) selon un processus de fermentation anaérobie classique. Au cours d'une seconde étape des bactéries produisant du méthane sont introduites et le pH modifié pour une production exclusive de méthane.

http://www.globaltechnoscan.com/28thMay-3rdJune03/food_processing.htm

L'utilisation des acides organiques pour produire des poly-hydroxyalkanoates, utilisables pour la fabrication de plastiques bio-dégradables, a également été proposée (Yu, 2003).

3.3. MICRO-AÉROPHILIE

Les bactéries micro-aérophiles se développent en présence d'une très faible pression partielle en oxygène. Cette petite quantité d'oxygène permettrait à des bactéries micro-

aérophiles d'obtenir de l'énergie pour leur croissance par un processus de respiration et de convertir en parallèle les substrats carbonés en hydrogène de façon plus efficace que lors d'une fermentation classique. En théorie, un tel procédé permettrait de récupérer 10 moles d'H₂ par mole d'hexose (Hallenbeck et Benemann, 2002).

Par ailleurs, des traces d'oxygène inhiberaient le développement des bactéries méthanogènes, qui sont anaérobies strictes. La population productrice d'H₂ ne serait pas composée d'organismes anaérobies stricts, tels que *Clostridium*. Il serait nécessaire de sélectionner une population bactérienne spécifique.

Aux USA (National Energy Technology Laboratory) un processus a été mis en évidence dans un bio réacteur de 14 l alimenté par des bactéries *Thermotoga neapolitana* qui produit environ 8 l.h⁻¹ de gaz à 80 % composé d'hydrogène. Les bactéries sont des extrémophiles micro-aérophiles opérant de façon optimale à 75 °C à partir d'ammonium et en présence d'oxygène. Le déchet est de l'urée cristallisée, sous-produit d'usines de traitement des eaux. Le fait que l'ammonium est bien la source d'hydrogène a été confirmé par des généticiens. La séquence du génome de *T. neapolitana* est en cours d'identification.

3.4. CONCLUSION

Les voies de production biologique de l'hydrogène sont très nombreuses et diverses. Pour l'instant, aucune n'a été développée et extrapolée à grande échelle. Les mécanismes utilisant l'énergie lumineuse sont séduisants sur le plan théorique, mais de nombreux obstacles technologiques limitent actuellement leur application. Les voies de production par fermentation obscure de biomasse ou de déchets semblent plus faciles à mettre en œuvre, dans des digesteurs comparables aux dispositifs de méthanisation. Cependant, les rendements sont généralement faibles. Les travaux futurs devront se consacrer à la sélection d'inocula efficaces et de conditions opératoires susceptibles d'améliorer les performances de conversion des substrats en H₂.

4. Enzymes bactériennes impliquées dans le métabolisme de l'hydrogène : biochimie et génétique de la bio-production d'hydrogène

De nombreuses bactéries anaérobies, aérobies, photosynthétiques, sont capables de consommer ou de produire de l'hydrogène grâce à la présence d'enzymes¹ spécialisées : les nitrogénases et les hydrogénases. Ces enzymes ont fait l'objet de nombreuses études au niveau structural, génétique et biochimique. La caractérisation de ces enzymes est le point de départ pour une optimisation de la synthèse et de l'activité de ces enzymes, et donc pour l'obtention (1) de micro-organismes producteurs et/ou consommateurs d'hydrogène utilisables dans des bio-procédés (de décontamination ou de bioproduction d'hydrogène), et (2) d'enzymes potentiellement intéressantes pour des applications telles que les biocapteurs.

Cette synthèse bibliographique a donc pour objectif de rassembler les données disponibles sur les nitrogénases et sur les hydrogénases, et de proposer un certain nombre de stratégies pour l'amélioration de la bio-production d'hydrogène.

4.1. LES NITROGÉNASES

Les nitrogénases sont des enzymes essentielles du cycle de l'azote dans la mesure où elles sont responsables de la fixation de l'azote atmosphérique. Les organismes procaryotes capables de fixer l'azote sont extrêmement divers ; pourtant, les nitrogénases sont des enzymes très conservées.

La réduction de l'azote atmosphérique en ammoniacque (forme sous laquelle l'azote est davantage utilisable pour les réactions biologiques), catalysée par les nitrogénases, est une réaction fortement endergonique qui nécessite de l'énergie sous forme d'ATP (généré au cours de la photosynthèse² ou de la respiration³). De plus, cette réaction est obligatoirement accompagnée d'une réduction de protons (H^+) en **hydrogène**. En effet, la production d'hydrogène est indispensable pour réduire N_2 en NH_3 . L'hydrogène est généralement produit en excès par les nitrogénases. Les nitrogénases sont ainsi

¹ Enzyme : catalyseur biologique protéique agissant à des concentrations très faibles, et augmentant la vitesse des réactions chimiques sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction, l'enzyme se retrouve inchangée. Une enzyme est spécifique d'une réaction. La synthèse d'une enzyme est généralement régulée en fonction des besoins de la cellule.

² Photosynthèse : processus permettant l'utilisation de l'énergie lumineuse pour synthétiser des carbohydrates à partir du CO_2 . En général, la photosynthèse peut se résumer à l'équation suivante : $CO_2 + 2 H_2O \rightarrow [CH_2O] + H_2O + O_2$.

³ Respiration : processus conduisant à l'oxydation totale de molécules telles que le glucose, en CO_2 et H_2O (pour la respiration aérobie, O_2 servant d'accepteur terminal d'électrons), ou H_2S (respiration anaérobie des BSR utilisant SO_4^{2-} comme accepteur terminal d'électrons), L'énergie libérée est récupérée sous forme d'ATP utilisable par les cellules.

les enzymes clés de la production d'hydrogène chez les cyanobactéries⁴, les bactéries photosynthétiques pourpres et les bactéries photosynthétiques vertes sulfureuses. L'hydrogène produit par les nitrogénases sert ensuite de substrat pour des hydrogénases.

4.1.1. Biochimie et génétique des nitrogénases

Les nitrogénases sont des complexes multiprotéiques composées de deux protéines : **une dinitrogénase** (protéine à MoFe ou protéine I, qui est un hétérodimère $\alpha_2\beta_2$ codé par les gènes *nifD* et *nifK*), et **une dinitrogénase réductase** (protéine à Fer ou protéine II, qui est un homodimère codé par le gène *nifH*) (Tamagnini et al., 2002). Les gènes codant pour la nitrogénase sont organisés en cluster⁵. Les cyanobactéries peuvent développer des cellules spécialisées dans la fixation d'azote : les hétérocystes⁶. Dans les cellules végétatives des cyanobactéries hétérocystaires, on observe un grand segment d'ADN qui sépare le gène *nifK* des gènes *nifDH*. Au cours de la différenciation en hétérocystes, ce segment d'ADN est enlevé et l'activité nitrogénase initiée. Cette situation n'est observée ni chez les cyanobactéries non hétérocystaires (filamenteuses et unicellulaires), ni chez les autres micro-organismes. L'enzyme décrite ici est dite conventionnelle (fig. 2 et 3) ; il existe en effet des nitrogénases dites alternatives.

Deux types de nitrogénases alternatives ont ainsi été mises en évidence (Pau, 1991) :

- la nitrogénase à Vanadium, codée par le cluster *vnfDGKH*, et transcrite en absence de Molybdène et en présence de Vanadium ;
- la nitrogénase à Fer ou nitrogénase-3, codée par les gènes *anfDGKH*.

Les nitrogénases alternatives et la nitrogénase conventionnelle possèdent des homologies notamment au niveau de la séquence primaire⁷ (Tamagnini et al., 2002). Ainsi, 5 cystéines et 5 histidines sont conservées dans les sous-unités codées par les gènes *nifD*, *vnfD* et *anfD*. Ces acides aminés seraient impliqués dans la liaison aux métaux. Les produits des gènes *nifH*, *vnfH* et *anfH* présentent un fort degré de conservation de séquence. Ainsi en position N-terminale, on retrouve un segment dont la séquence (qui fini par une lysine) est homologue à la région ATP-binding de l'adénylate kinase et d'autres nucléotide-binding phosphotransférases. On retrouve également 5 cystéines, dont 2 d'entre elles sont impliquées dans la liaison au cluster $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$.

Les nitrogénases alternatives diffèrent cependant de la nitrogénase conventionnelle des points de vue physique, chimique, et catalytique. La principale différence est

⁴ Cyanobactérie : bactérie aérobique phototrophe contenant de la chlorophylle et des phycobilines (pigments intervenant dans le photosystème II).

⁵ Cluster de gènes : groupe de deux ou plusieurs gènes situés sur un même chromosome, proches les uns des autres.

⁶ Hétérocyste : cellule dépourvue du photosystème II (qui est générateur d'oxygène) et ainsi spécialisée dans la fixation de l'azote.

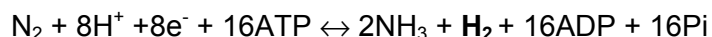
⁷ Séquence primaire d'une protéine : succession d'acides aminés.

d'ordre structural avec la présence d'une petite sous-unité additionnelle (codée par *vnfG* et *anfG*) chez les nitrogénases alternatives. D'un point de vue catalytique, les nitrogénases alternatives sont capables de réduire l'acétylène en éthane, alors que la réduction de l'acétylène par la nitrogénase à Mo ne permet que la formation d'éthylène. Il existe également une différence dans le degré de sensibilité à l'oxygène, les nitrogénases alternatives étant plus sensibles. A noter également un effet inhibiteur du CO pour la nitrogénase à Vanadium : le CO inhibe en effet la réduction du N₂ et de l'acétylène chez cette enzyme. Ceci s'explique probablement par la plus forte interaction du CO avec le Vanadium qu'avec le Molybdène. Le CO n'inhibe cependant pas la production d'hydrogène, que ce soit dans le cas de la nitrogénase à V ou dans le cas de la nitrogénase à Mo. Une autre différence tient dans la distribution des électrons entre la réduction de N₂ et la production d'H₂. Ainsi la nitrogénase conventionnelle attribue 75 % du flux total d'électrons à la réduction de l'azote : 25 % des électrons sont donc utilisés pour la production d'hydrogène. Ce pourcentage d'électrons dédié à la production d'hydrogène passe à 50 % pour la nitrogénase à Vanadium, et à 70-80 % pour la nitrogénase-3. Ces deux nitrogénases alternatives sont donc certainement moins efficaces pour la réduction de l'azote. Par contre, elles sont probablement plus efficaces pour la production d'hydrogène.

Les nitrogénases constituent donc une famille d'enzymes. L'évolution de cette famille semble avoir fait intervenir une duplication de gènes ainsi que le développement de la capacité à utiliser plusieurs métaux (Mo, V, Fe) dans la catalyse et dans la régulation des différents gènes impliqués dans la fixation de l'azote. Il faut noter que d'autres gènes sont impliqués dans la fixation de l'azote et dans la régulation de ce processus. L'expression du système nitrogénase nécessite des conditions de croissance spécifiques et notamment une absence dans le milieu d'une source d'azote autre que N₂.

4.1.2. Activité de production d'hydrogène par les nitrogénases

Les nitrogénases, *via* la dinitrogénase réductase, reçoivent leurs électrons d'une ferrédoxine⁸ ou d'une flavodoxine⁹ (la flavodoxine remplaçant la ferredoxine en absence de fer dans le milieu), qui sont donc les partenaires redox des nitrogénases. Ferrédoxine et flavodoxine reçoivent leurs électrons de l'oxydation de substrats tels que le malate, le pyruvate,... par l'intermédiaire d'enzymes telles que la pyruvate : flavodoxine oxydoréductase (codée par le gène *nifJ*) (Shah et *al.*, 1983). La réaction totale catalysée par les nitrogénases peut être écrite comme suit :



Chaque transfert d'électrons est donc accompagné de l'hydrolyse de 2 molécules d'ATP. Environ 40 % de l'ATP cellulaire total est nécessaire pour l'activité nitrogénase. Les ions Mg interviennent également (Markov et *al.*, 1995).

⁸ Ferrédoxine : transporteur d'électrons de bas potentiel redox. Petite protéine contenant des clusters Fer-Soufre.

⁹ Flavoprotéine: protéine ayant un rôle de transporteur d'électrons.

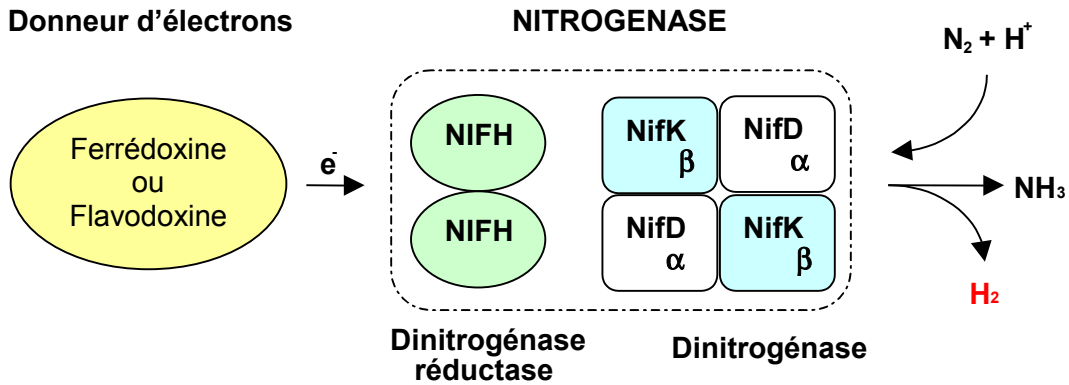
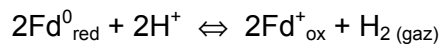
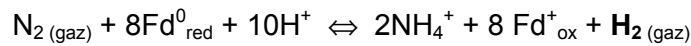


Fig. 2 - Schéma de l'organisation de la nitrogénase conventionnelle.

Si on prend le cas où la ferredoxine (Fd) est le donneur d'électrons, les trois équations biochimiques suivantes représentent les changements catalysés par la nitrogénase (Alberty, 1994) :



En absence de N_2 , les nitrogénases agissent comme des hydrogénases dans la mesure où elles continuent à produire de l'hydrogène sans que ce dernier soit utilisé pour la réduction de l'azote.

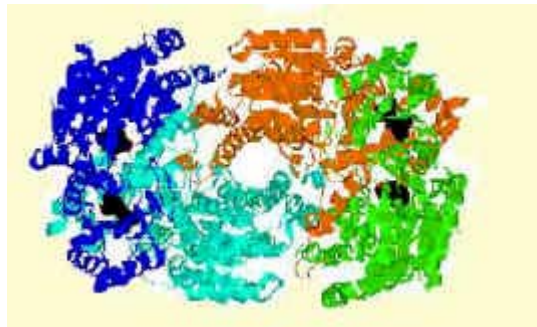


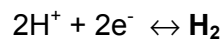
Fig. 3 - Structure tridimensionnelle de la nitrogénase.

Nous l'avons vu précédemment, les nitrogénases sont des enzymes très sensibles vis-à-vis de l'oxygène. Les bactéries fixatrices d'azote doivent donc protéger leurs nitrogénases de l'oxygène atmosphérique, mais également de l'oxygène généré intracellulairement. Chez les cyanobactéries, la protection des nitrogénases contre les effets de l'oxygène est d'autant plus obligatoire que ces bactéries sont capables de réaliser une photosynthèse aérobie. Ces bactéries ont donc développé différents

mécanismes et stratégies tels que la fixation d'azote seulement en conditions anaérobies, ou la séparation temporelle et même spatiale de la fixation d'azote et de la photosynthèse. Certaines cyanobactéries forment ainsi des hétérocystes spécialisés dans la fixation de l'azote, et qui sont caractérisés par une absence du photosystème II (responsable de la production d'O₂ au cours de la photosynthèse), un épaississement de la paroi cellulaire, et une forte concentration en nitrogénase.

4.2. LES HYDROGÉNASES

Les hydrogénases sont les enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène. Ces enzymes sont capables d'oxyder l'hydrogène de façon réversible, et catalysent ainsi la réaction suivante :



À l'heure actuelle, elles ont été découvertes chez un grand nombre de **bactéries et d'archae, aérobies et anaérobies, et chez certains eucaryotes**. Chez les procaryotes, les hydrogénases peuvent être périplasmiques, cytoplasmiques ou membranaires. À l'heure actuelle, plus de 100 hydrogénases ont été caractérisées génétiquement et/ou biochimiquement. Les hydrogénases constituent un groupe hétérogène d'enzymes qui, selon les organismes, jouent un rôle différent dans le métabolisme (production et/ou consommation d'Hydrogène).

Sur la base de la composition en métal du site actif, les hydrogénases sont classées en 3 groupes : les hydrogénases à Fer, à Nickel-Fer, et les hydrogénases ne contenant pas de métaux. Les hydrogénases les plus répandues sont les hydrogénases à Nickel-Fer, que l'on retrouve chez les bactéries méthanogènes, photosynthétiques, entériques, sulfato-réductrices et fixatrices d'azote. Ces hydrogénases peuvent également contenir un atome de sélénium, on parle alors d'hydrogénase à Nickel/Fer/Sélénium. La distribution des hydrogénases à Fer est limitée puisqu'on ne les retrouve que chez les organismes anaérobies. Les hydrogénases ne possédant pas de métaux n'ont été mises en évidence que chez certains organismes méthanogènes. Il n'est pas rare de trouver plus d'une hydrogénase chez un organisme donné, mais ces hydrogénases, possédant des fonctions différentes, diffèrent dans la localisation, la spécificité du transporteur d'électrons (donneur ou accepteur), et la régulation de l'expression. A noter qu'une hydrogénase productrice d'hydrogène localisée dans le cytoplasme contribue à l'établissement d'un gradient de pH transmembranaire, alors qu'une hydrogénase productrice d'H₂ localisée dans le périplasme va consommer ce gradient.

4.2.1. Les hydrogénases des bactéries sulfato-réductrices (BSR)

Les BSR¹⁰ possèdent des hydrogénases à Fer et à Nickel/Fer qui font l'objet de nombreuses études biochimiques, génétiques et structurales. Les hydrogénases à Fer ont cependant été beaucoup moins étudiées que les hydrogénases à Nickel/Fer. Ces deux types d'hydrogénases ne sont pas apparentés, et hormis les séquences codant pour au moins deux clusters 4Fe/4S, il n'existe pas de similarités de séquences entre les hydrogénases à Fer et celles à Nickel.

Les hydrogénases à Fer et à Nickel/Fer (fig. 4 et 5) sont composées de 2 sous-unités, appelées grande et petite sous-unités. Les hydrogénases possèdent un site actif (site catalytique) dont la composition en métal détermine le type d'hydrogénase, et qui est le lieu d'oxydo-réduction de l'hydrogène. Le site catalytique est enfoui au cœur de la protéine, dans la grande sous-unité. L'accès des protons au site actif se fait par un canal qui va de la surface de la protéine au site actif. Les hydrogénases possèdent également des centres Fer/Soufre qui permettent le transfert des électrons du site catalytique vers le partenaire redox (protéine donneur ou accepteur d'électrons). La liaison des centres Fer/Soufre à la chaîne polypeptidique, de même que la liaison avec les métaux, se fait par des cystéines.



Fig. 4 - Structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à Nickel/Fer.

¹⁰ Bactérie sulfato-réductrice : bactérie anaérobie réduisant le sulfate et intervenant ainsi dans le cycle du soufre.

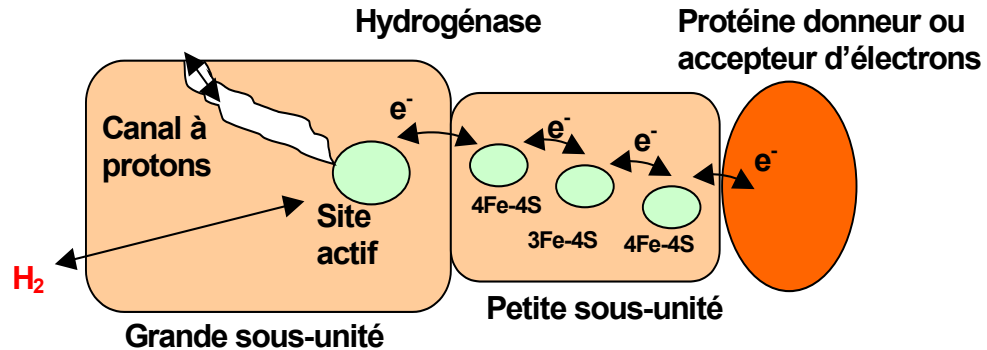


Fig. 5 - Schéma de l'organisation de l'hydrogénase à Nickel/Fer de *Desulfovibrio gigas* (Cammack, 1995).

Il est à noter que les hydrogénases à Nickel/Fer ont une activité spécifique vis-à-vis de l'hydrogène généralement plus élevée dans le sens de la consommation de l'hydrogène, alors que dans le cas des hydrogénases à Fer, l'activité spécifique est généralement plus élevée dans le sens de la production d'hydrogène. Ainsi l'activité de consommation d'hydrogène des hydrogénases à Ni/Fe est généralement de l'ordre de 300-400 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, et l'activité de production d'hydrogène est d'environ 65 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Hallenbeck and Benemann, 2002). Les hydrogénases à Nickel/Fer ont une activité enzymatique plus faible (de l'ordre de 100 fois) que les hydrogénases à Fer, mais elles ont une meilleure affinité pour l'hydrogène. De plus, contrairement aux hydrogénases à Fer, elles sont peu sensibles au monoxyde de carbone.

Les caractéristiques des hydrogénases à Fer et à Nickel isolées de BSR des genres *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium* (genres les plus étudiés) sont répertoriées dans le tableau 4.

4.2.2. Les hydrogénases des cyanobactéries

Contrairement à la nitrogénase, les hydrogénases des cyanobactéries diffèrent des hydrogénases des autres micro-organismes. Chez les cyanobactéries, deux hydrogénases ont été mises en évidence : une « uptake » hydrogénase, et une hydrogénase bidirectionnelle. Ces enzymes sont toutes deux des hydrogénases à Nickel/Fer. Elles diffèrent cependant sur plusieurs points : l'« uptake » hydrogénase est ainsi plus sensible à de hautes températures, mais est moins sensible à une inhibition compétitive par le monoxyde de carbone. Les deux enzymes ont un K_m ¹¹ pour l'hydrogène faible (et donc une bonne affinité pour ce gaz), mais seule l'« uptake »

¹¹ K_m : Constante de Michaelis : concentration du substrat pour laquelle la vitesse initiale d'une réaction enzymatique atteint la moitié de la vitesse maximum.

Hydrogénases	à nickel	à fer
Localisation	Périplasma ¹² , cytoplasme ¹³ , membrane	Périplasma, cytoplasme, membrane
Sous-unités	2	2
Poids moléculaire des sous-unités	55-65 + 26-36	46 + 14
Clusters [4Fe/4S]	2 (petite sous-unité)	3 (petite sous-unité)
Cluster [3Fe/4S]	1 (petite sous-unité)	0
CO inhibition	Faible sensibilité	Forte sensibilité
Activités spécifiques de consommation et de production d'hydrogène	Faible (généralement plus élevée dans le sens de la consommation d'H ₂)	Élevée (plus élevée dans le sens de la production d'H ₂)

Tabl. 4 - Caractéristiques des hydrogénases isolées des *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium*

hydrogénase est suscitée lors de l'addition d'hydrogène dans la phase gazeuse. Des travaux réalisés chez des cyanobactéries du genre *Nostoc* ont montré qu'un faible taux d'oxygène et une addition de nickel entraînent un plus haut niveau de transcription des deux hydrogénases, alors que la présence d'hydrogène moléculaire n'a un effet positif que sur la transcription des gènes codant pour l'« uptake » hydrogénase (Axelsson et Lindblad, 2002). Aucun gène codant pour une hydrogénase à fer n'a été mis en évidence chez les cyanobactéries.

« Uptake » hydrogénase

Cette hydrogénase, dite « uptake » hydrogénase (fig. 6) parce qu'elle catalyse la consommation de l'hydrogène produit par les nitrogénases, a été mise en évidence chez toutes les cyanobactéries fixatrices d'azote connues à ce jour. Des travaux suggèrent qu'elle pourrait également être présente chez les bactéries non fixatrices d'azote. Il est à noter qu'à ce jour, aucune « uptake » hydrogénase active n'a été purifiée chez les cyanobactéries : la composition exacte et la masse moléculaire de l'holoenzyme¹⁴ active sont donc encore inconnues. Il y aurait au moins 2 sous-unités, HupL (pour « Large subunit ») et HupS (pour « Small subunit »), mais la présence de sous-unités supplémentaires dans la forme active ne peut pas être écartée.

¹² Périplasma : compartiment cellulaire situé entre les membranes interne et externe des bactéries gram négatives. Compartiment soluble.

¹³ Cytoplasme : compartiment cellulaire contenant l'ADN. C'est le lieu des synthèses protéiques, etc... .

¹⁴ Holoenzyme : forme active de l'enzyme. Correspond à l'association de l'apoenzyme (partie protéique) au(x) cofacteur(s) (partie non protéique de l'enzyme).

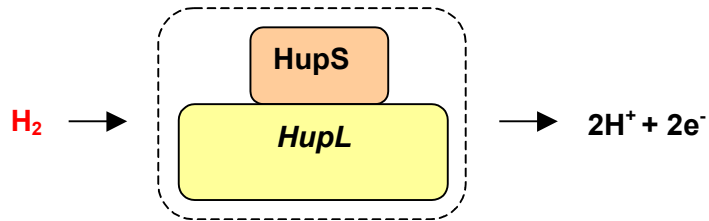


Fig. 6 - Schéma de l'organisation de l'«uptake» hydrogénase des cyanobactéries.

