



Université de Constantine 3

Faculté de Génie des Procédés

Département de Génie de l'Environnement

UTILISATION DES DECHETS ORGANIQUES BIODEGRADABLES
POUR LA PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR FERMENTATION
OBSCURE

THESE

Présentée pour l'obtention du
Diplôme de Doctorat Science en Génie des Procédés
En Génie de l'Environnement

Par

Esma MAHFOUF ép. BOUCHARB

Année Universitaire

2022-2023



Université de Constantine 3

Faculté de Génie des Procédés

Département de Génie de l'Environnement

N° de série :

N° d'ordre :

UTILISATION DES DECHETS ORGANIQUES BIODEGRADABLES
POUR LA PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR FERMENTATION
OBSCURE

THESE

Présentée pour l'obtention du
Diplôme de Doctorat Science en Génie des Procédés
En Génie de l'Environnement

Par

Esma MAHFOUF ép. BOUCHARB

Devant le Jury composé de :

Mustapha CHIKHI	Président	Professeur	Université Constantine 3
Kerroum DERBAL	Directeur	Professeur	Ecole Nationale Polytechnique Constantine
Abdellah BOUGUETOCHA	Examineur	Professeur	Université FERHAT Abbas Sétif 1
Derradji CHEBLI	Examineur	Professeur	Université FERHAT Abbas Sétif 1
Bani KHEIR EDDINE	Examineur	MCA	Université Constantine 3
Zahir BAKIRI	Examineur	MCA	Université Constantine 3

Année Universitaire

2022-2023

Remerciement

Je remercie tout d'abord notre clément **Dieu** qui m'a donné la puissance, pour que je puisse réaliser et terminer ce travail.

Je remercie tous **mes enseignants** de mon parcours du primaire à l'université, de leurs patience et efforts pour me transmettre du savoir.

Je tiens à remercier l'ensemble **des membres de jury** d'accepter l'expertise de ce modeste travail.

Je tiens à remercier mon superviseur de thèse, Monsieur le professeur **DERBAL Kerroum**, de m'avoir donné l'occasion de faire un projet de doctorat et de me superviser et de me soutenir tout au long du projet de doctorat. Je suis reconnaissante des précieux conseils et de la gentillesse qu'il m'a donnés tout au long du projet.

Je remercie également mon deuxième dirigeant de thèse, Monsieur le professeur **Nadir DIZGE**, directeur du laboratoire de génie de l'environnement à l'université de Mersin, Turquie pour son accueil, ses orientations et son avoir su me faire confiance, sans oublier le soutien de toute l'équipe du laboratoire : **Ezgi, Zellal, Yassin, Nazem** et surtout **Zeynep**.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues à l'école nationale supérieure de biotechnologie, ma deuxième famille. Un grand Merci à Monsieur le directeur de l'école Monsieur le professeur **KHELIFI Douadi** pour son soutien et ses conseils, à madame **SAKHRI**, ingénieur au sein de l'école pour le grand aide que m'a apporté tout au long de ce travail, à tous les enseignants de l'école qui n'ont jamais hésiter de me répondre à mes questions infinies : Mr **BOUHLESSA**, Mr **KECHKAR**, Mr **ERROUKI**, Mr **MEROUNE**, Mme **BELOUNISSI**, Mme **NAIMI**. Un autre grand merci à mon ex-étudiante **Anfel BELEBCIR**, une doctorante motivée, polie qui m'a aidé à appliquer plusieurs études et qui a été un plaisir de travailler avec. Aussi à ma **Sarra** mon amie et mon énergie positive à l'**ENSB**.

En remerciant, je ne peux pas oublier l'aide de **TATA Zahia**, chef de service à la clinique **BOUKERROU**, Constantine, pour son immense rôle à la collecte des flacons.

Un "Merci" ne suffit pas pour expliquer ce qu'ils ont fait et m'ont apporté en me soutenant pendant toutes ces longues années d'étude. Un grand merci à **MON PERE** réveille-matin de mes jeunes années, et le deuxième à **MA MERE**, qui s'est échinée à me faire tenir un crayon correctement.

Un merci à **MON MARI**, qui m'a toujours encouragé, aidé et accompagné pour finaliser ce travail.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de cette thèse,

Et enfin, merci à vous, lecteurs occasionnels ou assidus de ces pages.

Dédicaces

À la mémoire de mon grand-père,
À ma grand-mère,
À papa, à maman,
À mon mari,
À mes filles,
À mes neveux ;
À ma sœur ;
À mes frères ;
Et tous mes proches.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	x
RESUMES.....	ii
 INTRODUCTION GENERALE.....	 1
 CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
 Partie A : Sources d'énergies renouvelables : opportunités et défis pour la production d'énergie	 5
<i>Introduction</i>	5
I.A.1. Energie solaire.....	6
I.A.2. L'énergie géothermique.....	6
I.A.3. Hydroélectricité.....	7
I.A.4. Énergie éolienne.....	7
I.A.5. Énergie océanique.....	8
I.A.6. Bioénergie (biocarburant) de la biomasse	8
I.A.6.1. Bioéthanol.....	10
I.A.6.2. Biodiesel.....	10
I.A.6.3. Biogaz.....	11
I.A.6.4. Biohydrogène.....	13
 Partie B : L'hydrogène : historique, utilisations et voies de production	 14
<i>Introduction</i>	14
I.B.1. Utilisation de l'hydrogène.....	15
I.B.1.1. Consommation industrielle.....	15
I.B.1.2. Consommation pour la mobilité.....	16
I.B.2. Voies de production de l'hydrogène	16
I.B.2.1. Voies conventionnelles.....	18
I.B.2.1.1. L'électrolyse.....	18
I.B.2.1.2. Thermolyse (Décomposition thermique directe de l'eau).....	19
I.B.2.1.3. Production à partir de la biomasse.....	19
I.B.2.1.3.1. Pyrolyse/gazéification.....	19
I.B.2.1.3.2. Voies biochimiques.....	20
I.B.2.1.3.2.1. Photolyse (Photosynthèse)	20
I.B.2.1.3.2.2. Photo-fermentation	22
I.B.2.1.3.2.3. Fermentation obscure et digestion anaérobie.....	23
 Partie C : Production de biohydrogen par fermentation obscure	 27
<i>Introduction</i>	27
I.C.1. Voies métaboliques impliqués.....	27
I.C.2. Biochimie de la fermentation obscure.....	29
I.C.2.1. Les réactions biochimiques de la fermentation obscure	30
I.C.2.2. Bactéries productrices d'hydrogène	32
I.C.3. Substrats utilisés pour la production d'hydrogène.....	32
I.C.3.1. Les substrats simples.....	33

I.C.3.2. Les substrats complexes.....	33
I.C.4. Bioréacteurs utilisés pour la production de biohydrogène.....	34
I.C.4.1. Le fermenteur Batch	34
I.C.4.2. Le réacteur agité en continu CSTR.....	35
I.C.4.3. Réacteur UASB.....	36
I.C.4.4. Réacteurs à lit fixe.....	36
I.C.5. Modélisation cinétique de la production de biohydrogène.....	37
I.C.5.1. Modèle du <i>GOMPERTZ modifié</i>	38
I.C.5.2. Modèle du <i>LOGISTIQUE modifié</i>	39
I.C.6. Paramètres influençant le procédé.....	40
I.C.6.1. Température.....	40
I.C.6.2. pH.....	42
I.C.6.3. L'alcalinité.....	44
I.C.6.4. Le rapport C/N.....	44
I.C.6.5. Taux de dilution.....	45
I.C.6.6. La concentration des acides organiques AGV.....	45
I.C.6.7. La pression partielle de H ₂	46
I.C.6.8. Présence des toxiques.....	48
I.C.6.9. Présence des nutriments.....	48
I.C.6.10. Paramètres opérationnels.....	49
I.C.6.10.1. Temps de rétention hydraulique.....	49
I.C.6.10.2. ORL ' <i>Organic Loading Rate</i> '.....	52
I.C.6.10.3. Agitation.....	54
I.C.7. Amélioration du procédé de fermentation obscure.....	54
I.C.7.1. Les cultures productrices.....	54
I.C.7.1.1. Cultures pures.....	54
I.C.7.1.2. Co-cultures.....	55
I.C.7.1.3. Cultures mixtes.....	56
I.C.7.2. Prétraitement de substrat	57
I.C.7.2.1. Prétraitements physico-chimiques.....	58
I.C.7.2.2. Prétraitement biologique (enzymatique)	62
I.C.7.3. Application des NPs métalliques sur la production de biohydrogène (catalyseurs)	63
I.C.7.4. Co-fermentation.....	64

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Introduction.....	67
II.1. Substrats.....	67
II.1.1. Eau usée de Bourgoul.....	67
II.1.2. Lactosérum.....	67
II.1.3. Pelures de pomme de terre.....	67
II.1.4. Marc de café.....	68
II.2. Inoculum	68
III.2.1. Boues anaérobies.....	68
III.2.2. Boues aérobies.....	68
II.2.3. <i>Escherichia Coli</i>	69
II.3. Milieux de culture	69
II.3.1. Milieu nutritif.....	69

II.3.2. Milieu peptone.....	69
II.3.3. Milieu ISP9.....	70
II.3.4. L'eau physiologique	71
II.3.5. Solution tampon phosphate.....	71
II.4. Enzymes.....	71
II.4.1. <i>Alpha-amylased'Aspergillus niger</i>	71
II.4.2. <i>Lactase</i>	71
II.4.3. <i>Cellulase d'Aspergillus Niger</i>	71
II.4.4. Glucose oxydase d'Aspergillus Niger.....	72
II.5. Mode opératoire.....	72
II.5.1. Potentiel biochimique hydrogène (BHP)	72
II.5.2. Production de biohydrogène en mode semi-continu (description du bioréacteur)...	73
III.5.3. Prétraitement.....	74
III.5.3.1. Prétraitements physicochimiques.....	74
III.5.3.2. Prétraitement enzymatique.....	75
III.5.3.2.1. Lactosérum.....	75
III.5.3.2.2. Pelures de pomme de terre.....	76
III.5.3.3. Co-fermentation.....	76
III.5.3.4. Synthèse des nanoparticules.....	76
III.6. Méthodes analytiques.....	77
III.6.1. Mesure des caractéristiques physicochimiques	77
III.6.1.1. Les solides totaux et les solides volatils totaux.....	77
III.6.1.2. pH, Titre alcalimétrique, titre alcalimétrique complet.....	78
III.6.1.3. Turbidité.....	78
III.6.1.4. La demande chimique en oxygène.....	78
III.6.1.5. La demande biochimique en oxygène.....	79
III.6.1.6. Dosage des carbohydrates.....	79
III.6.1.7. Dosage de l'azote total Kjeldahl.....	79
III.6.1.8. Dosage du phosphore.....	80
III.6.1.9. Dosage des protéines.....	80
III.6.1.10. Densité.....	80
III.6.1.11. Mesure de la concentration cellulaire.....	81
III.6.1.11.1. Comptage cellulaire.....	81
III.6.1.11.2. Concentration cellulaire.....	81
III.6.1.12. Mesure du volume du biohydrogène.....	81
III.6.1.13. Caractérisation de biohydrogène	82
II.6.1.14. Caractérisation des nanoparticules.....	82

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

<i>Partie A : Production de biohydrogène par fermentation obscure des eaux usées industrielles du BOURGOUL</i>	86
Introduction.....	86
III.A.1. Caractérisation de l'inoculum.....	86
III.A.2. Caractérisation du substrat	87
III.A.3. Effet de I/S et effet de prétraitement de l'inoculum.....	88
III.A.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	90
III.A.5. Cinétique de production d'hydrogène.....	93
Conclusion.....	94

Partie B : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Lactosérum	
Introduction.....	95
III.B.1. Caractérisation de l'inoculum	95
III.B.2. Caractérisation du substrat.....	97
III.B.3. Effet de I /S.....	98
III.B.4. Effet de prétraitement de substrat.....	99
III.B.4.1. Effet de prétraitement physicochimique.....	99
III.B.4.1.1. Caractérisation du substrat après prétraitements physico-chimiques	99
III.B.4.1.2. Effet du prétraitement thermique	101
III.B.4.1.3. Effet du prétraitement ultrasonique.....	102
III.B.4.1.4. Effet du prétraitement chimique.....	103
III.B.4.2. Effet du prétraitement biologique.....	105
III.B.4.2.1. Hydrolyse Enzymatique.....	105
III.B.4.1.2. Effet du prétraitement enzymatique par la <i>lactase</i> sur le BHP.....	107
III.B.4.3. Comparaison des effets des différents prétraitements physicochimiques et biologique.....	109
III.B.4.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	110
III.B.5. Effet de présence des particules métalliques.....	112
III.B.5.1. Caractérisation des nanoparticules synthétisés.....	112
III.B.5.2. Effet de présence des NPs sur la production de Biohydrogène par fermentation du lactosérum.....	118
- Effet de présence des NPs à base de fer.....	118
- Effet de présence des NPs à base de manganèse	119
- Effet de présence des NPs à base de zinc.....	120
- Effet de présence des NPs à base de mercure.....	121
- Effet de présence des NPs à base de cuivre.....	121
- Effet de présence des NPs à base d'argent.....	122
III.B.5.3. Comparaison des effets de la présence des différents NPs dans le milieu de fermentation.....	126
III.B.5.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	127
III.B.5.5. Application en mode discontinue.....	129
III.B.5.1. Effet du temps du rétention hydraulique.....	129
III.B.5.2. Effet de la concentration de la charge organique.....	133
Conclusion	134

Partie C : Production de biohydrogène par fermentation obscure du lacto-sérum en utilisant la culture pure : <i>Escherichia coli</i>	
Introduction	136
III.C.1. Croissance bactérienne d' <i>E. coli</i>	136
III.C.2. Effet du type de milieu de culture et de concentration de la charge organique sur le potentiel biochimique de production de biohydrogène.....	137
III.C.3. Effet du pH.....	138
III.C.4. Effet du prétraitement du substrat sur le potentiel biochimique de production de biohydrogène.....	138
III.C.4.1. Effet du prétraitement thermique.....	139
III.C.4.2. Effet du prétraitement ultrasonique.....	140
III.C.4.3. Effet du prétraitement chimique.....	141
III.C.5. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	143
Conclusion	144

Partie D : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Marc du café	
Introduction.....	146
III.D.1. Caractérisation du substrat.....	146
III.D.2. Effet de I/S sur la production de Biohydrogène.....	147
III.D.3. Effet de la présence des ions métalliques.....	148
III.D.3.1. Effet de présence des ions Ferreux Fe^{2+} (sulfates de Fer)	148
III.D.3.2. Effet de présence des ions de cuivre Cu^{2+} (sulfates de cuivre)	150
III.D.3.3. Effet de présence des ions d'argent Ag^+ (sulfates d'argent)	151
III.D.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	153
Conclusion.....	154
Partie E : Production de biohydrogène par co-fermentation obscure du Lactosérum et du marc de café	
Introduction.....	155
III.E.1. Effet du rapport L/C sur la production de biohydrogène.....	155
III.E.2. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	157
Conclusion.....	157
Partie F : Production de biohydrogène par fermentation obscure de pelure de pomme de terre	
Introduction.....	159
III.F.1. Caractérisation du substrat.....	159
III.F.2. Effet de I/S sur la production d'hydrogène.....	160
III.F.3. Effet de prétraitement biologique (<i>hydrolyse enzymatique</i>)	161
- Effet du prétraitement par α -Amylase sur la production de biohydrogène.....	163
III.F.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène.....	165
Conclusion.....	166
CONCLUSION GENERALE.....	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	171
ANNEXES.....	194
Annexe A : Préparation des milieux.....	194
Annexe B : Méthodes de dosage.....	195
Annexe C : Articles scientifiques.....	202

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Avantages et inconvénients des différents procédés de production de l'hydrogène.....	26
Tableau 1.2 Différentes matières organiques résiduelles utilisées comme substrat pour la production de biohydrogène par fermentation sombre.....	33
Tableau 1.3 Rapport des études de production de biohydrogène par différentes cultures pures.....	55
Tableau 2.1 : La composition de la solution nutritive.....	69
Tableau 2.2 : Composition du milieu peptone.....	70
Tableau 2.3 : Composition de milieu minimum ISP9.....	70
Tableau 2.4 Composition de la solution saline.....	70
Tableau 3.1 Caractères physicochimiques de l'inoculum avant et après traitement.....	86
Tableau 3.2 Caractéristiques physicochimiques de l'inoculum après traitements.....	87
Tableau 3.3 Caractéristiques physicochimiques de l'eau usée industrielle de Bourgoul.....	87
Table 3.4 Comparaison des résultats expérimentaux avec les données du modèle <i>Gompertz modifié</i> et du modèle <i>Logistique modifié</i>	91
Tableau 3.5 Caractéristiques physicochimiques de la boue avant et après le prétraitement thermique à 90°C.....	96
Tableau 3.6 Caractéristiques physicochimiques du LS brut.....	97
Tableau 3.7 Caractéristiques physicochimiques du substrat avant et après prétraitements physicochimiques	101
Tableau 3.8 Caractérisation du surnageant et du digestat après une fermentation sombre	109
Tableau 3.9 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du LS , par différent prétraitement.....	111
Tableau 3.10 Effets de la présence des NPs sur les volumes cumulés maximales de biohydrogène en présence des nanomatériaux.....	126
Tableau 3.11 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du LS , en présence de différents NPs.....	128
Tableau 3.12 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du LS brut et prétraité par chaleur en utilisant la culture pure <i>E.Coli</i>	144
Tableau 3.13 Caractéristiques physicochimiques du MC	146
Table 3.14 Comparaison de l'effet de la concentration minimale réductrice des sels métalliques sur le taux de production de biohydrogène.....	153
Tableau 3.15 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du MC , en présence de des sels de métaux.....	153
Tableau 3.16 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par cofermentation obscure du LS et MC	157
Tableau 3.17 Caractéristiques physicochimiques des PPT	159
Tableau 3.18 Taux de sucres libérés par hydrolyse enzymatique des déchets de PPT à 37 °C et pH 6 en utilisant α -Amylase, Cellulase Amylase, Cellulase et leur mélange.....	163
Table 3.19. Caractérisation du surnageant et digestat obtenus après fermentation obscure du substrat prétraité par hydrolyse enzymatique en utilisant l' α -Amylase.....	165
Tableau 3.20 Paramètres cinétiques de la production de biohydrogène par fermentation obscure des PPT brutes et prétraitées par α -Amylase.....	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Certaines technologies de production de l'hydrogène à partir de différentes biomasses.....	9
Figure 1.2 Voies biochimiques de digestion anaérobie.....	12
Figure 1.3 Principales utilisations de l'hydrogène.....	16
Figure 1.4 Méthodes de production de biohydrogène.....	18
Figure 1.5 Voies métaboliques de la photo-fermentation du glucose.....	23
Figure 1.6 Voies métaboliques de digestion anaérobie, 1 : bactéries fermentaires hydrolytiques, 2 : acidogènes, 3 : acétogènes, 4 : <i>Archea</i> méthanogènes.....	25
Figure 1.7 Voies biochimiques de production de biohydrogène par fermentation obscure.....	29
Figure 1.8 Mécanisme biochimique de biohydrogène par fermentation obscure.....	30
Figure 1.9 Représentation schématique du bioréacteur batch.....	35
Figure 1.10 Représentation schématique du bioréacteur CSTR.....	36
Figure 1.11 Représentation schématique du bioréacteur UASB.....	37
Figure 1.12 Représentation schématique du bioréacteur à lit fixe.....	38
Figure 1.13 Modélisation utilisant le modèle de <i>Gompertz modifié</i>	39
Figure 1.14 Comparaison entre le de <i>Gompertz modifié</i> et <i>modèle logistique modifié</i>	40
Figure 2.1 Bioréacteur utilisé pour la réalisation des tests de BHP.....	73
Figure 2.2 Bioréacteur utilisé pour l'essai de production de biohydrogène en discontinu.....	74
Figure 2.3 Synthèse des nanoparticules métalliques (méthode hydrothermique).....	77
Figure 2.4 Plan expérimentale suivi dans cette étude.....	84
Figure 3.1 Production cumulative de biohydrogène par fermentation obscure de EUB avec différents pré-traitements de l'inoculum (A) par ultrasons (UP) pendant 5 min (B) de pré-traitement (UP) par ultrasons pendant 15 min (C) de pré-traitement thermique (TP) pendant 5 min (D) de pré-traitement (TP) pendant 15 minutes.....	90
Figure 3.2 Équation de <i>Gompertz modifiée</i> adaptée à tous les inoculums : production cumulative d'hydrogène. (A) par ultrasons (UP) pendant 5 min (B) de pré-traitement (UP) par ultrasons pendant 15 min (C) de pré-traitement thermique (TP) pendant 5 min (D) de pré-traitement (TP) pendant 15 minutes.....	92
Figure 3.3 Équation de <i>Logistique modifiée</i> adaptée à tous les inoculums : production cumulative d'hydrogène. (A) par ultrasons (UP) pendant 5 min (B) de pré-traitement (UP) par ultrasons pendant 15 min (C) de pré-traitement thermique (TP) pendant 5 min (D) de pré-traitement (TP) pendant 15 minutes.....	92
Figure 3.4 production optimale d'hydrogène par différents inoculums prétraités en fonction du temps	94
Figure 3.5 Effet du prétraitement thermique de la culture mixte.....	95
Figure 3.6 Production cumulative (A) et production (B) de biohydrogène pendant la fermentation obscure en fonction du temps et du rapport I/S à 55 °C et du pH 5,5.....	99
Figure 3.7 Production cumulative (A) et production de biohydrogène (B) pendant la fermentation obscure en fonction de température du prétraitement thermique avec I/S=1/4 gVS/gVS à 55 °C et du pH 5,5.....	102

Figure 3.8 Production cumulative (A) et production de biohydrogène (B) pendant la fermentation obscure en fonction de la durée du prétraitement ultrasonique avec I/S=1/4 gVS/gVS à 55 °C et du pH 5,5.....	103
Figure 3.9 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS en fonction du temps à 55 °C, pH de 5,5 avec prétraitements chimiques et I/S=1/4 gVS/gVS.....	105
Figure 3.10 Mécanisme d'hydrolyse enzymatique	106
Figure 3.11 Concentration de sucres libérées par l'hydrolyse enzymatique du LS à 37 °C et à pH 6 en utilisant Lactase et glucose oxydase.....	107
Figure 3.12 Cumulative biohydrogen production during dark fermentation in function of time at 55 °C Ph 5.5 and pretreatment by <i>Lactase</i> : I/S=1/4 gVS/gVS.....	108
Figure 3.13 Histogramme comparatif entre le rendement de l'hydrogène produit à l'aide des 11 prétraitements.....	110
Figure 3.14 Les diagrammes de diffraction des rayons X des nanoparticules à base de manganèse.....	113
Figure 3.14 les diagrammes de diffraction des rayons X des nanoparticules à base de fer.....	113
Figure 3.16 DRX de nanoparticule à base de zinc.....	114
Figure 3.17 DRX de nanoparticule à base de cuivre.....	114
Figure 3.18 DRX de nanoparticule à base d'argent.....	115
Figure 3.19 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de manganèse.....	116
Figure 3.20 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de fer.....	116
Figure 3.21 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de cuivre.....	117
Figure 3.22 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de zinc.....	117
Figure 3.23 Effet de la présence des différentes nanoparticules sur la production cumulée de l'hydrogène et la production de l'hydrogène en fonction du temps et en fonction de la concentration en NPs.....	124
Figure 3.24 Mécanisme de production de biohydrogène par fermentation sombre en présence des nanoparticules inorganiques.....	125
Figure 3.25 Histogramme comparatif entre les effets de la présence des différents NPs résultants le taux maximal de production de l'hydrogène.....	127
Figure 3.26 Effet du temps de rétention hydraulique sur la production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à ph 5,5 en mode discontinue en fonction du temps.....	130
Figure 3.27 Effet du temps de rétention hydraulique sur le taux de production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à ph 5,5 en mode discontinue.....	131
Figure 3.28 Effet de la concentration de la charge organique sur la production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à pH 5,5 en mode discontinue en fonction du temps.....	134
Figure 3.29 Effet du taux de charge organique sur le taux de production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à ph 5,5 en mode discontinue.....	134
Figure 3.30 Courbe de croissance bactérienne de la souche <i>Escherichia coli</i>	136

Figure 3.31 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS par la souche pure <i>E. coli</i> en fonction du type du milieu et en fonction de la charge organique.	137
Figure 3.32 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS par la souche pure <i>E. coli</i> en fonction du temps et du pH à 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.	138
Figure 3.33 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS (prétraité thermiquement) par <i>E. Coli</i> en fonction de température de traitement à pH 6,5 et 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.....	140
Figure 3.34 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS (prétraité par ultrasons) par <i>E. Coli</i> en fonction de durée de traitement à pH 6,5 et 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.....	141
Figure 3.35 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS (prétraité chimiquement) par <i>E. Coli</i> en fonction de température de traitement à pH 6,5 et 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.....	142
Figure 3.36 Histogramme comparatif des productions cumulées de biohydrogène par la fermentation obscure du LS prétraité (par différents prétraitements physicochimiques) par <i>E. Coli</i>	143
Figure 3.37 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du MC en fonction du temps à 55 °C, pH de 5,5 et en fonction des rapports I/S du café.....	147
Figure 3.38 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du MC en fonction du temps et en fonction de la dose de sulfates de fer à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/5 gVS/Gvs.	149
Figure 3.39 Evolution de taux de production de biohydrogène en fonction de la dose des sulfates de fer.....	150
Figure 3.40 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du MC en fonction du temps et en fonction de la dose de sulfates de cuivre à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/5 gVS/gVS.....	150
Figure 3.41 Evolution de taux de production de biohydrogène en fonction de la dose des sulfates de cuivre.....	151
Figure 3.42 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du MC en fonction du temps et en fonction de la dose de sulfates d'argent à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/5 gVS/gVS.....	151
Figure 3.43 Evolution de taux de production de biohydrogène en fonction de la dose des sulfates d'argent.....	152
Figure 3.44 Effet du rapport L/C sur la production d'hydrogène cumulée (A) et (B) la production en fonction du temps.....	156
Figure 3.45 Histogramme comparatif des taux de production de biohydrogène par fermentation obscure du LS et MC en fonction du rapport L/C	156
Figure 3.46 Production cumulée (A) et production (B) de biohydrogène pendant la fermentation obscure des PPT en fonction du rapport I/S à 55 °C et du pH 5,5.....	161
Figure 3.47 Taux de sucres libérés par hydrolyse enzymatique des déchets de PPT à 37 °C et pH 6 en utilisant α -Amylase, Cellulase Amylase, Cellulase et leur mélange.....	162
Figure 3.48 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS en fonction du temps à 55 °C et pH 5,5 sans et avec prétraitement par α -Amylase : I/S=1/6 gVS/gVS.....	164

Liste des abréviations

ADH : alcool déshydrogénase	MC : Marc de café
AGV : Acide Gras Volatile	MES : Matière En Suspension
AVT : Acidité Volatile Totale	NAD⁺ : Nicotinamide adenine dinucleotide
BESA : 2-bromo-éthane-sulfonate acide	ORL : taux de charge organique
BH : Bactéries productrices d'hydrogène	pH : Potentiel Hydrique.
BHP : Potentiel Biochimique d'Hydrogène	PPT : Pelures de Pomme de Terre.
BSA : Albumine Sérique Bovine.	PSI : Système Photosynthétique I.
BSR : Bactéries sulfato-réductrices	PSII : Système Photosynthétique II.
DBO : Demande Biochimique en Oxygène	R_m : cinétique de production d'hydrogène
DCO : Demande Chimique en Oxygène	S : Substrat
DGPS : génération de souche productrice en obscurité.	SRT : temps de rétention des solides
DD : Degré de désintégration.	TA : Titre Alcalimétrique.
DO : Densité Optique.	TAC : Titre Alcalimétrique Complet.
EUB : Eau usée de Bourgoul	TP5 : prétraitement thermique pendant 5 min
F420 : Fermentation obscure	TP15 : prétraitement thermique pendant 15 min
FO : Fermentation obscure	TS : Solides Totaux.
GO : Glucose Oxydase	TSS : Solides totaux suspendus
H_{max} : production maximale d'hydrogène	TVS : Solides Volatile Totaux.
gVS : gram de matière volatile en suspension	UV : Ultra-Violet.
HRT : temps de rétention hydraulique	UP5 : prétraitement ultrasonique pendant 5 min
I : Inoculum	UP15 : Prétraitement ultrasonique pendant 15 min
LS : <i>Lactosérum</i>	λ : durée d'adaptation,

RESUME

La production de biohydrogène par fermentation obscure est considérée comme voie prometteuse permettant l'utilisation d'énergie propre et renouvelable ; parallèlement les déchets municipaux et industriels générés quotidiennement en quantités élevées présentent un immense problème de pollution environnementale. Cette étude est concentrée sur la valorisation de quatre déchets (les eaux usées industrielles de Bourgoul, les eaux usées de l'industrie laitière, le marc de café et les pelures de pomme de terre) en biohydrogène par culture mixte ainsi que l'amélioration des taux de production obtenus par différentes techniques : prétraitements physicochimiques et biologiques du substrat, la catalyse par les nanoparticules métalliques, la cofermentation ainsi que l'utilisation d'une culture pure productrice d'hydrogène (*Escherichia coli*) ; l'effet inhibiteur de quelques sels métalliques a été aussi évalué. L'analyse cinétique des résultats expérimentaux a été réalisée par les modèles du *GOMPERTZ* et *LOGISTIQUE* modifiés.