Le recyclage – par l'«uptake» hydrogénase - de l'hydrogène produit par les nitrogénases pourrait avoir 3 fonctions bénéfiques pour l'organisme : (i) fournir la cellule en ATP via la réaction de l'oxyhydrogène, (ii) éliminer l'hydrogène du milieu intracellulaire de manière à éviter l'inactivation des nitrogénases, et (iii) approvisionner en équivalent réducteurs (électrons) les nitrogénases et d'autres fonctions cellulaires.

Hydrogénases bidirectionnelles (ou réversibles)

Les hydrogénases bidirectionnelles, qui comme leur nom l'indique sont capables de catalyser la réduction et l'oxydation de l'hydrogène, se retrouvent à la fois chez les bactéries fixatrices et non fixatrices d'azote, bien qu'elles ne soient pas des enzymes universelles chez les cyanobactéries fixatrices d'azote. Les hydrogénases bidirectionnelles des cyanobactéries sont généralement caractérisées par leur sensibilité vis-à-vis de l'oxygène, leur thermotolérance, et leur forte affinité pour l'hydrogène. Il est important de noter que les conditions physiologiques pour lesquelles l'hydrogénase bidirectionnelle est présente et active n'ont pas encore été déterminées.

L'hydrogénase bidirectionnelle (fig. 7) est formée d'une hydrogénase associée à une diaphorase. L'enzyme est un hétérotétramère composé des protéines HoxH, HoxY, HoxU et HoxF, avec HoxH et HoxY formant la partie hydrogénase, et HoxU et HoxF formant la partie diaphorase.

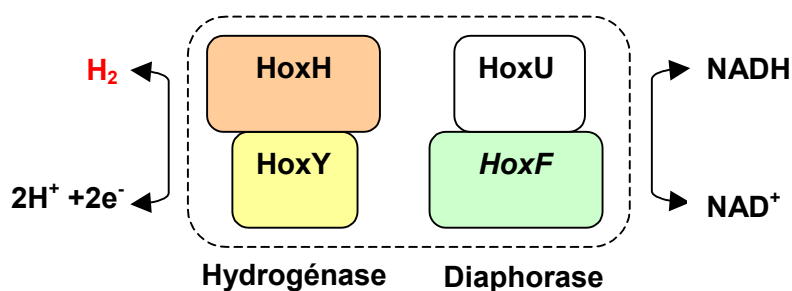


Fig. 7 - Schéma de l'organisation de l'hydrogénase bidirectionnelle.

Le rôle physiologique de l'hydrogénase bidirectionnelle est encore indéfini. L'implication de cette enzyme dans le processus de fermentation a été suggéré (Axelsson et Lindblad, 2002). Le faible K_m (et donc la forte affinité) de l'enzyme pour l'hydrogène pourrait indiquer que l'enzyme fonctionne généralement dans le sens de l'oxydation de l'hydrogène. Le gradient de protons étant dirigé vers l'extérieur chez les

cyanobactéries, une fonction de l'hydrogénase bidirectionnelle pourrait donc être d'oxyder l'hydrogène dans le périplasma afin de fournir des électrons à la chaîne respiratoire. Les propriétés des hydrogénases de cyanobactéries sont récapitulées dans le tableau 5. Des travaux réalisés chez *Anabaena cylindrica* suggèrent que l'hydrogénase bidirectionnelle reçoit des équivalents réducteurs de la photolyse de l'eau, et que les photosystèmes¹⁵ I et II participent à la production d'hydrogène.

	Hydrogénase bidirectionnelle	« Uptake » hydrogénase
Localisation	Membrane cytoplasmique	Membrane des thylakoïdes ¹⁶
Production d'H ₂	Catalyse la production d'H ₂ dans le noir dans les conditions physiologiques de même qu'avec des donneurs artificiels	Catalyse la production d'H ₂ seulement avec des donneurs artificiels tels que dithionite + méthyl viologène.
Stabilité pour des niveaux d'O ₂ atmosphériques	Inactivation irréversible	Stable
Stabilité à 70 °C	Stable	Instable

Tabl. 5 - Propriétés des hydrogénases bidirectionnelles et « uptake » des cyanobactéries.

4.2.3. Production d'hydrogène par les enzymes impliquées dans la fermentation¹⁷

Voie métabolique in vitro couplée à une hydrogénase (fig. 8)

La conversion du glucose en hydrogène par voie enzymatique *in vitro* a fait l'objet de nombreuses études et a mis en avant le rôle de la glucose déshydrogénase (GDH) et de l'hydrogénase dans ce processus (Woodward and Orr, 1998 ; Woodward et al., 2000). La photoproduction enzymatique d'hydrogène à partir d'autres monosaccharides, oligosaccharides ou polysaccharides peut également être envisagée. Le glucose peut par exemple être obtenu à partir du saccharose grâce à l'action de l'invertase. La combinaison invertase/GDH/hydrogénase permet donc la production d'hydrogène à partir de saccharose. À noter que la présence de NADP⁺, cofacteur¹⁸ de la GDH, est indispensable. L'hydrogénase, dans cette combinaison, doit être une hydrogénase capable d'utiliser le NADP⁺ comme transporteur d'électrons.

¹⁵ Photosystème : complexe multiprotéique membranaire contenant de la chlorophylle et des caroténoïdes, et intervenant dans la photosynthèse aérobie. Les photosystèmes catalysent les étapes de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons.

¹⁶ Thylakoïde : unité structurale composée de sacs et de vésicules contenant des pigments, et où a lieu la photosynthèse.

¹⁷ Fermentation: voie métabolique permettant la production d'énergie en absence d'oxygène. Dans la fermentation, l'accepteur terminal d'électrons est un substrat organique produit par la cellule elle-même.

¹⁸ Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique pour transporter ou compléter un substrat, accepter un produit, ou comme participant à la structure de l'enzyme.

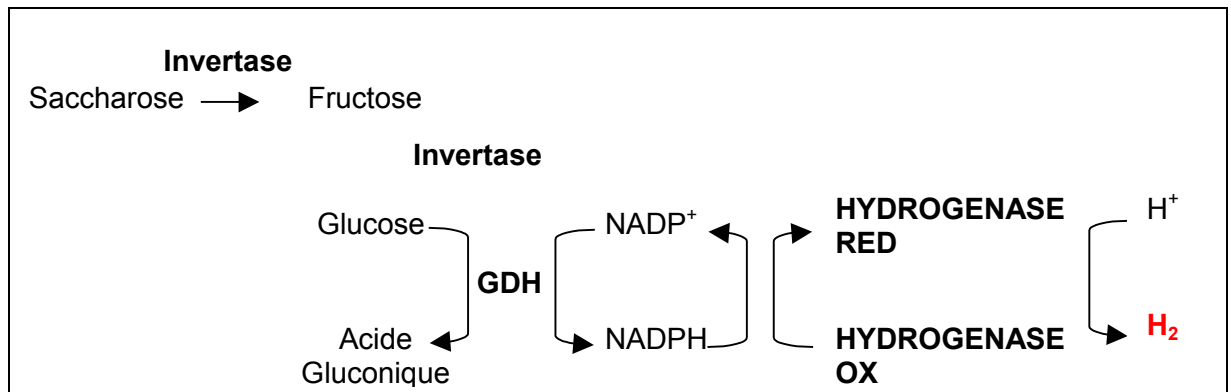
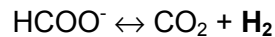


Fig. 8 - Production d'hydrogène par fermentation microbienne : production enzymatique d'hydrogène à partir du saccharose.

Ainsi le couplage d'une hydrogénase avec les enzymes du cycle du glucose-6-phosphate permet de générer 11,6 moles d'hydrogène par mole de G6P *in vitro*. En absence d'hydrogénase, seulement 2 moles d'H₂ sont produites par mole de G6P. Ces réactions n'ont pour l'instant pas été observées *in vivo* au cours d'une fermentation mettant en œuvre des cellules bactériennes entières et en phase de croissance.

Hydrogénase appartenant à un complexe multiprotéique : la formate-hydrogène lyase

La production d'hydrogène au cours de la fermentation du glucose (en conditions anaérobies) a été très étudiée chez *E. Coli* et a mis en évidence le rôle d'une formate-hydrogène lyase qui oxyde le formate (HCOO⁻) selon la réaction suivante :



La formate-hydrogène lyase (FHL) est un complexe multiprotéique formé d'une formate déhydrogénase (FDH) et d'une hydrogénase (HD) (Axley et *al.*, 1990). Ces deux protéines seraient reliées par l'intermédiaire d'un transporteur d'électrons, mais la nature de ce médiateur redox est inconnue. Le système FHL est un système multienzymatique lié à la membrane. La production d'hydrogène semble être due à l'association de ce complexe avec les pompes H⁺/K⁺.

La formate déhydrogénase du complexe FHL contient un atome de sélénium (sous forme de sélénocystéine), et du molybdène (une molybdoptérine sert de cofacteur). Les travaux suggèrent également un centre [4Fe/4S]. L'expression de la formate déhydrogénase est induite par le formate, et réprimée par l'oxygène, le nitrate, le nitrite, et d'autres accepteurs d'électrons. En présence de formate, la répression de l'expression de la FDH par le nitrate n'est plus observée. Le formate ne supprime cependant pas l'effet de l'oxygène.

L'hydrogénase du complexe FHL est, chez *E. coli*, l'hydrogénase 3.

Hydrogénases des Clostridies (bactéries anaérobies strictes)

Deux classes d'hydrogénases sont présentes chez les bactéries du genre *Clostridium* : les hydrogénases à Fer (Adams, 1990) et les hydrogénases à Nickel/Fer (Watrous et al., 2003). Ces 2 classes d'hydrogénases sont les mêmes que celles rencontrées chez les bactéries sulfato-réductrices. On peut noter quelques différences ; par exemple, l'information génétique codant pour l'hydrogénase à Nickel/Fer de *C. acetobutylicum* est localisée non pas sur le chromosome bactérien mais sur un plasmide¹⁹. L'analyse structurale a également montré que l'hydrogénase à fer de *C. pasteurianum* est une enzyme monomérique et non pas dimérique comme celles des bactéries sulfato-réductrices ; la structure et la fonction de l'hydrogénase à Fer de *C. pasteurianum* sont toutefois les mêmes que les hydrogénases à Fer rencontrées chez les BSR.

4.3. STRATÉGIES POUR AMÉLIORER LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE PAR LES CYANOBACTÉRIES

De nombreuses bactéries anaérobies, aérobies, photosynthétiques, sont capables de produire de l'hydrogène. Parmi ces bactéries, les cyanobactéries semblent des candidates idéales pour une production d'hydrogène en grande quantité dans la mesure où ces bactéries ont une demande nutritionnelle très simple : air (N₂ et CO₂), eau (électrons et agents réducteurs), sels minéraux simples, lumière (source d'énergie). De nombreuses stratégies ont été proposées pour améliorer la production d'hydrogène par les cyanobactéries. Ce sont principalement des stratégies de biologie moléculaire (mutagénèse) visant à augmenter la production d'hydrogène par la nitrogénase et par l'hydrogénase bidirectionnelle, et à empêcher la consommation de l'hydrogène par les hydrogénases, en particulier l'« uptake » hydrogénase. Cependant, il est également possible d'augmenter la production d'hydrogène en jouant sur les conditions de croissance des bactéries.

4.3.1. Augmentation de la production d'hydrogène par biologie moléculaire

Une des stratégies envisageables est de sélectionner des bactéries fixatrices d'azote, qui possèdent donc une nitrogénase produisant de l'hydrogène (Lindblad, 1999). Des souches impliquées dans des symbioses²⁰, au sein desquelles elles ont pour rôle la fixation de N₂, pourraient être d'un grand intérêt dans la mesure où, ces bactéries étant capables de fixer une importante quantité d'azote, elles devraient également être capables de produire une grande quantité d'hydrogène. Des travaux ont montré que

¹⁹ Plasmide : petite molécule circulaire d'ADN extrachromosomique présente chez les bactéries, capable de se répliquer de façon autonome, dans la cellule d'origine et dans une cellule-hôte. Cette molécule porte des caractères génétiques non essentiels à la cellule hôte. Certains plasmides sont utilisés comme vecteurs de clonage de gènes.

²⁰ Symbiose : association qui dure pendant au moins une partie du cycle biologique, entre deux ou plusieurs organismes spécifiquement distincts. Cette association conduit à la formation d'une nouvelle entité biologique, le symbiocosme, lui-même soumis à la sélection naturelle. Au plan physiologique, la symbiose permet généralement une meilleure adaptation au milieu et, au plan génétique, elle est un moyen sophistiqué d'acquérir de nouveaux gènes par transfert latéral.

chez les bactéries fixatrices d'azote, l'inactivation du gène codant pour l'« uptake » hydrogénase conduit à des mutants incapables de recycler l'hydrogène, c'est-à-dire de consommer l'hydrogène produit par la nitrogénase (Hansel and Lindblad, 1998). Toutes les bactéries fixatrices d'azote ne possèdent pas d'hydrogénase bidirectionnelle. De telles bactéries pourraient donc être un choix judicieux dans la mesure où, en présence d'hydrogène (produit par la nitrogénase), cette enzyme a tendance à fonctionner dans le sens de la consommation d'hydrogène. Ainsi, des cyanobactéries telles que la souche *Nostoc* PCC 73102 sont des candidates intéressantes pour de futures applications (Tamagnini et al., 2002). Chez des bactéries exprimant l'hydrogénase bidirectionnelle, l'inactivation des gènes codant pour cette enzyme peut être envisagée.

Une autre possibilité pourrait être d'inactiver les gènes codant pour la nitrogénase et l'« uptake » hydrogénase dans les hétérocystes, et de sur-exprimer l'hydrogénase bidirectionnelle, dans la mesure où en l'absence d'hydrogène produit par la nitrogénase, l'hydrogénase bidirectionnelle fonctionnerait dans le sens de la production d'hydrogène.

Des travaux réalisés sur l'hydrogénase bidirectionnelle ont montré que le remplacement des cystéines de la petite sous-unité par des sérines peut induire une insensibilité vis-à-vis de l'oxygène, et affecte préférentiellement l'oxydation de l'hydrogène par rapport à la production. La sur-expression d'une telle hydrogénase, par couplage des gènes avec un promoteur²¹ fort, pourrait conduire à une surproduction d'hydrogène. Une meilleure connaissance des gènes impliqués dans la régulation de l'expression des hydrogénases permettra d'envisager d'autres stratégies pour augmenter la production d'hydrogène par les cyanobactéries.

La sur-expression de la nitrogénase pourrait également être envisagée.

4.3.2. Augmentation de la production d'hydrogène par modification des conditions de croissance

De nombreux travaux ont montré que le taux de production d'hydrogène par les cyanobactéries varie en fonction de l'espèce, de l'âge et de la densité de la culture. Il s'agit donc de sélectionner des espèces de cyanobactéries produisant de fortes quantités d'H₂. Le taux maximum de photoproduction d'hydrogène est observé en début de phase stationnaire. La production d'H₂ décroît pour les cultures plus âgées. Les plus fortes productions d'hydrogène sont obtenues pour des suspensions cellulaires denses.

Des études ont démontré que les cellules immobilisées produisent plus d'hydrogène que les cellules libres (Markov et al., 1995). L'immobilisation des cyanobactéries pour la production d'hydrogène pourrait offrir certains avantages tels que 1) la stabilité de la production d'hydrogène pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois,

²¹ Promoteur : séquence d'ADN située en amont de la séquence codant la protéine, indispensable à l'expression du gène.

2) l'augmentation des taux de production d'hydrogène, 3) une plus grande tolérance vis-à-vis de l'oxygène exogène et de fortes intensités lumineuses, 4) une augmentation de la fréquence des hétérocystes et de l'activité de la nitrogénase, 5) une augmentation de l'activité photosynthétique (contenu en pigment, activité des photosystèmes, etc.) et du métabolisme cellulaire, et 6) une augmentation du rapport surface/cellule, ce qui optimise le contact entre les cellules immobilisées, le milieu de croissance et la phase gazeuse, et qui conduit à une croissance accélérée des cellules.

Chez les cyanobactéries hétérocystaires, le nombre d'hétérocystes (cellules contenant les nitrogénases et produisant l'hydrogène) par rapport aux cellules végétatives varie en fonction de certains paramètres (composés carbonés, etc.).

Il a été démontré que la phase gazeuse (CO_2 , N_2 , H_2 et O_2), la présence de métaux, l'intensité de la lumière, de même que la composition, le pH, et la température du milieu de culture interviennent sur la quantité d'hydrogène produit par les bactéries.

Les conditions de croissance peuvent en effet influencer sur les synthèses protéiques et donc sur la quantité d'hydrogène produit par les cyanobactéries. Par exemple, la présence ou non de Molybdène dans le milieu va déterminer le type de nitrogénase qui va être synthétisée. Ainsi, en absence de Molybdène, la nitrogénase conventionnelle n'est plus synthétisée, et c'est alors la nitrogénase alternative à Vanadium qui est produite. Des travaux ont montré que les nitrogénases ne contenant pas de Molybdène allouent plus d'électrons pour la production d'hydrogène. Un des moyens d'augmenter la production d'hydrogène pourrait donc être de favoriser l'expression des nitrogénases alternatives. En ce qui concerne l'activité hydrogénase, celle-ci est stimulée par les ions divalents Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} et Fe^{2+} . La synthèse d' H_2 par les cyanobactéries nécessite également du Fe^{3+} (5 mg.l⁻¹). La présence de nickel dans le milieu réduit la production nette d'hydrogène en augmentant l'activité de l'« uptake » hydrogénase.

La production d'hydrogène par la nitrogénase est inhibée par la présence d'azote organique (ammonium, NO_3 , NO_2 , urée) dans le milieu. On observe en effet en présence de ces sources d'azote une inhibition de la synthèse de la nitrogénase et une inhibition de la différenciation des hétérocystes. Enfin, la présence ou non de carbone organique joue un rôle sur l'activité nitrogénase et hydrogénase. Ainsi, pour certaines souches appartenant au genre *Nostoc*, les meilleures activités nitrogénase et hydrogénase sont obtenues en conditions d'hétérotrophie. À l'inverse, des souches telles que *Macrozamia communis* et *Anabaena cycadeae* ont de meilleures activités en conditions autotrophes. L'ensemble des études réalisées tend donc à montrer que la régulation des activités nitrogénase et hydrogénase se fait au niveau de la transcription et de la synthèse des enzymes, et non pas au niveau de la régulation de l'activité de protéines pré-existantes.

La présence de certains gaz joue un rôle dans la capacité des cyanobactéries à produire de l'hydrogène (Markov et al., 1995). Ainsi, la pression partielle d'hydrogène dans la phase liquide est aussi un des facteurs clés qui affectent la production d'hydrogène (Hawkes et al., 2002). La majorité des réactions produisant de

l'hydrogène sont en effet thermodynamiquement défavorables en présence d'une forte pression partielle d'hydrogène. La diminution de la concentration en H_2 dissous permet donc d'augmenter la production d' H_2 . Elle peut être obtenue artificiellement, par exemple, par bullage d'argon.

Comme tous les organismes photosynthétiques, les cyanobactéries utilisent le CO_2 pour la photosynthèse. En condition CO_2 -limitantes, le taux de production d' H_2 est proportionnel au taux de croissance (Markov et al., 1995). Il faut toutefois noter que chez les cyanobactéries non-hétérocystaires, le CO_2 inhibe la nitrogénase (probablement par compétition pour l'ATP et des réducteurs).

L'azote moléculaire inhibe la production d'hydrogène par la nitrogénase chez certaines cyanobactéries. Cependant, de faibles quantités (jusqu'à 1 %) de N_2 peuvent augmenter la production d'hydrogène. La présence de N_2 dans le milieu de culture est nécessaire pour la fixation de l'azote donc pour le métabolisme cellulaire.

La température joue également un rôle sur la production d'hydrogène (Markov et al., 1995). La température optimale pour la production de ce gaz varie considérablement d'un organisme à l'autre, et ne correspond pas nécessairement à la température optimale de croissance.

En ce qui concerne l'influence du pH, des travaux ont montré qu'aucune photoproduction d'hydrogène par les cyanobactéries ne peut être obtenue pour des pH inférieurs à 6,5 ou supérieurs à 10. La diminution de la photoproduction d' H_2 est plus prononcée pour des pH acides que pour des pH alcalins. Le fait qu'un pH supérieur à 9 soit défavorable pour la photoproduction d' H_2 s'explique par le fait que ce pH est le pH optimal pour l'activité de consommation de l'hydrogène par l'« uptake » hydrogénase.

La lumière est un facteur essentiel pour la production d' H_2 par les cyanobactéries dans la mesure où la production d'hydrogène dépend directement ou indirectement de l'activité photosynthétique. La production d'hydrogène augmente généralement avec l'intensité lumineuse ; cependant, une forte intensité lumineuse entraîne une forte production d'oxygène, ce qui inhibe les enzymes impliquées dans la production d' H_2 (nitrogénases et hydrogénase). Une illumination courte mais de forte intensité (100 W.m^{-2}) inhibe la production d'oxygène, et stimule l'activité nitrogénase et la production d'hydrogène. Il faut noter que certaines cyanobactéries produisent de l'hydrogène à l'obscurité en présence de carbohydrates exogènes, en utilisant l'énergie produite au cours de la respiration (qui est consommatrice d'oxygène). Cependant, le taux de production d'hydrogène par les cyanobactéries dans le noir est plus faible qu'en présence de lumière. Il semble donc qu'une alternance obscurité/lumière augmente la production d'hydrogène par rapport à une illumination continue.

4.4. CONCLUSION

Les études réalisées sur la production bactérienne d'hydrogène ont permis d'identifier les bactéries du cycle de l'hydrogène de même que les enzymes impliquées dans le métabolisme (production et consommation) de ce gaz. Les travaux ainsi réalisés en

microbiologie, biochimie, génétique et biologie structurale permettent de mieux comprendre les mécanismes de bio-production et bio-consommation d'hydrogène. De nombreuses stratégies visant à optimiser la bio-production d'hydrogène par les micro-organismes sont proposées. Outre les modifications génétiques, des modifications des conditions de croissance influent sur le taux de production d'hydrogène.

5. Production d'hydrogène à partir d'ordures ménagères en bioréacteur contrôlé

5.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Cette partie du rapport a pour objectif de cerner la faisabilité technique et économique de la valorisation du gaz de décharges par production d'hydrogène utilisable dans des piles à combustible. Les objectifs initiaux de ce module, financé par la Direction de la Recherche, sont :

- la description des mécanismes de production d'hydrogène sur les sites de stockage de déchets ;
- l'identification des gisements d'hydrogène pour différentes catégories de sites de stockage ;
- l'inventaire des cas répertoriés de sites de stockage produisant de l'hydrogène ;
- la description des étapes techniques nécessaires à la production d'hydrogène en bioréacteur contrôlé ;
- l'élaboration d'un cahier des charges et l'estimation des coûts pour une expérimentation de démonstration à l'échelle du laboratoire.

L'étude bibliographique exploratoire réalisée dans le cadre du projet MATUTA-H₂ (Touzé et *al.*, 2003) a permis de répondre aux trois premiers points. Deux pistes potentielles de production d'hydrogène sur les centres de stockage ont été identifiées : le craquage du méthane et l'optimisation de la phase d'acidogénèse par blocage de la phase méthanogénèse du processus de fermentation anaérobie des déchets. L'acidogénèse et la méthanogénèse sont des phases consécutives de la dégradation de la matière organique. Ces deux aspects ont été développés et ont abouti à la mise en place d'une expérimentation en laboratoire dans le cadre du projet de recherche.

À l'issue de l'étude exploratoire MATUTA-H₂, la voie la plus prometteuse de production d'hydrogène à partir de gaz de décharge, semble être l'optimisation de la voie d'acidogénèse où une production d'hydrogène est notable. Une méthode décrite dans le brevet américain déposé par Roychowdhury (2002) qui démontre qu'une application d'un faible courant électrique au sein d'un substrat organique partiellement dégradé, permet l'hydrolyse de ces composés en hydrogène et gaz carbonique.

Sur la base de l'expérience acquise au cours d'études précédentes de fermentation anaérobie de déchets ménagers, un protocole expérimental en bioréacteur a été mis au point pour permettre la dégradation anaérobie de déchets ménagers par voie méthanogénèse, afin de se placer dans les conditions adéquates pour l'application d'un courant électrique dans l'objectif de produire de l'hydrogène.

5.2. ÉTAT DES LIEUX RÉALISÉ PAR L'ÉTUDE EXPLORATOIRE MATUTA-H₂

L'étude exploratoire MATUTA-H₂ avait pour objectif l'identification des voies potentielles de production d'hydrogène à partir des sites de stockage des déchets ménagers. Le contenu de cette étude est ci-après rappelé.

5.2.1. État des lieux sur l'hydrogène

L'utilisation principale de l'hydrogène est par autoconsommation dans l'industrie du pétrole (reformage et craquage catalytique) ou sert de matière première de base dans les industries chimique et pétrochimique (synthèse d'ammoniac, de méthanol, production de colorants, d'eau oxygénée).

Aujourd'hui, l'hydrogène n'a pas d'usage significatif dans le domaine de l'énergie. Cependant il est vu comme un vecteur énergétique futur prometteur. Cet attrait vient du fait que son seul produit de combustion est l'eau. Actuellement, un des points faibles de son utilisation comme vecteur d'énergie est son conditionnement.

Il est principalement produit à partir d'énergie fossile, mais il existe aussi des applications industrielles de production par électrolyse. Par contre, la production d'hydrogène à partir de biomasse n'a pas d'application industrielle à l'heure actuelle.