Les résultats expérimentaux ont montré que tous les substrats bruts utilisés peuvent être valorisés en biohydrogène avec des taux de 143.72, 178.89, 210.13, 282.61 mL/gVS générés par les eaux usées de l'industrie laitière, les eaux usées industrielles de Bourgoul, les pelures de pomme de terre et le marc de café respectivement ; les essais d'amélioration du taux de production de biohydrogène ont été réussis avec succès avec un maximum d'amélioration par le prétraitement enzymatique de 4,236 et 8,27 fois en utilisant les eaux de l'industrie laitière, les pelures de pomme de terre respectivement. Il a été aussi observé que la présence des nanoparticules métalliques dans le milieu de fermentation des eaux de l'industrie laitière améliore le rendement de production jusqu'à 5,4 fois en utilisant les nanoparticules d'oxyde de cuivre. L'essai d'amélioration par cofermentation des eaux de l'industrie laitière et le marc de café a conduit à une amélioration de 2,65 fois. Enfin l'utilisation de la culture pure (*Escherichia coli*) a résulté un rendement moyennement faible de production de biohydrogène et son utilisation combinée par le prétraitement thermique du substrat a donné lieu à l'augmentation de du taux d'amélioration de 0,76 fois. La présence des sels de métaux dans le milieu de fermentation obscure du marc de café a engendré des toxicités variées de la culture productrice d'hydrogène avec des différences dues à leur nature différente.

La modélisation des résultats expérimentaux a montré une bonne approche et une excellente détermination de l'évolution de la production cumulée d'hydrogène et le modèle *GOMPERTZ* modifié a été le plus approprié.

Mots clés : biohydrogène, fermentation obscure, culture mixte, *Escherichia coli*, déchets alimentaires.

ABSTRACT

The biohydrogen production by dark fermentation is seen as a promising way to use clean and renewable energy; at the same time, municipal and industrial waste generated daily in high quantities presents a huge problem of environmental pollution. This study focuses on the recovery of four wastes (BOURGOUL industry waste water, dairy industry waste water, coffee grounds and potato wastes) to biohydrogen by mixed culture as well as the improvement of production yields obtained by different techniques : physicochemical and biological pretreatment of the substrate, catalysis by metallic nanoparticles, co-fermentation and the use of a pure hydrogen-producing strain (*Escherichia coli*); the inhibitory effect of some metal salts was also evaluated. Kinetic analysis of the experimental results was fitted by the modified *GOMPERTZ* and *LOGISTIQUE* models.

The experimental results showed that all raw substrates used can be upgraded to biohydrogen with yields of 143.72, 178.89, 210.131, 282.61, 178.89 mL/gVS generated by the water of the dairy industry waste water, Bourgoul industry waste water, Potato wastes and Coffee grounds respectively ; The improve assays of biohydrogen production rate have been successful with a maximum improvement by enzymatic pretreatment of 4,236 and 8,27 times using dairy industry waste water and potato wastes respectively. It was also observed that the presence of metal nanoparticles in the fermentation medium of dairy industry waste water improves production efficiency by up to 5.4 times using copper oxide nanoparticles. Improvement test by co-fermentation of dairy industry waste water and coffee grounds mixture waters of the dairy industry and coffee grounds led to an improvement of 2.6518 times. Finally, the use of pure culture (*Escherichia coli*) resulted in a moderately low yield of and its combination use by heat pretreatment of the substrate resulted in an increase in the improvement yield by 0.76 times. The presence of metal salts in the dark fermentation medium of coffee grounds has led to toxicities of the hydrogen-producing culture with differences due to their different nature.

The modelling of the experimental results showed a good approach and determination of the evolution of the cumulative hydrogen production and the modified *GOMPERTZ* model was the most appropriate.

Keywords: biohydrogen, dark fermentation, mixed culture, *Escherichia coli*, food waste.

ملخص

يعد إنتاج الهيدروجين الحيوي عن طريق التخمير المظلم وسيلة واعدة لاستخدام الطاقة النظيفة والمتجددة ؛ في الوقت نفسه، تمثل النفايات الغذائية والصناعية المتولدة يوميًا بكميات كبيرة مشكلة كبيرة من التلوث البيئي. تركز هذه الدراسة على استعادة أربعة نفايات (مياه الصرف الصناعي للبرغل، ومياه الصرف لصناعة الألبان، وبقايا طهي البن وقشور البطاطس) إلى الهيدروجين الحيوي عن طريق التخمير المظلم وكذلك تحسين معدلات الإنتاج التي يتم الحصول عليها بواسطة تقنيات مختلفة المعالجة الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية للركيزة، والتحفيز بواسطة الجسيمات النانوية المعدنية، والاقتحام المشترك واستخدام صنف واحد من بكتيريا منتجة للهيدروجين (الإشريكية القولونية) ؛ كما تم تقييم التأثير المثبط لبعض الأملاح المعدنية قد أجري تحليل حركي للنتائج التجريبية بواسطة نموذجي LOGISTIQUE وGOMPERTZ المعدلين.

أظهرت النتائج التجريبية أنه يمكن تحويل جميع الركائز الخام المستخدمة إلى الهيدروجين الحيوي بمعدلات 143.72 و 178,89 و 210.13 و 282.6087 مل/غ من المادة المعلقة القابلة للتبخار الناتجة عن مياه الصرف لصناعة الألبان الصرف الصناعي للبرغل و بقايا طهي البن وقشور البطاطس على التوالي.

نجحت اختبارات تحسين معدل إنتاج الهيدروجين الحيوي بأقصى قدر من التحسن عن طريق المعالجة المسبقة الإنزيمية بمقدار 4,236 و 8,27 مرة باستخدام مياه الصرف لصناعة الألبان، قشور البطاطس على التوالي. كما لوحظ أن وجود الجسيمات النانوية المعدنية في وسط التخمير لمياه الصرف لصناعة الألبان يحسن كفاءة الإنتاج بما يصل إلى 5.4 مرة باستخدام جسيمات أكسيد النحاس النانوية. أدت تجربة التخمير المختلط لمياه الصرف لصناعة الألبان إلى تحسن 2.65 مرة. أخيرًا، أدى استخدام البكتيريا النقية إلى انخفاض محصول معتدل، وأدى استخدامه مجتمعًا مع المعالجة المسبقة الحرارية للركيزة إلى زيادة في مقدار 0.76 مرة. كما أدى وجود الأملاح المعدنية في وسط التخمير المظلم لبقايا القهوة إلى تسمم البكتيريا المنتجة للهيدروجين بدرجات مختلفة بسبب طبيعتها المختلفة. كما أظهرت نمذجة النتائج التجريبية نهجًا جيدًا وتصميمًا لتطور الإنتاج التراكمي للهيدروجين وتحديد تطور الإنتاج التراكمي للهيدروجين بينت نمذجة النتائج التجريبية أن النهج الجيد ونموذج GOMPERTZ المعدل هو الأنسب.

الكلمات المفتاحية : الهيدروجين الحيوي، التخمير المظلم ، البكتيريات المختلطة، الإشريكية

القولونية، نفايات الطعام.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Actuellement, le monde est confronté à la fois à la pénurie de combustibles fossiles et au changement climatique mondial, la demande mondiale d'énergie augmente en raison de la croissance démographique, de l'industrialisation progressive, du développement des technologies et de la pollution de l'environnement (Lee et al., 2010)(Steyer et al., 2010). La majorité de l'énergie totale est produite par l'exploitation des combustibles fossiles (sources non renouvelable) et sa combustion libère dans l'atmosphère des polluants qui causent des problèmes de santé et des changements climatiques (Ayhan Demirbas, 2008). Il est généralement cru que le changement climatique est lié à l'augmentation rapide des dommages causés par les catastrophes naturelles au cours des dernières années et aux conséquences du réchauffement climatique, qui est causé par l'augmentation rapide des concentrations en de gaz à effet de serre (CO₂ et autres) dans l'atmosphère, émis principalement par la combustion de combustibles fossiles contenant du carbone comme le charbon, le pétrole et le gaz naturel. L'assurance de l'approvisionnement futur en énergie et l'aide à prévenir les effets négatifs du changement climatique (les changements des précipitations et des tendances saisonnières dans de nombreuses régions, les changements dans l'intensité et les tendances des phénomènes météorologiques extrêmes, l'élévation du niveau de la mer et l'augmentation des risques existants d'extinction des espèces et de perte de biodiversité), la communauté mondiale doit changer la façon dont elle utilise et génère l'énergie transportée. Des alternatives moins nocives sont nécessaires de toute urgence pour remplacer les combustibles fossiles non renouvelables. Aussi, l'utilisation d'énergie propre comme l'énergie éolienne, solaire, l'hydrogène, la biomasse, etc. suscite beaucoup d'attention ces dernières années (Keskin, Arslan, & Nalakth, 2018).

Dans la catégorie de l'énergie propre, l'hydrogène et le méthane produits à partir de déchets organiques et de résidus à l'aide du processus de digestion anaérobie pourraient jouer un rôle important dans l'économie énergétique future en tant qu'énergie écologique, renouvelable, durable et bon marché, mais le méthane pose l'inconvénient de génération du CO₂ lors de sa combustion. De nos jours, l'hydrogène est utilisé dans de nombreux domaines industriels tels que l'hydrogénation des huiles végétales, la production d'ammoniac, d'alcools et d'aldéhydes, le raffinage des combustibles fossiles, etc.(Emilio & Miranda, 2019). En outre,

il peut être utilisé dans les moteurs à combustion interne ou les cellules chimiques pour produire de l'électricité (André et al., 2019).

L'hydrogène est considéré comme l'un des principaux vecteurs d'énergie à l'avenir, car il a un contenu énergétique élevé 142 kJ/g supérieur à celui des hydrocarbures et sa conversion est efficace en puissance utilisable, l'absence de génération de gaz à effet de serre lors de la combustion (l'eau est le seul produit de la combustion de l'hydrogène) et son applicabilité polyvalente (Baykara, 2018) et peut surmonter les problèmes de pollution atmosphérique et de réchauffement climatique causés par les combustibles fossiles (Muradov et Vezirog lu, 2008). Aussi l'hydrogène ne se présente pas naturellement sous forme moléculaire sous forme d'hydrogène gazeux et est donc classé comme porteur plutôt que comme source d'énergie, par conséquent, il est seulement aussi écologique que le procédé utilisé pour sa production (Marbán & Valdés-Solís, 2008) à l'heure actuelle, la grande majorité de l'hydrogène est produite de façon non durable à partir de ressources fossiles grâce à des procédés énergivores et écologiquement nocifs.

Principalement, il peut être obtenu par différents procédés chimiques et physiques tels que reformage à la vapeur ou craquage thermique à partir du gaz naturel, gazéification du charbon, pyrolyse ou gazéification de la biomasse, électrolyse et photolyse de l'eau, l'oxydation partielle du mazout et la gazéification du charbon et par processus biologique à partir de déchets organiques (By, 2014)(Dincer & Acar, 2014). La plupart de ces processus de production de H₂ sont très énergivores et/ou dépendent des combustibles fossiles. En outre, les technologies physiques et chimiques ne réduisent pas la consommation de combustibles fossiles ou les émissions de CO₂, cela ne fait que déplacer le point des émissions de dioxyde de carbone vers les industries productrices de H₂ à partir des émissions des véhicules ou des émissions des centrales à hydrogène stationnaires, ce qui les rend moins attrayantes du point de vue environnemental. D'autre part, l'hydrogène produit par processus biologiques par les algues ou les bactéries, aussi appelé biohydrogène, devrait être moins énergivore et peut être produit par des sources renouvelables et semble être le moyen le plus approprié pour la production de biohydrogène attirant l'attention du monde entier, en raison de son potentiel en tant qu'inépuisable, peu coûteux et source renouvelable d'énergie propre (Ren et al., 2009) (Hallenbeck & Ghosh, 2009). Le biohydrogène comprend principalement

la production de biohydrogène photosynthétique et de biohydrogène anaérobie, comparativement à la méthode photosynthétique, le biohydrogène anaérobie est plus faisable et largement utilisé, car il peut être produit à des taux plus élevés et son grand avantage est la valeur négative des déchets organiques qui peuvent être valorisés pour la production d'énergie renouvelable avec le traitement (Giuliano et al., 2013). D'autre part, la fermentation obscure est un processus biologique qui produit de l'énergie renouvelable à partir de la fraction organique en l'absence d'oxygène et de l'énergie lumineuse comme dans les procédés de photo-fermentation.

Plusieurs groupes de microorganismes peuvent être distingués par la fermentation obscure, ils dégradent les composés organiques complexes présents dans les déchets solides ou les eaux usées en produits plus simples (hydrogène, dioxyde de carbone). De cette façon, la teneur en matières biodégradables des déchets ou les eaux usées qui sont des sources d'énergie renouvelables peut être réduite et stabilisée (Stoeglehner et al., 2016).

Récemment, la recherche sur la production de biohydrogène anaérobie s'est concentrée sur le système de microflore mixte, car ce système est simple à utiliser, facile à contrôler et a une source plus large de matières premières, comme les déchets lignocellulosiques (Lay, 2001; Fang et Liu, 2002).

La fermentation obscure est plutôt une alternative biologique respectueuse de l'environnement qui permet l'utilisation de flux de déchets organiques comme substrats pour la production d'hydrogène (G. Kumar, Mudhoo, et al., 2016), elle est largement considérée comme le processus le plus prometteur de production biohydrogène (Arimi et al., 2015), amélioration de la performance des processus est requis pour une application économiquement viable à l'échelle industrielle à des taux de production élevées (Patel et al., 2016).

Cette thèse portait sur l'essai de la production d'hydrogène par fermentation obscure de différents substrats disponibles en un grand volume à l'environnement, quatre substrats ont été utilisés : les eaux usées industrielles du Bourgoul, le lactosérum, le marc de café et les pelures de pomme de terre.

Les objectifs principaux de cette thèse étant la mise en œuvre de la production de biohydrogène et l'amélioration de rendement de production par différentes techniques : la sélection des bactéries productrices d'hydrogène, les prétraitements (physicochimique et biologique) du substrat, la catalyse par nanoparticules métalliques, la co-fermentation ainsi que l'utilisation d'une culture pure productrice d'hydrogène, L'effet inhibiteur de quelques sels métalliques a été aussi évalué.

La production de biohydrogène en mode discontinue a été aussi évalué.

La présente thèse est organisée de la manière suivante :

- Le premier chapitre 'Synthèse bibliographique' est réparti en trois parties :
 - **Partie A** : Sources d'énergies renouvelables : opportunités et défis pour la production d'énergie ;
 - **Partie B** : L'hydrogène : historique, utilisations et voies de production ;
 - **Partie C** : Production de biohydrogen par fermentation obscure.
- Le deuxième chapitre 'matériel et méthodes' représente le matériel utilisé ainsi que les méthodes suivies au cours de cette étude.
- Le troisième chapitre englobe les résultats et discussions réparti en six parties :
 - **Partie A** : Production de biohydrogène par fermentation obscure des eaux usées industrielles du Bourgoul ;
 - **Partie B** : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Lactosérum ;
 - **Partie C** : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Lactosérum en utilisant la culture pure : *Escherichia coli* ;
 - **Partie D** : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Marc du café ;
 - **Partie E** : Production de biohydrogène par co-fermentation obscure du Lactosérum et du marc de café ;
 - **Partie F** : Production de biohydrogène par fermentation obscure de pelure de pomme de terre ;

Enfin l'étude se termine par une conclusion générale qui résumera les différents résultats obtenus ainsi que les perspectives apportant une large vision sur le poursuit de recherche dans cet axe à l'avenir.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie A : Sources d'énergies renouvelables : opportunités et défis pour la production d'énergie

Introduction

En raison de la forte demande énergétique et l'augmentation rapide de la consommation mondiale d'énergie, les réserves de combustibles fossiles s'épuisent de plus en plus et les prix de l'énergie augmentent en flèche, surtout au cours de ces dernières années. Pendant ce temps, avec les préoccupations croissantes sur la protection de l'environnement, il y a des réglementations plus strictes sur les émissions de polluants, celles les plus importantes considérées dans l'industrie de la production d'électricité, en raison de leurs effets très nocifs sur l'environnement, les plus toxiques sont les oxydes de soufre et les oxydes d'azote. Ces émissions peuvent être modélisées au moyen de fonctions qui associent les émissions à la production d'électricité pour les unités de production conventionnelle. Outre la pollution de l'environnement, le réchauffement de la planète est un autre problème qui préoccupe largement la communauté internationale dans le climat politique actuel, autre qu'il est devenu un défi très urgent. L'activité humaine a aggravé les émissions de gaz à effet de serre, parce que la majeure partie de dioxyde de carbone est produite par la combustion du charbon, du pétrole et du gaz. Par conséquent, la température à la surface de la terre a augmenté d'environ 0,6 °C depuis la fin du XIXe siècle et d'environ 0,2 °C à 0,3 °C au cours des 25 dernières années selon ANOA (l'Administration nationale des études océaniques et atmosphériques). Cependant, la consommation de l'électricité continue à croître de façon extraordinaire à l'échelle mondiale, de nombreux pays ont fixé des objectifs pour réduire les émissions de dioxyde de carbone afin de prévenir ou de ralentir le réchauffement climatique. Essentiellement, il y a deux grandes façons pour atteindre ces objectifs visés, soit par la mise en œuvre de mesures d'économie d'énergie ou par l'utilisation généralisée des énergies renouvelables qui ont un impact environnemental beaucoup plus faible que les sources d'énergies conventionnelles, produisant peu ou pas d'émissions du dioxyde de carbone, de particules et de dioxyde de soufre. Aujourd'hui, il est devenu également faire face à la crise environnementale causée par les changements climatiques et les émissions de gaz à effet de serre/polluants. La mise au point de technologies énergétiques renouvelables rendra non

seulement l'indépendance énergétique possible, mais elle protégera notre planète et offrira un environnement plus sain aux êtres humains. De nos jours, des spécialistes dans les domaines pertinents apportent une vaste expertise pour accroître radicalement l'utilisation des énergies renouvelables et des carburants de remplacement. La plupart des énergies renouvelables proviennent directement ou indirectement du soleil, de sorte que les ressources énergétiques ne seront pas épuisées dans un avenir prévisible. En outre, la sécurité énergétique d'un pays peut être considérablement améliorée en utilisant pleinement l'énergie renouvelable en raison de sa dépendance réduite aux combustibles fossiles importés. Dans cette partie, les caractéristiques de plusieurs sources d'énergie de remplacement sont examinées. Outre la production traditionnelle au moyen de combustibles, les sources d'énergie renouvelables y compris les éoliennes, les panneaux solaires, l'énergie des vagues et des marées, la biomasse, les piles à combustible et l'énergie géothermique, sont abordées dans cette section.

I.A.1. Energie solaire

L'énergie solaire est une énergie alternative très favorable aux combustibles fossiles. Elle est obtenue à partir du soleil et définie comme une source renouvelable la plus abondante et la plus propre disponible. Avec une petite partie du rayonnement total (3,850,000 en Joule par an) (Panwar et al., 2011) du soleil qui pourrait être capturée, il serait suffisant pour répondre à la demande d'énergie actuelle (748 en joules par an en 2018) (Kulasekara, Vaithehi, 2019).

Plusieurs technologies sont utilisées pour exploiter l'énergie provenant de rayonnement solaire afin de produire de l'électricité, de l'énergie thermique, de répondre aux besoins d'éclairage direct et, éventuellement de produire des combustibles qui pourraient être utilisés pour le transport et pour d'autres fins. Bien que l'énergie solaire ait un grand potentiel, elle ne suffit plus à remplacer les combustibles fossiles en raison de ses coûts d'investissement initiaux élevés et des grandes superficies nécessaires à son application.

I.A.2. L'énergie géothermique

L'énergie géothermique peut être interprétée comme la « chaleur de la terre » en clair, elle peut être utilisée pour produire de l'énergie propre. Elle est plus compétitive dans les pays qui ont restreint les ressources en combustibles fossiles. En outre pour la production

d'électricité, elle a connu une croissance rapide dans le monde entier, atteignant environ 8 000 MW/an. La hausse récente des prix de l'énergie et ses fluctuations considérables ont rendu cette énergie plus attrayante sur le plan économique (Kulasekara, Vaithehi, 2019).

I.A.3. Hydroélectricité

L'hydroélectricité exploite l'énergie de l'eau qui passe des hautes aux basses altitudes, en utilisant des moteurs principalement pour produire de l'électricité. Les projets hydroélectriques englobent les projets de barrages avec réservoirs. L'hydroélectricité présente de nombreux avantages tels que la production de l'électricité et elle s'agit de la deuxième source d'énergie renouvelable importante après la biomasse. Les technologies hydroélectriques sont arrivées à la maturité. L'exploitation des réservoirs hydroélectriques reflète souvent leurs multiples utilisations, par exemple, l'eau potable, l'irrigation, le contrôle des inondations et des sécheresses, la navigation, ainsi que l'approvisionnement en énergie (Panwar et al., 2011). Il y a encore quelques obstacles à la production d'hydroélectricité, p. ex., des coûts d'investissement élevés pour les bâtiments et les étangs d'eau qui nécessitent beaucoup d'espace et peuvent avoir un impact négatif sur l'environnement. Mais une fois installé, elle a un coût d'exploitation relativement faible et présente une source d'énergie très propre (Robert Foster et al., 2011).

I.A.4. Énergie éolienne

L'énergie éolienne est utilisée depuis de nombreuses années. Initialement, elle n'était utilisée que pour propulser les bateaux, mais depuis 1880, l'énergie éolienne a été mise en place pour produire de l'électricité (Ottmar et al., 2011). C'est un autre type d'énergie solaire, puisque le vent est engendré lorsque le soleil brille en réchauffant l'atmosphère ensuite la création d'un gradient de température. La production d'électricité à partir de l'énergie éolienne est presque entièrement développée et concurrentielle par rapport à d'autres sources d'énergies renouvelables. Le vent est une technologie sans pollution qui est utilisé dans de nombreux endroits en monde. Cette énergie est convertie en énergie électrique ou mécanique par des éoliennes qui créent de l'énergie en actionnant une génératrice (Panwar et al., 2011).

Il y a peu de défauts concernant l'utilisation de l'énergie éolienne, le coût de construction et d'installation des turbines est encore plus élevé que pour les génératrices (générateurs)

utilisées pour les combustibles fossiles ainsi que l'instabilité des sources d'énergie. En outre, elle a été critiquée en raison de perturbation environnementale de la faune, en particulier des oiseaux, ainsi qu'en raison du bruit et des effets visuels (Ottmar et al., 2011).

I.A.5. Énergie océanique

L'énergie océanique provient de l'énergie potentielle, cinétique, thermique et chimique de l'eau de mer, qui peut être transformée pour fournir de l'électricité et de l'énergie thermique. Un large éventail de technologies est possible, comme des barrages pour la plage des marées, des turbines sous-marines pour les courants de marée et d'océans, des échangeurs de chaleur pour la conversion de l'énergie thermique de l'océan. Il existe une variété de dispositifs pour exploiter l'énergie des vagues et des gradients de salinité. Les technologies océaniques, à l'exception des barrages de marée, sont en phases de démonstration et de projet pilote. Certaines technologies ont des profils de production d'énergies variables avec des niveaux de prévisibilité différents (p. ex., ondes, plage de marée et de courant), tandis que d'autres peuvent être presque constants, voire des exploitations contrôlables (p. ex., gradient thermique et salin de l'océan) (Ottmar et al., 2011).

I.A.6. Bioénergie (biocarburant) de la biomasse

La biomasse est une matière organique produite par les plantes, les animaux et les micro-organismes. L'énergie solaire est convertie en matière organique (p. ex., glucides d'un cycle de carbone court comme les sucres, l'amidon et la cellulose) par les plantes vertes, les algues et les bactéries photosynthétiques (*Gold Book*, 2012). Pendant la photosynthèse, les glucides de la biomasse répondent à l'oxygène et forment du dioxyde de carbone et de l'eau. Lorsqu'il brûle complètement, la même quantité de dioxyde de carbone se forme puisqu'il est fixé pendant sa croissance. La principale différence avec les combustibles fossiles est le court cycle de carbone. Il y a des millions d'années, le carbone de ce carburant est extrait du cycle de carbone contrairement au cycle court de carbone (Panwar et al., 2011). En général, la biomasse désigne la matière végétale cultivée pour être utilisée comme biocarburant ainsi que les déchets biodégradables qui peuvent être brûlés comme combustible. Il comprend principalement les solides, les biocarburants, le biogaz, les gaz d'enfouissement et le gaz des stations d'épuration des eaux usées (Ottmar, 2011).

La biomasse est une forme d'énergie durable, mais elle contribue de même au réchauffement de la planète. Si elle est brûlée directement sans avoir prendre les mesures appropriées de traitement des effluents, elle cause des problèmes de pollution environnementale. Sur la base des technologies actuelles, la production de combustibles liquides à partir de la biomasse n'est pas suffisamment rentable en raison des dépenses occasionnées par la production de biomasse associée à son procédé de conversion en alcools (Xuan et al., 2009). D'ici 2030, l'énergie électrique alimentée à la biomasse devrait répondre à 2 % de la demande mondiale totale d'énergie (Nath & Das, 2003).

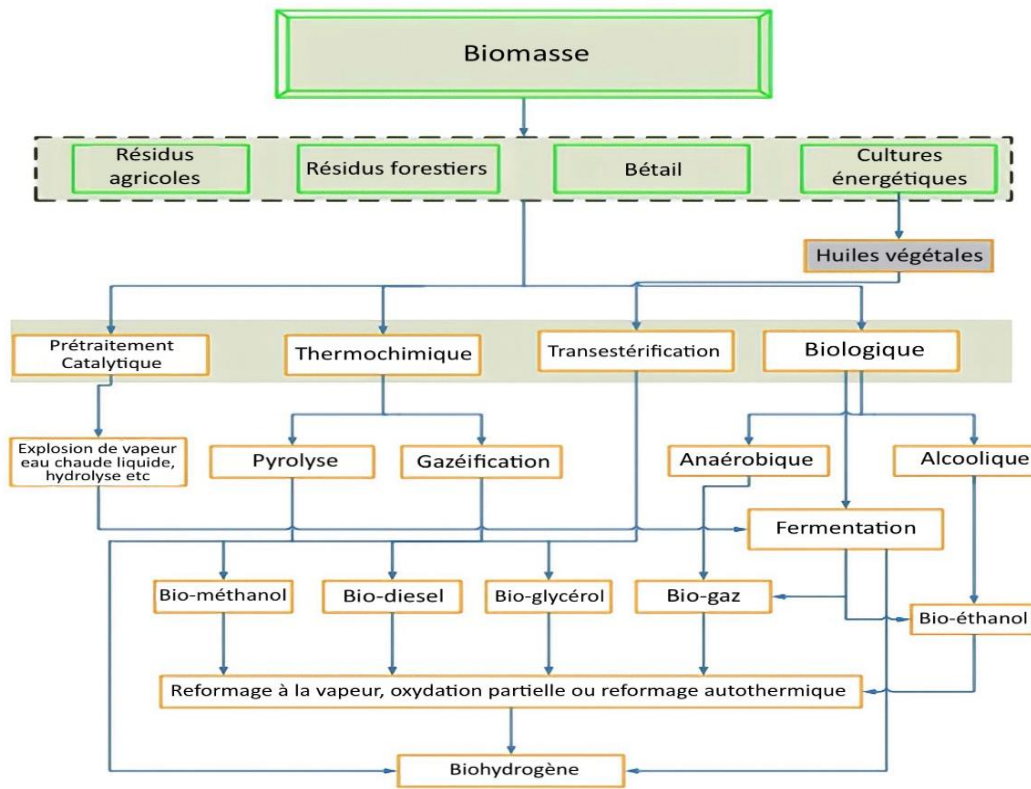


Figure 1.1 Certaines technologies de production de l'hydrogène à partir de différentes biomasses (Xuan et al., 2009).