5.2.2. Rappel sur le gaz de décharge

L'objectif de l'étude étant d'étudier le potentiel d'hydrogène sur les sites de stockage des déchets ménagers, il est important de bien comprendre les modes de production et les propriétés du gaz généré par les déchets ménagers sur ce type de site.

La fermentation est un ensemble de réactions biologiques aboutissant à la dégradation d'un substrat. Ce processus fait intervenir des réactions métaboliques impliquant différents microorganismes symbiotiques ; il se divise en trois phases : l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse. Ces trois phases seront décrites en détail dans le chapitre 4.3. Un déchet fermentescible est un déchet qui peut entrer en fermentation. Dans les déchets ménagers, la part fermentescible provient principalement des déchets de cuisine, du papier et du carton.

La fermentation des déchets produit un mélange de gaz nommé biogaz. Le gaz de décharge est principalement un mélange de biogaz et d'air. L'air est le plus souvent présent en faible quantité, c'est pourquoi le gaz de décharge est souvent assimilé au biogaz. Le biogaz est produit au cours de la phase de fermentation anaérobie (en absence d'air) de la décharge. Il est principalement constitué de méthane (de 50 à 70 %), d'anhydride carbonique (de 35 à 40 %), d'air (de 0,1 à 1 %), d'hydrogène (de 1 à 3 %), d'humidité et de contaminants en trace. Les facteurs qui influencent la production et la composition du gaz de décharge sont principalement des facteurs physico-chimiques (température, conditions anaérobies, pH, présence d'oligo-éléments, taux d'humidité, taille des particules du déchet et nature du déchet), l'âge du site (la production de biogaz diminuant au cours du temps), les méthodes d'exploitation

du site (confinement et système de collecte du biogaz) et la configuration naturelle de la décharge.

5.2.3. Gisement de biogaz

Suite à ces rappels sur les gaz de décharge, une évaluation du gisement de biogaz a été réalisée. Cette partie a été faite avec l'aide de l'association SOLAGRO, spécialisée dans les domaines des déchets et de l'énergie (SOLAGRO, 2003). Cette dernière a effectué un rapport sur l'évaluation des principaux gisements de biogaz (actuels et potentiels) : sources de production, valorisation, composition et conditionnement du biogaz et contexte économique et réglementaire. Suite aux observations sur les perspectives de l'hydrogène provenant du biogaz et l'état des principaux gisements, la filière « biogaz » apparaît intéressante pour l'approvisionnement énergétique de l'Europe à moyen et à long termes. Toutefois, considérant la nouvelle réglementation (directive décharge) qui conduit à la diminution de la part fermentescible, la production de gaz de décharge tendra à diminuer au profit des digesteurs anaérobies de déchets municipaux, industriels et agricoles.

5.2.4. Intérêt d'associer le gaz de décharge et l'hydrogène

Les techniques d'extraction et d'utilisation des gaz de décharge (combustion des gaz en vue de la diminution des nuisances et/ou valorisation énergétique) sont actuellement bien maîtrisées et soulignent les intérêts de l'utilisation du biogaz pour produire de l'hydrogène, à savoir :

- en plus de la diminution des gaz à effets de serre, minimisation de la dégradation des sols et des eaux (« contrôle » du caractère polluant des déchets) ;
- production d'énergie *in situ* pour autoconsommation ;
- savoir-faire acquis concernant la gestion des gaz de décharges ;
- croissance du marché biomasse/énergie.

5.2.5. Voies potentielles de production d'hydrogène

Suite à cet état des lieux de la situation de l'hydrogène et du gaz de décharge, une recherche sur les mécanismes donnant lieu à une production d'hydrogène sur les sites de stockage de déchets ménagers a été engagée. Deux **voies potentielles de production d'hydrogène** à partir des gaz de décharge ont été identifiées, il s'agit de :

- la stimulation de la phase acidogénèse et l'inhibition de la méthanogénèse ;
- le craquage du méthane issu du biogaz.

Lors de la **phase acidogénèse**, de l'hydrogène est produit, mais cet hydrogène est consommé par les bactéries méthanogènes afin de produire du méthane. Dans l'hypothèse où la méthanogénèse serait inhibée, les déchets organiques présenteraient un potentiel de génération d'hydrogène. Plusieurs voies d'inhibition de la méthanogénèse ont été répertoriées. Néanmoins il apparaît difficile de mettre en

place de tels systèmes sur une décharge. Il semble que ces techniques soient plus facilement applicables à des digesteurs.

Le principe du **craquage du méthane** consiste à casser la molécule de méthane en hydrogène et composé carboné. Le procédé de craquage se décompose en trois étapes : le pré-traitement du gaz, la conversion du méthane et la purification de l'hydrogène.

- Le pré-traitement a pour objectif d'éliminer les polluants (composés halogènes, sulfures...) qui pourraient être nuisibles à la réaction et aux équipements du procédé ;
- la conversion du méthane permet de craquer la molécule de méthane pour produire de l'hydrogène. Il existe différentes technologies : le vaporeformage, l'oxydation partielle, le vaporeformage auto-thermique et le craquage thermique. Le vaporeformage et l'oxydation partielle sont des techniques de craquage en présence de vapeur d'eau ou d'oxygène et produisent de l'hydrogène et du monoxyde de carbone. Le vaporeformage auto-thermique est une combinaison de ces deux techniques. Le craquage thermique décompose le méthane directement en composés élémentaires (carbone et hydrogène) ;
- le post-traitement permet d'enrichir du gaz en H₂ et d'éliminer les polluants en fonction de la qualité de l'H₂ voulue (fonction de l'usage futur de l'H₂).

Dans le but de sélectionner la meilleure technique pour une application avec du gaz de décharge, ces différentes technologies de craquage du méthane ont fait l'objet d'une comparaison suivant les points suivants :

- adaptabilité au contexte de la décharge (taille des équipements) ;
- apport externe de chaleur ;
- consommables du procédé ;
- maturité de la technologie ;
- coût.

Suite à l'analyse de ces différents critères, la technologie qui apparaît la plus appropriée est le vaporeformage. En effet, c'est la plus simple à mettre en œuvre dans le cadre de la décharge : il n'y a pas d'apport de consommable nécessaire en dehors de l'eau, de petites unités adaptables à de petits débits existent.

5.2.6. Valorisation de l'hydrogène

La voie de valorisation de l'hydrogène actuellement la plus employée est celle de l'industrie chimique. Dans le futur, l'hydrogène semble avoir des perspectives prometteuses de développement dans le domaine de l'énergie et particulièrement à travers la pile à combustible. Celle-ci semble être la plus adaptée au contexte de la décharge car elle permet une installation *on site* avec un rendement plus important que celui des moteurs thermiques.

5.2.7. Cas répertoriés

Une recherche des expériences passées de valorisation de l'hydrogène produit à partir de gaz de décharge a été menée. Seuls quatre cas d'études *in situ* sont répertoriés, et pour chacun de ces sites, la technique de vaporeformage couplée avec une pile à combustible a été employée. Trois expériences ont été réalisées aux Etats-Unis (Penrose, Groton, Beld et Cannock) et une en Grande-Bretagne (Beld). Dans chacun des cas, il a été techniquement possible de produire de l'hydrogène à partir du gaz de la décharge, avec des rendements différents selon les caractéristiques du site (débit, teneur en CH₄ du biogaz,...), mais sans aides publiques les projets n'auraient pas été économiquement viables.

5.2.8. Conclusion

La voie la plus prometteuse pour des essais en laboratoire parmi les deux voies présentées précédemment semble être la stimulation de l'acidogénèse. Cette voie est peu connue et peu explorée à ce niveau de connaissance. Il semble donc intéressant d'approfondir cette voie afin de connaître son potentiel. De plus, elle ne nécessite pas de matériel de laboratoire lourd en investissement et à l'utilisation, contrairement à la voie de vaporeformage.

5.3. GAZ DE DÉCHARGE

La biodégradation anaérobie des déchets ménagers passe par plusieurs phases successives. L'une d'entre elles est directement productrice d'hydrogène, il s'agit de la phase « acidogénèse ». Il a été décidé d'explorer cette voie afin d'évaluer le potentiel de la phase d'acidogénèse à produire de l'hydrogène, et plus particulièrement par la technique d'application d'un courant électrique.

5.3.1. Processus de dégradation de la matière organique

Sur un centre de stockage de déchets ménagers, le biogaz est produit par « méthanisation naturelle passive ». Chaque étape du processus de méthanisation mène à la formation de composés intermédiaires, servant à leur tour de substrats lors de la phase suivante. On admet généralement que le schéma de fermentation comprend trois étapes successives, réalisées par des populations bactériennes bien spécifiques (fig. 9) :

- 1^{ère} phase, l'**acidogénèse** : les microorganismes vont hydrolyser²² les composés organiques complexes en monomères qui vont ensuite être convertis en acides organiques, en H₂ et en acide acétique ;

²² Hydrolyser : Réaction chimique dans laquelle une molécule d'eau réagit avec une molécule d'une substance. L'eau et la substance se divisent en fragments pour se recomposer en de nouveaux produits.

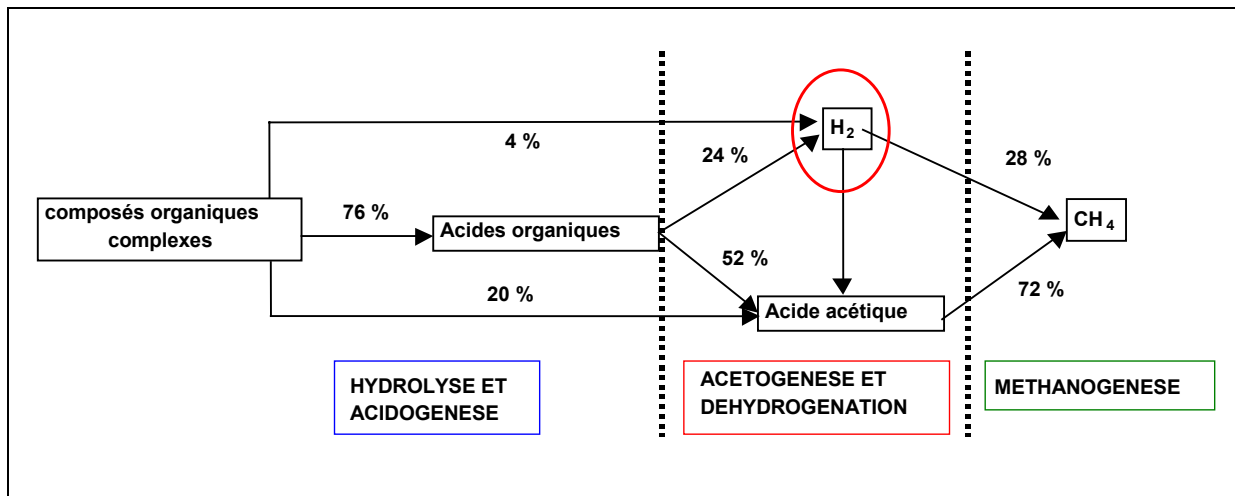


Fig. 9 - Les 3 phases successives de la dégradation de la matière organique.

- 2^{ème} phase, l'**acétogénèse** : les bactéries acétogènes transforment les acides organiques en H₂, CO₂ et acide acétique ;
- 3^{ème} phase, la **méthanogénèse** : les bactéries méthanogènes vont consommer l'H₂ et l'acide acétique pour produire du méthane.

Les phases acidogénèses et acétogénèses sont toutes deux productrices d'hydrogène qui est ensuite directement consommé au cours de la méthanogénèse.

L'équilibre qui existe entre les écosystèmes anaérobies, constitués de différents groupes bactériens, est primordial. Le rôle de chacun des groupes peut être perturbé si l'activité de l'un excède celle de l'autre. Par exemple, si les organismes acidogènes hydrolysent trop vite la matière organique, les acides carboxyliques et l'hydrogène produits vont s'accumuler, entraînant une baisse du pH et inhibant l'activité des bactéries méthanogènes (Bichet-Hebe, 1998).

5.3.2. Production de gaz au sein d'une décharge

Les déchets au sein d'une décharge évoluent au cours du temps influençant ainsi la composition du biogaz. On admet généralement que le schéma présenté ci-dessous (fig. 10) présente la relation entre la décomposition des ordures ménagères et la composition des gaz produits lors des phases successives de la maturation.

On repère bien les différentes phases de la méthanisation naturelle au sein d'un site de stockage de déchets ménagers :

- la première phase pouvant durer de quelques jours à quelques mois est une phase aérobie durant laquelle s'opèrent une consommation de l'oxygène et une production de dioxyde de carbone ;

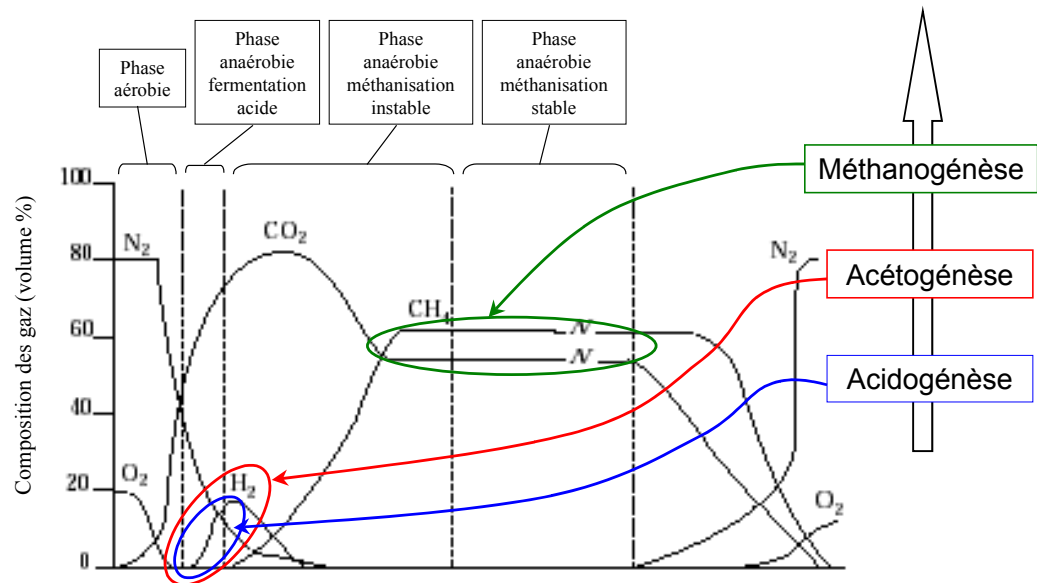


Fig. 10 - Schéma typique de génération de biogaz sur une décharge d'ordures ménagères (d'après Farquhar et Rovers, 1973, modifié).

- la deuxième phase, phase anaérobie non méthanogénique, peut durer de quelques mois à quelques années. Elle se caractérise par un taux élevé en gaz carbonique ;
- la troisième phase est anaérobie méthanogénique et dure plusieurs années. Elle se traduit par une apparition et une augmentation rapide de méthane alors que les quantités d'hydrogène et de gaz carbonique diminuent fortement ;
- la quatrième phase est une phase de stabilisation de la production de méthane et peut durer de nombreuses années. Le gaz produit au cours de cette phase se compose de 50 à 70 % de méthane, de 35 à 40 % de gaz carbonique, de 1 à 3 % d'hydrogène, de 0,1 à 1 % d'oxygène, de 0,5 à 3 % d'azote, de 1 à 5 % de gaz divers (hydrogène sulfuré, ammoniac, etc.) et de vapeur d'eau ;
- la dernière étape est dite phase de « minéralisation » qui s'exprime par une diminution de la production de méthane et de gaz carbonique.

Sur la figure 10, on peut observer le pic d' H_2 issu des phases « acidogénèse » et « acétogénèse », il diminue ensuite au profit de la concentration en méthane. Il est ainsi démontré qu'une décharge est productrice d' H_2 , mais la question est de savoir comment récupérer et valoriser cet H_2 *in situ* ?

5.4. BLOCAGE DE LA MÉTHANOGENÈSE PAR APPLICATION D'UN COURANT ÉLECTRIQUE ; BREVET DE ROYCHOWDHURY

Le brevet américain Roychowdhury (2002) démontre qu'en appliquant un courant électrique au sein d'un substrat partiellement dégradé, une production d'hydrogène se produit au détriment de la production de méthane.

5.4.1. Principe et conditions initiales requises

La condition requise par le brevet est d'avoir un substrat partiellement mûri. Un faible potentiel électrique compris entre 1,5 et 6 V (préférentiellement entre 3 et 4,5 V) est appliqué au matériel organique (matériau cellulosique, déchet ménager digéré). Sous l'application du courant électrique, celui-ci se décompose en acides carboxyliques volatiles comme l'acide acétique en conditions anaérobies. Ces acides volatils agissent comme des électrolytes²³. Le courant électrique va hydrolyser l'acide acétique et les autres acides carboxyliques volatils en produisant de l'hydrogène. La méthanogénèse est ainsi inhibée.

Voici le schéma, issu du brevet, du procédé de production d'hydrogène et d'inhibition de la phase méthanogénèse (fig. 11).

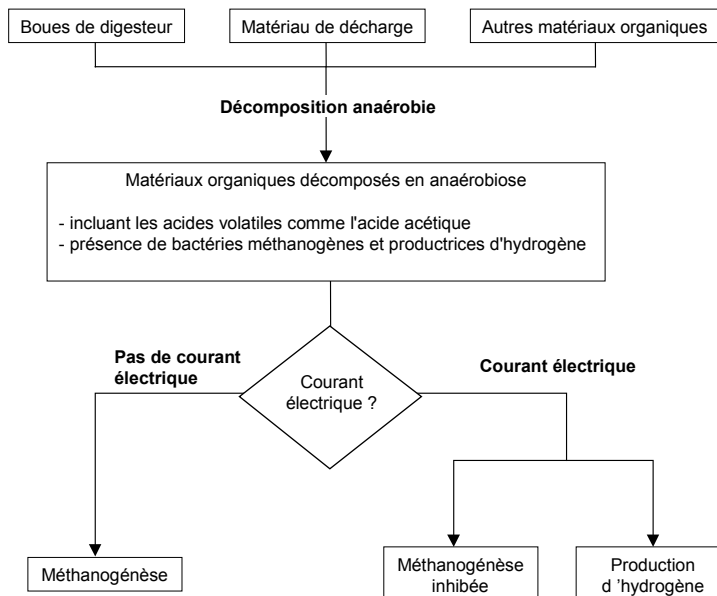


Fig. 11 - Procédé de production d' H_2 et d'inhibition de la méthanogénèse à partir de matériau décomposé de façon anaérobie en présence d'un courant électrique (d'après Roychowdhury, 2000).

²³ Electrolyte : Composé chimique en solution qui conduit l'électricité par migration des ions constituants

5.4.2. Essais en laboratoire présentés par le brevet

a) En bouteille de 800 mL (fig. 12)

Les expériences ont été réalisées dans des bouteilles de 800 mL munies d'un bouchon avec 3 ouvertures : 2 sont utilisées pour la mise en place des électrodes, la troisième est connectée à un tube en verre de collecte de gaz. Les électrodes sont connectées à 2 batteries de 1,5 V placées en série. Le système expérimental est placé dans un incubateur à 37 °C ou à 55 °C. Le pH du matériau organique est compris entre 6,5-7,0.

b) Sur des boues digérées

Le pH de la boue digérée est compris dans l'intervalle 7,0-7,5. Le potentiel électrique a été appliqué le deuxième jour de l'essai, qui a duré 8 jours.

La fermentation du déchet étudié est déjà au stade de méthanogénèse avec un taux de méthane atteignant 70 %. Dès qu'un potentiel électrique est appliqué, on observe une production d'hydrogène et une diminution du taux de méthane jusqu'à sa disparition après 6 jours. Le taux de CO₂ étant toujours constant, on comprend bien que la production d'hydrogène s'effectue aux dépens de celle du méthane.

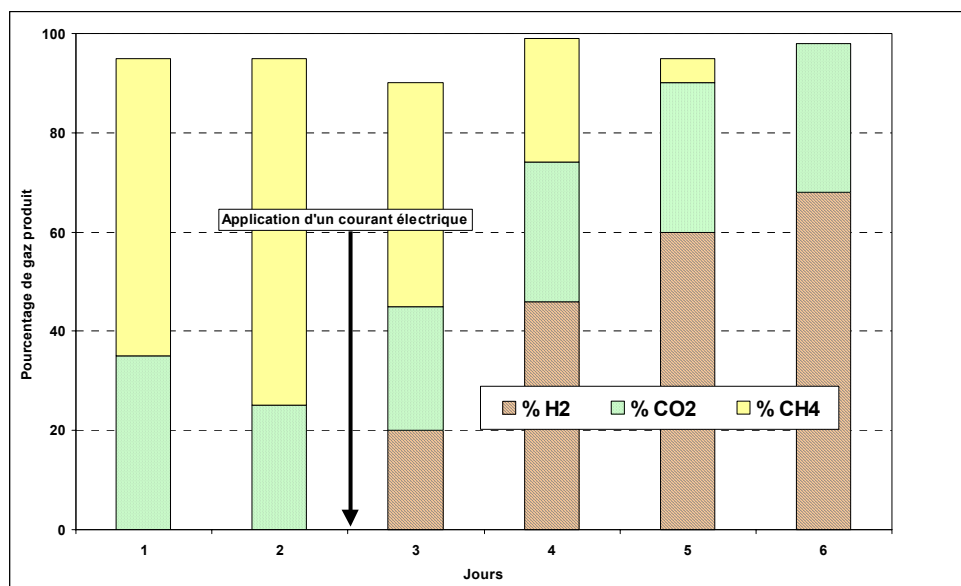


Fig. 12 - Expérience en bouteille de 800 mL sur des boues digérées issues de digesteur primaire (d'après Roychowdhury, 2000).

c) À partir de déchets ménagers municipaux

Une expérience similaire a été réalisée avec des déchets solides municipaux (fig. 13) mais dans ce cas, on applique le courant dès le début de l'essai. L'hydrogène produit atteint 70 % dès le second jour et reste constant les 7 jours restants, tandis que le CO₂ atteint 20 % le 3^{ème} jour et reste constant les 6 jours restants. On observe dans cette expérience l'absence de méthane, l'application du courant dès le premier jour semble inhiber très rapidement la méthanogénèse.

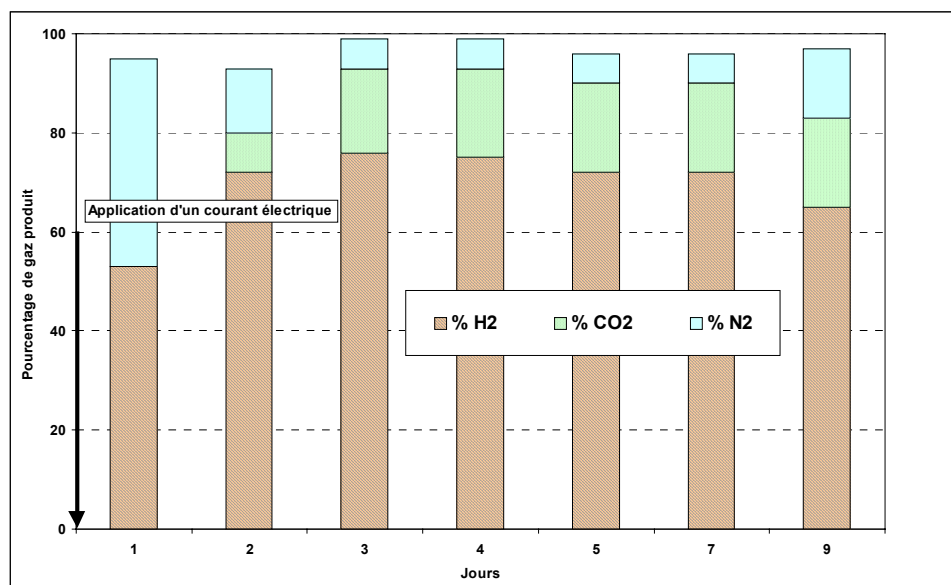


Fig. 13 - Expérience en bouteille de 800 mL sur du compost de déchets ménagers municipaux (d'après Roychowdhury, 2000).

d) En fermenteur de 6-8 litres

D'autres expériences ont été réalisées en digesteur de 6-8 litres où la température, l'agitation magnétique et le système de refroidissement sont contrôlés. La figure 14 ci-dessous présente l'essai réalisé sur du matériel de décharges. Un courant de 3,5 volts est appliqué dès le début de l'essai. Dès le premier jour et sur toute la durée de l'essai, l'application du courant électrique entraîne une production d'hydrogène à un niveau compris entre 70 et 75 %. Les teneurs en azote et en gaz carbonique respectives sont de l'ordre de 10-20 % et de 5-8 %. La production de méthane n'est pas observée.

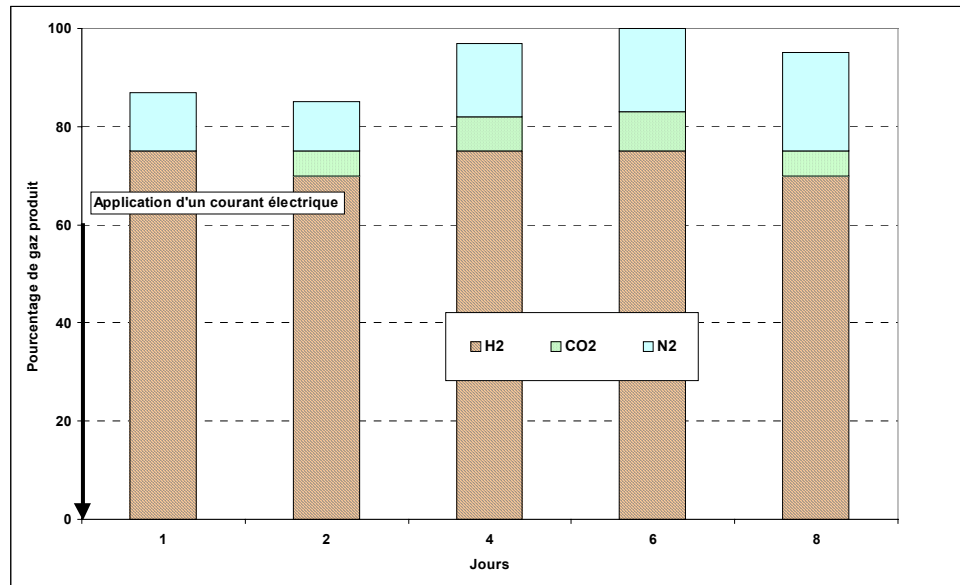


Fig. 14 - Expérience réalisée dans un fermenteur de 6 litres sur du matériel de décharge (d'après Roychowdhury, 2000).

5.5. EXPÉRIMENTATION EN LABORATOIRE AU BRGM

5.5.1. Objectifs

La conclusion de l'étude exploratoire MATUTA-H₂, résumée dans le chapitre 4.2 met en avant l'intérêt de la voie acidogénèse. Le blocage de la méthanogénèse peut être réalisé selon différentes techniques. Une de ces techniques est l'application d'un courant électrique au sein du matériel fermentescible. Ce procédé est exposé dans le brevet américain de Roychowdhury décrit précédemment. Le gaz produit, lors des essais commentés dans le brevet, était constitué principalement d'H₂ et de CO₂.

Le brevet décrit différents types de substrats pouvant être utilisés. Il semble qu'il n'y ait aucune restriction pour l'utilisation de déchets de décharge lors de la réalisation d'une expérience similaire. En effet, les matériaux de décharge sont globalement composés de 70 % de matériel cellulosique et ont une teneur en humidité comprise entre 36 et 46 %. Ils contiennent des bactéries méthanogènes et des bactéries productrices d'H₂.

Il est nécessaire de compléter les informations données par le brevet, elles ne sont pas suffisantes pour conclure sur la faisabilité et la viabilité d'un procédé de production d'H₂ au niveau des décharges. Le premier objectif de cet essai est de reproduire les tests voulant démontrer la faisabilité technique du procédé décrit dans le brevet. Le second objectif est de récolter suffisamment de données pour avoir un premier aperçu sur la viabilité de la technique. Enfin, cette expérience permettra d'élaborer le cahier des charges pour une poursuite des essais expérimentaux en 2004.

Les déchets utilisés proviennent de la décharge de Mézières-les-Cléry. L'expérience a été réalisée dans un réacteur de 5 litres. Un courant a été injecté dans le déchet au moyen de deux électrodes en acier inoxydable.

5.5.2. Matériel et méthodes

De façon à se caler sur le brevet, il était nécessaire de reproduire chacune des étapes de la dégradation de la matière organique. Sur la base de l'expérience acquise au cours d'études précédentes (cf. Nowak et *al.*, 2002), un protocole expérimental en bioréacteur contrôlé a été mis au point pour permettre la dégradation anaérobie de déchets ménagers par la voie classique de la méthanogénèse. Chaque étape de l'essai a été conçue pour optimiser le processus de biodégradation des déchets : il s'agissait de caler les différents systèmes et paramètres permettant de favoriser la dégradation de la matière organique en milieu anaérobie afin d'appliquer le courant électrique dans les meilleures conditions. La méthodologie expérimentale mise en œuvre est explicitée ci-après :

- 1) échantillonnage de déchets ménagers ayant déjà été mis en décharge (en cours de maturation) ;
- 2) broyage du déchet ;
- 3) dégradation accélérée d'ordures ménagères en digesteur pour obtenir une production de méthane ;
- 4) application d'un courant électrique pour induire la production d'hydrogène.

Chacune des étapes est détaillée ci-dessous.

a) Échantillonnage de déchets ménagers

Les prélèvements de déchets ménagers ont été réalisés sur le CET₂²⁴ de Mezières-les-Cléry (Loiret), sous climat sec, dans une alvéole de la partie récente du site (âgé de moins de quatre ans), à la pelle mécanique (cf. pl. 1) de façon à atteindre le déchet en profondeur et d'obtenir une maturation de déchet plus avancée (de 4 à 6 m, estimation de l'âge du déchet de 15 à 30 jours).

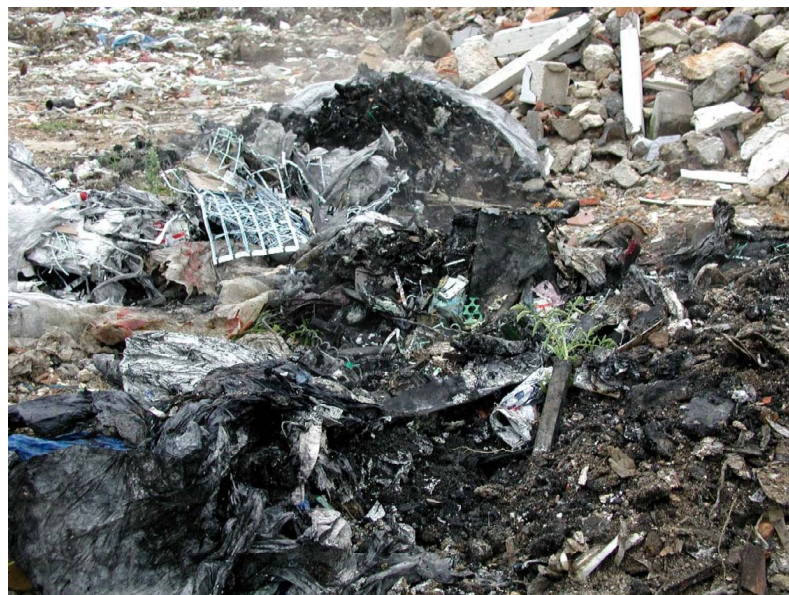
Le choix de l'échantillon s'est porté sur les parties noires du dépôt, reflet d'une dégradation partielle, qui dégageaient une fumée blanche. Il s'est avéré que l'échantillon possédait plus les caractéristiques d'un déchet de type DIB²⁵ que celles d'ordures ménagères : présence de bois, ferraille, carton, plastiques,... (cf. pl. 2).

²⁴ Centre d'Enfouissement Technique de classe II.

²⁵ Déchets Industriels Banals.



Pl. 1 - Échantillonnage de déchets à la pelle mécanique sur la décharge de Mézières-les-Cléry (Loiret).



Pl. 2 - Zoom sur l'échantillon de déchets prélevés.

b) Broyage du déchet

L'ensemble de cet échantillon (sans tri préalable) a été broyé à la Halle Pilote du BRGM de façon à obtenir une granulométrie d'environ 10 mm (cf. pl. 3). Le broyage a deux objectifs :

- être en mesure d'introduire l'échantillon dans le réacteur ;
- augmenter les surfaces de contact liquide/solide, permettant d'accélérer la vitesse de la biodégradation.

Tout le matériel broyé a de nouveau été mélangé de façon homogène. La mise en route de l'expérience en laboratoire s'est effectuée le jour même afin de limiter les perturbations de la population bactérienne en place. Le taux d'humidité (séchage à 105 °C) après broyage était de 32 %.

Le matériel de broyage utilisé est un déchiqueteur de maille 10 mm.



Pl. 3 - Broyage du déchet.

c) Dégradation du déchet en digesteur de 5 litres

Pour reproduire en bioréacteur contrôlé la méthanisation naturelle des déchets ménagers mis en décharge, les principaux paramètres et conditions physico-chimiques retenus sont les suivants :

- la nécessité d'être en anaérobiose stricte pour solliciter les bactéries intervenant dans la fermentation des déchets en conditions thermophiles. L'ensemble du système a été purgé à l'azote après introduction du substrat et de la solution nutritive ;
- la température de 55 °C est maintenue tout au long de l'expérience ;
- un pH proche de la neutralité ;
- la disponibilité d'éléments nutritifs pour la croissance des bactéries endogènes (la composition de la solution nutritive est décrite en annexe 1).

Un réacteur de 5 litres à double enveloppe, relié à un bain thermostaté pour maintenir la température souhaitée (fig. 15), a été choisi pour reproduire la maturation dite « naturelle » du déchet qui a lieu au sein d'une décharge. Le réacteur est équipé d'un système de mesure du pH et de la température. Le bain thermostaté est réglé à une température de 55 °C.

Une fiole de garde permet de prévenir les retours de liquides qui pourraient « polluer » le déchet et perturber la fermentation.

La cloche à gaz (éprouvette retournée dans une bassine remplie d'eau) permet de conserver le gaz produit et de mesurer son volume.

Les analyses de méthane (CH₄), dioxyde de carbone (CO₂), oxygène (O₂) et de sulfure d'hydrogène (H₂S) sont réalisées directement au sein du réacteur via un appareil de mesure par infrarouge : le GA2000. L'instrument a une gamme d'analyse de 0 - 100 (% vol) pour le CH₄ et le CO₂, de 0 - 25 % (% vol) pour l'O₂ et 0 - 200 ppm pour l'H₂S. L'analyse de l'hydrogène est réalisée au moyen d'un chromatographe portable.

La fréquence des analyses est de une à deux fois par jour. Deux analyses de gaz sont effectuées : avant et après agitation manuelle du réacteur.

d) Application d'un courant électrique pour la production d'hydrogène

L'essai est une succession de périodes de dégradation du déchet dite « naturelle » et de périodes de production d'hydrogène par application du courant. Elles sont listées ci-après :

- de 0-6 jours : dégradation dite « naturelle » de la matière organique en milieu anaérobie ;
- de 6-10 jours : première application du courant pendant **4 jours** ;
- de 10-14 jours : arrêt du courant pendant **4 jours** de façon à observer les effets sur la composition en gaz ;
- de 14 à 28 jours : la seconde injection de courant a duré **14 jours** au cours de laquelle il a fallu remplacer par deux fois les électrodes qui étaient corrodées ;
- de 28 à 71 jours : la dernière phase de **43 jours** fait suite à l'arrêt du courant, cette phase a été prolongée jusqu'à la fin de la production de gaz.

Une injection de courant électrique a été appliquée au réacteur pendant 18 jours, soit plus d'un quart de la durée totale de l'essai. Les injections consécutives de courant électrique au sein du réacteur avaient pour objectif majeur d'observer les conséquences sur la composition des mélanges de gaz produits.

La durée totale de l'essai est très supérieure à celle des expériences présentées dans le brevet de Roychowdhury puisqu'elle a duré 70 jours contre 8-10 jours pour les expériences du brevet.

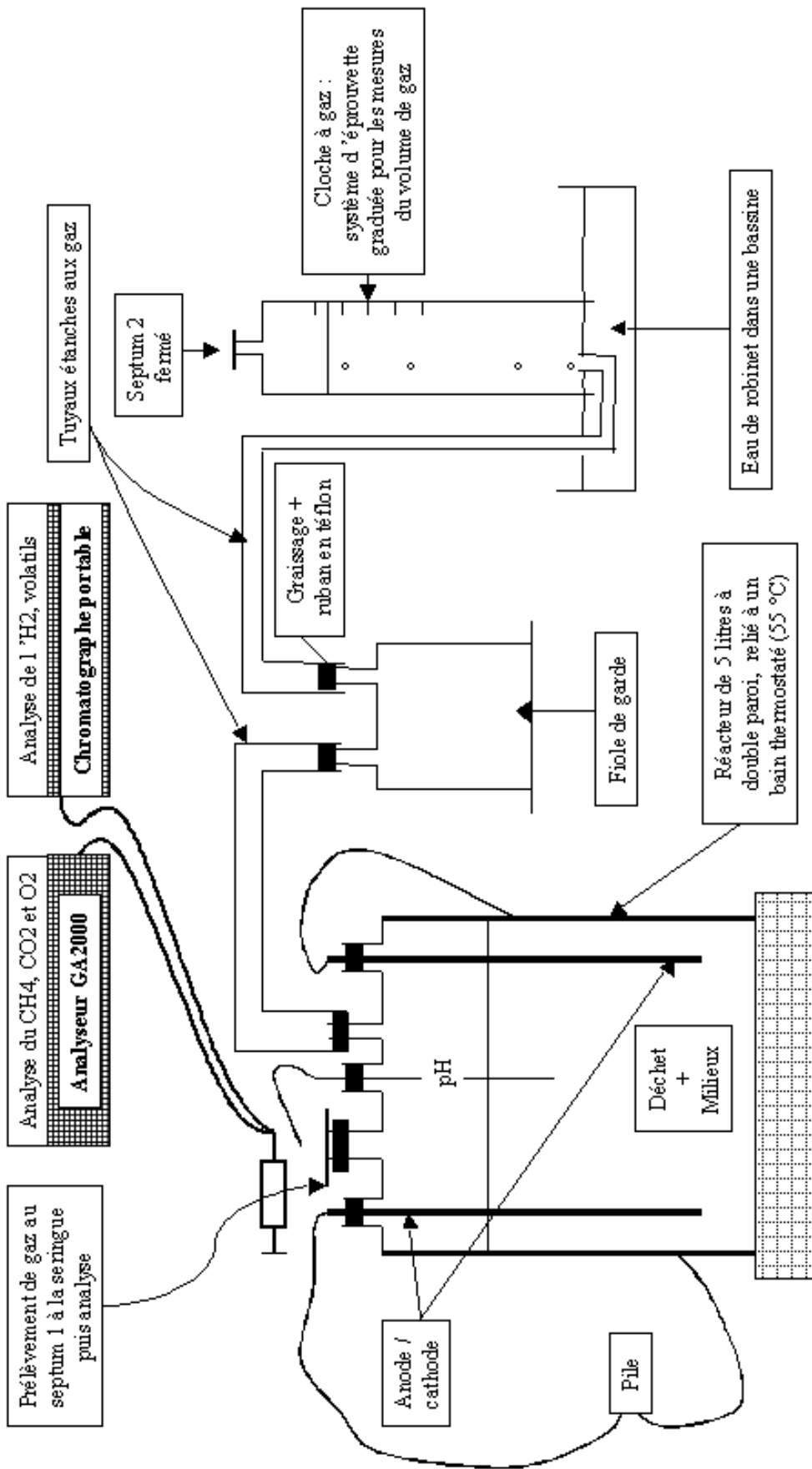


Fig. 15 - Schéma du système adopté pour l'expérience « Réacteur 5 litres ».

Deux électrodes en acier inoxydable²⁶ (inox 316) ont été ajoutées sur le réacteur au début de l'expérience de fermentation. Les premières électrodes utilisées avaient un diamètre de 4 mm pour une longueur de 40 cm, tandis que les dernières électrodes avaient un diamètre de 6 mm et une longueur de 50 cm. La partie supérieure des électrodes est reliée à une alimentation stabilisée et la partie inférieure est directement plongée dans le déchet sur une longueur de 15 cm. Les électrodes ont un espacement de 115 mm (axe/axe). L'alimentation est réglée pour fournir un courant de 3V.

5.5.3. Résultats

a) Production de gaz

Sur 71 jours d'expérience, environ 69 litres de gaz ont été produits. Le tableau 6 détaille les volumes de gaz produits sur chacune des périodes de l'essai. On remarque que 48 % du volume de gaz ont été produits au cours de la deuxième application du courant électrique alors que cette phase ne représente que 20 % de la durée totale de l'essai.

Périodes de l'essai	Durée (jours)	Volume de gaz produit (L)	% par rapport au volume total
Dégradation anaérobie dite « naturelle »	6	5,2	7 %
1 ^{ère} application du courant pour produire de l'hydrogène	4	4,1	6 %
Arrêt du courant : reprise de la dégradation anaérobie dite « naturelle »	4	8,9	13 %
2 ^{ème} application du courant pour produire de l'hydrogène	14	33,6	48 %
Arrêt du courant : reprise de la dégradation anaérobie dite « naturelle »	43	17,4	26 %
Total	71	69,2	100 %

Tabl. 6 - Volume de gaz produit sur les 5 périodes de l'essai.

La figure 16 expose le volume cumulé du gaz produit au cours de l'essai. Sur certaines périodes, la production de gaz a été telle que le volume produit a été supérieur au volume de la cloche de collecte du gaz (volume de 6 litres). Une estimation du gaz perdu a été effectuée afin de corriger la courbe.

²⁶ Acier inoxydable : Acier allié au chrome et au nickel ayant une grande résistance à la corrosion.



Pl. 4 - Système mis en œuvre permettant la maturation accélérée du déchet et la mesure du volume de gaz en continu.



Pl. 5 - Réacteur de 5 litres équipé de deux électrodes et d'une sonde pH, T°.

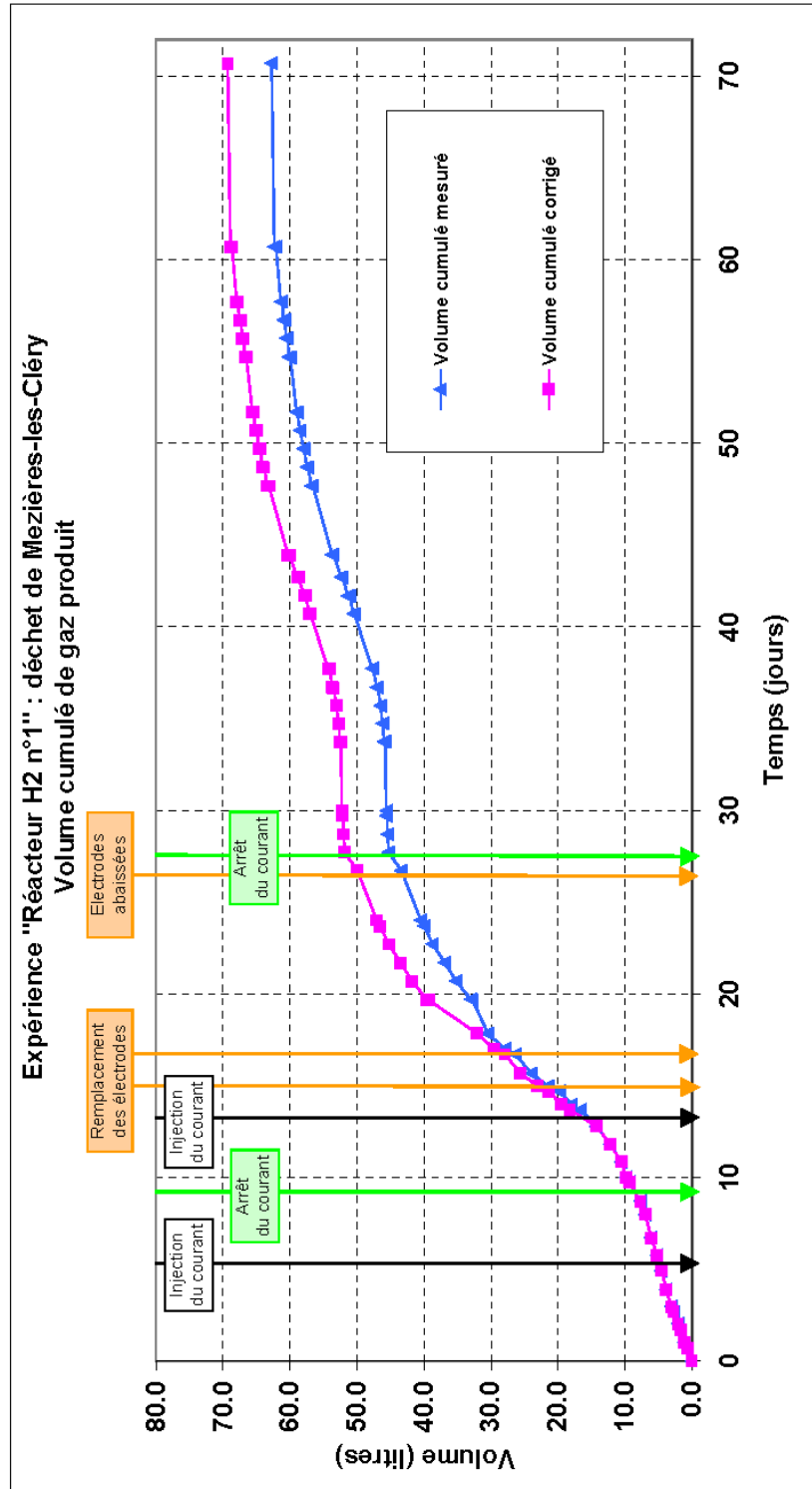


Fig. 16 - Volume cumulé du gaz produit au cours de l'essai

Le tableau 7 présente les débits moyens du gaz pour chacune des 5 périodes. Les plus forts débits de gaz sont observés pendant les 14 jours de la deuxième phase d'application du courant électrique.

Les débits sont faibles lors des deux premières phases (37 et 43 mL.h⁻¹), alors qu'ils sont importants pour les deux suivantes (94 et 99 mL.h⁻¹). Ces deux groupes comportent chacun une phase avec courant et une phase sans courant. Cette différence peut s'expliquer par une différence de maturation des déchets entre les deux périodes. Les déchets de la première période semblent ne pas avoir atteint la maturation.

Périodes de l'essai	Durée (jours)	Débit moyen (mL.h ⁻¹)
Dégradation anaérobie dite « naturelle »	6	37
1 ^{ère} application du courant pour produire de l'hydrogène	4	43
Arrêt du courant : reprise de la dégradation anaérobie dite « naturelle »	4	94
2 ^{ème} application du courant pour produire de l'hydrogène	14	99
Arrêt du courant : reprise de la dégradation anaérobie dite « naturelle »	43	16

Tabl. 7 - Les débits moyens de gaz au cours des 5 périodes de l'essai.

b) Composition du gaz produit

Différentes remarques peuvent être tirées de l'évolution de la composition du gaz produit au cours des 5 périodes de l'essai (fig. 17). L'axe de gauche (de 0 à 100 %) représente les teneurs en méthane, en gaz carbonique et en hydrogène, et l'axe de droite (de 0 à 10 %) représente l'oxygène.