I.A.6.1. Bioéthanol

Le bioéthanol est un bio carburant le plus couramment produit dans le monde. Il s'agit également d'une ressource potentielle d'énergie renouvelable. Le bioéthanol est un liquide incolore, inflammable et volatil à une température d'ébullition de 78,4 °C et gèle à -114,1 °C (*Compendium of Chemical Terminology Volume 64 (Gold Book)*, 2012). Le bioéthanol, le propanol et le butanol sont appelés 'bioalcools'. Bien que ce dernier soit le biocarburant le plus courant, en raison de sa production élevée au niveau mondial, il est ainsi considéré comme le meilleur remplacement de l'essence, car il peut être facilement utilisé par les moteurs à essence normaux présents dans la plupart des voitures et produira plus d'énergie lorsqu'une fois brûlé. Le bioéthanol a un indice d'octane très élevé, il se brûle rapidement et il possède une température d'évaporation plus élevée que celle de l'essence. Ces facteurs entraînent un taux de compression plus élevé et une combustion plus courte, ce qui améliore l'efficacité énergétique par rapport à l'essence (Panwar et al., 2011).

L'utilisation du bioéthanol comme additif dans l'essence augmente régulièrement avec un mélange commun à 10 % d'éthanol et 90 % d'essence. Des concentrations plus élevées d'éthanol, par exemple 85 %, nécessitent des moteurs et voitures hybrides. En outre, la proportion d'oxygène dans l'éthanol est plus élevée que celle formée principalement par une combustion incomplète. L'utilisation du bioéthanol comme carburant présente plusieurs inconvénients, l'énergie libérée par la combustion de l'éthanol est seulement 65-69% de l'énergie libérée par la combustion de la même quantité d'essence. En outre, l'éthanol a un faible point flamme et une faible pression de vapeur qui se traduit par des difficultés d'allumage du moteur à froid. Malgré ces inconvénients, le bioéthanol est considéré comme un biocarburant attrayant qui est renouvelable et qui réduit les émissions de gaz à effet de serre (NO_x, SO_x, CO et CO₂) (Umamaheswari et al., 2017).

I.A.6.2. Biodiesel

Le biodiesel est une énergie produite par transestérification enzymatique ou chimique d'huiles végétales ou de graisses animales (Panwar et al., 2011). Sa production provient principalement de plantes riches en huile, comme l'huile de colza et le soja, mais aussi d'algues, ce qui constitue une option viable. Les espèces d'algues peuvent dériver de petits

organismes unicellulaires (microalgues) à des organismes multicellulaires de structures complexes. Le rapport lipidique/huile en poids des algues varie considérablement (de 2 à 70 %), mais il se manifeste le plus élevé chez les organismes vivants. La composition du biodiesel est assez semblable à celle du diesel fossile et elle se compose principalement d'esters éthyliques et d'acides gras. Le biodiesel a théoriquement 5 à 8 % moins d'énergie que le diesel conventionnel. Cependant, en raison des meilleures propriétés de lubrification, la différence d'énergie réelle n'est que de 2 % inférieure, soit environ 35 MJ/L (Edenhofer, 2011).

I.A.6.3. Biogaz

Le biogaz est produit par digestion anaérobie de la biomasse et se compose principalement de méthane et de CO₂. Ce gaz peut être utilisé par un système combiné de chaleur et de gaz pour produire de la chaleur et de l'électricité, ou peut être utilisé directement comme carburant pour voitures, ou pour la cuisine et le chauffage. Pour cette dernière application, le biogaz peut être mélangé au réseau de gaz naturel, mais il doit d'abord être purifié. Une possibilité intéressante est de mélanger le fumier et les résidus de culture pour produire du biogaz dans les fermes. Le méthane est un gaz inodore composé d'un atome de carbone et de quatre atomes d'hydrogène (CH₄). Il est produit naturellement comme une partie du gaz naturel provenant du sol : il est produit microbiologiquement par des méthanogènes dans des environnements anaérobies comme les marécages, dans les décharges et dans les systèmes digestifs de nombreux animaux. Il est plus léger que l'air, très inflammable et non toxique, sauf s'il est présenté en grandes quantités dans des espaces clos où il peut causer la suffocation.

Le méthane est considéré comme un gaz à effet de serre : il a un effet de serre de 21 fois plus que le dioxyde de carbone (CO₂). Le biogaz (CH₄ et CO₂) produit dans les décharges est collecté depuis de nombreuses années et utilisé soit directement comme source d'énergie (combustion), soit le méthane est séparé du CO₂ (et d'autres gaz) et utilisé comme carburant pour les véhicules. Plus couramment, le méthane est produit par digestion anaérobie à partir des eaux usées et des résidus agricoles, et il a été largement appliqué à la fois dans des installations pilotes et à grande échelle, principalement au Danemark et en Allemagne (*Gold Book*, 2012).

La forte proportion de la production du méthane par digestion anaérobie provient de l'utilisation de l'acétate et de l'hydrogène par des bactéries méthanogènes. Le clivage acéticlastique de l'acétate et la réduction du CO₂ sont les deux principales voies de production du méthane. Les voies de fermentation des acides propioniques et butyriques n'ont qu'une contribution mineure à la production du méthane. Il existe trois principaux groupes de bactéries méthanogènes, dont les méthanogènes hydrogéntrophes, acétotrophes et méthylotrophes. Les méthanogènes hydrogéntrophes utilisent l'hydrogène pour convertir le CO₂ en méthane, les méthanogènes acétotrophes dégradent l'acétate en méthane et en CO₂, tandis que les méthanogènes méthylotrophes se développent sur des substrats qui contiennent de groupe méthyle, y compris le méthanol et les méthylamines. Les méthanogènes acétotrophes se reproduisent plus lentement que les méthanogènes hydrogéntrophes et ils sont affectés par l'accumulation d'hydrogène. Le maintien d'une faible pression partielle d'hydrogène dans un digesteur anaérobie est donc favorable à l'activité des méthanogènes acétotrophes (Ottmar, 2011).

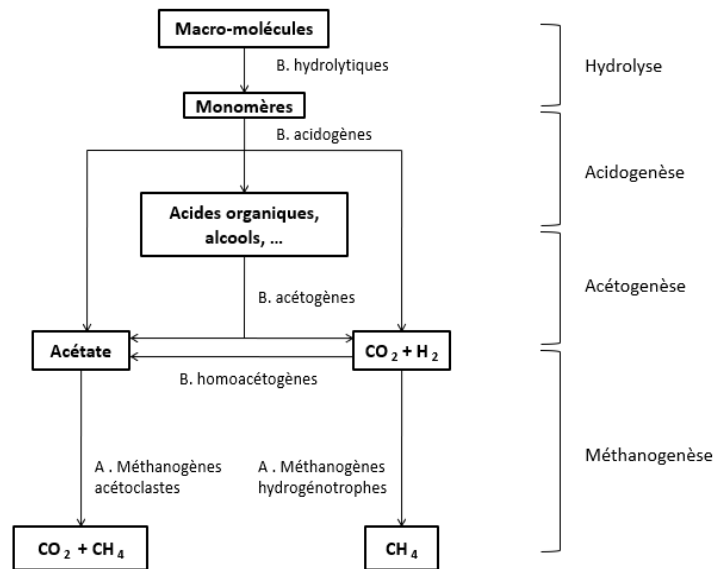


Figure 1.2 Voies biochimiques de digestion anaérobie adaptée d'après (Moletta,2002).

I.A.6.4. Biohydrogène

L'utilisation de la biomasse renouvelable comme matière première importante pour la production d'hydrogène a fait l'objet d'une attention considérable ces dernières années. Deux types de biomasse peuvent être convertis en hydrogène (Nath & Das, 2003) : les cultures bioénergétiques et les résidus moins coûteux, tels que les déchets organiques issus de l'agriculture traditionnelle et de la transformation du bois (résidus de biomasse). En particulier, comme on l'avait représenté dans la **figure 1.1**, le processus de production d'hydrogène à partir de la biomasse peuvent être divisées en deux voies principales thermochimiques et biologiques. Ce processus peut impliquer différentes voies basées sur la biomasse pour la production de biohydrogène par exemple via des réactions de reformage (reformage autothermique, reformage à la vapeur et reformage à la vapeur oxydative partielle) (By, 2014). Le système de production d'hydrogène se diffère de la biomasse et d'autres sources, il sera discuté plus tard dans ce chapitre, partie C.

Partie B : L'hydrogène : historique, utilisations et voies de production

Introduction

L'hydrogène est l'élément chimique le plus simple, le plus léger et le plus abondant existant dans la nature. Cependant, l'hydrogène n'est jamais trouvé sous sa forme élémentaire pure, mais il est largement distribué dans la matière organique par des liaisons covalentes avec, principalement, des atomes de carbone, d'oxygène et d'azote. Seul le gaz d'hydrogène diatomique, appelé H₂, correspond à la forme pure de l'hydrogène mais il est rarement trouvé dans la nature, avec une abondance inférieure à 1 ppm dans l'atmosphère. L'hydrogène gazeux a été observé pour la première fois au début du 16^{ème} siècle par Henry Cavendish, un scientifique britannique, qui a trempé les métaux dans des acides forts. Cet étrange gaz hautement inflammable qui forme de l'eau après combustion a ensuite été appelé « gaz hydrogène » comme équivalence de « gaz hydroformant ». Plus tard, dans le roman « L'île mystérieuse » publié en 1874, Jules Verne a imaginé l'utilisation de l'hydrogène comme source d'énergie de substitution, mais ce n'est pas une définition bien adaptée : l'hydrogène n'est pas une source d'énergie puisque l'hydrogène doit être produit à partir d'autres sources d'énergie primaire telles que les combustibles fossiles, mais il peut être considéré comme un vecteur d'énergie idéal (Hollmuller et al., 2005). En effet, et selon la définition académique d'un porteur d'énergie telle qu'établie précédemment dans la législation internationale ISO 13600, un porteur d'énergie est « une substance ou un phénomène qui peut être utilisé pour produire des travaux mécaniques ou de la chaleur ou pour faire fonctionner des procédés chimiques ou physiques ». Les principaux vecteurs énergétiques actuels sont les solides (charbon), les liquides (essence, diesel, carburacteur, éthanol, méthanol, gaz liquéfiés, esters gras), les gaz (gaz naturel, gaz synthétique) et l'électricité (By, 2014).

L'hydrogène, en tant que vecteur d'énergie, présente plusieurs avantages liés à ses propriétés physico-chimiques : d'abord, à la température et à la pression standard (0°C, 1atm), l'hydrogène gazeux est inodore, incolore, non métallique, insipide, non toxique, hautement combustible et possède la plus grande énergie par rapport à une unité de poids de 121 MJ.kg⁻¹. Autrement dit, 1 kg d'hydrogène représente la même quantité d'énergie que 2,1 kg de gaz naturel ou 2,8 kg d'essence. Deuxièmement, la combustion de l'hydrogène ne produit que de l'eau et, par conséquent, aucun gaz à effet de serre n'est produit directement pendant ce

processus de combustion. De plus, les polluants de combustion secondaire comme les NO_x sont considérablement réduits.

Finalement, la combustion de l'hydrogène présente des températures de flamme plus élevées que d'autres gaz, avec 2318°C et 3000°C dans l'air contenant 29% de H₂ en volume et dans l'atmosphère d'oxygène pur, respectivement. En comparaison, la température la plus élevée qui peut être atteinte lorsque le méthane est brûlé dans l'air est seulement d'environ 2000°C, beaucoup moins que les valeurs de la combustion de l'hydrogène (IAEA, 1999).

I.B.1. Utilisation de l'hydrogène

L'hydrogène est considéré comme une source d'énergie propre utilisée au sein de plusieurs domaines :

I.B.1.1. Consommation industrielle

L'hydrogène est une molécule très importante dont l'application et l'utilisation sont très étendues, il est actuellement utilisé dans de nombreuses industries, dans l'industrie chimique : la fabrication d'ammoniac (un composé d'hydrogène et d'azote), et dans l'hydrogénation du carbone et du raffinage à la métallurgie, le verre et l'électronique (Chezeau, 2018).

L'hydrogène est principalement utilisé comme réactif, mais il est aussi utilisé comme combustible dans les applications spatiales, comme « fixateur d'O₂ » dans le traitement thermique des métaux et pour sa faible viscosité et densité. En raison de l'utilisation accrue de pétrole brut plus lourd, contenant des quantités plus élevées de soufre et d'azote et pour répondre à des normes d'émissions rigoureuses, le besoin d'hydrogène connaît une croissance très rapide dans l'industrie pétrochimique du raffinage du pétrole (Ramachandran & Menon, 1998).

À l'heure actuelle, l'hydrogène n'est pas utilisé commercialement comme vecteur d'énergie, mais majoritairement dans les industries pétrochimiques (By, 2014). Aujourd'hui, la production commerciale d'hydrogène atteint plus de 50 millions de tonnes par an (CEA, 2020). Ce gaz est utilisé industriellement pour la production d'ammoniac (à 34%), pour la désulfuration du pétrole et la production de méthanol dans les raffineries (à 51%) et dans les

secteurs de la métallurgie, de l'électronique, de la pharmacologie, de la transformation des aliments et de l'utilisation de l'espace (à 15%) (CEA, 2020), comme montre la **figure1.3**.

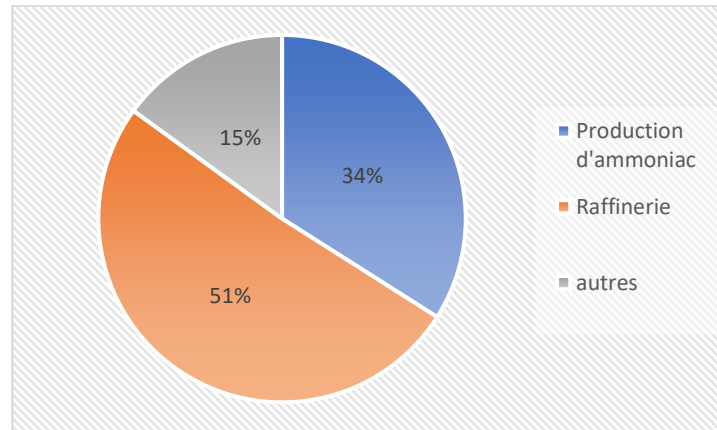


Figure 1.3 Principales utilisations de l'hydrogène (By, 2014).

I.B.1.2. Consommation pour la mobilité

L'hydrogène a également été considéré comme une source potentielle d'énergie et de transport et peut être à l'avenir, une source d'énergie propre abondante (By, 2014).

L'utilisation de l'hydrogène dans le transport comme source d'énergie pour les voitures, bus, trains et même des bateaux et avions qui sont sous le contexte de la recherche et développement dans plusieurs compagnies mondiales d'automobiles dont les recherches montrent que techniquement l'utilisation d'hydrogène comme carburant est possible, à base de piles à combustibles qui fonctionnent suivant le principe inverse de l'électrolyse pour produire de l'électricité. Donc différentes entreprises dans le domaine de la mobilité sont intéressées par les véhicules à hydrogène en s'inscrivant dans une conception évolutive ces dernières années (moins carbonée et plus diversifiée) (Chezeau, 2018).

I.B.2. Voies de production de l'hydrogène

D'un point de vue technique, l'hydrogène est produit à partir de trois sources principales : les combustibles fossiles, les centrales nucléaires et les sources renouvelables.

À ce jour, 96% de l'hydrogène est produit à partir d'énergie fossile (Nath & Das, 2003), plus précisément, le reformage à la vapeur du gaz naturel par eau chaude est le procédé le plus

courant ayant le coût de production le plus bas par rapport aux autres méthodes de production d'hydrogène, mais les processus thermochimiques de reformage de la vapeur de gaz naturel présentent plusieurs inconvénients et, notamment, un rejet massif de CO₂ dans l'atmosphère qui conduit à aggraver l'effet de serre. L'approvisionnement en combustibles fossiles étant en baisse, l'étude des autres modes de production de l'énergie est devenue très essentielle et à intérêts politiques, sociologiques et scientifiques (By, 2014).

Une autre façon est de séparer les atomes d'oxygène et les molécules d'hydrogène de l'eau par électrolyse, le point prometteur de ce processus est son absence d'émissions de gaz à effet de serre. Bénéficiant d'un développement important au cours des 20 dernières années, l'électrolyse de l'eau a été plus largement utilisée et représente maintenant jusqu'à 4% de l'hydrogène total produit au cours des dernières années. Une autre méthode consiste à décomposer l'eau par des cycles thermochimiques associés à de faibles courants électriques, cette méthode nécessite de dissocier la molécule d'hydrogène, des températures comprises entre 800°C et 1000°C. Ces températures et courants électriques sont obtenus dans les réacteurs nucléaires de nouvelle génération et dans les nouvelles centrales solaires. La dernière possibilité est de convertir l'énergie renouvelable en hydrogène par gazéification thermique de la biomasse ou, par des moyens biologiques, soit avec des microalgues pour la bio-photolyse de l'eau, ou si la matière organique est biologiquement dégradable, en utilisant des bactéries fermentatives productrices d'hydrogène (CEA, 2020). La production biologique d'hydrogène présente plusieurs avantages puisqu'elle peut être exploitée indépendamment de la disponibilité des combustibles fossiles, que les émissions nettes de gaz à effet de serre sont nulles puisque le carbone est biologiquement recyclé et qu'il nécessite moins d'énergie que les processus thermochimiques. Cependant, les processus biologiques sont limités par le métabolisme microbien et la thermodynamique, conduisant à de faibles rendements et productivités d'hydrogène (Panwar et al., 2011).

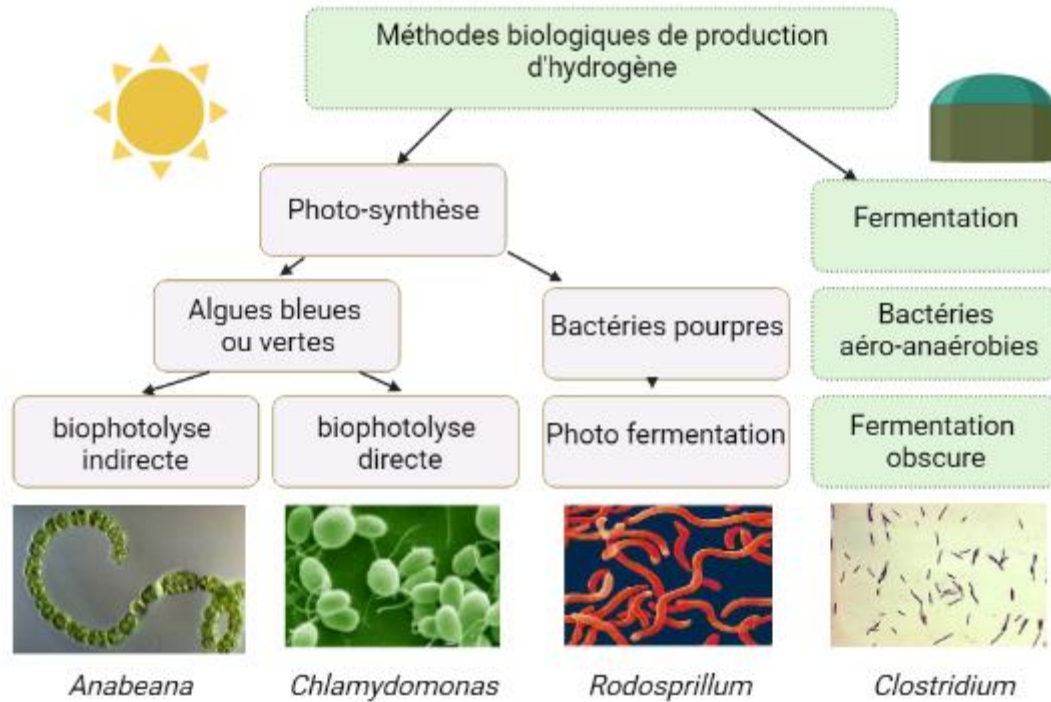


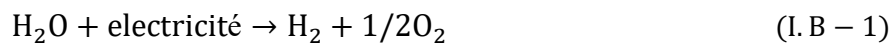
Figure 1.4 Méthodes de production de biohydrogène (CEA, 2020).

I.B.2.1. Voies conventionnelles

Les voies conventionnelles de production d'hydrogène sont des méthodes électriques ou thermiques basées sur la décomposition de la molécule d'eau en fournissant de l'énergie, parmi ces procédés on distingue (By, 2014):

I.B.2.1.1. L'électrolyse

La production d'hydrogène par électrolyse de l'eau est une technologie mature, basée sur un processus simple, et très efficace, il convient à la production d'hydrogène à grande échelle. Les efficacités typiques sont de 72 à 82%, c'est la méthode électrique la plus connue, elle se base sur le principe de décomposition de l'eau en utilisant un système électrique contenant deux électrodes alimentés par un courant électrique qui va produire un mouvement des électrons et donc les molécules d'hydrogène vont finir par se séparer de celles de l'oxygène sous la formule (Shah, 2014):



Plusieurs technologies avancées d'électrolyseur sont en cours de développement, comme l'électrolyse alcaline avancée (qui utilise de nouveaux matériaux pour les membranes et les électrodes qui permettent d'améliorer d'avantage l'efficacité jusqu'à 90%), le procédé électrolytique à polymère solide (qui utilise une membrane échangeuse d'ions conductrice de protons comme électrolyte et comme membrane qui sépare la cellule d'électrolyse) et l'électrolyse à vapeur à haute température (qui fonctionne entre 700°C et 1000°C et qui utilise des céramiques conductrices d'ions d'oxygène comme électrolyte). Une installation d'électrolyse peut fonctionner sur un large éventail de facteurs de capacité et pratique pour un large éventail de capacités de fonctionnement, ce qui rend ce processus intéressant pour le couplage avec des sources d'énergie renouvelables, en particulier avec le photovoltaïque (PV). Ces derniers génèrent un courant continu à basse tension, ce qui est exactement nécessaire pour le processus d'électrolyse. Des études théoriques et expérimentales sur la performance des électrolyseurs photovoltaïques ont été réalisées. Parmi les installations expérimentales d'électrolyse photovoltaïque actuellement en exploitation dans le monde, citons la centrale pilote Solar Wasserstoff-Bayern (Neunburg vorm Wald, Allemagne), le projet HYSOLAR (Arabie saoudite), le Schatz Energy Center (Humboldt State University, Arcata, Californie)(Balachandar et al., 2013).

I.B.2.1.2. Thermolyse (Décomposition thermique directe de l'eau)

L'eau peut être fractionnée thermiquement à des températures supérieures à 2000K, le degré de dissociation est fonction de la température : seulement 1% à 2000 K, 8,5% à 2500 K et 34% à 3000 K. Le produit est un mélange de gaz à des températures extrêmement élevées. Les principaux problèmes liés à cette méthode sont liés aux matériaux nécessaires à des températures extrêmement élevées, à la recombinaison des produits de réaction à des températures élevées et à la séparation de l'hydrogène du mélange (Balachandar et al., 2013).

I.B.2.1.3. Production à partir de la biomasse

I.B.2.1.3.1. Pyrolyse/gazéification

L'hydrogène peut être obtenu à partir de la biomasse par un procédé de pyrolyse/gazéification. L'étape de préparation de la biomasse consiste à chauffer la lisière biomasse/eau à des températures élevées sous pression dans un réacteur. Ce processus décompose et oxyde partiellement la biomasse, produisant un produit gazeux composé

d'hydrogène, de méthane, de CO₂, de CO et d'azote. Les matières minérales sont retirées du fond du réacteur. Le flux de gaz est acheminé vers un réacteur à haute température où la teneur en hydrogène est augmentée. L'unité d'adsorption par oscillation de pression subséquente produit de l'hydrogène de pureté relativement élevée. L'ensemble du système est très semblable à une installation de gazéification du charbon, à l'exception de l'unité de prétraitement de la biomasse et de la conception du réacteur. En raison de la faible valeur énergétique par unité de masse de biomasse par rapport au charbon, l'installation de traitement est plus grande que celle d'une usine de gazéification du charbon de taille comparable (Ghimire et al., 2015).

I.B.2.1.3.2. Voies biochimiques

Le biohydrogène peut être produit par deux mécanismes, photo-biologique et fermentaire (Guo, 2020). Les méthodes photo-biologiques utilisent les rayonnements solaires comme une source d'énergie y compris la biophotolyse directe, la biophotolyse indirecte et la photo-fermentation. Par contre, les processus de fermentation nécessitent des sources de carbone libres et sont donc une voie prometteuse pour la conversion efficace et économique des déchets organiques (Ghimire et al., 2015).

I.B.2.1.3.2.1. Photolyse (Photosynthèse)

La photolyse (ou extraction directe de l'hydrogène de l'eau en utilisant uniquement la lumière du soleil comme source d'énergie) peut être réalisée en utilisant des systèmes photo-biologiques, des ampoules photochimiques ou des cellules photoélectrochimiques. Des activités de recherche intensives ouvrent de nouvelles perspectives pour la photo-conversion, où de nouveaux catalyseurs redox, des semi-conducteurs colloïdaux, des enzymes immobilisées et des micro-organismes sélectionnés pourraient fournir des moyens de récolte d'énergie solaire à grande échelle et de conversion en hydrogène (Balachandar et al., 2013).

La photolyse est la façon de produire du H₂ en utilisant des microalgues et des cyanobactéries (micro-organismes photo-autrophes), qui utilisent le rayonnement de la lumière pour diviser les molécules de H₂O en H₂ et O₂ par photosynthèse. Cela peut être appelé bio-photolyse, on distingue deux procédés :

-Bio-photolyse directe

L'utilisation potentielle de micro-organismes pour la production biologique d'hydrogène en tant que ressource énergétique place le métabolisme de l'hydrogène à l'avant-garde de la recherche sur la production biologique d'hydrogène. Le concept de bio photolyse directe englobe l'évolution simultanée de l'O₂ induite par la lumière du côté oxydant pour la production de H₂, avec un rapport molaire H₂-O₂ (mol-mol) maximum de 2:1 (Guo, 2020). Une telle réaction avec les algues vertes pourrait servir à fournir un combustible H₂ propre, renouvelable et économiquement viable. Ce processus de production d'hydrogène photosynthétique n'entraîne pas de fixation du CO₂ ou le stockage d'énergie dans les métabolites cellulaires. L'hydrogénase est le nom donné à la famille des enzymes qui catalysent l'oxydation réversible de l'hydrogène en ses constituants de particules élémentaires, deux protons (H⁺) et deux électrons (Robert Foster, Majid Ghassemi, Alma Cota Jeanette Moore, 2011), ces enzymes sont divisées en trois classes en fonction de la teneur en métal du site actif : hydrogénase de Fe, hydrogénase de NiFe et nitrogénase. L'enzyme hydrogénase de Fe est utilisée dans les processus de bio-photolyse et fermentation obscure tandis que les processus de photo-fermentation utilisent la nitrogénase. Les hydrogénases de Fe sont des enzymes qui présentent une haute sensibilité à l'O₂ et à la lumière, cela peut poser un problème supplémentaire pour leur utilisation biotechnologique dans les organismes photosynthétiques tels que les algues (Balachandar et al., 2013). L'hydrogène biologique peut être produit à partir de plantes par la bio photolyse de l'eau à l'aide de microalgues (algues vertes et cyanobactéries), la fermentation de composés organiques et la composition photogénique de composés organiques par des bactéries photosynthétiques. La production photosynthétique d'hydrogène à partir de l'eau est un processus biologique qui peut convertir la lumière du soleil en énergie chimique utile et emmagasinée par la réaction générale suivante (équation I. B – 2)(Guo, 2020) :



-Bio photolyse indirecte

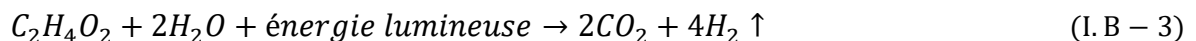
Les processus de bio-photolyse indirectes à base d'hydrogénase réversible présentent, du moins sur le plan conceptuel, des avantages majeurs par rapport aux systèmes à base de nitrogénase. Les activités spécifiques d'évolution du H₂ des hydrogénases réversibles sont

presque mille fois plus élevées que celles de la nitrogénase et, Surtout, ne nécessitent pas d'ATP. D'autre part, il y a aussi des reculs (Guo, 2020). Les hydrogénases réversibles dans les microalgues sont généralement exprimées à des activités relativement faibles, ce qui donne des taux de production de H₂ généralement beaucoup plus faibles que ceux observés avec les processus à base de nitrogénase. De plus, la production de H₂ par hydrogénases réversibles est généralement inhibée par les pressions partielles relativement faibles (< 10 %) de H₂ (By, 2014). De plus, les problèmes de sensibilité du processus d'évolution de l'hydrogène sont potentiellement contournés en séparant l'évolution temporelle et/ou spatiale de l'oxygène et l'évolution de l'hydrogène. Ainsi, les processus de bio photolyse indirecte impliquent la séparation des réactions d'évolution du H₂ et de l'O₂ en étapes séparées, couplées par fixation/évolution du CO₂ (Balachandar et al., 2013).