- On peut noter qu'avant la première application du courant (de 0 à 6 jours), la méthanogénèse n'était pas atteinte car aucune teneur en CH₄ (courbe rose) n'était présente. Par ailleurs, une teneur en CO₂ (courbe bleue) était bien présente ce qui laisse supposer que le système était en phase acétogénèse ;
- dès la première application du courant, une production d'hydrogène (courbe verte) a été observée (teneur de l'ordre de 50 %) avec une disparition du CO₂. La teneur en oxygène (courbe rouge) a augmenté de 2-3 % à 4-5 %, alors que celle en méthane est restée nulle ;
- à l'arrêt du courant, l'hydrogène a disparu alors que du méthane et du gaz carbonique sont apparus. Leurs teneurs spécifiques étaient représentatives d'une dégradation de la matière organique par voie méthanogénèse (70 % de méthane et 30 % de gaz carbonique). Cette fois, la phase de méthanogénèse était atteinte et a duré les 3 jours de l'arrêt du courant ;

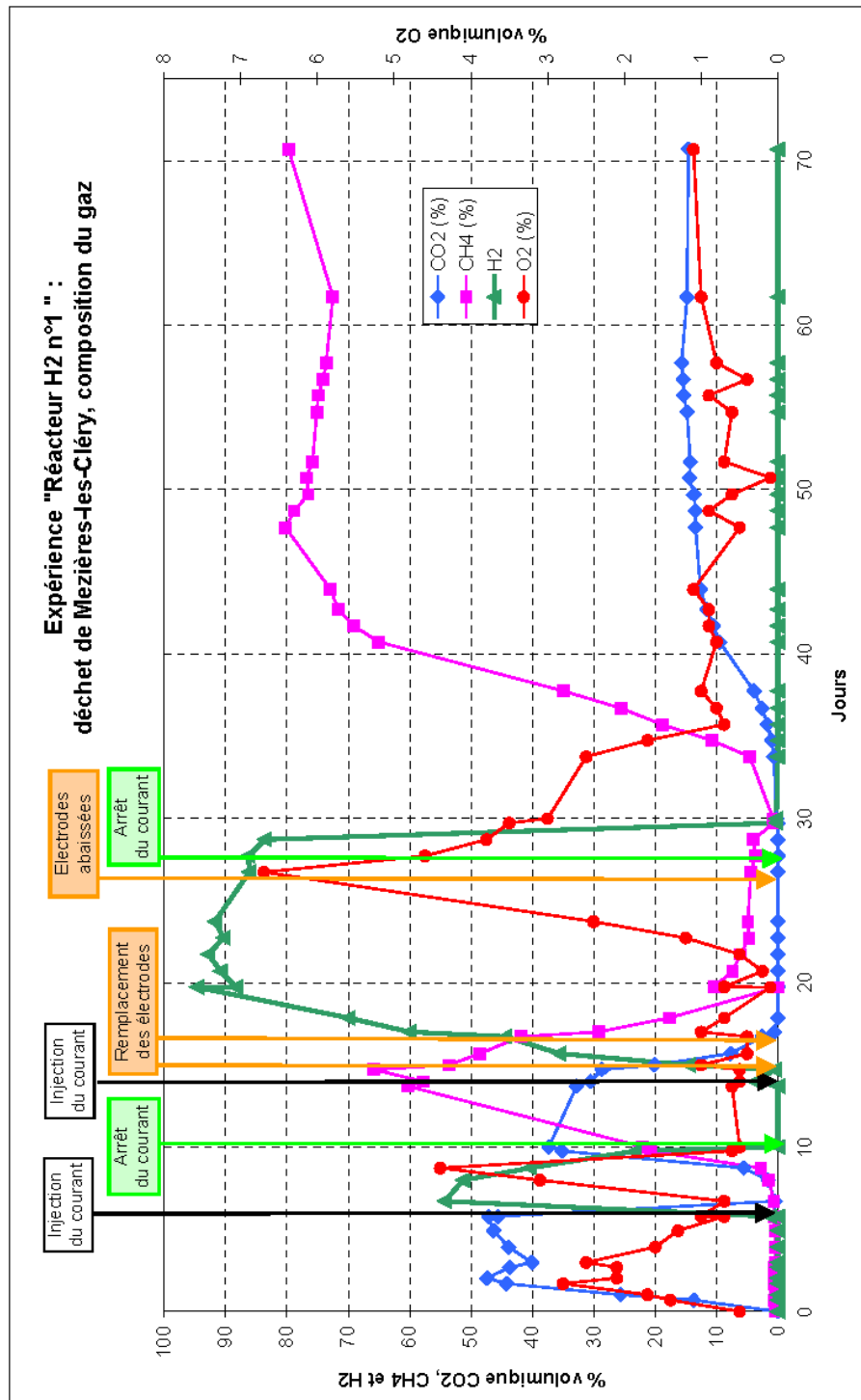
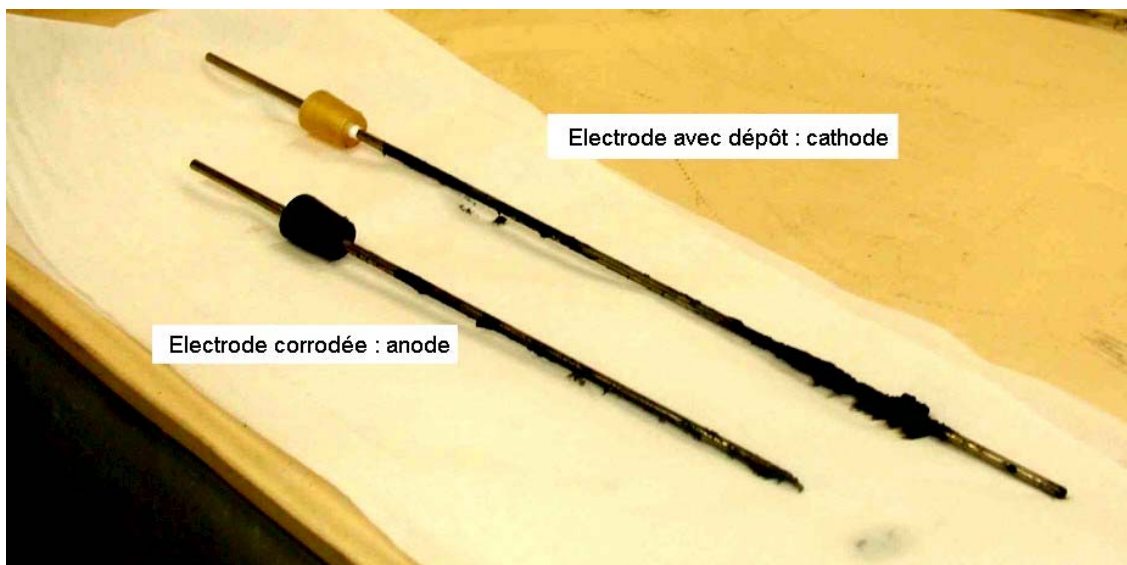


Fig. 17 - Composition du gaz au cours des 5 périodes de l'essai.

- dès la nouvelle application du courant (pendant 14 jours), de la même façon que précédemment, de l'hydrogène a été détecté mais cette fois avec des teneurs allant jusqu'à 90 %. Une disparition du CH₄ et du CO₂ a de nouveau été observée. Après 7 jours d'application du courant, la teneur en oxygène a considérablement augmenté de 1 % à 7 % le douzième jour ;
- au nouvel arrêt du courant, l'hydrogène a disparu et il a fallu beaucoup plus de temps que lors du premier arrêt pour ré-atteindre la phase méthanogénèse.

c) *Corrosion des électrodes*

Les électrodes ont été endommagées au cours de l'expérience. Elles ont été remplacées deux fois (cf. pl. 6). Lors du retrait des électrodes, une corrosion²⁷ de l'anode²⁸ a pu être observée, ainsi que la formation d'une pellicule de précipités sur la cathode²⁹. Le deuxième changement d'électrode s'est opéré seulement deux jours après la mise en place de cette nouvelle électrode. L'électrode était déjà fortement corrodée, et un dépôt important pouvait être observé sur la cathode.



Pl. 6 - Corrosion de l'anode et dépôt sur la cathode.

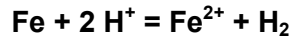
Le dépôt sur la cathode, analysé à la diffraction des rayons X (DRX), s'est avéré être une précipitation de carbonates mal cristallisés de type calcite magnésienne et aragonite (cf. ann. 2). On observe en effet les pics caractéristiques de la calcite (en rouge), ainsi que ceux de l'aragonite (en bleu). La calcite (plus commune), l'aragonite et la vatérite (très rare) sont les trois formes cristallines sous lesquelles se présente dans la nature le carbonate de calcium (CaCO₃).

²⁷ Corrosion : réaction chimique d'oxydation d'un métal intervenant à la surface du métal.

²⁸ Anode : électrode siège d'une réaction d'oxydation (perte d'électrons).

²⁹ Cathode : électrode siège d'une réaction de réduction (gain d'électrons).

La corrosion est une altération de l'anode due à une action électrolytique ou chimique. Dans les conditions du réacteur, il semble que la corrosion soit due à la réaction électrochimique entre le fer et l'hydrogène. La réaction est la suivante :



Comme l'indique la réaction, de l'hydrogène provenant de la corrosion des électrodes peut être produit. Un calcul théorique du volume d' H_2 produit a été réalisé en posant les hypothèses suivantes :

- cette réaction est la seule responsable de la corrosion de l'électrode ;
- 100 % du poids perdu par l'électrode est du fer ;
- l'hydrogène produit par cette réaction n'est pas consommé et se retrouve dans les gaz de sortie.

L'extrapolation du volume produit par la corrosion a été réalisée lors de chaque changement d'électrodes. À chacun des trois changements, les électrodes ont été pesées. La durée d'injection du courant pour chacune des 3 phases est respectivement de 5, 2 et 11 jours (cf. fig. 18). On note que pour les deux premiers renouvellements des électrodes, le volume théorique calculé est supérieur au volume mesuré, ce qui laisse supposer que les hypothèses sont à remettre en cause. Seule la dernière phase (entre le changement de la deuxième électrode et la fin de l'application du courant électrique) permet de confirmer que l'hydrogène produit n'est pas uniquement issu des phénomènes de corrosion. Toutefois, compte tenu des nombreuses incertitudes, il est difficile de tirer des conclusions définitives quant à la fiabilité des résultats.

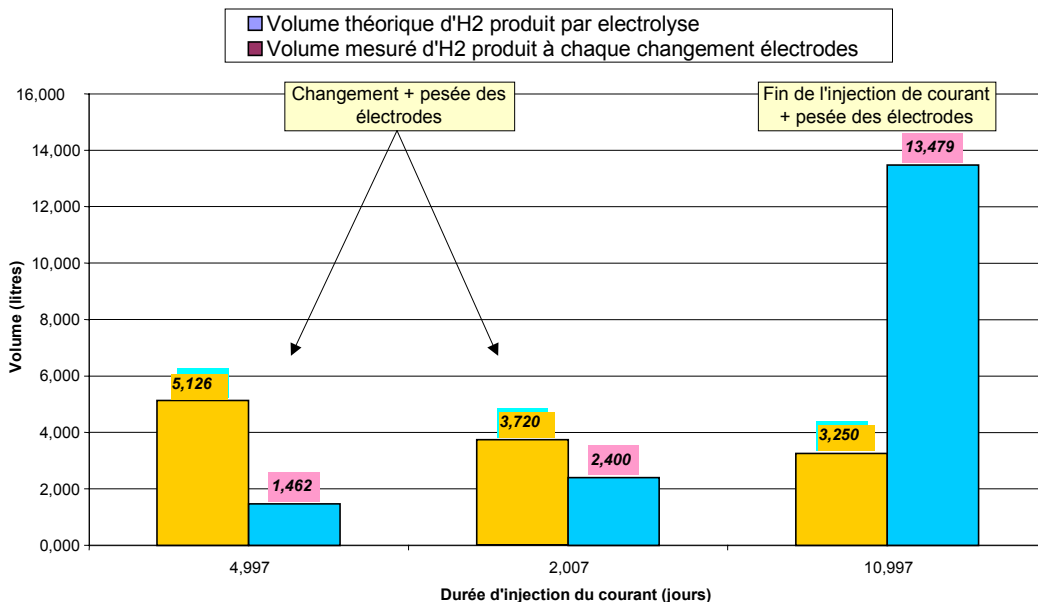


Fig. 18 - Comparaison du volume d'hydrogène mesuré par rapport au volume théoriquement produit par électrolyse à chaque pesée des électrodes.

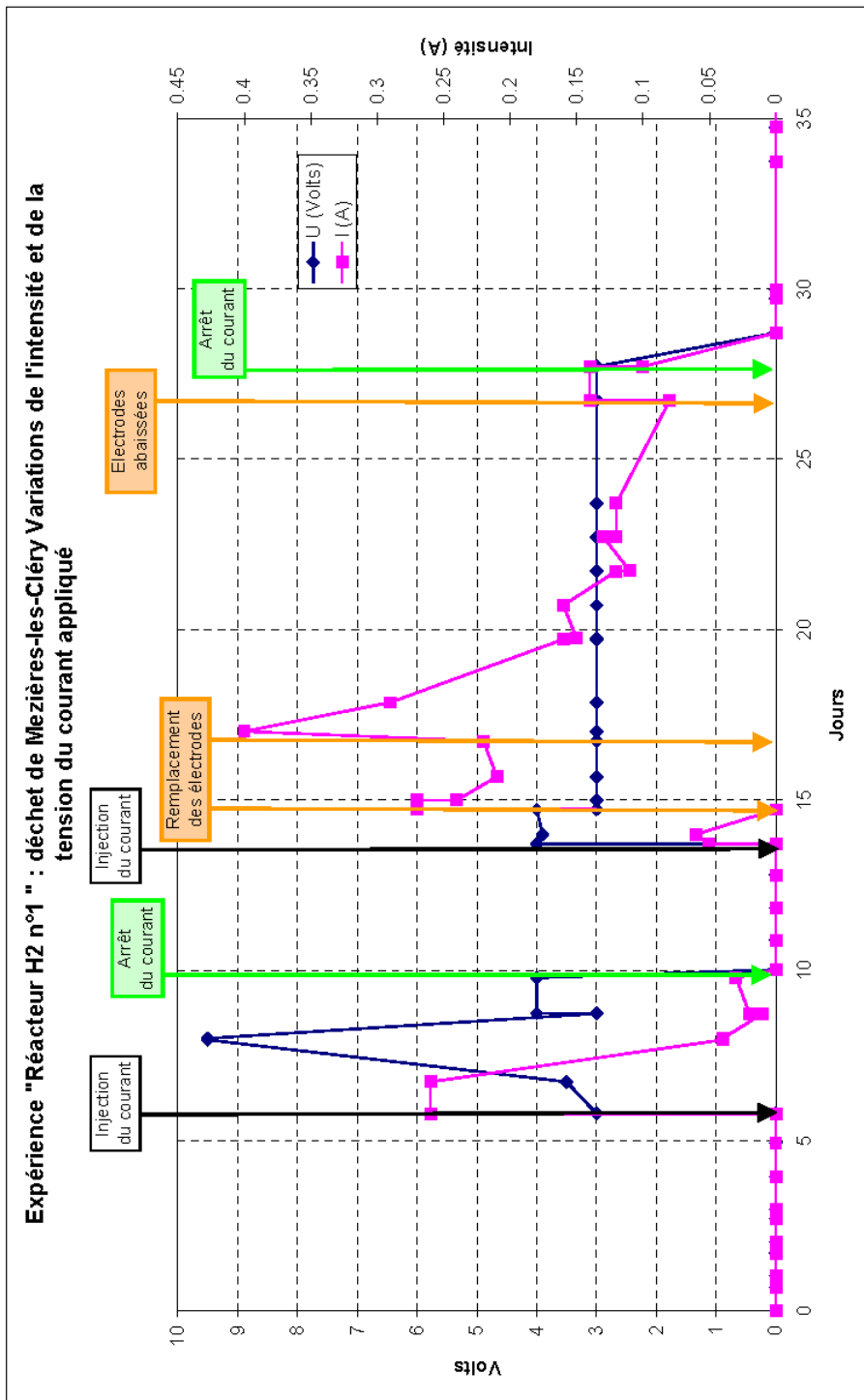


Fig. 19 - Variations de l'intensité et de la tension du courant électrique appliqué au cours de l'essai.

d) Intensité et voltage appliqués au réacteur

La figure 19 présente les variations d'intensité et de tension du courant électrique injecté dans le réacteur au cours des différentes périodes : l'axe pour la tension est à gauche et celui pour l'intensité à droite.

Pour respecter les conditions décrites dans le brevet déposé par Roychodhury il était prévu d'appliquer un courant électrique de 3 V. Dès la première injection de courant électrique, l'intensité diminue de façon considérable, de 0,26 à 0,01 A. Lors de la première phase d'application du courant, la tension a augmenté jusqu'à atteindre une valeur 9 V, actuellement cette augmentation n'a pas été expliquée.

La courbe d'intensité montre que celle-ci augmente rapidement lorsque les électrodes sont neuves ou lorsqu'elles sont abaissées dans la masse de déchets. Cette augmentation peut s'observer à 4 reprises (jours 6, 14, 15 et 27), avec une durée approximative de 1 jour. Après cette augmentation rapide, une diminution rapide de l'intensité jusqu'à 0 A est observée pour la première électrode et jusqu'à 0,12 A pour la dernière.

L'intensité est proportionnelle à la résistance du système (opposition au passage du courant électrique) : lorsque la résistance augmente, l'intensité diminue et inversement. L'augmentation rapide de l'intensité montre que lorsque les électrodes sont neuves, la résistance est faible. La chute de l'intensité qui suit, montre que la résistance du système augmente. La cause principale de l'augmentation de la résistance est la dégradation des électrodes. La précipitation d'éléments sur la cathode abaisse la conductivité de l'électrode, et la corrosion de l'anode diminue la surface d'échange avec le milieu. Ces deux changements augmentent la résistivité du milieu.

Ces observations montrent que la corrosion des électrodes est rapide et se réalise approximativement en 1 jour. La dernière électrode a une surface d'échange plus importante, ce qui explique que l'intensité soit montée jusqu'à 0,4 A.

e) Fluctuations du pH

L'application d'un courant entraîne une augmentation du pH (jusqu'à une valeur de 12).

Sur la figure 20, il est possible de voir que les courbes d'intensité et de pH sont fortement liées. Lorsque l'intensité augmente, le pH augmente après un petit temps de retard, et inversement. Il a été dit précédemment que les variations d'intensité étaient liées à la corrosion et à la formation de dépôts sur les électrodes. Il est possible de relier tous ces phénomènes de la façon suivante : lorsque l'intensité est élevée, la corrosion est importante, avec consommation des ions H^+ et augmentation du pH. Par contre, la diminution de l'intensité montre une diminution de la corrosion, une quantité moins importante d'ions H^+ est consommée, entraînant une diminution du pH. Il est possible qu'il y ait d'autres réactions consommatrices de H^+ , mais il y a de fortes chances pour qu'elles ne soient pas aussi importantes que celle de la corrosion. Cette hypothèse reste à démontrer.

Il est important de rappeler que la mesure de pH est une mesure de différence de potentiel (ddp) et que cette mesure peut être perturbée par la mise en route du courant dans le

réacteur, qui correspond aussi à une ddp. A l'heure actuelle, la perturbation du courant sur la mesure du pH n'est pas quantifiable. Malgré les perturbations du courant sur la mesure du pH, il est possible malgré tout de déterminer les conditions de pH du milieu de culture. Une valeur de pH comprise entre 10 et 12 va indiquer que le milieu est basique, au contraire, une valeur de pH de 5-6 va indiquer des conditions neutres du milieu.

Ces conditions de pH basiques sont peu favorables à une activité des bactéries acidogènes qui produisent normalement de l'acide acétique à partir des déchets organiques (optimum de pH proche de 5).

Dans le descriptif du brevet déposé par Roychodhury, il n'est pas fait mention de mesure de pH et les auteurs considèrent que les bactéries acidogènes produisent de l'acide acétique qui est par la suite hydrolysé pour produire de l'hydrogène et du CO₂. Il est possible d'envisager la présence de zones avec des gradients de pH dont une zone à pH acide favorable à l'activité des bactéries acidogènes. Les acides organiques produits biologiquement seraient ensuite hydrolysés sous l'effet du courant électrique. Ainsi, à l'anode les réactions d'oxydation vont générer une zone d'acidification autour de l'électrode. À la cathode, où se produisent les réactions de réduction créant une zone basique.

Lors des phases d'arrêt du courant, le pH a varié entre 6 et 8, cette gamme correspond aux conditions optimales de croissance des bactéries méthanogènes (pH autour de 7) (fig. 20). Cette observation concorde avec les courbes de production de méthane, qui montrent une production importante de méthane lors des phases d'arrêt du courant. Cette production est probablement liée à une activité importante des méthanogènes.

f) Disparition du gaz carbonique

Pendant les périodes d'application du courant, le gaz carbonique disparaît totalement, alors que dans le brevet déposé par Roychodhury, le gaz carbonique est toujours présent. Suite à cette observation, une analyse du CO gazeux au sein du réacteur a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG), et le CO n'a pas été détecté.

Lors d'une dégradation de déchets ménagers par voie méthanogénèse, la masse de déchet a tendance à devenir de plus en plus noire. Or, par deux fois au cours de l'essai, l'aspect du déchet a évolué différemment :

- Dans un premier temps, une gelée blanchâtre est apparue au sein de la masse de déchet (pl. 7). S'agissait-il d'une précipitation de carbonates qui aurait pu expliquer la remontée observée du pH et l'absence de CO₂ par précipitation de ceux-ci sous forme de carbonates ? Aucune analyse n'a pu être réalisée directement sur la gelée car elle adhérait à la surface du réacteur ;
- À la fin de la longue période de l'application du courant, est apparue une couleur rouille au sein du réacteur (pl. 7), couleur qui pourrait bien être en relation avec le fer libéré par les électrodes. Aucune analyse n'a été réalisée pour confirmer l'hypothèse émise.

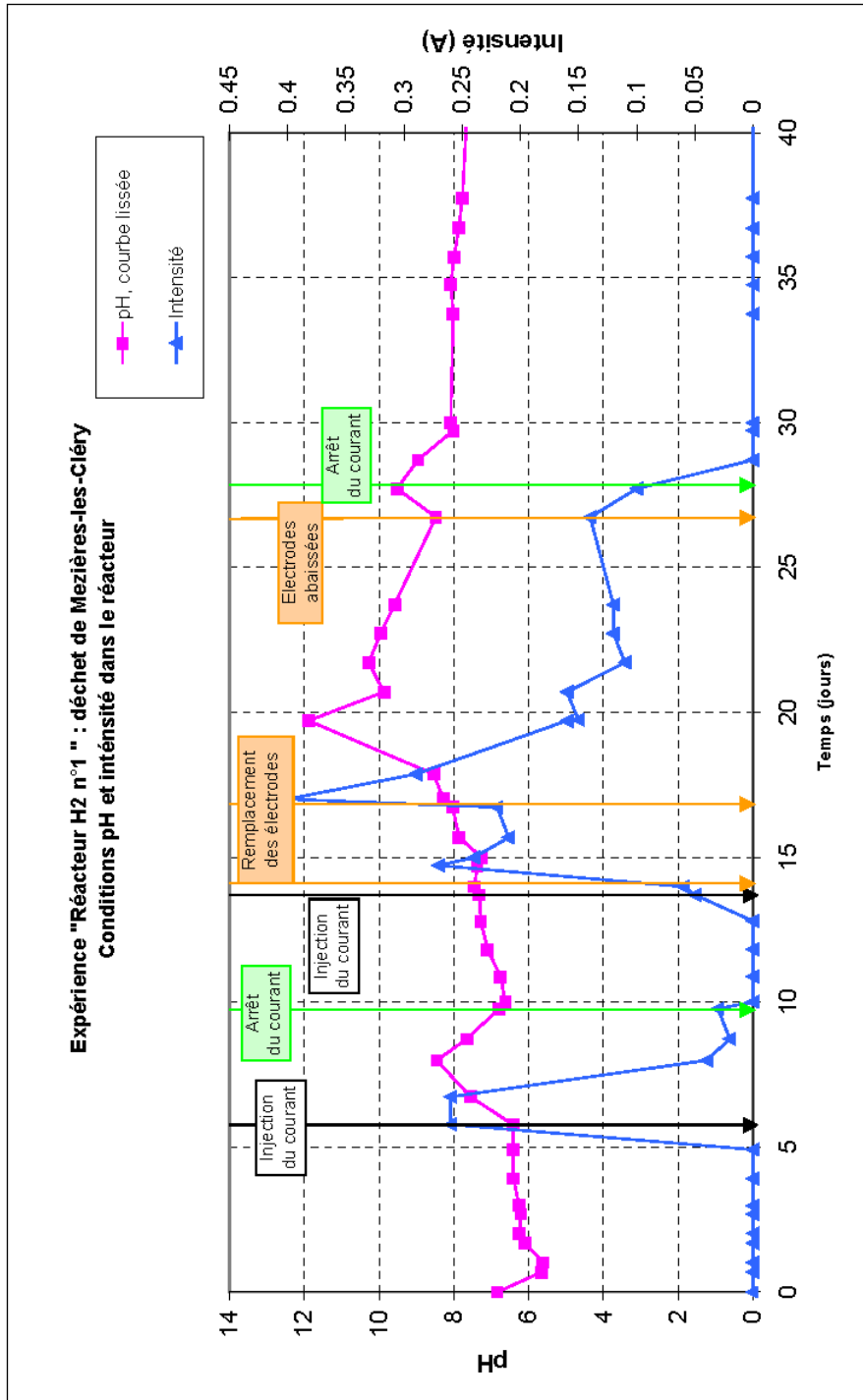
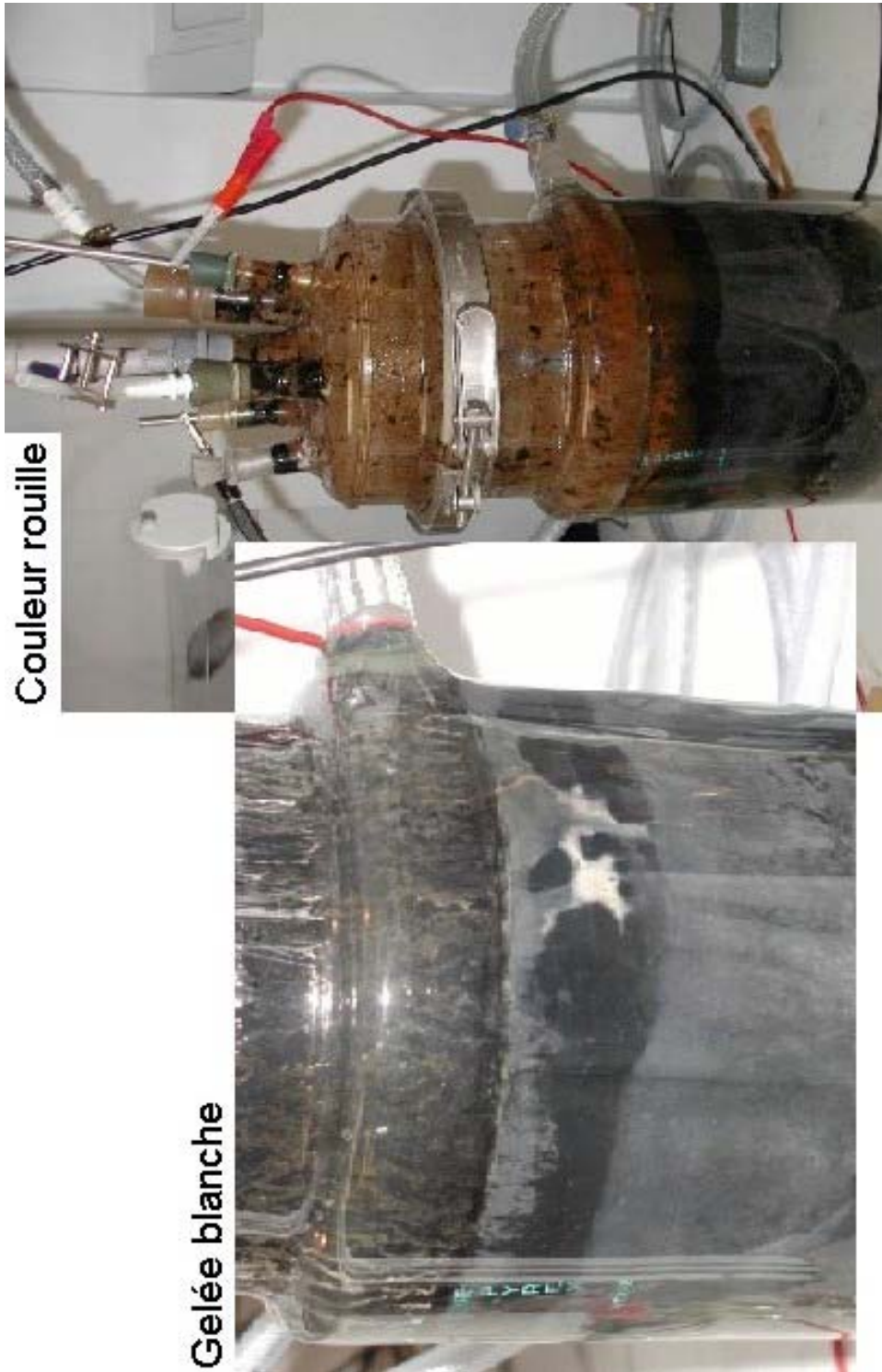


Fig. 20 - Variation de l'intensité et du pH au sein du réacteur.



Pl. 7 - La gelée blanche et la couleur rouille apparues au cours du test Bilan énergétique.

g) Bilan énergétique

Pour évaluer la pertinence économique de ce procédé, il est important de réaliser un bilan énergétique. Ce bilan permettra de savoir si l'opération crée un gain ou une perte énergétique. Le principe du bilan énergétique est de considérer l'énergie dépensée par rapport à l'énergie potentiellement produite.

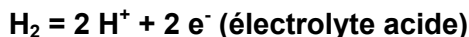
Pour réaliser ce bilan, plusieurs hypothèses ont dû être posées :

- le bilan énergétique ne prend pas en compte l'énergie consommée par le bain thermostaté et les instruments d'analyse (pH, température et analyse de gaz). Seule l'énergie électrique apportée par les électrodes est prise en compte ;
- la valorisation se fait au moyen d'une pile à combustible (PAC), dont le rendement réel du système est égal à 60 %.

L'expérience se divise en plusieurs phases d'essai. Le bilan énergétique a été fait sur les 12 derniers jours de la 4^{ème} phase, qui correspond à la seconde application du courant pour produire de l'hydrogène. Au cours de cette période, le système n'a pas subi de changement important (pas de changement d'électrode et pas d'arrêt du courant).

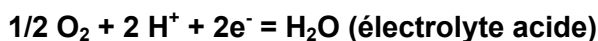
Les données nécessaires à l'élaboration du bilan sont la consommation d'électricité des électrodes et le volume d'H₂ produit.

Dans le cas d'une pile hydrogène-oxygène, on a une oxydation de l'hydrogène à l'anode selon la réaction suivante :

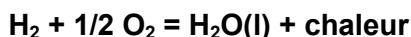


Il s'agit d'une réaction catalysée. L'atome d'hydrogène réagit en libérant deux électrons, qui circulent dans le circuit électrique qui relie l'anode à la cathode.

Il s'agit d'une réaction catalysée. L'atome d'hydrogène réagit en libérant deux électrons, qui circulent dans le circuit électrique qui relie l'anode à la cathode. À la cathode, on assiste à la réduction cathodique (également catalysée) de l'oxygène selon la réaction suivante :



Le bilan donne donc :



Enthalpie de formation³⁰ à 298,15K $\Delta H = - 285 \text{ kJ/mol}$

³⁰ Enthalpie de formation : Elle correspond à la chaleur dégagée ou absorbée lorsqu'une mole du composé (ici l'eau) est formée à partir des éléments (ici l'O₂ et l'H₂) dans des conditions normales de température et de pression.

- **Énergie consommée**

Énergie électrique consommée :

$$E = t * P \text{ avec } P = U * I$$

Avec : E : énergie électrique (Watt heure)
t : temps (heure)
P : puissance (Watt)
U : tension (Volt)
I : intensité (Ampère)

Au cours de ces 12 jours la tension est restée égale à 3 V et l'intensité a varié de 0,10 à 0,29 A. La consommation électrique est calculée quotidiennement, la somme sur les 12 jours est de **90 Wh**.

- **Énergie potentiellement produite**

Le travail non mécanique maximum par unité de matière que l'on peut obtenir dans un système à température et pression constantes, est égale à l'enthalpie libre de la réaction (ΔG). Ce travail optimal est possible lorsque tous les phénomènes qui se passent en sein de la réaction sont réversibles. Dans la réalité, des phénomènes d'irréversibilité perturbent le système et abaissent la valeur du travail. L'enthalpie libre de la dissociation de l'eau à 25 °C est $\Delta G = - 237 \text{ kJ/mol}$.

De manière arbitraire, nous considérerons que la production électrique réelle représente 60 % de la production théorique.

$$\eta = \text{Production d'électricité réelle} / \text{production théorique} = 60 \%$$

Lors de ces 12 jours **23 litres** d' H_2 ont été produits, ce qui correspond à 0,94 mole (en considérant la loi des gaz parfaits $PV = nRT$ avec $T = 298,15\text{K}$ et $P = 1\text{bar}$).

Énergie théorique récupérable : $237 * 0,94 = 222 \text{ kJ}$

Production électrique potentielle : $222 \text{ kJ} = 61 \text{ Wh}$; $61 * 60 \% = \mathbf{36 \text{ Wh}}$

Consommation électrique	90 Wh
Production électrique potentielle	36 Wh
Ratio	2,5

Le bilan énergétique montre qu'on consomme 2,5 fois plus d'électricité qu'il serait possible de produire dans la configuration décrite précédemment.

5.5.4. Discussion

La comparaison des résultats des expériences décrites dans le brevet et ceux de l'essai réalisé au sein du BRGM, amène plusieurs différences comme :

- au cours de l'essai BRGM, aucune production de gaz carbonique n'a été mise en évidence durant la phase d'application du courant ;
- le suivi du pH montre une élévation de ce dernier en présence de courant électrique (celui-ci n'a pas été mesuré dans les essais de Roychowdhury) ;
- contrairement au brevet qui stipulait que n'importe quel matériau métallique pouvait être utilisé comme électrode, il a été mis en évidence une corrosion des électrodes en inox ;
- des fluctuations de la teneur en oxygène ont été mises en évidence ;
- au sein du déchet, une modification de l'aspect du déchet a été décelée (« gelée blanche »).

Une hypothèse, présentée ci-après, a été émise devant chacun de ces constats.

- la précipitation de carbonates mis en évidence suite à l'analyse DRX réalisée sur les dépôts recueillis sur l'anode pourrait être en relation avec la disparition du CO₂ et l'augmentation du pH observées lors des phases d'application du courant. Ces valeurs élevées en pH (de l'ordre de 10) expliqueraient la présence d'une phase de latence avant la mise en évidence de la méthanogénèse. En effet, dès que le pH a été proche de la neutralité, du méthane a été produit ;
- les variations de l'intensité du courant seraient fonction de la corrosion des électrodes car dès leur remplacement, le courant a pu de nouveau être appliqué correctement. Toutefois, on pourrait se demander dans quelle mesure leur corrosion a influencé la production d'hydrogène. Le volume théorique d'hydrogène produit par la corrosion des électrodes a été comparé à celui mesuré après chacune des 3 pesées des électrodes, et seule la dernière phase permet de confirmer la production d'hydrogène par des phénomènes autres que la corrosion. Par ailleurs, pour les deux premières phases, au cours desquelles le volume d'hydrogène mesuré est inférieur au volume théorique produit par corrosion, on pourrait supposer que le milieu est consommateur d'hydrogène ou que d'autres réactions sont impliquées dans la corrosion de l'anode ;
- au cours de l'essai, le maintien des conditions anaérobies s'est révélé difficile, particulièrement pendant les périodes d'application du courant électrique. Une des hypothèses émises sur ces variations importantes de la teneur en oxygène pourrait être qu'il existe une réaction parasite productrice d'oxygène. Cette réaction pourrait être celle de la dissociation de l'eau $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$. Les données recueillies ne sont pas suffisantes pour savoir si cette réaction est possible dans les conditions du réacteur. La teneur en oxygène semble être liée à la disposition des électrodes. Cette relation peut s'observer au 27^{ème} jour : à l'abaissement des électrodes, la teneur en oxygène est progressivement redescendue de 7 % à 4 % le jour de l'arrêt du courant (deux jours plus tard) pour revenir à 1 % jusqu'à la fin de l'essai ;

- de même, la présence d'oxygène inhibe la méthanogénèse, et favoriserait ainsi l'acidogénèse ;
- en ce qui concerne le changement de couleur du déchet au cours de l'expérience, aucune hypothèse ou explication ne peut être formulée du fait qu'aucune analyse n'a été réalisée. On pourrait toutefois supposer que la couleur blanche pourrait être en relation avec la précipitation de carbonates, et la couleur rouille avec la précipitation de fer.

L'analyse de l'expérience met en avant les points faibles du matériel utilisé. Le point le plus critique est la détermination du volume de gaz produit. Le procédé actuel mesure le volume de gaz emmagasiné dans une cloche à gaz durant un temps donné. La taille de la cloche n'est pas adaptée : en effet à deux reprises (au cours de week-ends) le volume de gaz produit a été supérieur au volume de la cloche utilisée, et a dû être ensuite estimé par calcul.

À plusieurs reprises, le problème de corrosion de l'anode a été abordé. Cette corrosion est due à un échange entre le milieu et le fer présent dans les électrodes. Pour les prochaines expériences il est nécessaire de choisir une électrode non corrodable.

Enfin, il est important de pouvoir déterminer quelles sont les réactions productrices d'hydrogène et leurs parts respectives. Le changement de nature des électrodes pourrait éliminer le problème lié à la production d'hydrogène dû à la corrosion de l'anode. Il reste à déterminer le volume d'hydrogène produit par la dissociation de l'eau. Cette réaction a lieu dans un domaine pH/Eh (potentiel d'oxido-réduction ou potentiel redox) connu. Afin d'identifier le domaine de fonctionnement pH/Eh du réacteur, les prochaines expériences devront être équipées d'électrodes de mesure du potentiel d'oxydo réduction.

Le gaz produit sort de l'enceinte du réacteur à une température d'environ 55 °C. À cette température, le gaz doit avoir une certaine humidité et entraîner de l'eau dans le reste du circuit gaz. Afin d'éviter l'entraînement de l'eau hors du réacteur, les prochaines expériences devront être pourvues de condenseurs.

5.5.5. Conclusion

L'objectif de l'essai expérimental était de reproduire les résultats décrits dans le brevet de Roychodhury. Les résultats obtenus mettent en évidence une production d'hydrogène allant jusqu'à des pourcentages de 90 % des gaz produits.

L'hydrogène produit peut être généré via plusieurs réactions : l'électrolyse de l'eau, la corrosion de l'anode et enfin l'inhibition de la méthanogénèse via la dissociation des acides organiques. La dissociation de la molécule d'eau entraîne la formation d'hydrogène et d'oxygène. Lors des différentes phases de l'expérience, l'oxygène n'a été détecté qu'en très faible quantité (< 7 %), l'augmentation de la production d'oxygène intervient lorsque l'intensité diminue. Cette faible quantité d'oxygène dans le milieu de culture suggérerait que l'électrolyse de l'eau n'est pas une source importante de production d'hydrogène. La corrosion de la cathode entraîne la production d'hydrogène mais les calculs mettent en évidence que la production d'hydrogène ne

peut être totalement due à cette corrosion. Ces observations permettraient de supposer que l'application d'un courant électrique dans un déchet ménager en cours de maturation générerait de l'hydrogène en quantité significative via l'hydrolyse des acides organiques en inhibant la méthanogénèse. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour déterminer la part de ces réactions dans la production d'hydrogène et s'assurer qu'il n'existe pas d'autres réactions majeures intervenant dans la production d'H₂.

Le bilan énergétique effectué à partir des données expérimentales est négatif. En effet, le bilan énergétique montre qu'on consomme 2,5 fois plus d'électricité qu'il serait possible de produire dans la configuration décrite précédemment. Il faut cependant mitiger ce constat car l'expérience menée est une expérience exploratoire qui ne cherchait pas à être optimale. Les recherches futures sur cette technique doivent prendre en compte ce premier résultat et chercher à optimiser le procédé pour que le bilan devienne positif.

5.6. LES TRAVAUX 2004

Suite à l'essai réalisé en 2003, il est apparu nécessaire de répondre aux interrogations levées en effectuant de nouveaux essais, et d'améliorer le système « bioréacteur » mis en œuvre.

5.6.1. Lancement de nouveaux essais

a) Est-ce que le courant électrique accélère la dégradation du déchet ?

La technique actuellement employée pour la dégradation des ordures ménagères en bioréacteur est le MBP « *Mechanical Biological Pretreatment of Waste* » qui consiste à trier et broyer le déchet avant son entrée dans le réacteur. Dans cette optique, il serait intéressant de regarder les processus de dégradation du déchet par application du courant électrique. Est-il plus rapide de dégrader du déchet par application du courant, et est-ce que la dégradation est complète ?

Au cours de l'essai 2003, il n'a pas été possible de connaître l'influence de l'application d'un courant électrique sur la vitesse de dégradation de la matière organique. Pour répondre en partie à cette interrogation, il est prévu de lancer deux nouveaux essais en parallèle : un réacteur par dégradation dite « naturelle », et un réacteur sur lequel un courant électrique serait appliqué sur toute la durée de l'expérience.

L'expérience serait réalisée dans les mêmes conditions expérimentales (même substrat, mêmes conditions physico-chimiques,...), et permettrait de comparer les volumes de gaz produits sur la durée totale du test.

b) Est-ce qu'il existe une différence de production d'hydrogène entre un milieu saturé et un non saturé ?

L'essai réalisé lors de cette présente étude a été effectué sur un déchet en milieu saturé. Afin de connaître l'influence de ce milieu synthétique (ajout de nutriments dans la solution liquide), il est prévu de mettre en place une expérience en milieu non saturé. Lors des phases de prélèvement, d'échantillonnage et de broyage du déchet, celui-ci perd de l'humidité, il est donc nécessaire d'avoir un ajout minimum de liquide au début de l'expérience en non saturé.

c) Comment favoriser la production d'hydrogène ?

On pourra également envisager d'étudier les différents facteurs qui pourraient favoriser la production d'hydrogène, tels que la variation du courant électrique et la nature du substrat, sachant que l'on a utilisé un déchet plutôt de type DIB³¹ que du déchet ménager. Dans ce sens, il est prévu de lancer de nouveaux essais en faisant varier la puissance électrique et la répartition des électrodes (de 2 à 4), ainsi que la teneur en eau du substrat. Ces essais seront effectués par le biais d'un même réacteur mais en lançant les tests successivement sans attendre la dégradation complète du déchet.

d) Est-il possible de se passer de courant électrique ?

Considérant le bilan énergétique de l'expérience, on pourrait se demander s'il est possible de se passer de courant électrique pour inhiber la méthanogénèse et optimiser l'acidogénèse. Dans ce sens, de nouvelles recherches et essais en laboratoire seront réalisés, tels que :

- l'influence de l'ajout d'éléments métalliques au déchet sur l'inhibition de la méthanogénèse : un réacteur sera lancé avec ajout de fer et un autre avec ajout d'aluminium ;
- l'influence de la concentration en oxygène sur les réactions de dégradation au sein d'un seul réacteur.
- l'influence d'un inhibiteur chimique des méthanogènes sur les réactions de dégradation au sein d'un seul réacteur.

³¹ Déchet Industriel Banal.

e) Synthèse des essais envisagés pour 2004

Phénomène étudié	Essais
Durée de la dégradation du déchet	Application du courant en milieu saturé
	Application du courant en milieu non saturé
	Dégradation naturelle en milieu saturé
Promotion de la production d'hydrogène	Variation de la puissance électrique et des conditions du milieu (teneur en eau,...)
Alternatives à l'application d'un courant électrique	Mélange du déchet avec Fe
	Mélange du déchet avec Al
	Variation de la teneur en oxygène
	Mélange avec un inhibiteur chimique des méthanogènes

Tabl. 8 - Synthèse des essais envisagés pour 2004.

5.6.2. Améliorations du système de l'essai et acquisition de matériel

Considérant les essais « bioréacteurs » envisagés pour l'année 2004, une amélioration du système est à prévoir en envisageant d'utiliser d'autres électrodes, d'avoir un condenseur à la sortie des gaz et de mettre en place la mesure de paramètres complémentaires, tels que le potentiel redox et la température en sortie de gaz pour préciser le bilan énergétique. Dans ce sens, l'acquisition de nouveaux équipements est à prendre en compte, tels que l'achat de 5 nouveaux réacteurs de 5 litres à double enveloppe entièrement équipés comprenant :

- une sonde pH-Eh ;
- un bain thermostaté ;
- deux ou 4 électrodes : des recherches bibliographiques sur la thématique « électrochimie » permettront de préciser le choix des nouvelles électrodes ;
- le couvercle de chaque réacteur devra être composé d'au moins 8 septa : 4 septa pour les électrodes, 2 septa pour l'entrée/sortie du gaz, un autre pour la sonde pH et température et un autre pour la mesure du potentiel redox.

Il faut également se procurer pour chacun des 5 systèmes :

- une fiole de garde permettant de prévenir les retours de liquides ;
- une cloche à gaz (éprouvette retournée dans une bassine remplie d'eau) en fin de système pour la mesure en continu du volume de gaz produit ;
- un système pour l'application du courant électrique ;

- deux débitmètres multiples gaz reliés à un appareil d'acquisition de données pour équiper les deux réacteurs mis en route en parallèle (production d'H₂ et production de méthane en milieu saturé), dans ce cas la cloche à gaz n'est pas nécessaire, les débitmètres devront être reliés à un équipement d'acquisition de données ;
- d'un condenseur sur chacun des réacteurs pour éviter la perte d'humidité par évaporation.

Les analyses de gaz pourront être réalisées de la même façon, via les deux appareils de mesure : le GA2000 pour l'analyse du méthane et du gaz carbonique et un chromatographe en phase gazeuse pour l'analyse de l'hydrogène produit.

5.6.3. Perspectives

La suite logique de l'étape de production de l'hydrogène est la valorisation du gaz produit. L'état d'avancement de cette étude en est au stade expérimental, les essais réalisés sont trop en aval de ces préoccupations de valorisation. Cependant, il s'agit d'une étape importante qu'il faudra explorer dans le futur.

En référence au rapport MATUTA-H2, on pourrait supposer que compte tenu de l'existence de nombreux polluants en trace dans les gaz de décharges, le traitement qui s'avèrerait incontournable serait l'épuration des composés sulfurés et halogénés. La valorisation choisie conditionnera les propriétés de l'hydrogène en fonction des spécifications requises de l'équipement de son usage futur. Les techniques d'épuration à envisager pourraient être celles connues dans l'industrie : absorption des composants hydrogénés sur un lit fixe (charbon actif)...

6. Applications environnementales de l'hydrogène : réduction biologique du Cr(VI)

6.1. INTRODUCTION

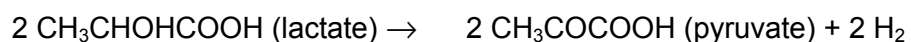
L'unité Biotechnologie du BRGM a pu acquérir une bonne expérience sur la croissance des bactéries sulfato-réductrices (BSR) utilisant de l'hydrogène, et la connaissance des procédures à respecter pour réaliser des expériences, jusqu'à l'échelle pilote, en présence de ce gaz. L'hydrogène est un substrat propre et très efficace pour diverses bactéries pouvant participer à la décontamination de milieux pollués (eaux, sols...) par des métaux lourds (comme le Cr(VI)).

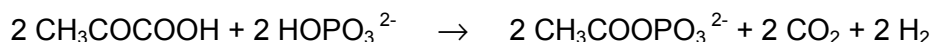
Cette décontamination se fait par précipitation des métaux sous formes réduites. Les BSR réduisent les métaux en présence d'hydrogène et de l'Hydrogénase (réduction enzymatique), ou par le sulfure d'hydrogène (H₂S) (réduction chimique), obtenu à partir du sulfate SO₄²⁻.

Le but de cette étude était d'évaluer la production d'hydrogène (gaz) à partir d'un produit commercialisé sous le nom de HRC® (Hydrogen Release Compound), et l'efficacité de ce produit pour la réduction du Cr(VI). Il s'agit d'un produit à base d'ester de polylactate et de glycérol, commercialisé par la société *Regenesys Bioremediation Products*. Le HRC® est principalement utilisé pour la bioremédiation des sites pollués par des substances organo-chlorées (Koenigsberg, 1999). Injecté dans le sol ou le sous-sol, le HRC® va libérer lentement des molécules de lactate. L'acide lactique et les acides organiques issus de sa dégradation peuvent être fermentés par la microflore endogène. De l'hydrogène est produit au cours de ces réactions de fermentation. Le HRC® se présente sous la forme d'un sirop très épais.

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont des microorganismes anaérobies hétérotrophes, largement répandus dans la nature puisqu'on les retrouve dans les environnements aquatiques, les sédiments marins, les eaux et le sol. Elles sont capables de réduire le sulfate SO₄²⁻ qui est utilisé comme accepteur terminal d'électrons, en sulfure S²⁻. Le S²⁻ ainsi produit réagit avec les métaux en solution pour donner des sulfures métalliques MS (M²⁺ + S²⁻ ⇒ MS). Ainsi, les BSR jouent un rôle dans la dépollution de l'environnement en réduisant les métaux toxiques. Les BSR doivent utiliser des substances comme donneurs d'électrons, telles que le lactate, l'acétate ou l'hydrogène. La génération de l'énergie s'effectue par une chaîne de transport d'électrons faisant intervenir des enzymes. Toutes les BSR possèdent des hydrogénases, et sont capables de consommer et/ou de produire de l'hydrogène.

Les bactéries sulfato-réductrices sont capables de produire de l'hydrogène par fermentation du pyruvate en absence de sulfate, selon les réactions suivantes :

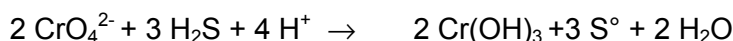




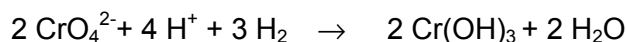
Cultivées sur lactate, et même en présence de sulfate, les bactéries sulfato-réductrices peuvent produire de l'hydrogène (Hatchikian et *al.*, 1977). Cette production d'hydrogène serait liée à une déficience en fer. Le fer présent dans le milieu est précipité avec le sulfure d'hydrogène provenant de la sulfato-réduction. Cet élément est indispensable pour la production des cytochromes impliqués dans la respiration du sulfate. La respiration serait donc « bridée » par une quantité insuffisante de cytochrome, et les électrons excédentaires seraient utilisés pour la production d'H₂.

Le Cr(VI) est un élément très toxique, mutagène, polluant des sols et des eaux souterraines. Cette pollution est très fréquente à proximité des industries de traitement de surface. Il existe deux mécanismes de réduction du Cr(VI) par les bactéries :

- un mécanisme indirect via le sulfure d'hydrogène (H₂S) :



- un mécanisme direct qui fait intervenir des protéines d'oxydo-réduction (mécanisme enzymatique) :



6.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

6.2.1. Préparation des inocula

Les souches choisies pour cette étude sont :

- la bactérie sulfato-réductrice ***Desulfomicrobium norvegicum*** (NCIB 8310) (Sharak Genthner et *al.*, 1997), souche pure étudiée et sélectionnée en laboratoire pour sa capacité à réduire le chromate (Michel et *al.*, 2001) ;
- la **population Métalbioréduction**, population mixte contenant *Desulfomicrobium norvegicum*, issue du bioréacteur de traitement d'effluent pollué par du Cr(VI), et donc adaptée pour la bioremédiation du Cr(VI) (Battaglia et *al.*, 2002).

Desulfomicrobium norvegicum et la population Métalbio ont été cultivés à 37 °C sous agitation sur les milieux de Starkey et MIU respectivement (après ensemencement à 10 % v/v) :

- **milieu de Starkey** (pH 7,2) : NH₄Cl (2 g), MgSO₄ (2 g), Na₂SO₄ (4 g), K₂HPO₄ (0,5 g), Extrait de levure (1 g), Lactate de sodium (2 g = 3,3 ml de solution à 60 %), Oligo-éléments (1ml), Na₂S (0,2 g), Eau déminéralisée (qsp1 litre).
- **milieu industriel Urée** (pH 7) : Urée (0,21 g), MgCl₂ (0,4 g), Na₂SO₄ (4 g), DAP (0,23 g), KOH (0,25 g), Lactate de sodium (3,3 ml) ou HRC® (4,4 g), Oligo-éléments (1 ml), Na₂S (0,2 g), Eau déminéralisée (qsp1 litre).

Remarques : afin d'éviter la dépolymérisation du HRC® en lactate lors de la stérilisation, le HRC® est filtré et ajouté au milieu de culture préalablement stérilisé. L'ajout de chromate est réalisé après dosage des sulfures dissous de manière à ajuster la quantité de Cr(VI) en tenant compte de la part de Cr(VI) qui sera réduit et précipité par le sulfure apporté par l'inoculum.

6.2.2. Conditions expérimentales

Afin d'étudier la réduction du chromate et la production d'hydrogène à partir de HRC® et de lactate, les expériences décrites dans le tableau suivant (tabl. 9) ont été réalisées.

	HRC®	Lactate	Cr(VI)	Inocula	Réplicats
Blanc 1	+	-	+	-	1
Blanc 2	+	-	-	-	1
Blanc 3	-	+	+	-	1
Blanc 4	-	+	-	-	1
HRC® + Cr(VI)	+	-	+	<i>D. norvegicum</i>	3
HRC® + Cr(VI)	+	-	+	Métalbio	3
HRC®	+	-	-	<i>D. norvegicum</i>	3
HRC®	+	-	-	Métalbio	3
Lactate + Cr(VI)	-	+	+	<i>D. norvegicum</i>	3
Lactate + Cr(VI)	-	+	+	Métalbio	3
Lactate	-	+	-	<i>D. norvegicum</i>	3
Lactate	-	+	-	Métalbio	3

Tabl. 9 - Conditions expérimentales. Au total, 28 fioles ont été préparées.