Bien que la photosynthèse présente un procédé simple mais, le faible taux de conversion à bioréacteurs coûteux sont les inconvénients majeurs rencontrés (Bakouri et al., 2019).

I.B.2.1.3.2.2. Photo-fermentation

En effectuant une fermentation obscure, un maximum de 3 moles d'hydrogène peut être produit à partir d'une mole de glycérol. Le reste de l'énergie potentiellement disponible restera piégé dans les acides organiques car il est thermodynamiquement impossible d'oxyder ces derniers sans entrée d'énergie supplémentaire. Cependant cela peut être traité par photo-fermentation (Guo, 2020)(Cristina Cavinato, 2011).



Cette conversion est effectuée par des bactéries photosynthétiques comme le genre *Rhodobacter*, qui obtiennent de l'énergie de la lumière pour lutter contre la barrière thermodynamique de l'oxydation des acides organiques anaérobies (acétique, lactique et butyrique). La production photo-biologique de H₂ peut être considérée comme le processus le plus économique utilisant simplement du H₂O, mais elle ne peut être exploitée que le jour. De plus, la production d'oxygène gazeux à partir du procédé peut diminuer l'efficacité de production du H₂ en inhibant la réaction de fractionnement du H₂O Pour un fonctionnement optimal, la conception du photo-fermenteur est très importante car elle nécessite une grande surface pour collecter l'énergie lumineuse et un mélange approprié à l'intérieur du fermenteur. Jusqu'à présent, les taux de production dans les photo-fermenteurs sont

beaucoup plus faibles que dans les fermenteurs à fermentation obscure. (Das & Veziroglu, 2008) avaient signalé que des efficacités photochimiques de 3 à 10% ont été observées en utilisant ce procédé, une alternative possible pourrait être l'utilisation de capteurs solaires (Ghimire et al., 2015)

Malgré que les acides organiques sont convertis en biohydrogène avec un taux élevé, la photo fermentation présente l'inconvénient de nécessité d'une lumière exigée à concurrence des méthanogènes C.

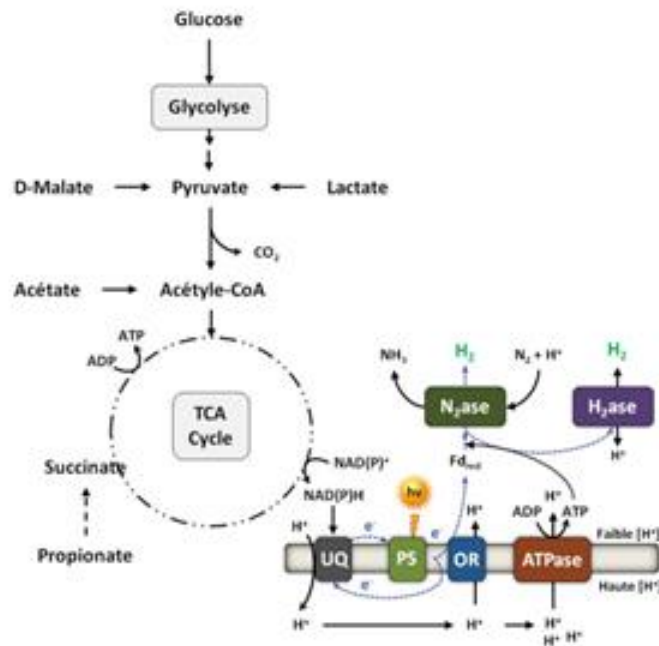


Figure 1.5 Voies métaboliques de la photo-fermentation du glucose (CEA, 2020).

I.B.2.1.3.2.3. Fermentation obscure et digestion anaérobie

La dernière voie biologique de produire de l'hydrogène est la fermentation obscure, dans laquelle les substrats riches en glucides sont décomposés en produits finaux métaboliques comme les acides gras volatils, les alcools et les acides organiques et en un biogaz mixte contenant du H₂, du CO₂, par des bactéries anaérobies strictes et/ou facultatives (Levin et al., 2007), (Mudhoo et al., 2011), des Cultures fermentatives pures comme *Clostridium sp.* (Jo, Lee, Park, Choe, et al., 2008), *Escherichia coli* (Hanaoka et al., 2005) et *Enterobacter sp.* (D. H. Kim et al., 2009) ont été étudiées.

Les procédés de fermentation obscure en cultures mixtes ont récemment gagné une importance pour produire de l'hydrogène, car ils s'adaptent mieux aux changements environnementaux et sont capables de promouvoir des déchets organiques renouvelables à faible coût et présentent une résistance élevée des communautés microbiennes contre les changements opérationnels (Cervulle et al., 2017).

La production d'hydrogène par fermentation sombre correspond aux premiers stades de la digestion anaérobie, un processus biologique efficace pour convertir la matière organique en méthane et en dioxyde de carbone dans des conditions anaérobies strictes.

La **figure 1.6** illustre les voies métaboliques de la digestion anaérobie, notamment : l'évolution de H₂. La première étape concerne l'hydrolyse de la matière organique complexe à petits polymères en molécules solubles disponibles pour les acidogènes, acidogènes dans l'étape suivante les bactéries convertissent les glucides simples, les protéines et les graisses en AGV, alcools, en produits finaux et au CO₂ et au H₂. L'hydrogène est accumulé comme intermédiaire clé et peut être rapidement consommé par d'autres micro-organismes dans des cultures mixtes, comme les homo-acétogènes, les méthanogènes et les bactéries sulfatées (Das & Veziroglu, 2008) pour produire le méthane et le CO₂.

En comparaison avec d'autres techniques biologiques pour la production d'hydrogène, les processus de fermentation obscure prennent les avantages de se débarrasser de l'exigence de lumière avec de simples techniques, ce qui permet le fonctionnement continu, et réduit largement les exigences de la demande de la production mondiale. De plus, la fermentation sombre combine des générations de molécules précieuses (p. ex., H₂ et AGV) avec une grande productivité ainsi qu'une réduction du volume de déchets. En effet, les produits métaboliques solubles peuvent également être utilisés comme matériaux chimiques à valeur ajoutée, tels que pour la production de bioplastiques. Comme dans la digestion anaérobies (Bakouri et al., 2019), les réactions biochimiques de la fermentation obscure représente un travail coopératif (*syntrophie*) séquentiel entre diverses populations bactériennes en équilibre stable, mais la difficulté mentionnée à cette dernière est que les performances d'hydrogène des bioprocédés dépendent fortement des interactions métaboliques et phylogénétiques qui se produisent dans les communautés microbiennes qui sont difficiles à contrôler. D'autres recherches sont encore nécessaires pour sélectionner des cultures produisant de l'hydrogène,

contrôler leur activité sous des paramètres de fonctionnement optimaux et concevoir un processus fiable et stable (Das & Veziroglu, 2008).

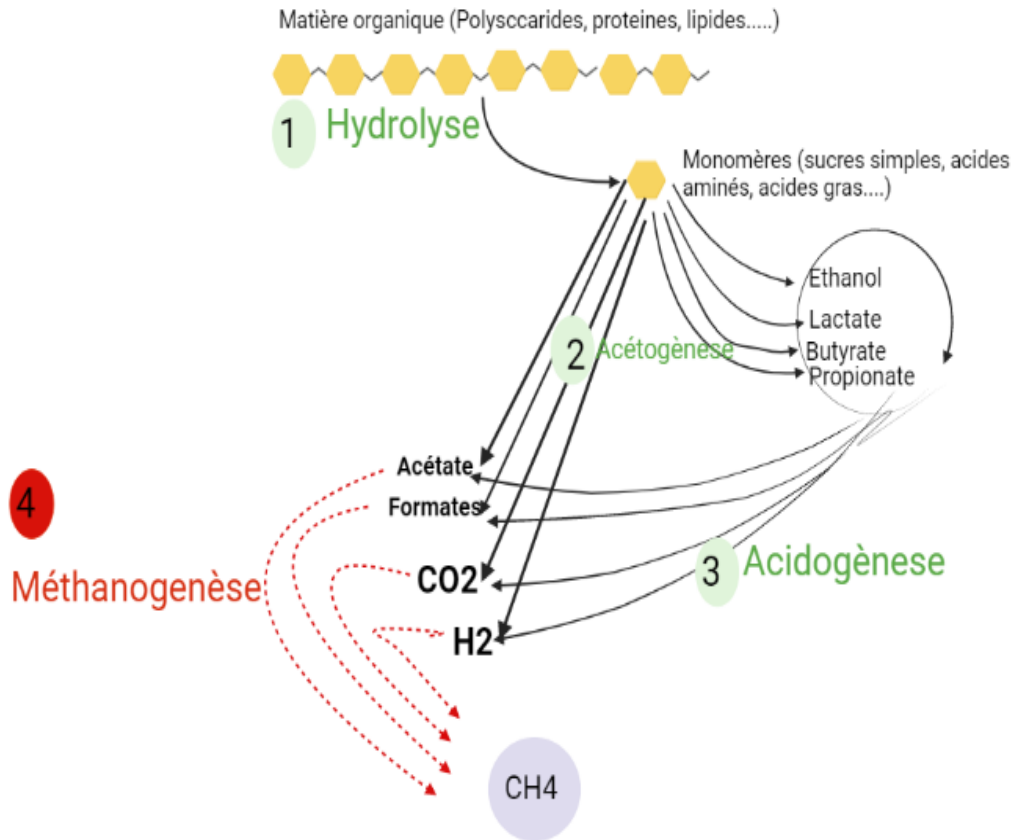


Figure 1.6 voies métaboliques de digestion anaérobie, 1 : bactéries fermentaires hydrolytiques, 2 : acidogéniques, 3 : acétogéniques, 4 : *Archea* méthanogènes, adapté d'après (Bourque, 2008).

En conclusion, les différents procédés de production d'hydrogène présentent des avantages et de inconvénients variables, le **tableau 1.1** résume les différences de procédé à un autre ;

Tableau 1.1 Avantages et inconvénients des différents procédés de production de l'hydrogène (Das & Veziroglu, 2008).

Procédé	Avantages	Inconvénients
Thermochimique Pyrolyse Gazéification	- Conversion maximale possible - Produit des matières carbonées ainsi que de l'huile biologique, des produits chimiques et des minéraux	-Un important conditionnement des gaz est nécessaire -coût élevé
Bi- photolyse directe	- Production du H ₂ directement à partir de l'eau et du soleil	-Possibilité de désactivation du catalyseur
Bio-photolyse indirecte	-Les cyanobactéries peuvent produire du H ₂ à partir de l'eau	-L'O ₂ peut être inhibiteur -Efficacité photochimique réduite -Les enzymes hydrogénase d'absorption doivent être enlevées pour arrêter la dégradation du H ₂
Photo-fermentation	-Une énergie lumineuse spectrale large peut être utilisée par ces bactéries -Elimination de différents déchets organiques	-L'O ₂ a un effet inhibiteur sur la nitrogénase -L'efficacité de conversion de la lumière est très faible, seulement de 1 à 5 %
Fermentation obscure	-Production du H ₂ toute la journée sans lumière -Diverses sources de carbone peuvent être utilisées comme substrats -Il produit de précieux métabolites tels que les acides butyriques, lactiques et acétiques -C'est un processus anaérobie, il n'y a donc pas de problème d'O ₂ limitant -conditionnement facile -application simple	-Rendements réalisables relativement faibles du H ₂ -Le mélange de gaz produit contient du CO ₂ qui doit être séparés -rentable

Partie C : Production de biohydrogen par fermentation obscure

Introduction

La fermentation obscure est la bioconversion fermentative anaérobie (en absence d'oxygène) de la matière organique (substrat) en biohydrogène et dioxyde de carbone. C'est un processus complexe manifesté par divers groupes de bactéries, impliquant une succession de réactions biochimiques utilisant deux étapes semblables à la digestion anaérobie. La fermentation obscure diffère de la photo-fermentation en ce qu'elle se déroule en absence de lumière.

I.C.1. Voies métaboliques impliqués

La production d'hydrogène par fermentation obscure est une partie intégrante du processus naturel de biodégradation de la matière organique, appelé digestion anaérobie (le processus de bioconversion complète de la matière organique en biogaz (méthane, CO₂,...etc.)(Moletta, 2002). La digestion anaérobie se déroule en quatre étapes, et en anaérobiose en présence de différents micro-organismes capables de coopérer pour produire une fermentation stable et autorégulée (Sterling et al., 2001).

La première étape consiste à l'hydrolyse de la matière organique constituée de polysaccharides, de protéines et de lipides. En effet, les matières organiques complexes, comme les déchets agricoles ou industriels ou les eaux usées, ne sont pas directement assimilables par les microorganismes, une étape d'hydrolyse est donc nécessaire pour les rendre métabolisables (Moletta, 2002), l'hydrolyse enzymatique est l'étape plus la longue et limitante réalisée par les enzymes extracellulaires spécifiques (*polysaccharidases*, *protéases* et *lipases*) sécrétées par des bactéries aéro-anaérobies facultatives (*Echirichia coli*, *Acetobacter sp.*, *Bacillus sp.*,) ou anaérobies strictes (*Clostridium sp.*, *Bacteroides sp.*) ces enzymes coupent les macromolécules en molécules monomères solubles (monosaccharides, acides aminés et acides gras à longues chaînes) assimilables par la plupart des bactéries rencontrées au phases suivantes.

Les molécules monomériques solubles générés à la fin de la phase d'hydrolyse pénètrent à l'intérieur des cellules microbiennes acidogènes où ils sont métabolisés. A la fin de la voie

de la glycolyse, les monosaccharides sont transformés en glycéraldéhyde-3-phosphate, puis, en acide pyruvique. Puis le pyruvate est fermenté en alcools, acides gras volatils, en acides organiques, en dioxyde de carbone et en hydrogène par des micro-organismes fermentaires. D'après (Show et al., 2019), les acides aminés sont convertis à 90 % grâce aux réactions couplées d'oxydo-réduction de Stickland (Nisman, 1954). Deux acides aminés, un récepteur et un donneur d'atome de carbone, sont dégradés en même temps pour former du dioxyde de carbone, de l'ammonium et de l'AGV.

Les acides gras à longue chaîne se décomposent en acides gras plus courts et en hydrogène pendant une période de lénine (Lynen et Ochoa 1953). Cette étape rapide et la production d'acide abaisse le pH du milieu, qui peut être une source d'inhibition.

L'acétogénicité est l'étape au cours de laquelle les bactéries acétogènes oxydent les différents composés obtenus à l'étape précédente en acétate. Les réactions qui se produisent dans cette étape sont endergoniques, mais deviennent exergoniques en raison de la consommation d'hydrogène par des microorganismes synthétiques (homoacétogènes, méthanogènes, bactéries sulfato-réductrices de nitrate)(M. S. Kim & Lee, 2010).

La méthanogénèse est la dernière phase de la digestion anaérobie qui correspond à la conversion de l'acétate et/ou du CO₂ et de l'H₂ en méthane par les *Archeae méthanogènes*. La digestion anaérobie est largement utilisée à l'heure actuelle pour la production de méthane et de dioxyde de carbone par à partir de biomasses agricoles, industrielles et municipales. En effet, le méthane pur, peut être utilisé comme combustible pour produire de la chaleur ou de l'électricité. L'inconvénient majeur de ce procédé, est le dégagement dioxyde de carbone lors de la combustion du méthane. En revanche, si l'on limite aux deux premières étapes, l'hydrogène produit peut, être purifié, utilisé comme source d'énergie renouvelable générant de la vapeur d'eau après combustion ou transformé en électricité via les piles à combustibles. L'avantage majeur est la génération de la vapeur d'eau lors de la production d'énergie (Khalid et al., 2011).

L'hydrogène est un intermédiaire clé consommée dans le processus naturel de la digestion anaérobie, ainsi les 2 premières étapes de la digestion anaérobie sont essentielles à sa production puisqu'il s'agit de privilégier l'étape hydrogénotrophe en limitant à la fois les deux dernières étapes acétogénèse et la méthanogénèse (Kim et al., 2009).

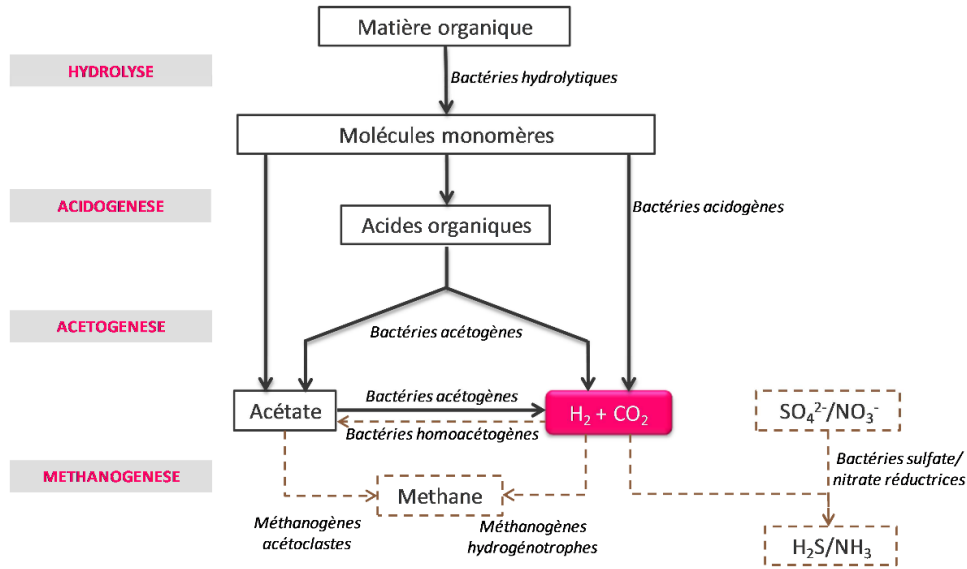


Figure 1.7 Voies biochimiques de production de biohydrogène par fermentation obscure (Francois-lopez, 2016).

I.C.2. Biochimie de la fermentation obscure

Afin de comprendre les voies métaboliques impliquées dans la production d'hydrogène par culture mixte, le glucose ou le saccharose en tant que substrats modèles ont été largement étudiés et leurs voies sont maintenant bien décrites. Comme le montre la figure 1.8, la première étape concerne la conversion du glucose ou du pentose en pyruvate, suivie par les voies métaboliques de glycolyse (ou Embden-Meyerhoff-Parnas), dans lesquelles l'adénosine triphosphate (ATP) et les nicotinamides réduits sont des adénine dinucléotides (NADH) sont générés comme stockage d'énergie et donneur d'électrons pour la synthèse cellulaire, respectivement ; Pyruvate, comme un produit clé du métabolisme central peut ensuite être converti en acétyl-CoA, la Ferredoxine réduite et le CO₂. La Ferredoxine réduite excessive est ensuite re-oxydée pour former de l'hydrogène à l'aide d'*hydrogénases*. Chez certaines bactéries entériques, comme *Escherichia coli*, le pyruvate peut être directement converti en acétyl-CoA, puis en formate qui génère de l'hydrogène et du CO₂ à l'aide d'une formatylase. L'acétyl-CoA est un intermédiaire central des voies de fermentation du butyrate, de l'acétate et de l'éthanol selon les espèces de microorganismes, l'état physiologique des microorganismes, les conditions opérationnelles, le type de substrats et la

charge organique. Le NADH réduit excessif est re-oxydé pour former de l'hydrogène à l'aide d'hydrogénases. Parmi toutes les possibilités métaboliques, la fermentation de l'acétate et du butyrate est plus facile puisqu'ils sont associés à l'ATP et à la réduction de la ferredoxine et de la génération de NADH qui sont fortement nécessaires pour l'anabolisme cellulaire (Ramírez-morales et al., 2015).

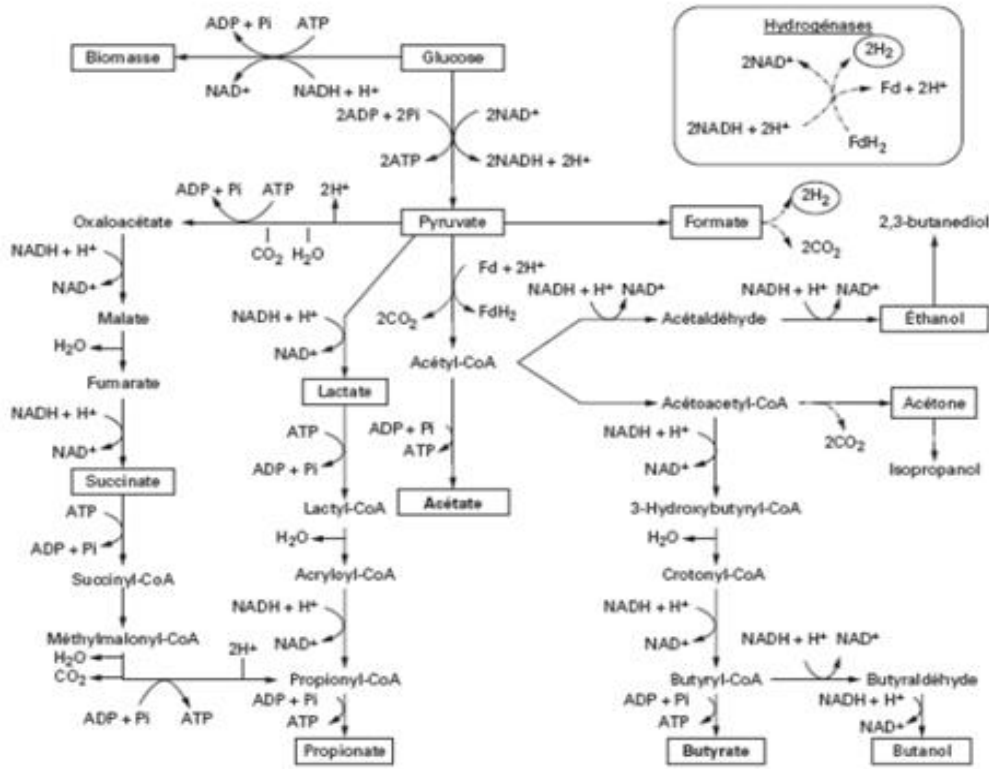
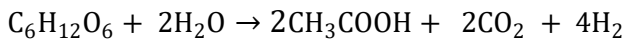
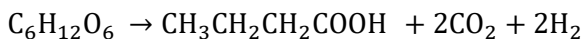


Figure 1.8 Mécanisme biochimique de biohydrogène par fermentation obscure (Ramírez-morales et al., 2015).

Dans la large gamme de produits finaux générés par les différents métabolismes microbiens présents dans les cultures mixtes, l'acétate et le butyrate s'accumulent substantiellement avec les principaux métabolismes produisant de l'hydrogène décrits dans *Clostridium sp.* ou *Enterobacteriaceae* (Eqs. (I.C-1) et (I.C-2)).



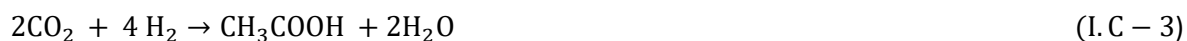
$$\Delta G_0' = -215 \text{ kJ/mol (I.C - 1)}$$



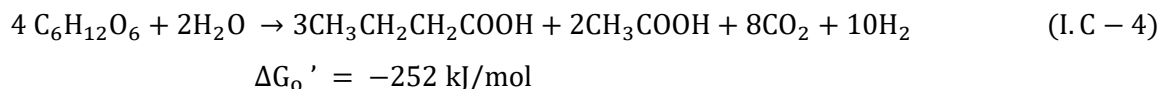
$$\Delta G_0' = -264 \text{ kJ/mol (I.C - 2)}$$

L'accumulation d'acétate en tant que produit final unique donne une production stœchiométrique de 4 mol H₂/mol hexose, équivalent à 498 ml H₂/ g hexose (0°C, 1 atm), tandis que dans la voie butyratée produit un rendement en hydrogène molaire inférieur est observé avec 2 mol H₂/mol hexose, équivalent à 249 ml H₂/ g hexose (0 C, 1 atm) (Hawkes et al., 2007).

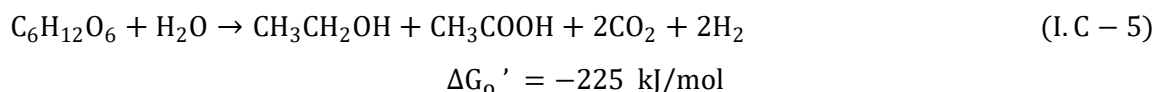
Toutefois, l'accumulation d'acétate dans le milieu n'implique pas nécessairement la production de biohydrogène puisque plusieurs espèces microbiennes peuvent également convertir l'hydrogène et le carbone dioxyde en acétate (Eq. (I.C -3)) (Antonopoulou et al., 2008)



Dans les cultures mixtes, on observe habituellement un rapport de 3:2 de butyrate/acétate, ce qui donne un rendement moyen théorique en hydrogène de 2,5 mol H₂/mol hexose (Hawkes et al., 2007).(Hawkes et al., 2007) ont même proposé une équation théorique qui pourrait représenter un métabolisme moyen dans les cultures mixtes (Eq.(I.C -4)) :

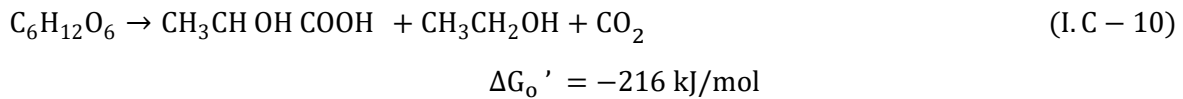
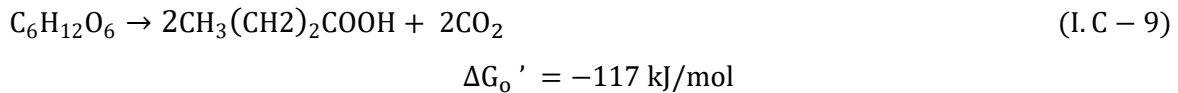
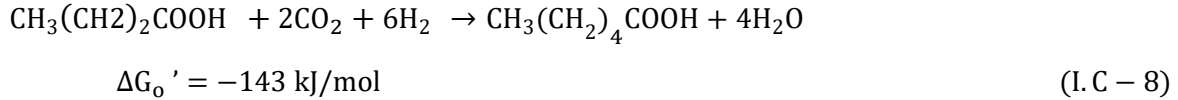
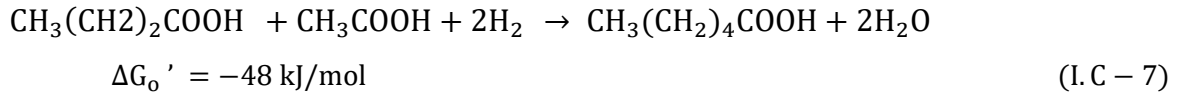


D'autres études ont suggéré une façon possible de convertir le glucose en acétate et en éthanol avec un rendement en hydrogène de 2 mol H₂/mol glucose (Eq.(I.C-5))(Coll et al., 2006)



Dans les cultures mixtes, d'autres produits finaux métaboliques comme le propionate et le caproate peuvent aussi s'accumuler. Le propionate est un métabolite d'une voie consommatrice d'hydrogène. Il est une voie alternative de dégradation du glucose où aucun H₂ n'est produit en présence de bactéries d'acide propionique. En revanche, le caproate est produit après consommation directe d'hydrogène et de butyrate et/ou d'acétate (Eqs. (I.C-6), (I.C-7) et (I.C-8)). Enfin, la voie lactatée réalisée par les bactéries lactiques telles que *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* redirige le flux électronique du glucose vers la formation de lactate au lieu de l'acétate et du H₂ (Eqs (I.C-9), (I.C-10). En raison de la concurrence

directe sur le même substrat, une partie du glucose menant à l'accumulation de lactate ne produit pas d'excès en réduisant l'équivalent et donc pas de bioH₂.



I.C.2.2. Bactéries productrices d'hydrogène

Plusieurs espèces de bactéries ont été rapportées comme étant capables de dégrader les sucres en hydrogène. Parmi celles-ci, on retrouve *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Enterobacter aerogens*, *Thermotoga neapolitana*, *Salmonella thyphimurium*, *Clostridium butyricum*, *Rhodopseudomonas palustris P4*, *Thermotoga elfii*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium pasteurianum* (Show et al., 2019).