Les paramètres suivis au cours du temps étaient :

- l'acétate, analysé avec des Kits Diffchamb 1 002 891 (dosage enzymatique colorimétrique) ;
- le lactate, analysé avec des Kit Diffchamb 1 002 811 (dosage enzymatique colorimétrique) ;
- le Cr(VI) (Kit Merck spectroquant® 1.14758.0001 ; dosage colorimétrique) ;
- le sulfate SO_4^{2-} (Kit Merck spectroquant® 1.14548.0001 ; dosage colorimétrique).

Lorsque la méthode de dosage du lactate a été utilisée pour analyser des échantillons issus des fioles contenant de l'HRC®, il n'a pas été possible de déterminer si seul le lactate libre était détecté ou si les enzymes utilisées pour le dosage étaient capables de réagir avec le glycérol-ester de lactate. L' H_2 dans la phase gaz (par CPG, dosages réalisés par le service ANA) a été recherché ponctuellement après prélèvement dans

des ampoules de 250 ml. La croissance bactérienne a été évaluée par deux comptages en cellule de Thoma (microscopie optique, grossissement x 400). Les essais ont duré 3 mois.

6.3. RÉSULTATS

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier (i) la capacité de *D. norvegicum* et de la population Métalbio à utiliser le HRC® comme source d'énergie, (ii) la réduction du Cr(VI) en fonction de la souche et en fonction du donneur d'électrons (HRC® ou lactate), et (iii) la production d'hydrogène par ces bactéries, notamment en présence d'HRC®.

6.3.1. Consommation de lactate et production d'acétate

a) En absence de Cr(VI)

Pour la croissance sur HRC®, les résultats obtenus pour *D. norvegicum* sont semblables à ceux obtenus pour cette même souche avec le lactate (fig. 21 et fig. 22) ; *D. norvegicum* est donc capable d'utiliser le HRC® pour sa croissance et pour la réduction du sulfate (fig. 23 et fig. 24). Par contre, ces résultats diffèrent dans le cas de la population Métalbio ; en effet, aucune consommation de lactate ni de sulfate n'est observée en présence de HRC® (fig. 24). On observe cependant une augmentation de la concentration en acétate (fig. 25 et fig. 26). Ceci suggère qu'au sein de la population mixte Métalbio, ce sont des microorganismes autres que les bactéries sulfato-réductrices, apparemment des organismes acétogènes, qui se sont développés. Ces bactéries ont pu utiliser du lactate issu de l'HRC®, mais moins efficacement que *D. norvegicum*. Comme le HRC® libère en permanence du lactate « libre », la consommation de lactate par la population métalbio n'est pas quantifiable à travers le suivi de la concentration totale en lactate. Il est également remarquable que la population Métalbio présente une activité sulfato-réductrice équivalente à celle de *D. norvegicum* sur lactate, et ne réduit pas du tout le sulfate en présence de HRC® ; l'activité sulfato-réductrice de la population Métalbio semble inhibée par le HRC®. Le métabolisme global de la population Métalbio est différent sur lactate seul et sur HRC®. Cela est certainement dû à une substance inconnue présente dans le HRC®.

Dans les cultures de *D. norvegicum*, une accumulation d'acétate est observée (fig. 25 et fig. 26). L'acétate est un produit de la dégradation du lactate. Avec la population Métalbio, la concentration en acétate augmente pendant 1 à 3 semaines, puis diminue. Ces résultats s'expliquent par le fait que *D. norvegicum* n'utilise pas l'acétate comme source d'énergie, alors que la population Métalbio contient diverses bactéries, dont certaines capables de consommer l'acétate.

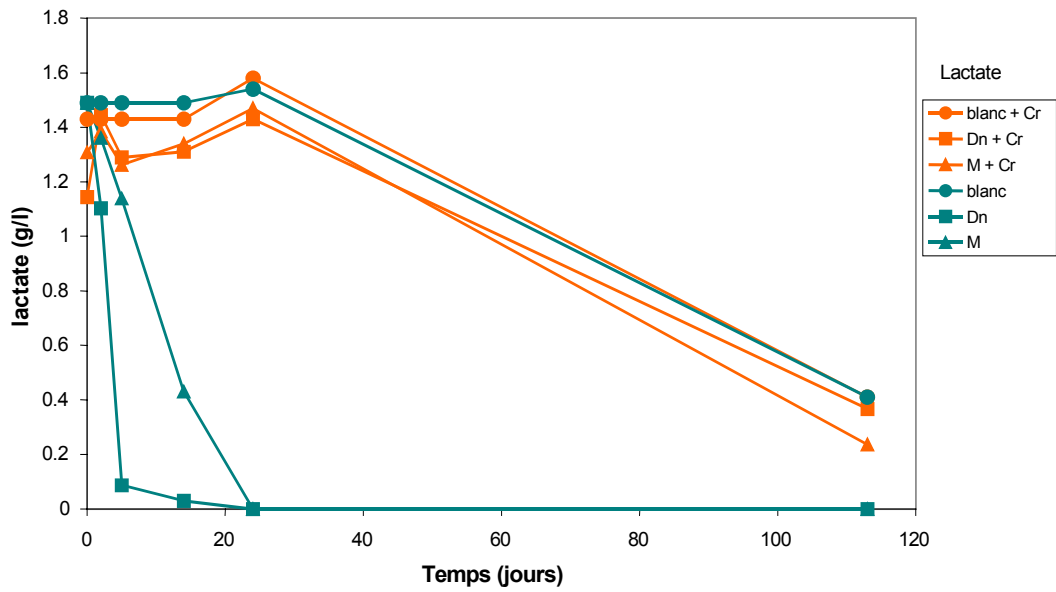


Fig. 21 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en lactate.

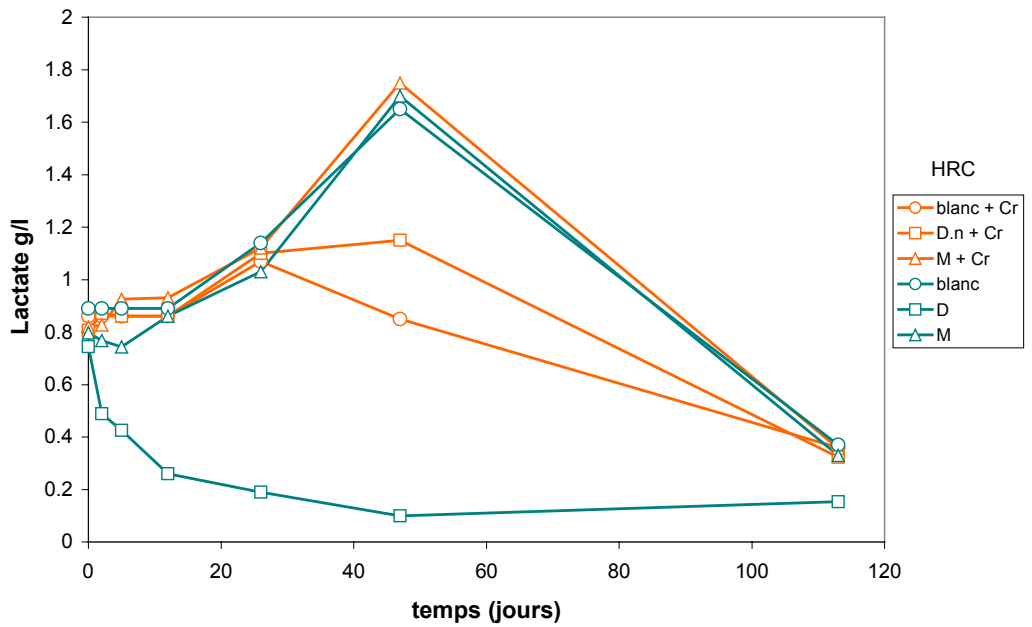


Fig. 22 - Cultures sur HRC®, évolution des concentrations en lactate.

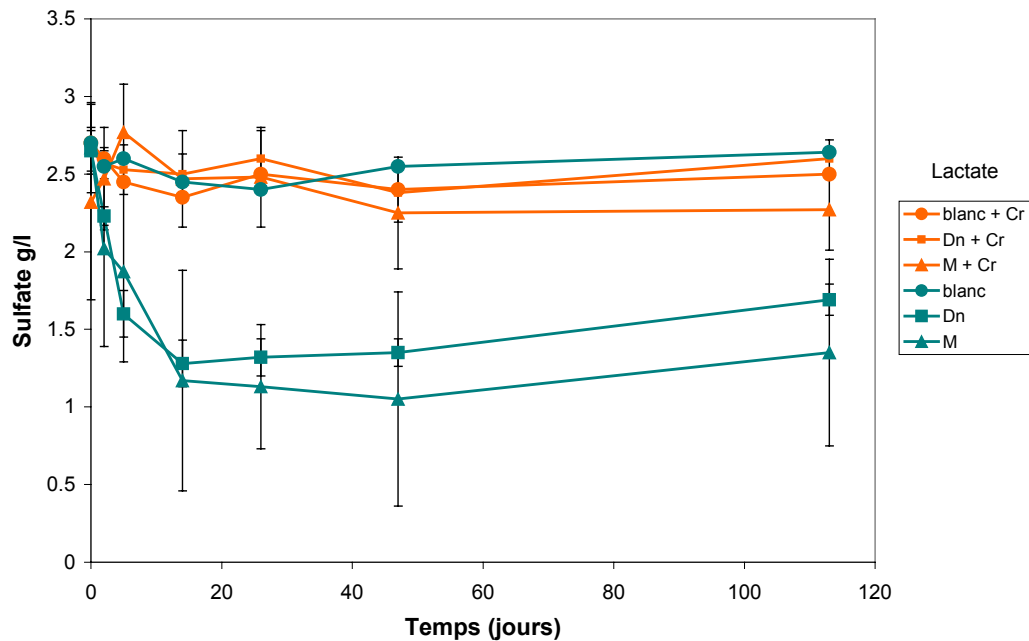


Fig. 23 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.

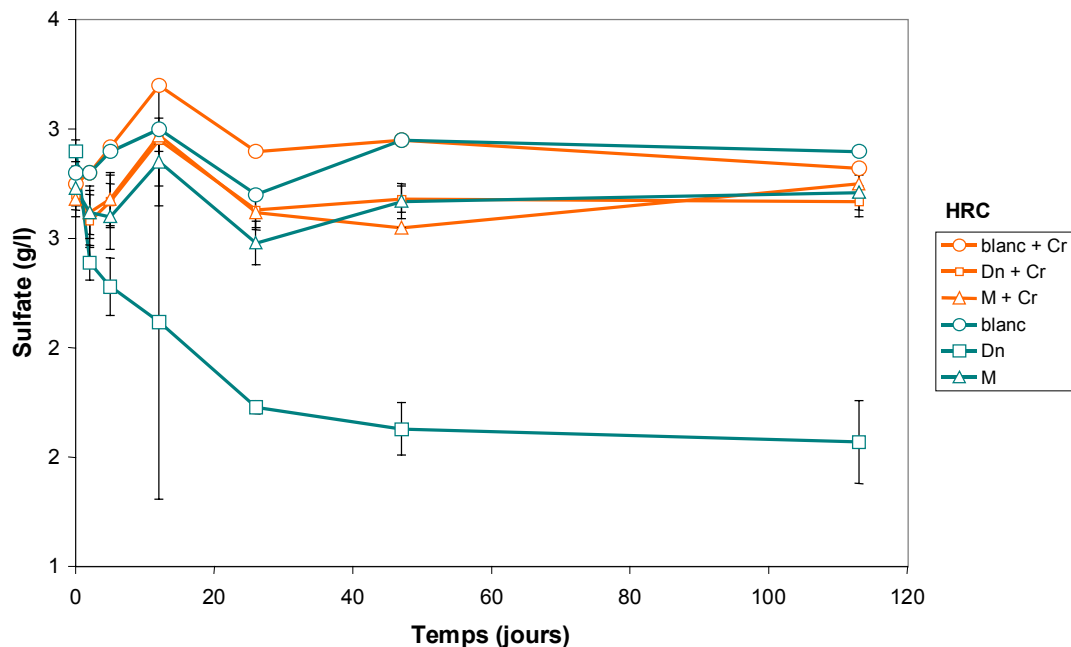


Fig. 24 - Cultures sur HRC®, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.

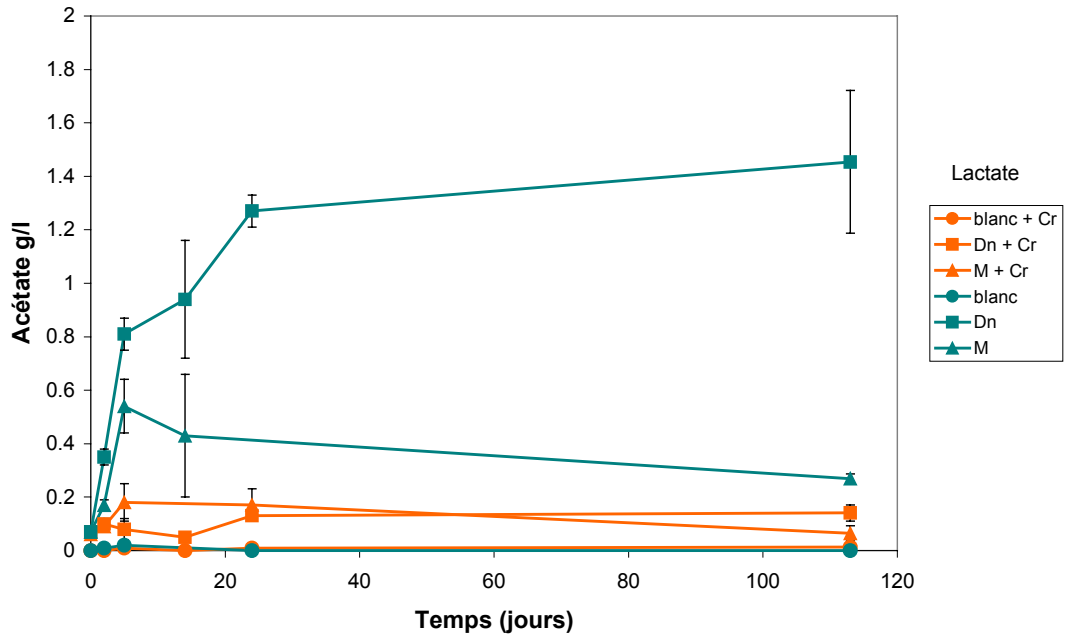


Fig. 25 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.

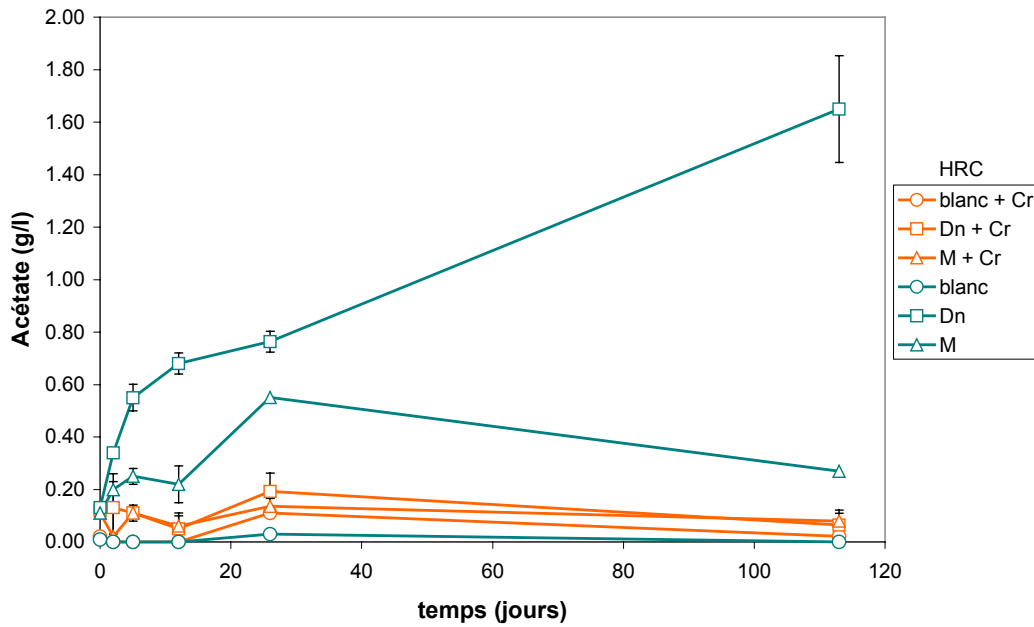


Fig. 26 - Cultures sur HRC®, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.

b) En présence de Cr(VI)

En présence de Cr(VI), les concentrations en lactate et sulfate (fig. 21 à fig. 24), ne diminuent pas de manière significative au cours du temps. Aucune production d'acétate n'est observée (fig. 25 et fig. 26). La présence de Cr(VI) affecte donc le métabolisme énergétique et par conséquent la croissance bactérienne. Les résultats, notamment ceux obtenus par comptage bactérien, montrent toutefois que la population Métalbio est moins sensible à la présence de Cr(VI) que la souche *D. norvegicum*, ce qui s'explique probablement par le fait que cette population issue d'un réacteur pour la bioremédiation du chromate est adaptée à la présence de Cr(VI), et tolère mieux la présence de ce métal toxique.

6.3.2. Réduction du Cr(VI)

L'étude de la réduction du Cr(VI) en Cr(III) par les bactéries en présence de lactate ou de HRC® montre tout d'abord une réduction du chromate par le HRC® en absence de bactéries (fig. 27). Ceci s'explique probablement par le fait que le HRC® est un produit industriel complexe, qui contient probablement un composé (en faible quantité) qui est capable de réduire le chromate. Ce composé est peut-être ajouté dans la formule du HRC® pour faire diminuer volontairement le potentiel redox du milieu. Dans la mesure où la composition exacte du HRC® commercialisé n'est pas détaillée, nous ne pouvons pas identifier le composé responsable de cette réduction. Le lactate seul ne réduit pas le Cr(VI).

Cette réduction du chromate par le HRC® est cependant lente au cours du temps, et la présence de bactéries permet une réduction plus rapide du métal.

La population Métalbio a une meilleure activité de réduction du chromate que la souche pure *D. norvegicum*.

Une meilleure réduction du chromate par les 2 populations étudiées est observée lorsque le HRC® est utilisé comme source d'énergie. En effet, la réduction du chromate en présence de lactate est plus faible pour la population Métalbio, et inexistante pour la souche *D. norvegicum*. Ce résultat est peut-être lié à la présence, dans le HRC®, de la substance inconnue qui fait chuter le potentiel redox. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le comptage bactérien qui a montré une meilleure croissance de la population Métalbio par rapport à *D. norvegicum*, notamment sur lactate, en présence de Cr(VI).

Dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, nous observons donc une réduction du Cr(VI) malgré le fait qu'aucune consommation de lactate ou de HRC® (donneurs d'électrons) n'ait été observée. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ceci. La première est qu'il y a probablement un pool d'électrons dans les cellulesensemencées. La deuxième est que la réduction d'une faible concentration de Cr(VI) nécessite la consommation d'une faible quantité de lactate non détectable par le test enzymatique que nous avons utilisé pour le dosage des acides organiques. En effet, la concentration en Cr(VI) est de 0,4 mM pour une

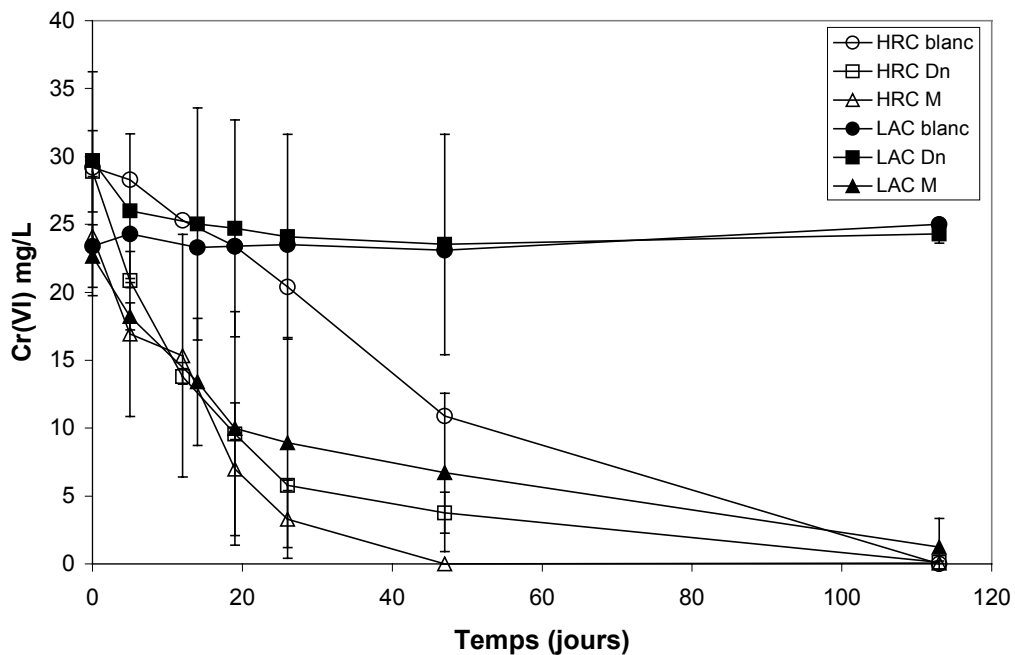


Fig. 27 - Evolution des concentrations en Cr(VI). Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats.

concentration en lactate de 17 mM. La variation de la concentration en lactate due à la consommation d'une partie du lactate pour la réduction du Cr(VI) est donc très faible.

6.3.3. Croissance bactérienne

La croissance des 2 populations choisies pour cette étude a été suivie en fonction de la source d'énergie fournie aux bactéries (lactate et HRC®).

Deux comptages bactériens ont été effectués, un premier après 1 mois d'incubation (fig. 28), et un second après 3 mois d'incubation (fig. 29).

Après 1 mois de culture (fig. 28), les concentrations bactériennes les plus élevées sont obtenues en présence de lactate et en absence de Cr(VI). Sur HRC® et sans Cr(VI), les concentrations bactériennes sont plus faibles pour les deux populations. En présence de Cr(VI), les concentrations bactériennes sont globalement plus faibles qu'en absence de Cr(VI). La croissance de la population Métalbio est moins inhibée que celle de *D. norvegicum*.

Après 3 mois de culture (fig. 29), les concentrations bactériennes ont beaucoup diminué dans les fioles ne contenant pas de Cr(VI). Ce phénomène est certainement lié à la lyse des cellules au-delà de la phase stationnaire de croissance : le nombre de cellules diminue lorsque tout le lactate a été consommé, après 3 mois de culture.

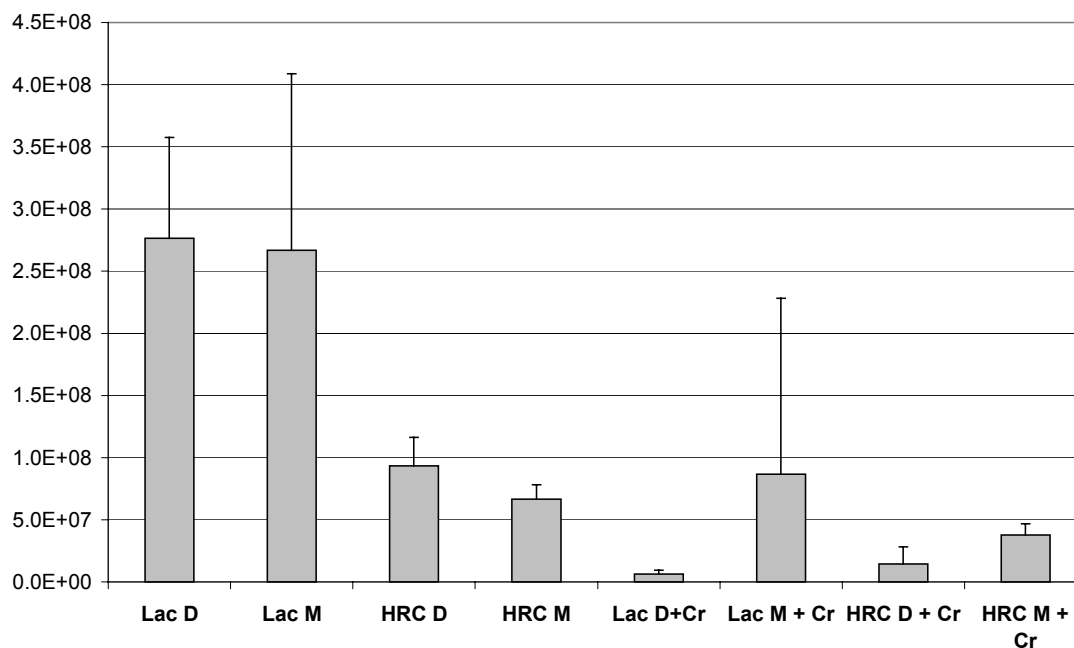


Fig. 28 - Concentration bactérienne après 1 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. D : *D. norvegicum* ; M : *Métalbio*.

En présence de Cr(VI), les concentrations bactériennes sont plus élevées après 3 mois qu'après 1 mois de culture, sauf dans le cas de *D. norvegicum* + lactate, qui est la seule condition dans laquelle le chrome n'a pas du tout été réduit par les bactéries. Ces résultats semblent montrer que la présence de Cr(VI) a retardé la croissance des bactéries.