L'inconvénient majeur d'utilisation de souches pures, est le coût très élevé du maintien des conditions de stérilité et du risque de perte de productivité de l'inoculum. En effet c'est irréalisable de procéder à grande échelle (Azeitona, 2012).

I.C.3. Substrats utilisés pour la production d'hydrogène

La nature du substrat utilisé dans la fermentation obscure joue un rôle important dans les rendements de production en biohydrogène c'est à dire l'économie du procédé. La production et la productivité dépendent principalement du contenu en carbohydrates du substrat, de la biodisponibilité et du taux de biodégradation de la matière organique (Chairattanamakorn et al., 2009).

Généralement, les substrats utilisés sont des substrats simples tels que les monosaccharides et disaccharides ou des substrats complexes tels que les déchets organiques domestiques, agricoles et alimentaires.

I.C.3.1. Les substrats simples

Dans la littérature, les substrats simples les plus utilisés sont le glucose, le saccharose (R. Lin et al., 2020) autres expérimentations ont été réalisées en utilisant le hexose, xylose, lactoseetc. (De Sá et al., 2013) Les substrats simples sont des monomères assimilables par la majorité des bactéries (Kongjan, 2010).

I.C.3.2. Les substrats complexes

Les substrats complexes sont des macromolécules ; celles les plus utilisés sont l'amidon (Bao et al., 2012). Les biodéchets sont considérés comme substrats complexes, très importants parce qu'ils constituent un grand volume et un très fort potentiel énergétique ; ils peuvent être de différentes sources :

- a) Les déchets agro-alimentaires,
- b) les déchets industriels,
- c) les déchets agricoles,
- d) les boues des stations d'épuration

Tableau 1.2 Différentes matières organiques résiduelles utilisées comme substrat pour la production de biohydrogène par fermentation sombre.

Type de substrat	Substrat	Références
Déchets alimentaires	Les eaux usées d'un moulin à huile	(Adnan Khair & Abu-Rumman, 2020)
	Les eaux usées de moulin de riz	(Das, 2020)
	Marc de raisin	(Achkar et al., 2018)
Déchets industriels	Effluents papetiers	(Qu et al., 2015)
	Mâchefers d'incinération	(Lin & Wu, 2006)
Déchets agricoles	Feuilles mortes	(Yang, Hu, et al., 2019)
	Déjection animales	(Tou & Touzi, 2001)
Boues des stations d'épuration	Boues aérobies en excès	(Pays-bas, n.d.)
	Boues anaérobies en excès	(Kehal, 2001)

I.C.4. Bioréacteurs utilisés pour la production de biohydrogène

La conception du bioréacteur est très importante pour la croissance de la culture cellulaire. En pratique, le type de réacteur utilisé a une influence sur le mélange des phases liquide et gazeuse et sur la rétention cellulaire. Quelques types des bioréacteurs décrits dans la littérature pour la production d'hydrogène par fermentation obscure sont cités ci-après :

I.C.4.1. Le fermenteur Batch

Le bioréacteur batch est utilisé dans la majorité des études de production de biohydrogène par fermentation obscure, ce bioréacteur, souvent une bouteille de sérum agitée ou non, thermostatée dans un incubateur, permet d'étudier l'influence de plusieurs paramètres sur la cinétique de production en parallèle et de procéder facilement à des plans d'expériences systématiques. Ce mode d'opération, beaucoup moins coûteux que les tests en bioréacteurs automatisés, est très facile à mise en œuvre pour l'étude des expériences cinétiques (Zhang et al., 2005).

Le concept de temps de rétention dans ce cas n'existe pas puisque le système est fermé à tout apport liquide extérieur dans la plupart des cas (pas d'échange de matière avec le milieu extérieur). Par contre, l'effet d'autre paramètre tel que la concentration initiale du substrat, la concentration cellulaire sont important (Balachandar et al., 2013).

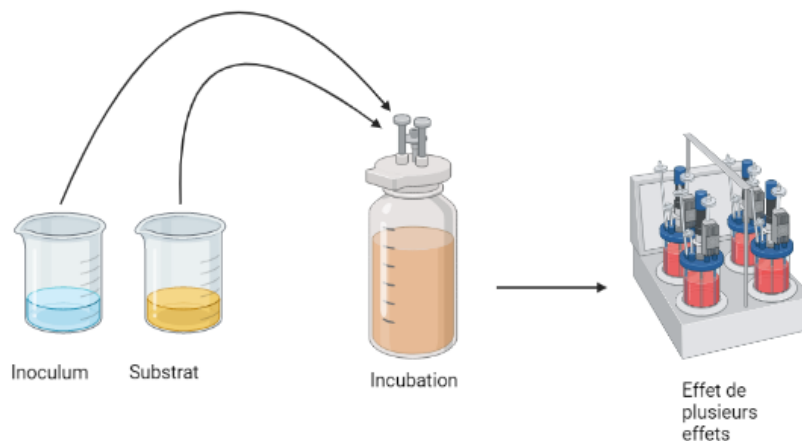


Figure 1.9 représentation schématique du bioréacteur batch (Arooj et al., 2008).

I.C.4.2. Le réacteur agité en continu CSTR

Les réacteurs agités en continu sont basés sur une alimentation et un soutirage au même débit, de sorte que le volume de la culture reste constant et suppose un mélange parfait des phases liquide et gazeuse dans la cuve, et que l'alimentation est à tout égards au même débit volumique que le soutirage du réacteur. Il permet une culture continue simple et efficace. Bien que certaines des premières études sur la production d'hydrogène en réacteur aient utilisé des CSTR, a un inconvénient important : la culture peut sortir avec le débit du soutirage avec les autres produits dans le réacteur (Arooj et al., 2008).

En effet, les floccs des micro-organismes ont tendance à se décanter par bio-floculation, le soutirage est situé à un point en haut de la cuve aura une concentration en inoculum plus faible que la valeur moyenne dans le bioréacteur, résultant ainsi un effet positif sur la séparation et la concentration des micro-organismes actifs dans la cuve. Pour éviter la diminution de la concentration cellulaire, autres designs de bioréacteur ont été mis en œuvre (Elbeshbishy et al., 2010).

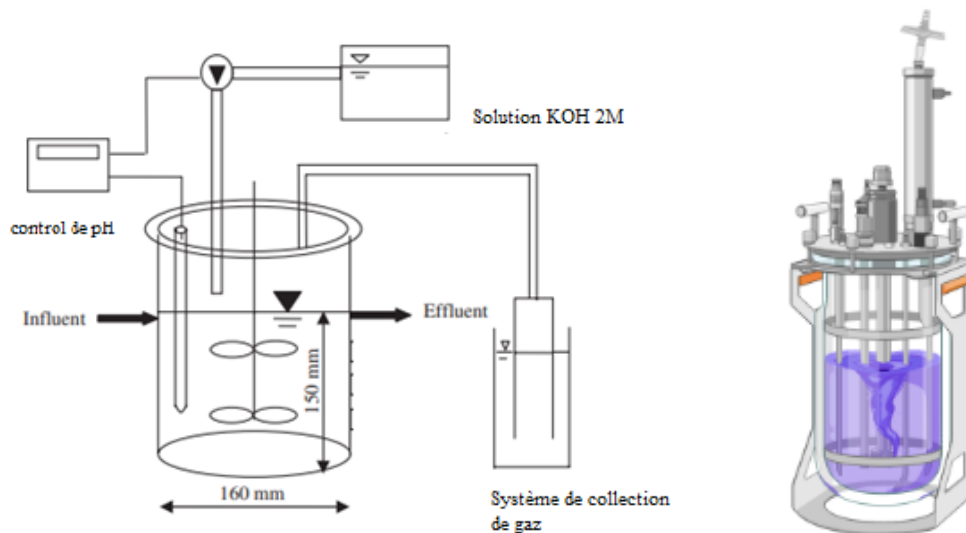


Figure 1.10 représentation schématique du bioréacteur CSTR (Ming-Ju Chen, Kreuter, 1996).

I.C.4.3. Réacteur UASB

Le réacteur est un réservoir à processus simple où l'eau usée rentre dans le réacteur par le fond, et coule vers le haut. Une couche de boues suspendue filtre et traite l'eau usée pendant son passage son nom est l'abréviation de Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), il a été développé par Lettinga et al (Lettinga & Hulshoff Pol, 1991). Les bactéries sont capables de s'agréger en particules à cause de leur poids résistant au flux ascendant. La culture présente dans la couche de boues dégradent la matière organique présente dans le substrat. En conséquence, les bulles de gaz ascendantes se mélangent aux eaux usées et le biogaz est libéré sans aucune utilisation de force mécanique. Les parois inclinées redirigent les matières vers le bas atteignant le dessus du réacteur. L'effluent clarifié est récupéré au-dessus du réservoir et des parois inclinées (Kumar, Mudhoo, et al., 2016).

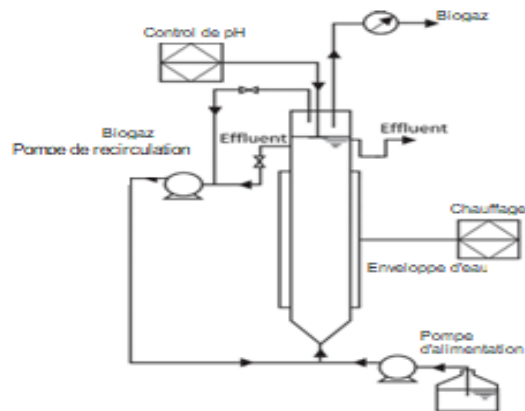


Figure 1.11 représentation schématique du bioréacteur UASB (Ming-Ju Chen, Kreuter, 1996).

I.C.4.4. Réacteurs à lit fixe

Un autre moyen pour favoriser la croissance bactérienne ou d'améliorer l'activité des microorganismes consiste à les fixer sur des supports. Le support d'immobilisation sont des pierres, des particules ou billes sur lesquelles les cultures sont immobilisés. Il est compacté dans une colonne au travers de laquelle le milieu peut être injecté. Les deux extrémités du réacteur sont fermées par des grilles ou des plaques perforées et permettant la percolation d'une phase liquide, mais empêchant tout mouvement de la phase solide dispersée. L'alimentation peut être injectée de bas en haut ou l'inverse selon le type de construction.

Les supports bactériens peuvent être placés. À ce jour, plusieurs études ont été réalisées avec ce type de bioréacteur, et les résultats semblent être les plus prometteurs et satisfaisants.. Ce concept est principalement utilisé pour évaluer le temps de dégradation des substrats solides (Jo, Lee, Park, & Park, 2008).

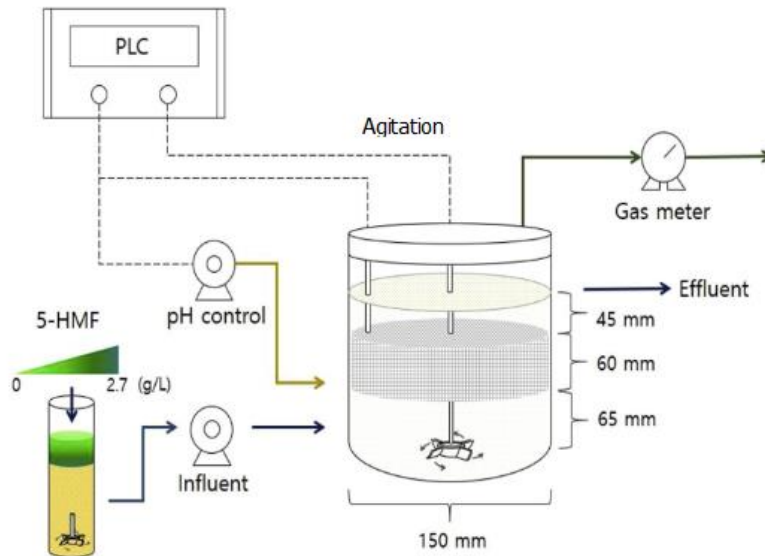


Figure 1.12 représentation schématique du bioréacteur à lit fixe (Anburajan et al., 2017).

I.C.5. Modélisation cinétique de la production de biohydrogène

Les modèles mathématiques sont utilisés pour la prédiction et l'élucidation, détermination des constantes cinétiques, l'analyse, la conception et le fonctionnement du processus de production. Les modèles cinétiques peuvent être utilisés pour la production de H_2 fermentative en discontinu pour voir les effets du substrat et de la concentration inhibitrice, T, pH, etc. sur le procédé.

Les modèles couramment utilisés pour la production de biohydrogène sont les suivants : Le modèle de *Gompertz* décrit la progression d'un procédé de production d'hydrogène fermentatif, la croissance de bactéries productrices d'hydrogène, la dégradation du substrat ; Le modèle *Monod* analyse les effets de la concentration du substrat (sans effets inhibiteurs) sur les taux de dégradation du substrat, la croissance des bactéries productrices de H_2 , la production de H_2 ; le modèle *Arrhenius* décrit les effets de la température sur la production fermentative de H_2 ; Le modèle *Levenspiel* décrit les effets de la concentration de l'inhibiteur

(sel ou hydrogène sur le pH intercellulaire) sur la production fermentative d'hydrogène, principalement, les effets de l'analyse le modèle *Andrew* décrit l'effet la concentration des protons H^+ sur le taux de production d'hydrogène ; Le modèle *Luedeking–Piret* montre la relation entre le taux de croissance des bactéries productrices d'hydrogène et le taux de production de ce dernier.

De ces modèles, le modèle *Gompertz modifié* et *Logistic modifié* sont choisis dans cette thèse parce qu'ils présentent les avantages suivants : faciles (pas compliqué), omnipotents (progrès, croissance, production d'hydrogène et de certains métabolites solubles), obtiennent des constantes qui ont une signification biologique, meilleure compréhension d'un processus, largement utilisés (plusieurs études sur différents processus et substrats), coefficients de corrélation proche de 1 (0,95-1,0) et parfaits pour décrire les processus de fermentation obscure (Rambabu et al., 2021).

I.C.5.1. modèle de GOMPERTZ modifié

Ce modèle est exprimé par l'équation (I. C – 11) :

$$H(t) = H_{max} \exp\left(-\exp\left(\frac{R_m e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (\text{I. C – 11})$$

Où :

$H(t)$: le volume de l'hydrogène cumulé produit à l'instant t (mL H_2),

H_{max} : le volume maximale de l'hydrogène cumulé produit à la fin du procédé (mL H_2),

R_m : la cinétique maximale de production de l'hydrogène durant le procédé (mL H_2/j),

λ : durée de la phase d'adaptation (j)

e constante mathématique (nombre adimensionnel équivalent à 2.718) (Rambabu et al., 2021).

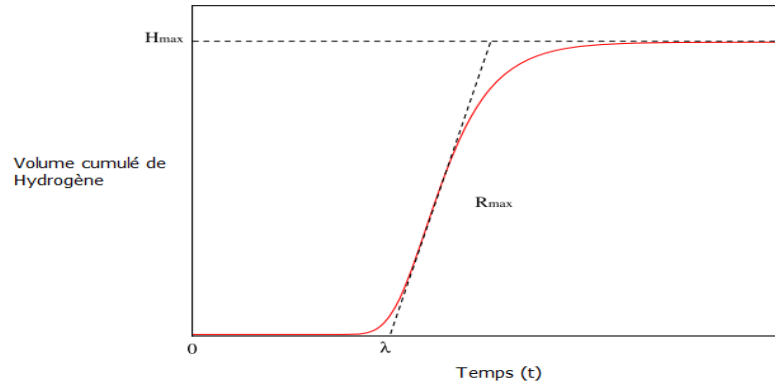


Figure 1.13 modélisation utilisant le modèle de *Gompertz modifié* (Wang & Wan, 2009)

L'équation (I.C – 11) et la **figure 1.13** décrivent la valeur cumulative (H) sur un certain temps (dégradation ou croissance), λ est appelé le temps d'adaptation ou de décalage et donne des informations sur le début réel du processus de production. Lorsque λ est atteint, la cinétique (R) augmente rapidement jusqu'à atteindre finalement la valeur cumulative maximale (H_{max}).

I.C.5.2. Modèle *LOGISTIQUE modifié*

Récemment, le modèle *logistique modifié* (Eq. (I.C – 12)), dont la courbe est très semblable à celle du modèle de *Gompertz modifié*, a été utilisé par (Wang & Wan, 2009) pour décrire les progrès de la production d'hydrogène utilisant le glucose comme substrat. En outre, Mu et al. l'ont également utilisé pour décrire les progrès de la croissance bactérienne.

$$H(t) = \frac{H_{max}}{1 + \exp\left(\frac{4R_m}{H_{max}}(\lambda - t) + 2\right)} \quad (\text{I.C – 12})$$

En outre, Mu et al. ont comparé la capacité du modèle de *Gompertz modifié*, du modèle *logistique modifié* et de Richards modifié à décrire les progrès de la croissance DGPS dans les essais de production de biohydrogène et ont conclu que le modèle de *Gompertz modifié* était le plus approprié. De plus, un modèle *logistique* Eq(I.C – 12) a également été utilisé par Mu et al. pour décrire la progression de la croissance bactérienne dans les essais par lots (Rambabu et al., 2021).

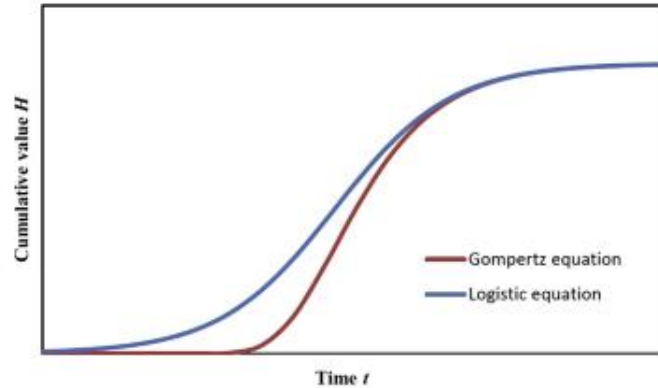


Figure 1.14 Comparaison entre le de *Gompertz modifié* et *modèle logistique modifié*
(Chezeau & Vial, 2019)

Comparé au *Gompertz modifié* (Eq. (I.C – 11)), le modèle *logistique modifié* (Eq. (I.C – 12)) peut obtenir la durée d’adaptation de la culture bactérienne directement en ajustant les données expérimentales, l’utilisant ainsi pour décrire la progression de la croissance bactériennes dans les essais par lots recommandé.

I.C.6. Paramètres influençant le procédé

Actuellement, seulement 1% de la biomasse est utilisé pour la production d’hydrogène. Toutefois, les processus de production de biohydrogène gagnent une importance principalement pour deux raisons : la facilité de fonctionnement dans les conditions ambiantes (température et pression) et une efficacité accrue tout en utilisant des ressources en énergie renouvelable (Sinha & Pandey, 2011). Par conséquent, il est essentiel de tenir compte des facteurs physiques qui influent sur la production de biohydrogène par fermentation obscure comme la température, le pH, la pression partielle de H_2 , la matière première (glucides ou source de carbone), la concentration du substrat, l’inoculum, les éléments nutritifs et d’autres métabolites solubles peuvent influencer le processus de production biologique d’hydrogène. Les principaux facteurs qui influent sur ce processus sont examinés ci-dessous.

I.C.6.1. Température

Le processus de fermentation obscure est fortement influencé par la température et son rôle principal se distingue dans l’une des trois gammes de température : psychrophile (0-20 °C),

mésophile (20-45 °C) et thermophile (45-65°C). Les plages de température idéales mésophiles et thermophiles sont 35-38 °C et 50-55 °C, respectivement. Néanmoins, la température optimale de la fermentation peut varier selon la composition de la matière première et le type de digesteur, (Fabien Monnet, 2003) a mentionné une quatrième plage de température pour l'activité microbienne : hyperthermophile, entre 70 et 95 °C.

Le principal problème associé aux différentes plages de température opérationnelles et à l'activité microbienne est associée avec le plage de vie et de fonctionnement des bactéries, qui augmentera ou diminuera l'efficacité du processus biologique, et donc la production de biohydrogène (Azeitona, 2012).

Les usines de digestion anaérobie fonctionnent généralement dans des conditions mésophiles, c'est pourquoi les régimes opérationnels adoptés pour le digesteur sont de 30 à 40 °C (Arooj et al., 2008)(Kim et al., 2002), ou plus précisément dans la fourchette de 35 à 37 °C (Kim et al., 2006), puisque ces températures assurent des conditions favorables à la croissance microbienne et augmentent l'efficacité du réacteur. Bien que la fermentation thermophile soit généralement plus efficace que la fermentation mésophile, elle est plus difficile à contrôler et moins stable ; la bactérie est plus sensible aux variations de température, qui provoquent des diminutions substantielles de son activité, taux de charge organique (OLR) et la présence de composés toxiques; elle exige également une grande quantité d'énergie, ce qui lui donne un équilibre énergétique moins favorable qu'avec la digestion mésophile (Hagelqvist, 2013).

Des températures comprises entre 40 et 45 °C sont particulièrement critiques pour les mésophiles et peut affecter leur activité de façon irréversible. Les changements de température, de type de substrat ou de concentration des substrats peuvent entraîner une défaillance de la production de biogaz ainsi que le biohydrogène (Dieter Deublein & Angela Steinhausser, 2008).

Ces perturbations peuvent survenir en quelques semaines, jusqu'à ce que le système microbiologique s'adapte aux nouvelles conditions (Deublein & Steinhausser, 2008). L'acétogénèse est la phase la plus sensible à la température que l'hydrolyse ou acidogénèse.

Plusieurs études ont examiné les effets de la température sur la production de biohydrogène par fermentation de plusieurs substrats. Les résultats ont montré que l'augmentation de température renforçait le processus. Dans le même axe Gadow et al. (Gadow et al., 2012) a montré que les conditions thermophiles et hyperthermophiles ont conduit à de meilleurs résultats que les conditions mésophiles. En outre, une recherche récente de Sotelo-Navarro et al. (Sotelo-Navarro et al., 2017) a évalué la viabilité de couches jetables pour la production de biohydrogène tout en évaluant les influences de la température et de la concentration du substrat. Les réacteurs de BHP test ont été chargés avec le substrat contenant 25 % de solides totaux, et les résultats ont montré que la production de biohydrogène à 55 °C était plus élevée qu'à 35 °C, ce qui pourrait être attribué au rythme accru du métabolisme microbien dans le régime thermophile.

I.C.6.2. pH

Le pH interagit différemment avec les fonctions spécifiques de l'activité microbienne dans la fermentation obscure. Les polymères comme les glucides (p. ex., la pomme de terre, qui présente une teneur élevée en glucides) sont susceptibles de s'acidifier et ce n'est que par la dégradation des protéines que des ions tampon de pH sont libérés. Par conséquent, la valeur du pH diminue facilement et la dégradation des carbohydrates ce qui augmente facilement la pression partielle de H₂, tandis que des acides intermédiaires (produits) sont formés, tels que les acides acétique, lactique et propionique formés dans l'acidogénèse (Dieter Deublein & Angela Steinhausser, 2008; Fabien Monnet, 2003). Selon la littérature de (Khalid et al., 2011), les processus de la fermentation obscure peuvent être inhibés à différents niveaux de pH : tandis que l'hydrolyse et l'acidogénèse se produisent de préférence à pH 5,0-6,5, respectivement.

De plus, certains auteurs ont signalé un pH optimal précis d'environ 7 (Khalid et al., 2011). Bien que d'autres gammes de pH préférées puissent être trouvés pour chaque groupe microbien, selon d'autres facteurs, tels que le substrat (Archdaily, 2012). Par exemple, (Fabien Monnet, 2003) a indiqué une plage de pH optimale pour la méthanogénèse de 6,6 à 7,0, et (Dieter Deublein & Angela Steinhausser, 2008) ont indiqué un pH optimal de 6,7 à 7,5.

Liu et al. (2006)(Liu et al., 2006), ont constaté que le pH était un facteur clé dans une corrélation directe entre le H₂, l'acétate et butyrate de sélection de la voie de fermentation. Alors que le pH 5,0-5,5 est la gamme optimale pour la production d'hydrogène et d'acétate était le seul produit final à être trouvé, à un pH inférieur à 4,8, l'hydrogène a été libéré et le butyrate a commencé à se concentrer. Mata-Alvarez et al. ont déclaré que les constantes pour l'hydrolyse des lipides, des protéines et les glucides dépendent du pH (Mata-Alvarez et al., 2000), la production de biohydrogène au cours des processus de fermentation obscure est à faible pH de culture (< 6,0). Li et al. (Li et al., 2010) ont examiné l'influence du pH sur la production d'hydrogène à partir de fumier de porc liquide complété avec du glucose dans un réacteur séquentiel anaérobie. Les résultats ont montré une augmentation rapide de la teneur en hydrogène de 0,14 % à 33,57 % à pH 5,6 et pH 5 respectivement. Néanmoins, la teneur en hydrogène a diminué à 13,66 % à pH 4,7. Il a été montré que les valeurs de pH inférieures à 5 étaient liées à la stabilité du réacteur, ce qui entraînait un environnement défavorable et un résultat plus faible. Ghimire et al. ont étudié l'influence du pH de la culture sur la stabilité de la production d'hydrogène par cofermentation du lactosérum (riche en glucides mais pH acide), complété par du fumier de buffle (caractérisé par pH alcalin élevé). Les résultats de cette étude ont montré qu'à un rapport de 4 gVS/gVS (lactosérum à fromage/fumier de buffle) et un taux de charge de 2,1 gVS/L/j de lactosérum à un pH de culture stable de 4,8–5,0 le rendement maximal en hydrogène et le taux de production ont été 152,2 mL H₂/gVS et 215,4 mL H₂/L/j. L'utilisation de fumier de buffle a amélioré la production d'hydrogène stabilité et pourrait éventuellement remplacer les agents tampons chimiques utilisés dans applications à grande échelle de fermentation obscure (Ghimire et al., 2015). De même, (Xiao et al., 2013) a étudié les impacts de la variation du pH des eaux usées protéiques utilisées comme substrat pour la production de biohydrogène. Les résultats ont montré que le pH du prétraitement a entraîné une baisse importante de la teneur en protéines de 69,1% à 42,4% pourtant aucun hydrogène n'a été produit. Toutefois, après fermentation, le pH varie entre 7 et 10 ; et la fermentation anaérobie des acides aminés est passée de l'acide propionique à l'acide acétique, ce qui a amélioré l'activité des enzymes clés, entraînant une production maximale d'hydrogène de 205,2 mL/g-protéine.

I.C.6.3. L'alcalinité

Le paramètre d'alcalinité est la mesure de l'effet tampon du substrat, ou la capacité d'une solution pour neutraliser les acides afin de prévenir les variations de pH, et répondre à sa résistance aux changements de pH. Il est généralement exprimé en mg CaCO₃/L (Korres & Nizami, 2013).

Selon (Franco et al., 2007), le paramètre d'alcalinité peut être mesuré par deux façons, qui sont des paramètres de contrôle utiles pour le procédé de fermentation obscure : l'alcalinité partielle en présence de concentration de bicarbonate [titrage jusqu'à pH 6] et alcalinité intermédiaire en présence de la concentration de acides gras volatils ; cependant, en absence de AGV, il a été prouvé que la fermentation obscure peut se réaliser à pH 6. L'alcalinité partielle plus l'alcalinité intermédiaire est l'équivalent de l'alcalinité totale [titration jusqu'à pH 4](Flor, 2006), cette dernière à 1500 mg CaCO₃/L est conseillé pour une performance appropriée des processus de fermentation obscure (Franco et al., 2007). Toutefois, le rapport entre l'alcalinité intermédiaire et l'alcalinité totale doit être contrôlé et réglementé à moins de 300-400 mg.CaCO₃.L⁻¹ (Franco et al., 2007). Dans de nombreux essais, les phosphates sont également utilisés comme source d'alcalinité (Santos, 2013), tandis que l'utilisation des sels de calcium ne sont pas recommandés car ils peuvent provoquer des incrustations dans le réacteur Performant (Flor, 2006). Par contraste, selon Korres et Nizami (2013), dans les processus fermentation obscure, la réaction d'ammoniac avec les molécules de CO₂ et les ions de carbonate dissous pour former du bicarbonate d'ammonium peut influencer l'alcalinité, lorsque l'ammoniac est présent avec des proportions élevées cela est due à la dégradation de substrats contenant des taux élevés de protéines et d'acides aminés (Korres & Nizami, 2013).