La comparaison de l'ensemble des résultats obtenus avec les 2 populations suggère qu'en absence de chromate, *D. norvegicum* a une croissance plus rapide que la population *Métalbio*, aussi bien sur lactate que sur HRC® (cf. comptage bactérien à t = 1 mois). Les résultats indiquent également que la croissance des deux populations étudiées est plus rapide en présence de lactate que sur HRC®. Le lactate permet aussi d'obtenir une concentration bactérienne plus importante, ce qui peut s'expliquer par le fait que ce substrat est immédiatement utilisable, contrairement au HRC® qui doit être dépolymérisé pour être utilisé.

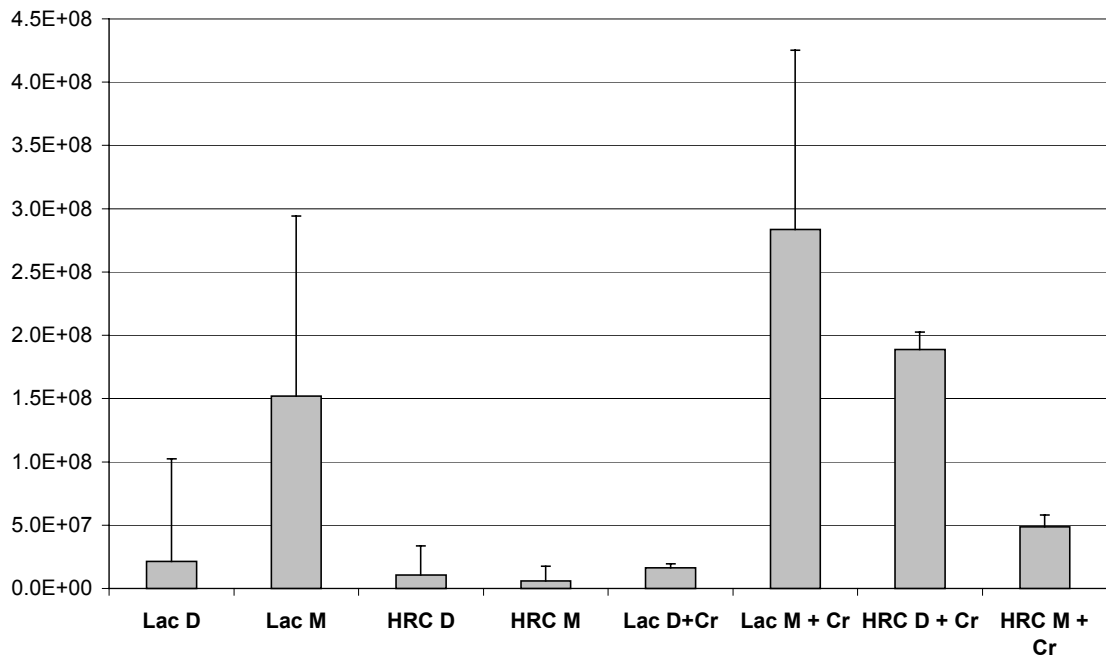


Fig. 29 - Concentrations bactériennes après 3 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. D : *D. norvegicum* ; M : *Métalbio*.

6.3.4. Production d'hydrogène gaz

Les bactéries sulfato-réductrices, parce qu'elles possèdent des hydrogénases capables de réaliser l'oxydation réversible de l'hydrogène, peuvent produire ou consommer de l'hydrogène en fonction des conditions expérimentales. Nous pouvons donc nous attendre, notamment en présence de HRC®, à observer une production d'hydrogène.

Les dosages réalisés par CPG ne permettent pas de détecter la présence d'H₂, sauf dans les trois fioles contenant de l'HRC® et la population *Métalbio* dans lesquelles 0,55 % d'hydrogène ($\pm 0,37\%$) a été détecté dans la phase gaz. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'absence d'hydrogène dans les échantillons :

- il n'y a pas de production d'hydrogène par les bactéries dans les conditions expérimentales que nous avons choisies ;
- l'hydrogène produit par les bactéries est directement réutilisé par celles-ci comme source d'énergie pour la réduction du sulfate ;
- le système de prélèvement de gaz que nous avons utilisé (ampoule de verre) n'est pas adapté (volume de l'ampoule trop gros par rapport au volume des fioles notamment, et dilution dans de l'azote injecté pour purger le système).

Il est remarquable que la seule condition expérimentale ayant conduit à une production détectable d'hydrogène est la culture de la population *Métalbio* en présence d'HRC®,

qui n'a pas réduit le sulfate. Les bactéries ont adopté un métabolisme fermentaire avec production d'hydrogène dans cette condition précise.

6.4. CONCLUSIONS

Ces travaux ont démontré que la source d'énergie (HRC® ou lactate) a une influence sur la croissance bactérienne, la réduction du Cr(VI) et la production d'hydrogène. Ainsi, le HRC® permet la croissance des bactéries sulfato-réductrices, puisque *D. norvegicum* est capable de réduire le sulfate en présence d'HRC®. Cependant, une population mixte contenant des BSR au départ peut adopter un métabolisme différent de la sulfato-réduction en présence d'HRC®. Le HRC® pourrait favoriser davantage le métabolisme fermentaire de certaines bactéries de la population mixte que l'activité de sulfato-réduction. L'utilisation de HRC® comme source d'énergie pour la réduction du Cr(VI) donne de meilleurs résultats que l'utilisation de lactate, probablement en raison de la présence d'une substance réductrice dans le HRC®.

7. Conclusion générale

Une part importante du projet ENER 09 a été consacrée, en 2003, à l'étude de l'abondante bibliographie disponible sur le thème de la production d'hydrogène.

L'analyse bibliographique a fourni des indications sur les axes les plus prometteurs à moyen terme, et en synergie avec les thèmes de recherche du BRGM. Une de ces voies est la production biologique d'hydrogène par fermentation obscure à partir de la fraction organique des déchets ménagers. Les procédés physico-chimiques et thermiques de production d'hydrogène à partir de combustibles fossiles, couplés à des systèmes de séquestration du CO₂, seront largement prépondérants à court terme par rapport aux autres méthodes de génération d'hydrogène. Cependant, la biomasse et les déchets ménagers sont des sources potentielles d'hydrogène, qui présenteraient l'avantage d'être transformées localement et d'éviter ainsi les problèmes associés au transport du gaz sur de longues distances et à son stockage. Actuellement, le biogaz (mélange de méthane et de CO₂) est une source locale d'énergie produite à partir de déchets ménagers ou agricoles ou de boues de stations d'épurations. La pertinence des unités de production de biogaz n'est pas remise en cause par leur co-existence avec les grandes voies de production d'énergie. Par référence à ce modèle, des procédés permettant de générer de l'hydrogène à partir de déchets ménagers ou de la biomasse en général, pourraient être envisagés, à condition que leur rentabilité énergétique et économique soit démontrée.

Un essai réalisé en 2003 a fourni des résultats intéressants. La fermentation de déchets a été maintenue en phase de production d'H₂ par l'application d'un courant électrique, et le CO₂ produit par cette réaction semble être piégé sous forme de carbonate. Le programme expérimental sera focalisé en 2004 sur la compréhension des processus impliqués. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir stabiliser la voie de fermentation produisant l'hydrogène par un autre dispositif que l'utilisation de courant électrique. Dans ce but, plusieurs stratégies seront comparées : l'apport de donneurs d'électrons inorganiques, la micro-aérophilie et un inhibiteur de la méthanogénèse.

Les nombreuses autres voies de production d'hydrogène sont énumérées dans le présent rapport, et leur principe est plus ou moins détaillé en fonction de leur intérêt potentiel vis-à-vis des objectifs du projet. Les processus biologiques utilisant de l'énergie lumineuse pour générer de l'hydrogène sont séduisants sur le plan conceptuel, mais leur développement est encore limité par de nombreuses contraintes technologiques. Ils ont cependant été soigneusement pris en compte dans la présente étude, en raison de leur potentialité à long terme dans les domaines de l'énergie et de l'environnement.

Enfin, l'utilisation de l'hydrogène en tant que réactif « propre » dans les procédés biologiques appliqués à l'environnement a été abordé dans le projet ENER 09. Une substance permettant de libérer de l'hydrogène *in situ* pour les bactéries a été testée au laboratoire avec du Cr(VI) en tant que polluant « modèle ». Les résultats de cet essai très préliminaire seront utiles pour les futurs projets qui mettront en œuvre des processus biologiques pour la dépollution *in situ* de sols ou d'eaux souterraines.

Bibliographie

PUBLICATIONS ET RAPPORTS

Adams M. (1900) - The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1020, p. 115-145.

Ademe (1998) - Valorisation matière de déchets industriels dangereux et non-dangereux en centres collectifs. 227 p. ISBN 2-86817-365-9. 227 p. : ill. ; 30 cm. -- (Connaître pour agir. Produits et procédés).

Alberty R. (1994) - Thermodynamics of the nitrogenase reactions. *J. Biol. Chem.*, 269, p. 7099-7102.

Atkins P. (1992) - Chimie générale, InterEditions.

Axelsson R., Lindblad P. (2002) - Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases : effects of oxygen, hydrogen and nickel. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, p. 444-447.

Axley M., Grahame D., Stadtman T. (1990) - *Escherichia coli* formate-hydrogen lyas. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogénase component. *J. Biol. Chem.*, 265, p. 18213-18218.

Battaglia-Brunet F., Foucher S., Denamur A., Ignatiadis I., Michel C. and Morin D. (2002) - Reduction of chromate by fixed films of sulphate-reducing bacteria using hydrogen as an electron source. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, p. 154-159.

Bichet-Hebe I. (1998) - Caractérisation microbiologique et physico-chimique de déchets ménagers en centre d'enfouissement technique - Analyse taxonomique de la flore cellulotytique, étude fluorimétrique de la dégradation de la cellulose. Thèse de l'Université d'Angers, 192 p.

Cammack R. (1995) - Splitting molecular hydrogen. *Nature*, 373, p. 556-557.

Barbosa M.J., Rocha J.M.M., Tramper J., Wijffels R.H. (2001) - Acetate as carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *J. Biotechnol.*, 85, p. 25-33.

Brosseau J.D. and Zajic J.E. (1982) - Hydrogen gas production with *Citrobacter intermedius* and *Clostridium pasteurianum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, p. 496-499.

Czernik S., French R., Feik C., Chornet E. (2002) - Production of hydrogen from post-consumer wastes. Proceedings of the 2002 U.S. DOE Hydrogen Program Review NREL/CP-610-32405.

Dabrock B., Bahl H., Gottschalk G. (1992) - Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, p. 1233-1239.

Fang H.H.P.H. (2002) - Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Biores. Technol.*, 82, p. 87-93.

Farquhar G.J., Rovers F.A. (1973) - Gas Production During Refuse Decomposition. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2, p. 483-495.

Fédération des Minerais et métaux. (2002) - L'industrie des minerais, minéraux industriels et métaux non ferreux. Chiffres clés 2001.

Feliubadalo J. (1998) - Proceedings Sardinia 7th International Waste Management and Lanfill Symposium, p. 503-510.

Van Groenestijn J.W., Hazewinkel J.H.O., Nienoord M., Bussman P.J.T. (2002) - Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. *Int. J. Hyd. Ener.*, 27, p. 1141-1147.

Hallenbeck P.C., Kochian L.V., Weissman J.C., Benemann J.R. (1978) - Solar energy converszion with hydrogen producing cultures of the blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Biotech. Bioeng. Symp.*, 8, p. 283-298.

Hallenbeck P., Benemann J. (2002) - Biological hydrogen production ; fundamentals and limiting process. *Int. J. Hy. Ener*, 27, p. 1185-1193.

Hansel A., Lindblad P. (1998) - Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, p. 153-160.

Hatchikian E.C., Chaigneau M., Legall J. (1977) - Analysis of gas production by growing Culture of three species of sulfate-reducing bacteria. *Confer. Microbial. Prod. Util. Gases*, p. 109-117.

Hawkes F., Dinsdale R., Hawkes D., Hussy I. (2002) - Sustainable fermentative hydrogen production : challenges for process optimisation. *Int. J. Hy. Ener.*, 27, p. 1339-1347.

Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I. (2002) - Sustainable fermentative hydrogen production : challenges for process optimisation. *Int. J. Hy. Ener.*, 27, p. 1339-1347.

Kalia V.C., Jain S.R., Kumar A., Joshi A.P. (1994) - Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. *Water J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, p. 224-227.

Kataoka N., Miya K., Kiriyaama K. (1997) - Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Sci. Technol.*, 36, p. 41-47.

Keszthelyi C., Bagyinka K., Kovacs K., Laczko I. (1986) - Possibilities of biological energy production. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, 21, p. 99-113.

- Koenigsberg S.** (1999) - The Use Hydrogen Release Compound (HRC) For CAH Bioremediation, Selected Battelle Conference Papers: 1993-1999. P.105-109, p. 119-122.
- Lay J.J., Lee Y.J., Noike T.** (1999) - Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water. Res.*, 33, p. 2579-2586.
- Lin C.Y., Chan R.C.** (1999) - Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, p. 498-500.
- Lindblad P.** (1999) - Cyanobacterial H₂ metabolism: knowledge and potential/strategies for a photobiotechnological production of H₂. *Biotechnologica Aplicada*, 16, p. 141-144.
- Ma K., Schicho R.N., Kelly R.M., Adams M.W.W.** (1994) - Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: a key role for NADPH. *FEMS Microbiol. Lett.*, 122, p. 245-249.
- Markov S., Bazin M., Hall D.** (1995) - The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. *Ad. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 52, p. 59-86.
- May P.S., Blanchard G.C., Foley R.T.** (1964) - Biochemical hydrogen generators: 18th Annual Proceedings Power Sources Conferences.
- Mellis A., Happe T.** (2001) - Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol.*, 127, p. 740-748.
- Michel C., Brugna M., Aubert C., Bernadac A., Bruschi M.** (2001) - Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulphate-reducing bacteria. Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, p. 95-100.
- Mizumo O., Dinsdale R., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Noike T.** (2000) - Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Biorem. Technol.*, 73, p. 59-65.
- Miyamoto K., Hallenbeck P.C., Benemann J.R.** (1979) - Solar energy conversion by nitrogen limited cultures of *Anabaena cylindrica*. *J. Ferment. Technol.*, 57, p. 287-293.
- Nakajima Y., Tsuzuki M., Ueda R.** (2001) - Improved productivity by reduction of the content of light harvesting pigment in *Chlamydomonas perigranulata*. *J. Appl. Phycol.*, 13, p. 95-101.
- Nandi R., Sengupta S.** (1998) - Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24, p. 61-84.
- Nielsen A.T., Amandusson H., Bjorklund R., Dannerun H., Ejlertsson J., Ekedahl L.-G., Lundström I., Svensson B.H.** (2001) - Hydrogen production from organic waste. *Int. J. Hy. Ener.*, 26, p. 547-550.

Nowak C., Riolland H., Guyonnet D., Dictor M.C., Galle P. (2002) - Caractérisation du potentiel d'émission résiduelle des ordures ménagères après la phase de maturation de la matière organique - Rapport final -. BRGM/RP-51884-FR, 144 p.

Observatoire des matières premières. Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie, Secrétariat d'état à l'industrie, 1999. Recyclage des métaux non ferreux : Rôle économique, dynamique industrielle et réglementation. Paris : DIRCOM, 233 p

Pau R. (1991) - The alternative nitrogenases. In *Biology and Biochemistry of nitrogen fixation*, Dilworth M.J. and Glenn A.T. Eds Elsevier, Amsterdam, p. 37-57.

Ren N., Qin Z., Li J. (2003) - Optimal type for bio-hydrogen production by fermentation. Proceedings of the European Hydrogen Energy Conference, Grenoble.

Roychowdhury S., Cox D., Levandowsky M. (1988) - Production of hydrogen by microbial fermentation. *Int. J. Hy. Ener.*, 13, p. 407-410.

Roychowdhury S. (2000) - Process for production of hydrogen from anaerobically decomposed organic materials. US Patent 6,090,266p.

Shah V., Stacey G., Brill W. (1983) - Electron transport to nitrogenase. Purification and characterization of pyruvate : flavodoxin oxydoreductase, the nifJ gene product. *J. Biol. Chem.*, 258, p. 12064-12068.

Sharak Genthner B., Friedman D., Devereux R. (1997) - Reclassification of *Desulfovibrio desulfuricans* Norway 4 as *Desulfomicrobium norvegicum* comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, p. 889-892.

SOLAGRO (2003) - Production d'hydrogène ex-biogaz. Quelles opportunités ? Rapport final C/540, 66 p.

Suzuki S., Karube I., Matsunaga T. (1978) - Application of a biochemical fuel cell to wastewater. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 8, p. 501-505.

Symonds R.B., Rose W.I., Bluth G., Gerlach T.M. (1994) - Volcanic gas studies: methods, results, and applications. In Carroll, M.R., and Holloway, J.R., eds., *Volatiles in Magmas: Mineralogical Society of America Reviews in Mineralogy*, 30, p. 1-66.

Tagushi F., Mikukami N., Saito-Taki T., Hasegawa K. (1995) - Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. strain No. 2. *Can. J. Microbiol.*, 41, p. 536-540.

Tamagnini P., Alexsson R., Lindberg P., Oxefelt F., Wünschiers R., Lindblad P. (2002) - Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.*, 66, p. 1-20.

Touzé S., Nowak C., Dictor M.C. et Guyonnet D. avec la collaboration de Couturier C. (SOLAGRO) (2003) - Production et valorisation d'hydrogène sur les sites de stockage de déchets ménagers – Etude exploratoire. Rapport BRGM/52525, 60 p.

Ueno Y., Sato S., Morimoto M. (1996) - Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostate culture. *J. Ferment. Bioeng.*, 82, p. 194-197.

Ueno Y., Haruta S., Ishii M., Igarashi Y. (2001) - Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, p. 555-562.

Voolapalli R.K., Stuckey D.C. (1998) - Stability enhancement of anaerobic digestion through membrane gas extraction under organic shock loads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 73, p. 153-161.

Wallman P.H., Thorsness C.B., Winter J.D. (1998) - Hydrogen production from wastes. *Energy*, 23, p. 271-278.

Wang C.C., Chang C.W., Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V., Liao C.S., Tay J.H. (2003) - Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation. *Water Res.*, 37, p. 2782-2793.

Warthmann R., Cypionka H., Pfennig N. (1992) - Photoproduction of H₂ from acetate by syntrophic co-cultures of green sulfur bacteria and sulfur-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, 157, p. 343-348.

Watrous M., Clark S., Kutty R., Huang S., Rudolph F., Hugues J., Bennett G. (2003) - 2,4,6-trinitrotoluene reduction by an Fe-only hydrogenase in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, p. 1542-1547.

Woodward J., Orr M. (1998) - Enzymatic conversion of sucrose to hydrogen. *Biotechnol. Prog.*, 14, p. 897-902.

Woodward J., Orr M., Corday K., Greenbaum E. (2000) - Enzymatic production of biohydrogen. *Nature*, 405, p. 1014-1015.

Yokoyama T., Jimbo G., Nishimura T., Sakai S. (1992) - Effect of fineness of wear particles from steel balls on the rate of hydrogen generation during wet grinding of hard materials in water. *Powder Technology*, 73, p. 43-49.

Yu H.Q., Zhu Z., Hu W., Zhang H. (2002) - Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int. J. Hy. Ener.*, 27, p. 1359-1365.

Yu H.Q., Zheng X.J., Hu Z.H., Gu G.W. (2003) - High-rate anaerobic hydrolysis and acidogenesis of sewage sludge in a modified upflow reactor. *Wat. Sci. Technol.*, 48, p. 69-75.

Yu H.Q. (2003) - Production of hydrogen and bio-plastics from wastewater. Proceedings of the European Hydrogen Energy Conference, Grenoble.

Zhu H., Ueda S., Asada Y., Miyake J. (2002) - Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment – studies on tofu wastewater with entrapped *R. sphaeroides* and mutagenesis. *Int. J. Hyd. Ener.*, 27, p. 1349-1357.

SITES INTERNET

<http://www.cnrs.fr/SDV/biolfontecilla.htm1>: Basestructurales de la biocatalyse de l'hydrogène moléculaire.

Sites référencés dans le texte et :

<http://hydridetech.com/>

<http://www-cenerg.cma.fr/cleancarbhy> (Europe, procédé propre de craquage d'un plasma hydrocarboné pour produire des nanoparticules de C et de l'hydrogène)

<http://www.hydrogen.org/>

<http://www.eere.energy.gov/aro/pdf/evans.pdf> (biomasse)

http://www.afh2.org/index.php?page=ehec2003_2_introduction (1ère Conférence internationale de l'hydrogène énergie)

<http://www.nf-2000.org/home.html> (information projets européens)

http://www.iaea.org/inis/aws/htqr/abstracts/abst_30027279.html (production nucléaire d'hydrogène)

Annexe 1

Composition du milieu utilisé

Milieu tampon phosphate

Le milieu de base est composé d'une solution A et d'une solution B. Le pH de la solution est ajusté à pH 7,0.

Solution A

KH_2PO_4	2,70 g
K_2HPO_4	3,50 g
$(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$	5,30 g
Glucose	5,00 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Eau déminéralisée	500 ml

Solution B

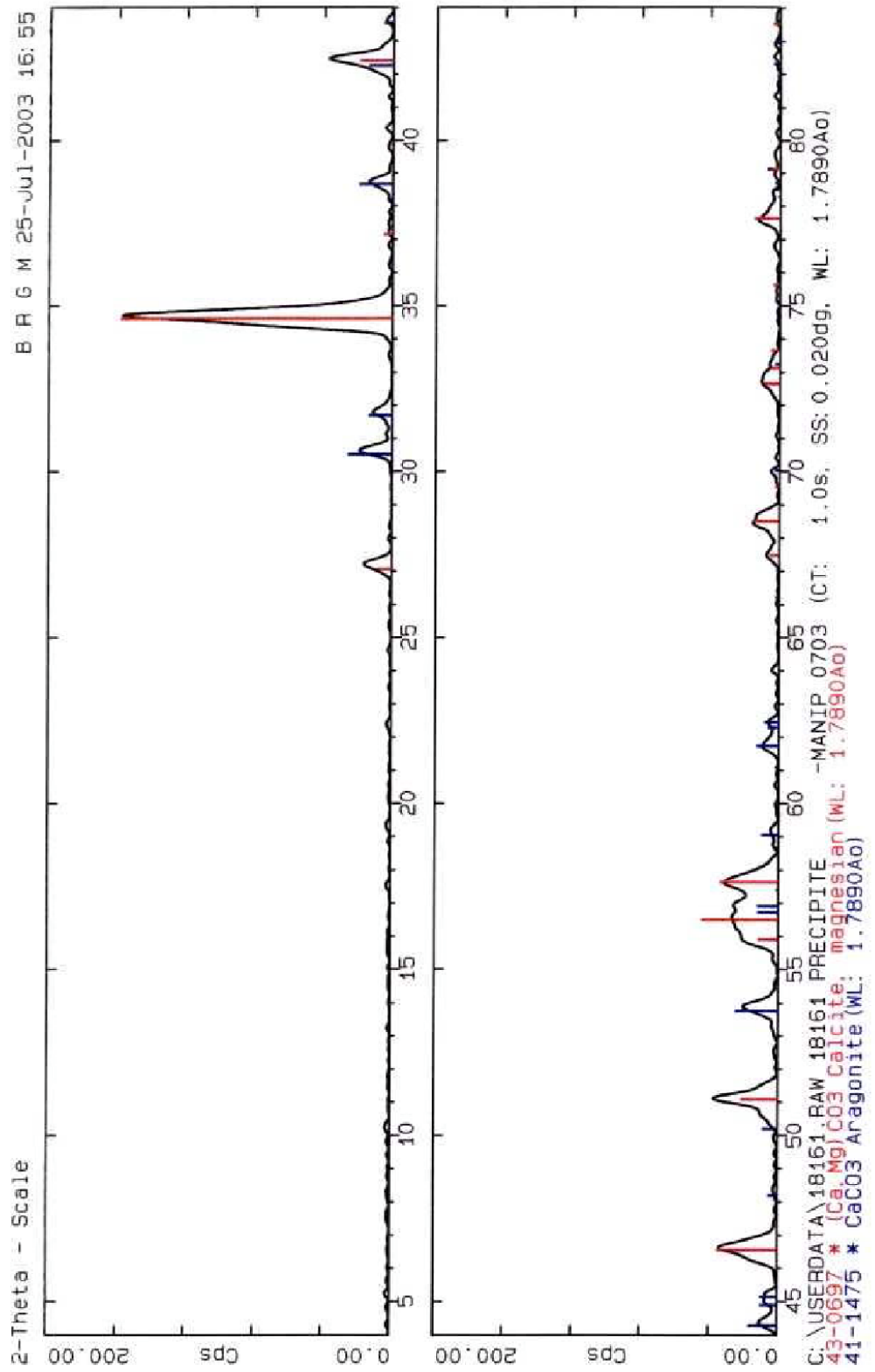
$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	1,00 g
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,75 g
$\text{FeCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
Eau déminéralisée	500 ml

Solution d'oligo-éléments

HCl en solution à 25 %	6,5 ml
$\text{FeCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
H_3BO_3	60 mg
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	117 mg
$\text{CoCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
ZnCl_2	70 mg
$\text{NiCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$	15 mg
$\text{NaMoO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
Eau déminéralisée	1000 ml

Annexe 2

Résultat de l'analyse DRX du dépôt de la cathode





Géosciences pour une Terre durable

brgm

Centre scientifique et technique
Service environnement industriel et procédés innovants
3, avenue Claude-Guillemin
BP 6009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 33 (0)2 38 64 34 34