I.C.6.4. Le rapport C/N

Plusieurs études soulignent l'importance de normaliser le C/N, Rughoonundun et al. (Rughoonundun et al., 2012) ont montré que les ratios optimaux des rapports C/N faciliteraient les métabolismes microbiens. Une plage optimale de rapports C/N entre 13 et 25 a été rapportée pour la co-fermentation des boues d'eaux usées et de la bagasse prétraitée.

Il s'avère que la croissance microbienne est entravée au-delà de cette plage (par exemple, 30 g C/g N). De même, Anzola-Rojas et al. (Anzola-Rojas et al., 2015) ont proposé qu'une

concentration très élevée d'azote ($C/N < 137$) contribuerait à une croissance cellulaire excessive alors que des traces d'azote ($C/N > 137$) inhiberaient l'activité enzymatique. On a également constaté que le rapport C/N n'avait aucun effet sur les modes de fermentation. De même, Farghaly et al. (Del Pilar Anzola-Rojas et al., 2015) ont examiné la production de biohydrogène à l'aide d'un réacteur anaérobie multiphasique avec des eaux usées d'industrie de carton comme source d'éléments nutritifs où le taux de production d'hydrogène le plus élevé a été obtenu à un rapport C/N de 47,9. Ces observations illustrent l'importance d'optimiser le rapport C/N dans l'amélioration des métabolismes microbiens pour la production d'hydrogène.

I.C.6.5. Taux de dilution

Han et Shin, (Han & Shin, 2004) ont examiné les effets du taux de dilution (D) sur la production d'hydrogène par fermentation des déchets alimentaires prétraités par choc thermique. Il a été constaté que l'efficacité de fermentation (58%) à un taux de dilution D initial de 4,5/j était plus élevé que les efficacités obtenues (51,4 %, 55,2 % et 53,7 %) à D initial de 2,1, 3,6 et 5,5/j, respectivement. En outre, l'efficacité de la fermentation avait bondi jusqu'à 70,8 % lorsque le taux de dilution était est passée de 4,5/j à 2,3/j. Cette efficacité accrue a été attribuée à la détérioration extrême des matériaux qui se dégradent lentement en fonction de la conversion efficace de la DCO en hydrogène (19,3 %), en AGV (36,5 %) et en éthanol (15,0 %). Radjaram et Saravanane (Radjaram & Saravanane, 2011) ont signalé qu'à une HRT constant de 30 h, une production maximale de biohydrogène de 7960 mL/j a été observée à un rapport de dilution optimisé de 1:10 (de la boue de presse à eaux usées).

Une étude de Hwang et al. (Hwang et al., 2014) a signalé l'importance de normaliser le rapport de dilution par rapport à la biomasse micro-algale pour la production de biohydrogène. Les résultats ont montré un schéma complexe, car l'augmentation du rapport de dilution a réduit la production d'hydrogène à pH 6,8, 8,0 et 9,0, respectivement, bien qu'une telle situation n'ait pas été observée à pH 4,9.

I.C.6.6. La concentration des acides organiques AGV

Dans la production d'hydrogène fermentatif, les produits finaux métaboliques sont connus pour affecter le rendement en hydrogène. Principalement, l'éthanol, l'acide acétique, l'acide butyrique et l'acide propionique sont produits comme métabolites finaux dominants (Lee et

al., 2002). Cependant, vers la phase stationnaire, alors que l'augmentation de la concentration des métabolites fins solubles augmente la force ionique du milieu, ce qui provoque une lyse cellulaire. Certains chercheurs ont également montré qu'à des concentrations acides plus élevées, Les protons peuvent pénétrer dans la membrane cellulaire des bactéries productrices d'hydrogène et perturber l'équilibre physiologique de la cellule. Dans de telles conditions, pour rétablir l'équilibre physiologique dans la cellule, l'énergie de maintenance est utilisée. Toutefois, elle compromet considérablement la croissance bactérienne et la production d'hydrogène (Jones & Woods, 1986). Pour déterminer l'effet inhibiteur des AGV sur la production d'hydrogène, Lee et al. ont ajouté des métabolites solubles dans le milieu, ils ont constaté qu'en ajoutant de l'éthanol, de l'acide acétique, de l'acide propionique et de l'acide butyrique dans la gamme de 0 à 300 mmol/L de potentiel de production de l'hydrogène, l'efficacité de dégradation du substrat, le taux de production d'hydrogène, et le rendement en hydrogène a diminué de manière significative avec la concentration des acides gras volatils (Lee et al., 2002).

Les principaux AGV détectés sont l'acétate, le butyrate, le propionate, le succinate, le lactate et le formate. Les trois premiers AGV sont les plus couramment trouvés dans la production biologique de H₂ et utilisés pour évaluer le rendement du procédé. Théoriquement, 4 moles et 2 moles de gaz H₂ peuvent être générées à partir d'une mole d'hexose lorsque les acides acétique et butyrique sont respectivement des produits finaux (Balachandar et al., 2013).

I.C.6.7. La pression partielle de H₂

La pression partielle du H₂ est un autre facteur qui a une influence sur le processus de production de biohydrogène. Lorsque la quantité de H₂ augmente, sa pression partielle augmente également. Cette situation provoque la diminution de production de H₂. Il a également un effet direct sur la proportion des différents produits intermédiaires des réactions métaboliques anaérobies (Lee et al., 2002). Tel que présenté ci-après la production fermentative de H₂ par procédé anaérobie est une oxydation partielle de des matières organiques. Au cours de la fermentation obscure, la réaction hydrogénase, impliquant le transfert enzymatique d'électrons d'une molécule porteuse d'électrons intracellulaire aux protons, est thermodynamiquement défavorable et dépend de la plage de pression partielle H₂ (Kim et al., 2004) . Le transfert des électrons des squelettes de chaînes carbonique

(donneur d'électrons) aux accepteurs d'électrons inorganiques tels que les protons, dans la phase liquide, est facilité par les porteurs d'électrons tels que la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH, $E_{\text{NADH}}^{\circ} = -320 \text{ mV}$) et la ferredoxine (Fd, $E_{\text{Fd}}^{\circ} = -400 \text{ mV}$). Avec le potentiel redox du couple proton/dihydrogène $E_{\text{H}_2} = -414 \text{ mV}$, les pressions partielles H_2 doivent être inférieures à 40 Pa (0,3 atm) ou 60 Pa ($6 \times 10^{-4} \text{ atm}$) pour permettre la libération d'électrons sous forme de H_2 moléculaire à partir de NADH ou de ferredoxine. Par conséquent, une pression partielle de H_2 faible favorise la production de H_2 avec production d'acétate et de CO_2 comme coproduits plutôt que d'éthanol ou de butyrate (Lee et al., 2002). En revanche, les pressions partielles élevées de H_2 stimulent l'accumulation de propionate, de composés d'acides gras réduits et d'alcools en phase liquide avec une diminution du taux de production de H_2 et du rendement de H_2 (Ginkel & Logan, 2005). Par conséquent, la pression partielle de H_2 doit être maintenue à un niveau bas pour permettre la synthèse de H_2 pendant un processus de fermentation continue. Cela signifie que pour maintenir une production de H_2 plus élevée, il est nécessaire d'éliminer l'excédent de H_2 du système.

De nombreuses stratégies d'élimination ou de séparation de l'excès de gaz H_2 ont été développées pour éviter l'effet négatif de l'accumulation de H_2 dans la phase gazeuse et pour augmenter le taux de production de H_2 et le rendement de H_2 , comme épargner le réacteur avec de l'azote (taux de production d'hydrogène 15 fois plus élevé) ou de l'argon ou du CO_2 dans l'espace de tête du bioréacteur, et l'ajout de KOH en phase liquide (Li & Fang, 2007). La production biologique de H_2 s'accompagne habituellement de la production de métabolites solubles (AGV et solvants). La production de ces produits intermédiaires reflète les changements dans la voie métabolique des micro-organismes en cause. Une meilleure connaissance de ces changements pourrait améliorer la compréhension des conditions favorables à la production de H_2 (Van Ginkel & Logan, 2005).

Ainsi, des rendements élevés en H_2 sont associés à un mélange d'acétate et de produits de fermentation du butyrate. La production de propionate est une voie dépendante du H_2 (il consomme du H_2 lorsqu'il est présent dans le réacteur), empêcher le début de cette voie aidera à augmenter le taux de production de H_2 . La plupart du temps, l'éthanol, le butanol, le butanediol et l'acétone accompagnent la formation d'AGV pendant la production anaérobie de H_2 . On sait que l'accumulation d'alcool dans le bioréacteur diminue le taux de production de H_2 et le rendement de H_2 . Ceci est dû au fait que les produits finis à fermentation réduite

contenant du H₂ qui n'a pas été libéré sous forme de gaz H₂ et aussi les donneurs d'électrons produits pendant les processus de fermentation (important pour les enzymes hydrogénase), sont principalement consommés par ces produits. Par conséquent, pour maximiser le rendement en H₂, le métabolisme bactérien pendant le processus de fermentation doit être dirigé loin des alcools et de la formation réduite d'acides vers les AGV (Hawkes et al., 2002).

I.C.6.8. Présence des toxiques

Parmi les inhibiteurs de fermentation obscure, certains métaux lourds ont été reportés comme inhibiteurs de production d'hydrogène, les dérivés furaniques, les composés phénoliques et les lignines (libérés lors du prétraitement physico-chimique de la biomasse lignocellulosique) ont un impact négatif sur les rendements en hydrogène (diminution entre 69 et 80 %) une autre diminution observée à la présence des composés phénoliques (entre 17 % et 23 %). Aussi les ions ammonium, issus de la dégradation de la matière organique, ont été toxiques et inhibiteurs à une concentration de 2 g équivalent d'azote/L (Salerno et al., 2015)

I.C.6.9. Présence des nutriments

En plus de la matière première fournie pendant le processus de fermentation, les microorganismes ont également besoin de certains nutriments, notamment de l'azote, du phosphore, du potassium, du fer, du cuivre, du cobalt, du manganèse, du calcium, du molybdène, du vanadium, du magnésium, du sodium, du nickel, du sélénium, le tungstène et le zinc dans certaines proportions, pour le métabolisme bactérien efficace et la croissance (Akinbomi, 2015). L'azote et le phosphore sont des macronutriments dont les microorganismes anaérobies ont besoin en grande quantité. Par exemple, l'azote est un composant essentiel des acides aminés et est nécessaire à la croissance optimale des microorganismes. Pour les déchets organiques à haute résistance et à faible charge, le rapport entre la demande chimique en oxygène (DCO), l'azote et le phosphore qui est principalement utilisé est de 1000 :7:1 et 350:7:1, respectivement. Les micronutriments tels que le cobalt, le fer et le nickel, entre autres, sont nécessaires car ils sont incorporés dans les systèmes enzymatiques pour une dégradation appropriée du substrat et les micronutriments tels que le cobalt, le fer et le nickel, entre autres, sont nécessaires car ils sont incorporés dans les systèmes enzymatiques pour une dégradation appropriée du substrat et sa conversion en hydrogène (Francois-lopez, 2016).

Le cobalt, par exemple, est nécessaire comme activateur d'enzymes lors de la production d'hydrogène et de méthane. Le fer est un composant important des hydrogénases, les enzymes impliquées dans la production d'hydrogène. Des ions métalliques tels que le magnésium et le sodium sont également nécessaires pour le transport à travers la membrane cellulaire et comme cofacteurs d'autres enzymes. L'extrait de levure est souvent utilisé pour fournir une partie des nutriments au micro-organisme car il contient des acides aminés, des minéraux et des vitamines, y compris les vitamines B, biotine et acide folique. Cependant, pour que ces nutriments soient biologiquement disponibles aux micro-organismes anaérobies, ils doivent être présents dans le milieu nutritif sous forme soluble et non comme (Chezeau, 2018).

En outre, les éléments nutritifs disponibles ne doivent pas être en excès, car l'excès de ces éléments nutritifs peut inhiber l'efficacité des micro-organismes anaérobies. Par exemple, pour la fermentation efficace des déchets solides municipaux, les valeurs optimales moyennes (sur la base sèche) de la supplémentation en éléments nutritifs pour le C/N, le C/P et le C/K ont été données comme étant de 20/30, 150/300 et 40/100, respectivement, alors que les concentrations de Fe, Ni, Se et W ont été signalées à 100 - 5000, 5 - 20, 0 - 0,05 et 0,05 - 1 mg/kg, respectivement (Mudhoo et al., 2011).

I.C.6.10. Paramètres opérationnels

I.C.6.10.1. Temps de rétention hydraulique

Le temps de séjour des fractions liquides et solides, c'est-à-dire le temps de rétention hydraulique (HRT) et le temps de rétention solide (SRT), respectivement, doit être pris en considération pour le processus de fermentation obscure. Le temps de rétention hydraulique est le temps de séjour moyen (jours) du substrat par une unité de volume du réacteur. Par conséquent, ce paramètre est d'une importance primordiale pour la conception et l'exploitation du fermenteur, ce qui implique des coûts d'investissement plus ou moins élevés sous-jacents au volume du bioréacteur. Le HRT est décrite par la division du volume du digesteur et du débit quotidien des affluents (Krus & Lucas, 2014) (I. C – 13) :

$$\tau_H = \frac{V}{Q} \quad (\text{I. C – 13})$$

Où :

τ_H : le taux de rétention hydraulique (j)

V : le volume de bioréacteur (m^3)

Q : le débit volumique (m^3/j)

Le temps de rétention effectif peut influencer considérablement pour chaque constituant du substrat, en fonction, par exemple, de la géométrie de la cuve et du système de mélange (Kossman et coll., 1997). selon (Fabien Monnet, 2003), la conception du réacteur est également un facteur important pour l'efficacité du SRT; les digesteurs verticaux nécessitent un SRT légèrement plus élevé que les digesteurs horizontaux (Korres & Nizami, 2013).

La SRT se produit à l'intérieur de la capacité du digesteur, par des moyens physiques et mécaniques, pour retenir la biomasse obtenue par le procédé par des périodes plus longues que celles observées pour le débit hydraulique, empêchant l'encastrement des zones mortes ou des voies préférentielles dans le digesteur (Korres & Nizami, 2013). Ainsi, l'expression SRT est la suivante :

$$\tau_S = \frac{V \cdot S_{vs}}{S_0} \quad (\text{I.C} - 14)$$

Où :

τ_S ou SRT : temps de rétention des solides (j)

V : le volume de bioréacteur (m^3)

S_{vs} : concentration des solides dans le réacteur (g/m^3)

S_0 : Taux de chargement des solides volatils ($g/j m^3$)

Une étude de l'effet du HRT sur la production d'hydrogène a indiqué que le rendement maximal en hydrogène de 1,7 mol H_2 /mol de glucose a été obtenu à HRT de 6 h (Lin & Chang, 1999). En plus de l'effet du temps de rétention hydraulique sur le CSTR, la fermentation de l'hydrogène pourrait être effectuée à un HRT plus court dans le bioréacteur à haut débit, qui peut maintenir la biomasse avec un temps de rétention des boues illimité. Dans un bioréacteur à lit fluidisé triphasique, le SRT pouvait être atteint en aussi peu que 2 h pour obtenir le meilleur rendement en hydrogène de 2,67 mol H_2 /mol saccharose (Wu et al., 2003). D'autre part, un rendement maximal en hydrogène de 3,03 mol H_2 /mol saccharose a été observé à une HRT de 0,5 h dans un bioréacteur à lit de boues granulaires induit par

transport (Dhar et al., 2015). Étant donné que la variation du SRT a modifié simultanément le taux de charge organique, l'ambiguïté entre l'effet du THS et le taux de charge organique sur la production d'hydrogène a été inquiétante.

Par conséquent, une étude examinant l'influence de la concentration de substrat et de TRH sur la production continue d'hydrogène par les boues acidogènes granulaires à un taux de charge organique constant de 18 %, a indiqué que le rendement maximal était à TRH de 13,7 h avec une concentration de saccharose de 14,3 g/L (Fang et al., 2002). En bref TRH, les consommateurs d'hydrogène, principalement des méthanogènes, pourraient être essentiellement lessivés ou épuisés. Le contrôle du TRS pourrait être une autre stratégie pour limiter les consommateurs d'hydrogène sans prétraitement des boues de semences. Lin et Jo (Lin & Jo, 2003) ont exploité un réacteur séquentiel anaérobie produisant de l'hydrogène avec une réduction progressive du HRT jusqu'à 8 h pour inhiber complètement la production de méthane.

Un faible HRT favorisait le lavage des méthanogènes, garantissant la survie des producteurs d'hydrogène. Donc un faible HRT et pH acide léger (6.0-6.5) représentent la meilleure condition pour la production d'hydrogène ; au contraire, le modèle de fermentation de l'hydrogène peut se déplacer vers un méthanogène lorsque HRT est augmenté (Ma et al., 2008).

Badieï et al. (Badieï et al., 2011)(Fang et al., 2002) ont reconnu le rôle essentiel du HRT dans la production d'hydrogène et ont montré que dans des TRH optimales de 72 h pour les effluents dilués des usines d'huile de palme dans un système de séquençage anaérobie à réacteur discontinu. Une réduction du HRT a entraîné le lavage des bactéries actives du système, ce qui a ensuite nui à la production d'hydrogène. De même, Scoma et al. (Scoma et al., 2013) ont évalué l'influence du SRT sur le processus acidogène anaérobie avec les eaux usées déphénolisées des oliveraies. La réduction des HRT a contribué à l'augmentation des taux de production d'hydrogène. Le HRT a été multiplié par 7. (7-1 jour), une augmentation de 30 fois la quantité d'hydrogène a été enregistrée. Les études de co-fermentation donnant à la fois de l'hydrogène et du méthane ont également montré d'importantes dépendances au SRT qui ont contribué de manière significative à la normalisation du produit désiré. Rosa et al. (Rosa et al., 2014) ont montré qu'il n'y avait pas d'apparition de méthane et un rendement

maximal en hydrogène de 1,0 mmol H₂/g DCO ont été atteints, respectivement à HRT de 10 h.

I.C.6.10.2. ORL ‘Organic Loading Rate’

Le taux de charge organique (ORL) est également un paramètre important des systèmes de fermentation continue et discontinu de l’hydrogène et correspond à la quantité de composés organiques introduits par unité de temps et par unité de volume du réacteur.

C’est la quantité possible de la matière volatil en suspension à ajouter dans le fermenteur, c.-à-d. la quantité de biomasse alimentée par unité de volume du fermenteur par unité de temps (Korres & Nizami, 2013), généralement exprimés en solides totaux (TS), en solides volatils (VS), ou Demande chimique en oxygène (DCO) (Astals et al., 2013)(Carrillo-Reyes et al., 2019), l’OLR est décrit par l’expression suivante (Eq. I. C – 15) :

$$ORL = \frac{QS}{V} \quad (I. C - 15)$$

L : Le taux de charge organique (kg/m³/j)

Q : Débit volumique (m³/j)

S : Concentration de charge organique (kg/m³)

V : Volume du fermenteur (m³)

Ainsi, l’ORL est une mesure de la capacité de conversion biologique du processus de fermentation d’une importance primordiale pour un démarrage approprié du système d’alimentation. Lorsque l’OLR s’écarte de la norme condition, il y a une diminution de la dégradation de la matière organique, et donc une faible production de biohydrogène en raison de la concentration de composants inhibiteurs (Monnet, 2003). Cependant, l’ORL est un paramètre opérationnel particulièrement important pour les systèmes continus et semi-continus, afin d’éviter une défaillance en surcharge du système de fermentation, comme cela s’est produit dans de nombreuses industries (Monnet, 2003). Pour la stabilité du procédé, l’OLR spécifique de la matière volatil en suspension devrait être inférieur à 9 kgVS/m³j (Mata-Alvarez et al., 2000). Généralement, l’OLR est exprimé par la concentration en DCO (kg DCO/m³ j) ou TVS (kg VS/m³ j).

Compte tenu de l'apport énergétique d'un système de fermentation continue, il est recommandé d'augmenter l'ORL ainsi que le taux de charge liquide pour augmenter la rentabilité du procédé.

Cependant, les ORL élevés semblent défavorables à la production d'hydrogène. En effet, pour des valeurs élevées d'OLR, les produits fermentatifs comme les AGV s'accumulent, et le métabolisme microbien peut passer de l'acidogénèse à la solvantogénèse et peut même être accompagné d'une sporulation à ce stade (Lee et al., 2008).

De plus, (Kyazze et al., 2005) ont montré qu'une augmentation du taux de charge peut entraîner une diminution du rendement en hydrogène. Dans cette étude, les CSTR ont été nourris de saccharose etensemencés par des boues de fermenteur anaérobie chauffées. Le rendement en hydrogène a été réduit de 1,7 mol H₂/mol hexose à 0,8 mol H₂/mol hexose⁻¹ par des valeurs d'ORL 10 g/L.j et 50 g/L.j, respectivement.

La voie de production du butyrate de biohydrogène a été la plus touchée, mais le mécanisme moléculaire d'inhibition n'a pas été clairement établi (Kyazze et al., 2006). Une autre expérience menée dans le cadre de le réacteur séquentiel anaérobie a présenté l'effet de l'OLR variant de 25 à 40 g /L.j du jus de sorgho doux sur les rendements de production d'hydrogène (Saraphirom et Reungsang, 2010). Le rendement en hydrogène le plus élevé de 0,53 mol H₂/mol hexose et le taux de production maximal de 413 mL/Lj ont été observés dans un ORL de 30 g/ Lj. D'après l'analyse microbienne, la présence de *Lactococcus lactis* et de *Lactobacillus sp.* ont été suggérés pour causer de faibles rendements d'hydrogène par l'accumulation de lactate. Mais la présence de bactéries lactiques n'a pas pu expliquer les faibles rendements en hydrogène observés à l'OLR le plus élevé de 35 ou 40 g/ Lj, puisque les bandes affiliées à *Lactobacillus sp.* disparu, ce qui donne à penser que la solvantogénèse aurait pu se produire (Saraphirom & Reungsang, 2010).

Ozmihci et Kargi ont signalé un OLR optimal à 1,38 gTS/Lj pour la solution d'amidon de blé à 10 g/L pour atteindre un rendement élevé en hydrogène de 109 mL/gTS. Dans cette étude, des cultures pures de *Clostridium butyricum* et de *C. pasteurianum* ont été utilisées comme inoculums et aucun concurrent ou consommateur d'hydrogène n'a été pris en considération. La diminution du rendement en hydrogène à un OLR plus élevé était probablement due aux changements métaboliques qui se produisent par l'accumulation de

AGV (Ozmihci & Kargi, 2011). Dans l'ensemble, on n'a pas trouvé de preuve claire de l'effet de l'OLR sur l'hydrogène.

I.C.6.10.3. Agitation

Le mélange du réacteur est un paramètre opérationnel important pour améliorer et augmenter le contact entre les micro-organismes et le substrat, contribuant ainsi à réduire le I.C – 15 et à améliorer les performances des réactions dans le digesteur (Korbekandi et al., 2009). L'agitation assure l'homogénéité du mélange dans le réacteur ainsi que la température, et empêche la formation d'écume et de zones inactives (Azeitona, 2012). Une agitation en douceur peut entraîner une concentration homogène de nutriments et de produits métaboliques pour chaque micro-organisme. Toutefois, afin de détruire une couche de H₂ autour du micro-organisme, une agitation importante doit être employée (Deublein & Steinhäusser, 2008), bien que dans ce cas, il est également possible de détruire les cellules microbiennes et de réduire le taux d'oxydation des AGV, l'instabilité dans l'ensemble du processus (Azeitona, 2012). Les moyens habituels pour favoriser l'agitation du fluide à l'intérieur du fermenteur sont la recirculation et l'injection d'une partie du biogaz dans le fermenteur, l'agitation mécanique qui entraîne des coûts plus élevés, l'injection de l'influent et l'élimination de l'effluent dans le fermenteur, ou une combinaison tout ce qui précède (Azeitona, 2012; Taghinazhad et al., 2017).

I.C.7. Amélioration du procédé de fermentation obscure

Plusieurs technologies ont été récemment réalisées afin d'améliorer la production de biohydrogène par fermentation obscure, ces technologies sont détaillées par la suite :

I.C.7.1. Les cultures productrices

Il est possible d'agir sur le rendement de production d'hydrogène par choix d'inoculum utilisé. Trois types d'inoculum peuvent produire le biohydrogène par fermentation obscure de la matière organique : cultures pures, cocultures et cultures mixtes.

I.C.7.1.1. Cultures pures

La production de biohydrogène s'effectue par une seule espèce microbienne, qui consomme et transforme le substrat organique en biohydrogène par différentes voies (acétates, butyrate, formate, lactate.....etc.). Les bactéries productrices d'hydrogène peuvent être aéro-

anaérobies facultatifs ou anaérobies strictes, mésophiles 25-40°C, thermophiles 40-60°C ou hyperthermophiles > 80°C (Fabien Monnet, 2003) ; l'utilisation des cultures pures anaérobies nécessite l'absence totale d'oxygène dans le milieu de fermentation ainsi que le maintien des conditions axéniques pour éviter la contamination par d'autres micro-organismes au cours de l'inoculation et la cultivation (Hamilton et al., 2010)

Plusieurs études ont été concentrées sur la production de biohydrogène par fermentation obscure en utilisant des souches pures afin d'améliorer la productivité, d'une façon générale les rendements et les productivités de biohydrogène par cultures pures sont très variables. Quelques études récentes sont résumées au tableau 1.3 ;

Tableau 1.3 Rapport des études de production de biohydrogène par différentes cultures pures.

	Espèce	Substrat	Rendement de production d'hydrogène	Références
Anaérobies stricts	<i>Clostridium thermocellum</i>	Graines de dattes	103.97 mmol/L	(Rambabu et al., 2020)
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Glucose	10.3 mL H ₂ / (g DCO/L)	(Skonieczny & Yargeau, 2009)
	<i>Clostridium butyricum</i>	Glucose	1.67 mol H ₂ /mol glucose	(Puhulwella et al., 2014)
	<i>Clostridium bacterium</i>	Glucose	2.49 mol H ₂ /mol glucose	(Beckers et al., 2012)
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Hexose	223 ml /g hexose	(Jo, Lee, Park, & Park, 2008)
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Paille de riz	2580 ml/L	(Srivastava et al., 2017)
Anaérobies facultatives	<i>Escherichia coli</i>	Déchet de papier	1.45 mmol H ₂ / L	(Poladyan et al., 2020)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glucose	163.5 mL/g	(R. Lin et al., 2020)

I.C.7.1.2. Cocultures

La production de biohydrogène par cocultures consiste à utiliser au moins deux espèces de micro-organismes pour contrôler l'association de métabolismes d'intérêt, l'amélioration de la production de biohydrogène repose sur l'installation de mécanisme de symbiose entre les espèces, l'union entre plusieurs espèces permet de dégrader en plus les substrats organiques.

Parmi les études concentrées sur cet axe : Kao et al., ont utilisé les souches *Clostridium butyricum* et *Rhodospseudomonas palustris* au lieu d'utiliser une seule souche pure pour l'évaluation de la production de biohydrogène par fermentation obscure de sucrose (Kao et al., 2014). Dans le même objectif, Hadiseh Tondro et al., ont groupé les deux espèces *Enterobacter aerogenes* et *Clostridium acetobutylicum* pour fermenter la bagasse de canne à sucre et les pailles de riz dont l'objectif est la production l'hydrogène, l'acétone, le butanol et l'éthanol. Le rendement de production de biohydrogène par coculture a été amélioré à 3.4 et 1.5 fois face à l'utilisation des souches pures *Enterobacter aerogenes* et *Clostridium acetobutylicum* respectivement (Tondro et al., 2020).

I.C.7.1.3. Cultures mixtes

La production de biohydrogène par cultures mixtes est majoritairement étudiée à cause de leurs disponibilité et facilité d'usage sans conditions de stérilisation. Plusieurs types de cultures peuvent être rencontrés tel que les boues aérobies et anaérobies issues des stations d'épuration des eaux usées, des déchets de sols et d'élevage (Deublein & Steinhausser, 2008). La culture mixte comprend une grande concentration en micro-organismes de différents types : aérobies, anaérobies, méthanogènes, sulfato-réductrices et homo-acétogènes. C'est pourquoi il est indispensable de procéder un prétraitement pour sélectionner les bactéries productrices d'hydrogène et éliminer celles consommatrices de ce bioproduit. Plusieurs prétraitements ont été effectués pour sélectionner les bactéries productrices d'hydrogène : enrichir les bactéries sporulées de l'espèce *Clostridium* et inhiber les bactéries consommatrices d'hydrogène.

- Prétraitements physiques

Le prétraitement physique utilisé fréquemment est le prétraitement thermique ; la culture mixte subit un choc thermique à des températures élevées et proches à celle de l'ébullition de l'eau (100°C) ou parfois l'ébullition pendant une durée de 20 à 30 minutes (Moussa et al., 2022; O-Thong et al., 2009) pour éliminer les bactéries non sporulées (consommatrices d'hydrogène) ce qui sert à enrichir l'inoculum par les bactéries sporulées (*Clostridium*) (Mohan et al., 2012). Lee et al. ont réalisé un prétraitement thermique de 95 à 100°C pendant 1 h pour éliminer les bactéries méthanogènes (Lee et al., 2021). Autres études ont sélectionné les bactéries productrices d'hydrogène par prétraitement thermique à autres températures

pendant des durées différentes : Mohan et al. ont utilisé ce prétraitement à 90°C pendant 2 h (Mohan et al., 2012) ; tandis que Aspiranti a sélectionné les bactéries productrices d'hydrogène à 80°C pendant 15 minutes et 100°C pendant 4 h dans les cultures mixtes liquides et granulaires respectivement (Aspiranti, 2014).

Les ultrasons ont été utilisés comme prétraitement physique par (Elbeshbishy et al., 2010), Shao-Yi Hsia et al. qui ont trouvé qu'une fréquence ultrasonique supérieure à 1 Mhz détruit les méthanogènes ainsi que les bactéries productrices d'hydrogène (Hsia et al., 2014), l'aération forcée aussi a été un outil de prétraitement d'inhibition d'*Archea* méthanogènes (Morimoto et al., 2004).

- Prétraitements chimiques

L'utilisation des réactifs chimiques pour la sélection des bactéries productrices d'hydrogène a été largement étudié ; le *BESA 2-bromoethanesulfonicacid*, le *chloroform* et l'*iodopropane* avec une faible quantité dans la culture mixte ont une action spécifique sur les *Archea* méthanogènes (Zhang et al., 2005)(O-Thong et al., 2009). Les chocs acides et basiques (par réactifs forts) des cultures mixtes ont conduit à inhiber l'activité des bactéries productrices de méthane (Elbeshbishy et al., 2010).

Le choix du prétraitement dépend de la nature de la culture mixte ainsi que sa source, le prétraitement le plus utilisé est le prétraitement thermique grâce à son efficacité, facilité de mise en œuvre et coût plus au moins faible (Li & Fang, 2007).

I.C.7.2. Prétraitement de substrat

La fermentation obscure implique une série de réactions biochimiques par lesquelles les matières organiques sont transformées en un mélange de biohydrogène par des micro-organismes en l'absence d'oxygène. C'est une méthode efficace pour réduire le volume et le poids des boues, et déchets organiques, éliminer les microbes nocifs et améliorer la production d'énergie renouvelable. Malgré que le faible taux de production de l'hydrogène par fermentation obscure constitue un énorme inconvénient ; pour y remédier, des méthodes de prétraitement ont été développées au fil des années. Un large éventail de technologies de pré-conditionnement de substrat a été utilisé pour réduire la longue durée de séjour de la fermentation et, par conséquent, et facilitent ainsi la consommation de substrat pour la

production de biohydrogène. Par exemple, l'exposition des substrats à des conditions oxydatives élevées (ozone) a rompu les liaisons chimiques, ce qui a entraîné l'augmentation de DCO solubles, ce qui a entraîné l'hydrolyse rapide (Weemaes et al., 2000). Dans une autre étude de Hogan et al. (Hogan et al., 2004) ont signalé que l'utilisation de la sonication comme prétraitement des boues activées (auto-fermentation) a entraîné une assimilation multipliée par trois dans le processus de fermentation obscure, plusieurs prétraitements ont été étudiés et cité ci-après.

I.C.7.2.1. Prétraitements physico-chimiques

– Prétraitements par ultrasons

La sono-lyse, en termes simples, fait référence à la rupture de liaisons chimiques ou à la production de radicaux à l'aide d'ondes ultrasonores. Le mécanisme des ultrasons est basé sur la cavitation acoustique des ondes ultrasonores de haute puissance et de basse fréquence (20-100 kHz). La cavitation renforce les réactions chimiques ou une énorme densité de puissance est fournie en peu de temps, ce qui facilite les réactions chimiques à haute température et à haute pression (Hogan et al., 2004). Plusieurs études ont été menées en utilisant l'ultrasonication comme méthode de prétraitement en vue d'améliorer la production de biohydrogène. Par exemple, les eaux usées laitières prétraitées avec cinq densités ultrasoniques (de 0 à 0,2 W/mL) à cinq intervalles différents (de 6 à 14 min) ont démontré un effet synergique sur la biodégradabilité et l'expression microbienne, ce qui, à son tour, a multiplié par deux la production d'hydrogène par rapport à un échantillon non traité (Gadhe et al., 2015). Budiman et Wu (Budiman & Wu, 2016) ont examiné les résultats de l'utilisation des ultrasons comme prétraitement pour les effluents intégrés des usines d'huile de palme et de pâtes et papiers. Une forte solubilisation des particules, une solubilisation élevée des particules, des matières organiques, du tanin, de la lignine, de la cellulose et d'autres composés organiques complexes dans les effluents a été réalisée au cours de la phase de mélange. Par conséquent, le prétraitement ultrasonique (amplitude de 70 % ; 45 min) a augmenté le rendement de l'hydrogène de 467 à 872,4 mL. Une augmentation significative du rapport DCO soluble/DCO total (de 0,25 à 0,85) du substrat disponible pour la consommation a été également observée. Cependant, l'optimisation de toute stratégie de prétraitement pour une production efficace de biohydrogène ne peut produire que certains

facteurs défavorables. Par exemple, la présence de certains composés inhibiteurs comme les furanes et les composés phénoliques peut se former en utilisant certains substrats (Bundhoo, 2017). En outre, bien que plusieurs études expérimentales aient révélé des résultats prometteurs, le saut vers la production industrielle de biohydrogène précédée par de telles méthodes de prétraitement reste une tâche difficile (Rafieenia et al., 2017).

– **Prétraitements par micro-ondes**

Le prétraitement par micro-ondes est le processus d'irradiation utilisant des ondes électromagnétiques de fréquence 300 MHz à 300 GHz, qui à son tour produit de la chaleur dans les liquides polaires. Cette technique est connue pour perturber la paroi cellulaire, augmentant ainsi la solubilité du milieu qui y est soumis. Il y a aussi beaucoup de chaleur générée pendant le processus en raison du réalignement des dipôles, ce qui contribue également à la perturbation (Gadhe et al., 2015). Dans une étude menée par (Gadhe et al., 2015), les boues d'eaux usées ont été utilisées comme substrat et soumises à trois méthodes de prétraitement différentes, à savoir la stérilisation, l'irradiation par micro-ondes et l'échographie. La boue prétraitée par micro-ondes a fourni un rendement maximal en hydrogène de 11,44 mL/g de DCO totale avec un délai plus court de 10 h. De plus, il a été noté que les boues traitées aux micro-ondes produisaient un rendement en hydrogène plus élevé que les boues traitées aux ultrasons, avec un rendement de 4,68 mL/g de DCO totale seulement. Dans une étude menée par Thungklin et al. (Thungklin et al., 2011), la matière organique contenue dans les boues des eaux usées de l'abattoir de volailles (composées de glucides, de protéines et de matières grasses) a été libérée par prétraitement des boues par micro-ondes (850 W pendant 3 min). Le prétraitement a été réalisé pour inhiber les bactéries méthanogènes qui entravent la production d'hydrogène. Les résultats expérimentaux ont montré une production maximale d'hydrogène de 132,10 mL de H₂/ L boues et une diminution marquée des protéines solubles à la fin du processus de fermentation. Ainsi, il pourrait être démontré que la principale caractéristique du substrat pour la production d'hydrogène serait la protéine provenant des boues d'abattoir de volailles. Malgré les avantages de l'utilisation des micro-ondes pour le prétraitement des déchets industriels, il est souvent nécessaire d'utiliser une irradiation de faible intensité afin d'éviter de changer la température du système. En effet, un environnement à haute température peut entraîner la

formation de composés inhibiteurs. De plus, le prétraitement par micro-ondes a un besoin énergétique élevé ce qui le rend non économique (Rafieenia et al., 2017), c'est pourquoi il n'est pas couramment utilisé dans la production d'hydrogène à grande échelle.

– **Prétraitements Acid/basic**

La méthode de prétraitement acide/alcali est une technique largement adoptée en raison de sa solubilisation extrêmement élevée dans les substrats pour faciliter la digestion par les micro-organismes. Une consommation efficace de substrat favorise la fermentation et contribue directement à l'augmentation de la production des produits désirés. Pour les substrats contenant de l'hémicellulose, un prétraitement acide est largement préféré (Hendriks & Zeeman, 2009) tandis que pour les substrats lignocellulosiques, un prétraitement alcalin est généralement adopté en raison de la décomposition efficace des structures cristallines (c.-à-d. cellulose cristalline) en raison de la saponification des liaisons ester. Les acides les plus couramment utilisés sont le HCl et le H₂SO₄ ; et le NaOH est la base la plus utilisée pour le prétraitement des eaux usées (Hendriks & Zeeman, 2009). Dans une série d'expériences, les eaux usées de transformation du sucre et la pulpe de betterave ont été prétraitées en utilisant différentes méthodes (alcaline, thermique, micro-ondes, thermique-alcaline et micro-ondes-alcaline) pour comprendre la pertinence de ces méthodes pour la production améliorée d'hydrogène (Ozkan et al., 2011). L'analyse expérimentale a révélé que, de toutes les approches considérées, la pulpe de betterave prétraité par méthode alcaline présentait la production d'hydrogène la plus élevée, soit 115,6 mL H₂/g de DCO.

Liu et al. (Hendriks & Zeeman, 2009) ont réalisé une étude sur l'hydrolysat de paille de riz prétraité à l'acide (55 % H₂SO₄, 40 °C, 2 h), qui a révélé un rendement en hydrogène inférieur de seulement 0,44 mol H₂/mol sucre total par rapport à un rendement supérieur de 1,89 mol H₂/mol sucre total, préalablement obtenu pour un prétraitement acide hydrolytique similaire de paille de riz (3 % en poids (acide/biomasse), 150 °C, 1 h). Les auteurs ont proposé que la diminution était probablement due à l'hydrolyse qui se produit dans un environnement acide beaucoup plus fort, ce qui a entraîné la génération d'inhibiteurs, et finalement affecté la production d'hydrogène. Récemment, Battista et al. (Battista et al., 2016) ont rapporté qu'un prétraitement basique avec ajout de NaOH au mélange des eaux usées moulin à olives et la pomace d'olive a donné un rendement en hydrogène de 1,98 NL/L avec le rendement en

pourcentage le plus élevé de ~ 20% par rapport à d'autres méthodes de prétraitement utilisant les ultrasons et le carbonates de calcium CaCO_3 . Cela a été attribué à l'attaque biologique efficace du NaOH sur la cellulose, qui a provoqué la fissuration des liens structurels entre les glucides, qui ont libéré du glucose pour utilisation comme substrat. Bien que ce type de prétraitement soit économique et très efficace, la corrosion des bioréacteurs causée par un contact prolongé est susceptible de provoquer des complications pendant le processus de fermentation. En outre, il est essentiel d'optimiser la concentration d'acide/alcali précisément afin d'obtenir les rendements souhaités.

– **Thermique / choc thermique**

Afin de maximiser la solubilisation des déchets industriels, en particulier les boues (riches en nutriments organiques), un prétraitement thermique est effectué à grande échelle. Le choc thermique est l'une des nombreuses méthodes de prétraitement utilisées pour les boues digérées. En faisant bouillir les boues pendant 20 min (Srivastava et al., 2017), les boues traitées utilisées comme substrat par choc thermique ont produit 2,65 mmol d'hydrogène, ce qui est inférieur à celui des boues non traitées à 3,8 mmol d'hydrogène.

Cela s'explique par la possibilité que la chaleur provoque la destruction de diverses bactéries non sporulées, provoquant une diminution de la consommation d'oxygène, diminuant finalement la bioconversion du substrat en hydrogène. Kotay et Das (Kotay & Das, 2009) ont signalé que le prétraitement thermique a entraîné une meilleure solubilisation des protéines que le gel-dégel ou la supplémentation chimique. En utilisant les boues prétraitées comme inoculum, le rendement en hydrogène a été augmenté de 1,5 à 4 fois.

Dans une étude réalisée par Chairattananokorn et al. qui ont amélioré l'accès à une teneur élevée en cellulose dans les résidus de bagasse en appliquant un prétraitement thermique (100 °C pendant 2 h), qui a desserré le faisceau de fibres, suivi d'une hydrolyse par cellulase, favorisant la production de biohydrogène (Chairattananokorn et al., 2009). Un rendement de 1,40 mmol/g de solides volatils totaux a été obtenu. Toutefois, lors du traitement alcalin au NaOH (4 g/L), le rendement a augmenté jusqu'à 13,39 mmol/g de solides volatils totaux. Cette augmentation a été attribuée à un taux de délignification plus élevé couplé à une hydrolyse accrue de la cellulase. Plus récemment, Pagliaccia et al. (Pagliaccia et al., 2016) ont signalé que la production de biohydrogène à l'aide de substrats prétraités thermiquement, (les déchets alimentaires et les feuilles d'olive). Leurs résultats ont montré une augmentation

du rendement en hydrogène de plus de 30 % par rapport au mélange non traité des substrats, ce qui était dû à la présence de matériaux solubilisés hautement disponibles et le taux de conversion élevé de 87 NL de H₂/kgVS a été atteint. Avec une analyse comparative, une optimisation supplémentaire peut être effectuée pour obtenir une productivité améliorée. De même, des études à long terme ont montré que des chocs thermiques répétés sont nécessaires pendant la fermentation obscure pour inhiber définitivement certains microorganismes consommateurs d'hydrogène. Dans de tels cas, le prétraitement à l'aide d'une méthode thermique peut ne pas être une approche rentable (O-Thong et al., 2009).

I.C.7.2.2. Prétraitement biologique (enzymatique)

Le prétraitement biologique est utilisé pour augmenter le taux d'hydrolyse pendant la fermentation, car il brise les structures réticulées des déchets riches en lignocellulose et polymère. Cui et al. (Cui et al., 2010) ont établi la stratégie de prétraitement enzymatique pour augmenter le rendement en hydrogène à l'aide de résidus de feuilles de peuplier, un rendement cumulatif maximal en hydrogène de 44,92 mL/g de feuilles de peuplier séchées a été obtenu à partir d'un substrat prétraité par le mélange d'enzymes (2 % de *Vicozyme L* : un mélange d'*arabonase*, de *cellulase*, de *b-glucanase*, d'*hémicellulase* et de *xylanase*), soit environ 3 fois plus que le substrat brut et 1,34 fois supérieur à celui du substrat prétraité à l'acide (HCl à 4 %).

Massanet-Nicolau et al. (Massanet-Nicolau et al., 2008) ont examiné le potentiel d'une nouvelle approche de prétraitement enzymatique pour accroître la solubilisation des glucides dans les boues primaires obtenues à partir d'une station d'épuration. Une augmentation des carbohydrates solubles de 2,6 % à 13,5 % du total des carbohydrates a été observé à la suite d'un prétraitement enzymatique réussi, ce qui a probablement contribué à un rendement en hydrogène de 18,14 L H₂/kg de solides secs à un pH optimal de 5,5. Cheng et Liu (Cheng & Liu, 2012) ont mis au point une nouvelle méthode de prétraitement pour améliorer la production d'hydrogène à l'aide de tiges de maïs brutes mélangées à des tiges de maïs prétraitées par prétraitement fongiques par *Trichoderma reesei* Rut C-30. Une augmentation de l'activité de la cellulase a été observée, ce qui a contribué au taux élevé d'hydrolyse des composants lignocellulosiques en substances solubles, facilitant ainsi la fermentation et la production de l'hydrogène. De plus, un rendement très élevé de 194,9 mL a été obtenu, soit

environ 209 % de plus que celui obtenu par la fermentation directe de tiges de maïs crues. Dans une autre étude, une analyse comparative entre l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse acide comme méthodes de prétraitement des eaux usées des rizières a été mise en place (Ramprakash & Muthukumar, 2014). L'hydrolyse enzymatique utilisant *Aspergillus niger* a produit 1,74 mol H₂/mol de sucre réducteur, ce qui était plus élevé que par un prétraitement d'hydrolyse acide (1,40 mol H₂/mol de sucre réducteur). Une étude plus récente de Contreras-Dávila et al. (Contreras-Dávila et al., 2017) a utilisé la bagasse d'*Agave tequilana* prétraitée par hydrolyse enzymatique pour la production continue à long terme d'hydrogène dans un réacteur à cuve agitée continue (CSTR) et un réacteur à lit d'arrosage (TBR). Le TBR présentait une production d'hydrogène plus élevée (1,53 mol H₂/substrat mol) que le CSTR (1,35 mol H₂/substrat mol). Les méthodes de prétraitement biologique sont rentables, car l'énergie requise est souvent inférieure à celle des autres protocoles de prétraitement. Malgré cela et d'autres caractéristiques positives de l'utilisation de méthodes de prétraitement biologique, il y a aussi quelques difficultés communes. Par exemple, il faut évaluer la compatibilité des enzymes utilisées avec la substance microbienne particulière afin d'éviter l'inactivation possible des enzymes, qui peut avoir un impact négatif sur la production d'hydrogène.

I.C.7.3. Application des NPs métalliques sur la production de biohydrogène (catalyseurs)

Récemment, la nanotechnologie a été impliquée dans un grand nombre de production et de processus habituels depuis que les nanomatériaux apportent de nouvelles propriétés chimiques et physiques. En effet, en raison de leur taille comprises entre 1 et 100 nm, les nanomatériaux présentent une très grande surface spécifique et les effets quantiques commencent à prédominer (Dinesh et al., 2012). L'intérêt pour le domaine biologique ne cesse de croître avec des applications pratiques dans de nombreux domaines différents puisque les nanoparticules (NPs) ont récemment montré des interactions avec des micro-organismes même à très faible concentration. D'une part, certains NPs présentent une activité antimicrobienne par contact étroit avec les micro-organismes, ce qui entraîne une perturbation des membranes, et soulève également des préoccupations environnementales quant à leur dissémination dans la nature (Neal et al., 2008). D'autre part, certains microorganismes peuvent tirer profit du NP, en particulier en milieu anaérobie, en transférant

plus efficacement les électrons aux accepteurs. Le NP intra-cellulaire ou extra-cellulaire peut être produit par la réduction des ions métalliques pour la biosynthèse de nanomatériaux à composition chimique ou morphologie différentes (Korbekandi et al., 2009).

Le transfert d'électrons peut également se produire à travers des cytochromes de type C membranaire ou des nano-fils vers des accepteurs d'électrons tels que des composés chimiques polluants (pour les applications d'assainissement des sols (Korbekandi et al., 2009), des électrodes pour la génération actuelle de piles à combustible microbiennes ou par transfert d'électrons interspécifiques) (Korbekandi et al., 2009). Dans tous ces domaines d'application, le NP a récemment montré certains avantages par sa capacité à réagir rapidement avec les donneurs d'électrons conduisant ainsi à une amélioration cinétique et, par son action en tant que biocatalyseurs, à l'amélioration de l'activité microbienne (Korbekandi et al., 2009)(Guo, 2012).

Une production accrue d'hydrogène par fermentation obscure en introduction de la nanotechnologie, utilisant des nanoparticules inorganiques (NP) dans les bioréacteurs a été reconnu ces jours-ci. Une telle nanotechnologie comprend le métal et les oxydes métalliques comme le cuivre, l'or, le palladium, l'argent, l'oxyde de fer, l'oxyde de nickel, ont été révélés un développement remarquable de la productivité de l'hydrogène par fermentation sombre. Les cultures pures/mixtes peuvent produire de l'hydrogène fermentatif à partir de matières premières de déchets biologiques et avec des sucres purs dérivés. L'amélioration de production et l'efficacité de la productivité dépendent de la nature et de la concentration que les NPs employaient (Pugazhendhi et al., 2019).

En général, comme les nanoparticules ont une surface spécifique plus élevée due à leurs petites tailles, c'est à dire un effet catalytique, leurs présences dans le milieu de fermentation anaérobie augmentent la performance de l'activité fermentative obscure (Mullai et al., 2013). De plus, les nanoparticules améliorent l'activité enzymatique comme l'hydrogénase en améliorant le transfert d'électrons dans les systèmes anaérobies (Lin et al., 2016).

I.C.7.4. Co-fermentation

La production de biohydrogène par fermentation obscure a reçu une grande attention, puisque la matière première de ce processus est une source de matières renouvelables (telle que les eaux usées complexes, déchets agro-industriels) mais la plupart des études ont été menées en

utilisant les procédés de mono-fermentation des déchets alimentaires (Nazlina et al., 2009), de la vinasse (Buitrón & Carvajal, 2010), de la jacinthe d'eau, des résidus d'extraction d'huile de soja, des déchets de champignons (Chuang et al., 2011).

Les données obtenues dans ces études montrent que la production de biohydrogène pourrait être réduite ou même inhibée en raison de certaines caractéristiques spécifiques des eaux usées ou des déchets organiques, telles que la capacité tampon insuffisante, déséquilibre des nutriments et présence de populations microbiennes qui peuvent consommer de l'hydrogène ou produire du méthane. Une stratégie pour surmonter ces problèmes est l'utilisation de processus de codigestion en raison des effets synergiques positifs des matériaux mélangés ayant des caractéristiques complémentaires et l'apport de nutriments manquants par le rapport cosubstrat (carbone/azote (C/N) adéquat, et la concentration de macronutriments et de micro-nutriments) (Luostarinen et al., 2009). Il a été signalé que la co-fermentation de plus d'un substrat augmentait le rendement en bioH₂ de façon générale en :

- (a) minimisant les effets inhibiteurs du substrat,
- (b) améliorant la capacité tampon du substrat,
- (c) fournissant les éléments nutritifs manquants ou insuffisamment présents, et,
- (d) réglage du rapport carbone/azote (C/N) des substrats.

Un rapport C/N équilibré permet d'améliorer la capacité tampon du système. En outre, le processus de co-fermentation réduit également la possibilité d'effets inhibiteurs qui, à leur tour, augmentent la production de biohydrogène (Luostarinen et al., 2009)(W. Wang et al., 2011). Peu de nouveaux processus de co-fermentation anaérobie ont été développés pour la production de biohydrogène.

Dans le cadre de telles études, des déchets organiques tels que les déchets alimentaires municipaux et eaux usées de cuisine ont été utilisés (Tawfik & El-Qelish, 2012), les déchets de glycérol-boues (Sittijunda & Reungsang, 2012), les boues d'épuration avec de paille de riz (M. Kim et al., 2012), les boues d'épuration avec des déchets alimentaires (W. Wang et al., 2011), les boues de broyage du manioc et les boues d'épuration (Radjaram & Saravanane, 2011).

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

Introduction

Dans le présent chapitre le matériel et les différents matériaux utilisés ainsi que les différentes méthodes et protocoles suivis au cours de cette étude sont détaillés, y compris les méthodes d'essai de production de biohydrogène en mode batch, les essais d'amélioration de cette dernière par différentes voies (prétraitements du substrat, présence de nanomatériaux, etc.), le résultat optimal du mode batch a été appliqué en mode semi-continu où les effets du temps de rétention hydraulique et le taux de charge organiques ont été évalués.

II.1. Substrats

Deux types de substrat ont été utilisés : eaux usées et déchets solides, ils ont été conservés à 4°C pour arrêter toutes activités biologiques, et utilisés à l'état brut sans aucune dilution.

II.1.1. Eau usée de Bourgoul

Les eaux usées industrielles de traitement du Bourgoul **EUB** ont été recueillies du système d'ébullition de l'usine de production de graines de boulgour, *Armada Foods* situé à *Mersin, Turquie*. Cette industrie a une importance immense dans le secteur alimentaire au Moyen-Orient et en Turquie. L'usine d'*Armada Foods* génère plus de 500 m³ d'**EUB** par jour.

II.1.2. Lactosérum

Le lactosérum **LS**, est l'eau usée de transformation du lait en différents types de fromage, elle a été recueillie de l'industrie fromagère *Numidia* de *Constantine, Algérie*. L'industrie laitière joue un rôle important en Algérie puisque le lait et ses dérivées constituent un produit d'alimentation basique. La consommation algérienne moyenne en produits laitiers a été de 3,8 millions kg équivalent lait/j en juin 2021 rapportés par les médias. L'usine *Numidia* génère plus de 1500 m³ de lactosérum par semaine pour répondre aux besoins des habitants de la wilaya de *Constantine* et de ses environs.

II.1.3. Pelures de pomme de terre

Les épluchures de pommes de terre **PPT** ont été utilisées comme substrat, pour leur disponibilité due à la consommation immense de la pomme de terre par la population algérienne, les statistiques de l'année 2018 ont indiqué que l'Algérien consomme environ de

111 Kg par an. Ces déchets ont été recueillis du réfectoire de la ville *universitaire de Constantine 3, Algérie*, séchés à température ambiante. Ensuite, ils ont été broyés pour obtenir une poudre dont les particules ont une taille de 5 à 10 mm. Ces derniers ont été conservés à température ambiante à l'abri de l'humidité.

II.1.4. Marc de café

Le marc de café **MC** est le résidu de la consommation du café soluble obtenu après torréfaction et mouture des grains de café marchand et extraction à l'eau bouillante ou à la vapeur d'eau. Ce déchet est disponible en abondance en *Algérie* puisque notre pays est classé parmi les pays les plus consommateurs de café en Afrique et en moyen-Orient, soit une consommation de 4 kg/individu chaque année selon les statistiques de l'an 2021 cités dans le journal 'l'express quotidien'.

Le Marc de café a été collecté quotidiennement des cafeterias publiques de la nouvelle ville *Ali Mendjeli, Constantine*, a été séché à une température de 35° C, puis conservé à température ambiante et l'abri de l'humidité.

II.2. Inoculum

Trois sources d'inoculum ont été utilisés au cours de cette recherche :

II.2.1. Boues anaérobies

Des boues anaérobies ont été utilisées comme inoculum pour la production de biohydrogène par fermentation des eaux usées de Bourgoul après prétraitement thermique 90°C et ultrasonique 30 Khz. elles ont été recueillies d'un digesteur anaérobie utilisé pendant plusieurs années pour le traitement des eaux usées de la ville de *Mersin, Turquie*.

II.2.2. Boues aérobies

Des boues aérobies en excès ont été utilisées après prétraitement thermique (90°C pendant 30 min) comme inoculum pour la production de biohydrogène par fermentation obscure de **LS**, **PPT**, **MC** et cofermentation du **LS** et **MC**. Elles ont été recueillies du bas du bassin d'aération de la station d'épuration des eaux urbaines de *Oued El Athmania* localisé à *Mila*, en *Algérie*.

II.2.3. *Escherichia Coli*

La culture pure *Escherichia coli* ATCC 8793 a été ramenée du *CHU* de *Constantine*, sa suspension bactérienne a été préparée par ajout d'une colonie dans de l'eau physiologique à 37 °C. Après 48 heures, 13/15 tubes sont apparus troubles. La réalisation de la croissance bactérienne a été réalisée par ajout d'un volume de 5 mL d'*Escherichia coli* de 100 mL de milieu peptone et conservé dans une étuve à 37°C.

II.3. Milieux de culture

II.3.1. Milieu nutritif

Pour favoriser la croissance bactérienne des cultures mixtes utilisées comme inoculum et aider le déroulement des réactions microbiennes ; une solution nutritive a été préparée et ajoutée dans le milieu de fermentation avec un ratio volumique de 1:1 (SN : I)(Hilgsmann, 2012), sa composition en macro et micronutriments est représentée dans le **tableau 2.1**.

Tableau 2.1 : La composition de la solution nutritive.

Constituants	Concentrations	Unités
Glucose monohydrate	5	g/L
Extrait de levure	0.5	g/L
KH ₂ PO ₄	0.5	g/L
FeCl ₃	0.02	g/L
MgCl ₂	0.1	g/L
CaCl ₂	0.075	g/L
NH ₄ Cl	0.53	g/L
K ₂ HPO ₄	1.12	g/L
pH=5.5	/	/

II.3.2. Milieu peptone

Le milieu peptone **PM** a été préparé et stérilisé pour la cultivation de la culture pure *Escherichia Coli* dans des conditions anaérobies mésophiles (37 °C) dans des flacons de sérum stériles de 125 mL scellés avec des bouchons en caoutchouc renforcés par

l'aluminium. La composition du **PM** est présentée dans le **tableau 2.2** (Poladyan et al., 2020).

Tableau 2.2 : Composition du milieu peptone.

Constituant	Concentrations	unités
Peptone	20	g/L
K ₂ HPO ₄	2	g/L
NaCl	5	g/L
Glucose	2	g/L
Extrait de levure	5	g/L
pH=6.5	/	/

II.3.3. Milieu ISP9

Le milieu minimum ISP9 a été utilisé comme milieu de fermentation par la culture pure, c'est un milieu composé des éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne de *Escherichia Coli*, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière. La composition de milieu ISP9 est représentée dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Composition de milieu minimum ISP9.

Constituants	Concentrations	Unités
(NH ₄)SO ₇	2.64	g/L
KH ₂ PO ₄	2.38	g/L
K ₂ HPO ₄	5.65	g/L
MgSO ₄	1	g/L
Solution saline	1	mL
PH= 7.4	/	/

Pour la composition de la solution saline est représentée dans le **tableau 2.4**

Tableau 2.4 : Composition de la solution saline

Constituants	Concentrations	Unités
CuSO ₄	0.64	g/L
FeSO ₄	0.11	g/L

MnCl₂	0.79	g/L
ZnSO₄	0.15	g/L

II.3.4. L'eau physiologique

L'eau physiologique a été utilisée pour cultivation et comme milieu de fermentation par la culture pure, c'est un milieu aqueux stérile, préparé par dissolution de chlorure de sodium dans l'eau distillée à une concentration de 9 %.

II.3.5. Solution tampon phosphate

Une solution tampon phosphate ST à pH 5,5 a été préparée et ajoutée dans le milieu avec un ratio de 1:1 (ST:I). La présence de la solution tampon dans le milieu de fermentation a pour objectif le maintien du pH plus au moins stable (Pharmacopoeia & Ii, 2005). Le protocole de préparation de ST est détaillé dans l'annexe A

II.4. Enzymes

Les enzymes utilisées dans cette étude pour le prétraitement du **LS** et **PPT** sont des enzymes commerciales provenant de diverses sources.

II.4.1. *Alpha-amylase d'Aspergillus niger*

L'*α-amylase* (EC 3.2.1.1) est une enzyme de catégorie glycosidase capable d'hydrolyser les liaisons glycosidiques de type α (1-4) présentent dans les poly-glucides (comme l'amidon) en mono-molécules de sucre (comme le maltose). Le pH et la température d'activité de l'*α-amylase* varient entre 5,5 à 7,0 et 30 et 55 °C respectivement (Siddique et al., 2014).

II.4.2. *Lactase*

La *lactase* (EC 3.2.1.108) est une enzyme classée comme β -galactosidase, elle permet d'hydrolyser le lactose en oses simples : glucose et galactose. La lactase est active dans un environnement acide compris entre un pH de 2 à 7 avec un pH optimal de 6 et une température entre 21 et 49°C avec une température optimale entre 30° C et 35° C (Roger et al., 1976).

II.4.3. *Cellulase d'Aspergillus Niger*

La *cellulase* est une enzyme capable d'hydrolyser la cellulose en unités plus simples. Elle est active et efficace dans une large gamme de température (40°C à 80°C) avec une activité

optimale entre 50 à 55°C et d'une gamme de pH (4,5 à 6,0) avec un pH optimal de 5 (Sohail et al., 2009).

II.4.4. Glucose oxydase d'Aspergillus Niger

Le *glucose oxydase* (EC 1.1.3.4) est une enzyme oxydoréductase capable de catalyser la réaction d'oxydation du β -D-glucose en D-glucono-1,5-lactone et le saccharose en métabolites simples. Le pH optimal pour l'activité du *glucose oxydase* est de 5,5 tandis qu'il a une large plage d'activité de pH 4 à 7 et une température comprise entre 25 et 55 °C, en dehors de cette plage, l'activité diminue rapidement (Sohail et al., 2009).

II.5. Mode opératoire

II.5.1. Potentiel biochimique hydrogène (BHP)

La quantité de biohydrogène maximale produite par fermentation obscure d'un substrat dans des conditions optimales est représentée par le potentiel biochimique d'hydrogène (BHP)(Mohan et al., 2012) produit majoritairement en utilisant des boues anaérobies issues de digesteurs anaérobies (Guo, 2012), ou des boues activées aérobies (Chezeau, 2018). Les tests de BHP sont intéressants et largement utilisés parce qu'ils sont faciles, peu coûteux, ont une réponse rapide et permettent d'étudier l'effet sur la production d'hydrogène de plusieurs paramètres à la fois (Rafieenia et al., 2017). La production de biohydrogène à partir de déchets agro-alimentaires a été suggérée comme étant efficace à une température thermophile comprise entre 50°C et 60°C (Dreschke, 2018) avec un pH optimal de 5.5 ; (Rafieenia et al., 2017), ces conditions permettent l'inhibition des *Archéas* méthanogènes (Pyzik et al., 2018).

Les tests BHP ont été réalisés dans des réacteurs batch anaérobies de 100 mL (flacons de sérum stériles fermés hermétiquement par des septums en caoutchouc assemblés avec capsules à sertir en aluminium) permettant l'échantillonnage de gaz et de liquide à l'aide d'une seringue, ces réacteurs sont remplis à 2/3 du volume total (67 mL), par 5 mL d'inoculum, 5 mL de solution nutritive, et un volume de substrat calculée selon sa valeur de TVS obtenue (Mohan et al., 2012) (**Figure 2.1**). Le pH du mélange a été ajusté à 5.5 par l'acide chloridrique ou l'hydroxyde de sodium à 0,5 N ; une fois que le pH est ajusté, 5 ml de solution tampon phosphate (pH 5,5) a été ajoutée pour maintenir le pH stable (Lavagnolo et al., 2018). Ensuite, les bouteilles ont été remplies à 67 mL avec de l'eau et homogénéisées

par une agitation manuelle. Les conditions anaérobies ont été assurées par un barbotage pendant 3 minutes par l'azote gazeux dans l'espace de tête des bouteilles. Enfin, les réacteurs remplis et étanchéifiés ont été incubés à une température de 55°C (Wang & Wan, 2009) dans un incubateur. Des essais à blanc, préparés de la même façon mais exempts de substrat afin de mesurer la production de biogaz issues des micro-organismes seulement. Chaque essai a été effectué en triplet, alors que les blancs en doublet. Les essais ont duré jusqu'à la fin de la production de biogaz. Au cours de cette période, la quantité et la qualité du biogaz ont été mesurées et le pH a été surveillé une/deux fois par jour à travers un papier pH. À la fin des essais de fermentation, le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre et des échantillons liquides ont été prélevés, filtrés à 0,2 µm et entreposés à 4 °C.

Les tests BHP réalisés par cultures mixtes de plusieurs substrats avec différents rapports Inoculum/Substrats (I/S) (1/2, 1/3, 1/4, 1/5 et 1/6 gVS inoculum/g VS substrat) ont été étudiés ; ainsi que l'effet de plusieurs essais d'amélioration tel que le prétraitement de l'inoculum, les prétraitements physicochimiques et biologique de substrat. Aussi les effets de la présence des NPs ont été évalués et la toxicité par les sels de métaux a été étudiée.

Les tests de BHP par culture pure pour fermentation du lactosérum ont été réalisées pour étudier l'effet du milieu de fermentation ainsi que l'effet des prétraitements physicochimiques du substrat.

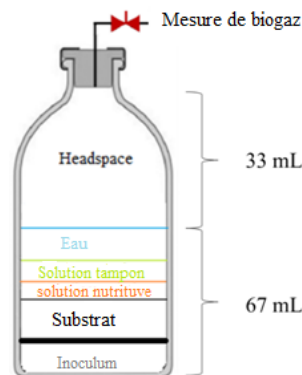


Figure 2.1. Bioréacteur utilisé pour la réalisation des tests de BHP (Mohan et al., 2012)

II.5.2. Production de biohydrogène en mode semi-continu (description du bioréacteur)

La production d'hydrogène a été réalisée dans un bioréacteur d'une capacité de 2 L avec un volume de travail de 1,5 L (BIOSTAT-A, Sartorius, Allemagne) **figure 2.2** Ce fermenteur

fonctionnait en continu. Deux différentes stratégies de chargement ont été suivies : (i) ORL variable et TRH constant et (ii) ORL constante et TRH variable. Le bioréacteur était recouvert d'une feuille d'aluminium pour éviter la lumière solaire et a été agité à une vitesse constante de 250 tr/min. Le pH du liquide mélangé dans le réacteur a été contrôlé à $\text{pH } 5,5 \pm 0,05$ avec 1 N de NaOH. Le volume du biogaz total libéré de l'espace de tête du réacteur a été mesuré en continu par un système de déplacement de liquide quotidiennement.

Le réacteur a été initialement exploité pendant 2 jours en mode batch, sans alimentation supplémentaire afin d'éviter le lessivage de biomasse inactivée, puis convertie en fonctionnement continu lorsqu'une production totale considérable de gaz a été observée (Zhang et al., 2015).

Après l'inoculation (la concentration initiale de culture : 1 g/L), L'alimentation (ayant différentes valeurs de DCO initiales en fonction de l'ORL et HRT) a été ajoutée au réacteur après soutirage de même quantité.

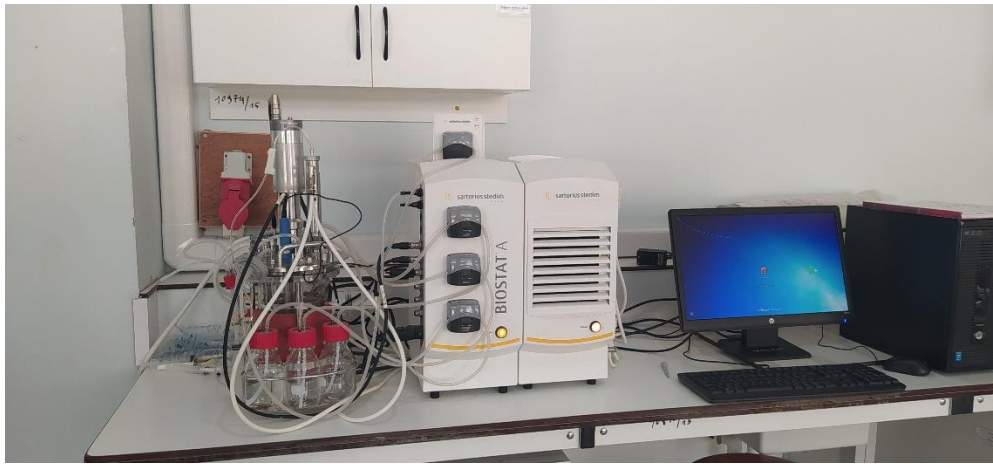


Figure 2.2. Photo du bioréacteur utilisé pour l'essai de production de biohydrogène en discontinu.

II.5.3. Prétraitements

II.5.3.1. Prétraitements physicochimiques

Dans cette étude, les prétraitements physicochimiques réalisés sur le substrat sont :

– **Les prétraitements physiques**

Les prétraitements physiques sont thermiques et ultrasoniques appliqués sur l'inoculum et le substrat.

Le prétraitement de l'inoculum a été réalisé pour sélectionner les *Clostridies* productrices d'hydrogène et inhiber les *Archeas* méthanogènes, l'effet de la durée du prétraitement de la boue anaérobie sur la production de biohydrogène par fermentation de **EUB** a été étudié. Le traitement ultrasonique (BTX-600) à 30 kHz par et le traitement thermique à 100°C pendant ont été évalués à deux durées 5 et 15 min .

Les prétraitements physiques du substrat ont été réalisés sur le lactosérum ont pour objectif d'hydrolyser les macromolécules en mono-molécules, ce sont le prétraitement thermique à 80, 90 et 100°C pendant 30 min ; le prétraitement ultrasonique à 25 Hz durant 5, 10 et 20 min.

– **Les prétraitements chimiques**

Les prétraitements chimiques acides et basiques ont été réalisés par chocs acide et basique du substrat pour détruire les macromolécules de substrat (**LS**).

Un acide fort HCL (5N) et un acide organique faible CH₃COOH (9N) ont été ajoutés séparément au substrat subitement pour diminuer le pH à 2 ; le prétraitement basique a été réalisé par l'ajout brusque de l'NaOH (base forte) (5N) ou le Ca(OH)₂ (base faible) à (8N) pour élever le à pH 11.

II.5.3.2. Prétraitement enzymatique

Le prétraitement biologique utilisé est le prétraitement enzymatique où différentes enzymes ont été utilisées pour effectuer l'hydrolyse enzymatique des macromolécules de substrat et les dégrader en mono-molécules à un pH et température optimaux d'activité d'enzymes. L'hydrolyse enzymatique a été réalisé en anaérobiose pendant 72h (Quéméneur, Bittel, et al., 2012). L'objectif étant la décomposition des macromolécules (carbohydrates, protéines, lipides....) de substrat en monomolécules assimilables pour les micro-organismes de l'inoculum.

II.5.3.2.1. Lactosérum

Le prétraitement enzymatique de lactosérum par la lactase et la glucose Oxydase a été réalisé en mélangeant 2.5 mg d'enzyme avec 1 g VS de **LS** et 20 mL d'eau distillée dans une bouteille de 100 mL en assurant les conditions anaérobies, le mélange a été incubé sous agitation 150 tr/min pendant 42 h dans un incubateur (Edmund Bühler GmbH TH15). Des échantillons de 1 mL de solution ont été prélevés toutes les 3 h pour analyse de sucres réducteurs.

II.5.3.2.2. Pelures de pomme de terre

Le prétraitement enzymatique des **PPT** par l'*alpha-amylase* et la *cellulase* a été réalisé en mélangeant 5 mg d'enzyme avec 1000 mg de **PPT** et 20 mL d'eau distillée dans une bouteille de 100 mL mise dans des conditions anaérobies, puis incubé sous agitation 150 tr/min pendant 42 h dans un incubateur (Edmund Bühler GmbH TH15). Toutes les 3 h, un 1 mL d'hydrolysats a été prélevé périodiquement puis centrifugé (8000 tour/min, 5 min) pour la caractérisation des sucres réducteurs, afin d'optimiser la durée optimale d'hydrolyse.

II.5.3.3. Co-fermentation

Un essai de cofermentation de **LS** et **MC** a été réalisé en fixant la concentration de substrat à 5 gVS/L, et en variant le pourcentage des deux substrats de 0 à 100% (Yang, Wang, et al., 2019). Les expériences ont été réalisées dans des flacons de sérum stériles d'une capacité de 100 mL, d'un volume de travail de 67 mL, le rapport de mélange entre le **LS** et **MC** a été ajusté à 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 et 0:100 sur la base de la concentration en matière VS. La fermentation de **LS** seul (100 : 0) et la fermentation de **MC** seul (0:100) ont servi de control (Yang, Hu, et al., 2019). La concentration du substrat était de 5 gVS/L et 5 mL d'inoculum ont été ajoutés. Le pH initial a été mesuré et les solutions tampon et nutritive n'ont pas été ajoutés. En fin, les bouteilles ont été barboté à l'aide de gaz N₂ (3 min) pour maintenir les conditions anaérobies, puis agitées et incubées à 55 °C pour le démarrage du processus de fermentation. La durée de l'expérience de cofermentation a été limitée par l'arrêt de production du biogaz. Trois essais ont été effectués en parallèle pour chaque rapport de mélange.

II.5.3.4. Synthèse des nanoparticules

La synthèse des sept échantillons de nanoparticules utilisées dans cette recherche a été effectuée avec la méthode hydrothermique (Rambabu et al., 2021) et schématisée dans la **figure 2.3** où :

- 2.9 g de nitrates de métal désiré a été dissous dans 30 mL d'eau déionisée.
- 5.5 g de D-Glucose a été ajouté sous agitation magnétique de 400 tr/min pendant 30 min.
- Le pH a été ajusté à 9 en par l'hydroxide de sodium NaOH à 2 M.
- Le mélange a été maintenu à 180 °C pendant 06 heures.
- Après refroidissement à une température ambiante, l'échantillon produit a été filtré, lavé trois fois par l'eau déionisée et une fois par l'éthanol.
- La poudre obtenue a été séchée à 70 °C pendant 03 heures.
- Les particules ont subi une calcination est à 550 °C à pendant 03 heures.
- Enfin, la poudre finale a été lavée, séchée et broyée puis analysée.

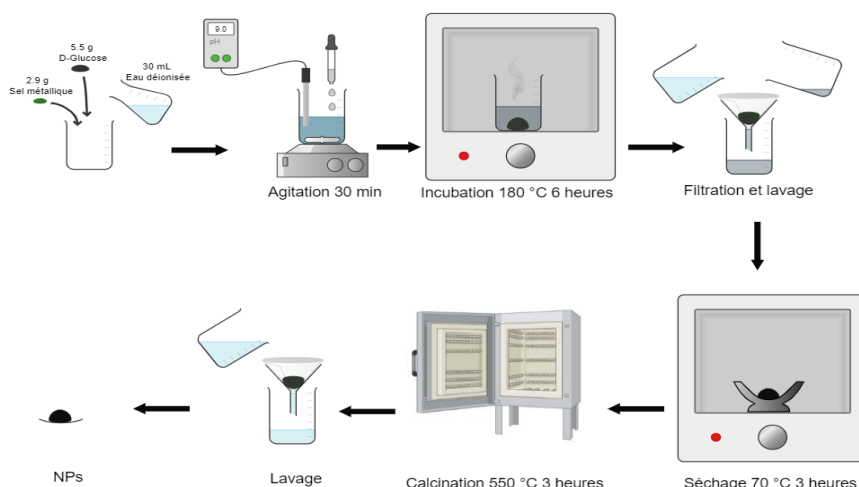


Figure 2.3. Synthèse des nanoparticules métalliques (Rambabu et al., 2021).

II.6. Méthodes analytiques

II.6.1. Mesure des caractéristiques physicochimiques

II.6.1.1. Les solides totaux et les solides volatils totaux

La teneur totale en solides (TS) est généralement déterminée dans une étuve par un processus de chauffage à 105°C pendant 24 h (Xu et al., 2014), il peut être divisé en deux sous-

processus : l'évaporation de l'humidité superficielle et l'évaporation de l'eau piégée dans la microstructure du solide après sa migration. Une fois sèche, la teneur en solides volatils (TVS) est déterminée après avoir brûlé ces échantillons à 550°C pendant 2 h dans un four à moufle jusqu'à poids constant (APHA, 1999)(Voir annexe B).

II.6.1.2. pH, Titre alcalimétrique, titre alcalimétrique complet

Le pH ou le potentiel d'hydrogène d'un échantillon est le logarithme décimal de l'inverse de la concentration en ion H^+ présente de cet échantillon. Le principe de la mesure consiste à déterminer la différence de potentiel existant entre une électrode de verre et une électrode de référence plongeant dans une même solution.

Le pH est mesuré par la méthode potentiométrique à l'aide d'un pH mètre (Amariglio, 1986) par une lecture directe. Le pH mètre utilisé (HI 2211 pH/ORP Meter de HANNA instruments) est préalablement étalonné.

La détermination de l'alcalinité est basée sur la neutralisation d'un volume d'eau ou un volume d'échantillon par un acide minéral dilué (annexe B). L'alcalinité correspond à la présence des hydrogénocarbonates, carbonates et hydroxydes dans l'échantillon. Le titre alcalimétrique (TA) mesure la teneur de l'eau en hydroxydes libres et en carbonates et le titre alcalimétrique complet (TAC) correspond à la teneur en hydroxydes libres, carbonates et hydrogénocarbonates (Rodier, 2009).

II.6.1.3. Turbidité

La turbidité des différents échantillons a été déterminée à l'aide d'un turbidimètre AQUA LYTIC PCH 57650.

II.6.1.4. La demande chimique en oxygène

La DCO permet de déterminer la concentration en matières organiques ou minérales, dissoute ou en suspension dans l'échantillon, au travers de la quantité d'oxygène nécessaire à leur oxydation chimique totale. Le protocole de la détermination de la DCO comprend deux étapes selon la méthode normalisée NF T 90-101 (APHA, 1999), la première étape est l'oxydation chimique de la matière organique réductrice contenue dans l'échantillon, par un excès de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) en milieu sulfurique (H_2SO_4), en présence de

catalyseur tel que le sulfate d'argent (Ag_2SO_4) ou le sulfate de mercure (HgSO_4) pendant 2 h dans un thermo réacteur à une température de 150°C . Après refroidissement, la deuxième étape est le titrage de l'excès de dichromate de potassium avec une solution titrée de sulfate de fer (II) et d'ammonium hexa-hydraté (sel de Mohr), la valeur de la DCO soluble a été déterminée avec la même méthode de la DCO, la seule différence c'est qu'on filtre l'échantillon par un filtre de $0.45 \mu\text{m}$ avant caractérisation (Jenkins, 1982) (Voir annexe B).

II.6.1.5. La demande biochimique en oxygène

La demande biochimique en oxygène (DBO), constitue une mesure de la pollution des eaux par les matières organiques, c'est la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes vivants pour assurer l'oxydation et la dégradation des matières organiques présentes dans l'eau usée.

La DBO_5 a été déterminée en utilisant des bouteilles de DBO sombres dotées par des WTW OxiTop dans une enceinte thermique à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 05 jours (APHA, 1999) (Voir annexe B).

II.6.1.6. Dosage des carbohydrates

Pour doser les sucres totaux dans les échantillons, la méthode de Michel Dubois et ses collaborateurs (Dubois et al., 1951) a été appliquée à la présence de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) et le phénol. Les glucides en milieu acide sulfurique sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combinent facilement avec le phénol et donnent des complexes colorés (le glucose fournit de l'hydroxy-furfural) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, la densité optique est déterminée à la longueur d'onde entre 450 à 550 nm (480 nm) par spectrophotométrie. La concentration des sucres totaux dans les échantillons à doser a été calculée par rapport à la calibration au glucose (Voir annexe B).

II.6.1.7. Dosage de l'azote total Kjeldahl

L'azote total Kjeldahl représente deux formes d'azote présentes dans la matière organiques : l'azote organique total et l'azote ammoniacal. Cependant, une mesure réalisée par DAONIX montre des concentrations négligeables en nitrites et en nitrates.

Il est déterminé selon une méthode standard comprend trois phases : une minéralisation de l'azote organique en azote ammoniacal pendant 80 minutes à 480°C en milieu acide (H_2SO_4) en présence de catalyseur de minéralisation (sulfate de potassium), Le distillat récupéré après

la phase de distillation, piégé dans de l'acide borique saturé a été titré par l'acide chloridrique (APHA, 1999).

II.6.1.8. Dosage du phosphore

La teneur en phosphore a été déterminée dans tous les substrats par une adaptation de la technique colorimétrique de vert malachite. Une partie de chaque échantillon du substrat a été pesée, puis réduite en cendres à 550 °C pendant 5 heures. Les cendres résultantes ont été dissoutes dans 5 mL d'eau distillée et placées sur une plaque chauffante pour s'évaporer jusqu'à ce qu'il ne reste que quelques gouttes. La teneur en P a été mesurée par titrage colorimétrique après la minéralisation de P par l'acide HNO₃ (Van Veldhoven & Mannaerts, 1987).

II.6.1.9. Dosage des protéines

La détermination de la teneur en protéines totales contenues dans les échantillons a été faite par un dosage colorimétrique selon la méthode établie par (Lowry *et al.*, 1951). Il s'agit de la combinaison d'un traitement cupro-alkalin et de la réaction de Folin. Le réactif de Folin (acides phosphotungstique et phosphomolybdique) réagit de façon spécifique avec certains acides aminés (cystéine, tyrosine et tryptophane) en donnant une coloration bleue spécifique. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique du réactif Folin-Ciocalteu par la tyrosine, le tryptophane (Guillou *et al.*, 1986).

La densité des composés réduits est mesurée au spectrophotomètre UV à la longueur d'onde 750 nm. La concentration en protéines des échantillons analysés est déterminée en employant une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (Voir annexe B).

II.6.1.10. Densité

En physique, la masse volumique d'un échantillon solide n'est que la masse totale de l'échantillon divisée par son volume, quelle que soit la façon de distribution de la matière dans l'échantillon. La densité étant la masse volumique rapportée à celle de l'eau, elle est

mesurée pour déterminer la masse équivalente aux volumes nécessaires de substrat solide fermenté au cours des tests de potentiel biochimique d'hydrogène (Voir annexe B).

II.6.1.11. Mesure de la concentration cellulaire

II.6.1.11.1. Comptage cellulaire

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules de cultures mixtes contenues par unité de volume de milieu liquide. Le principe consiste à dénombrer les cellules contenues dans les limites des carreaux de la cellule de Malassez. Les dénombrements sont effectués sur plusieurs mesures ; leur nombre dépend de la concentration cellulaire et des dilutions effectuées sur la solution à dénombrer.

En prenant en considération le facteur de dilution (f) et le nombre de cellules (n), la concentration cellulaire en g/L est calculée comme suit (Denimal, 2018):

$$N = \frac{n_{\text{Bactéries}}}{50 \cdot 10^{-5}} f \quad (II. 1)$$

II.6.1.11.2. Concentration cellulaire

Pour suivre le temps réel de la croissance de la concentration bactérienne dans le milieu de culture pure ou mixte ; la densité cellulaire a été déterminée en effectuant la mesure de l'absorbance (DO) du milieu à une longueur d'onde de 600 nm par un spectrophotomètre (PERSEE - T6U-T6V). Une relation empirique entre la densité optique et la matière sèche cellulaire a été établie (Poladyan et al., 2020) (Voir annexe B).

II.6.1.12. Mesure du volume du biohydrogène

Le volume de biogaz a été mesuré à l'aide d'un système hydraulique (méthode de déplacement de liquide), où le gaz produit en sortie du fermenteur, passe dans une éprouvette graduée plongée dans un liquide acidifié par HCl (pH 3) pour éviter la solubilisation des gaz (Ruzza, 2013), ce qui déplace le niveau du liquide contenu dans l'éprouvette et indique ainsi le volume du biogaz produit. Ensuite, le biogaz piégé a été injecté dans la solution KOH (20 g/L) dans le but d'éliminer le dioxyde de carbone. Les données de rendement en hydrogène sont exprimées en mL ou mL /gVS d'hydrogène à une température de 0 °C et pression de 1 atm.

Le volume de l'hydrogène produit durant deux instant consécutives t-1 et t est calculé par la formule suivante (Aspiranti, 2014):

$$V_{c,t} = C_{c,t}V_{G,t} + V_H(C_{c,t} - C_{c,t-1}) \quad (II.2)$$

$V_{c,t}$: volume d'hydrogène produit dans l'intervalle de temps t-1 et t.

$V_{G,t}$: Volume de biogaz produit dans l'intervalle de temps t-1 et t.

$C_{c,t}$, $C_{c,t-1}$: les concentrations de l'hydrogène mesurées aux instants t-1 et t respectivement,

V_H : volume de l'espace libre du bioréacteur

III.6.1.13. Caractérisation de biohydrogène

La composition en hydrogène du biogaz total a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC, Agilent) équipé d'un détecteur de conductivité thermique (TCD). Il a été mesuré en utilisant une colonne en acier inoxydable emballé avec tamis moléculaire 5 Å dont les dimensions sont 1,83 m x 3,18 mm (diamètre intérieur). Les températures de fonctionnement de l'injecteur, du détecteur et de la colonne étaient maintenues à 25, 110 et 165 °C, respectivement. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 5 mL/min (Roberge et al., 2004).

Pour d'autres expériences à cause du manque d'analyse, la composition en hydrogène du biogaz total a été aussi validée à l'aide d'un analyseur de biogaz GEOTECH 5000.

II.6.1.14. Caractérisation des nanoparticules

- Diffractomètre de rayons X (DRX)

Une quantité suffisante d'échantillon a été mise et soumise à un faisceau de rayons X pour être diffractée par les plans réticulaires des phases cristallines présentes. La relation entre l'angle du faisceau diffracté et la distance réticulaire séparant les plans d'atomes au sein d'un réseau cristallin est exprimée par la loi de Bragg.

$$n \times \lambda = 2 \times d_{hkl} \times \sin\theta \quad (II.3)$$

Avec : λ : la longueur d'onde en Å,

d : la distance réticulaire en Å,

θ : l'angle de diffraction ou de réflexion en degrés.

Les diffractogrammes ainsi obtenus par diffractomètre à rayons X, sont interprétés. Les positions et les intensités des pics observés sont comparés aux fichiers de référence **PDF-ICDD** (Powder Diffraction File - International Center for Diffraction Data) pour l'identification des phases minéralogiques présentes. Une base de données sur HighScore Plus est aussi utilisée pour identifier les différents pics et les tailles correspondances.

Quant à l'analyse quantitative, celle-ci est effectuée par la méthode *Rietveld*, basée sur un affinement mathématique des paramètres cristallographiques des minéraux présents dans l'échantillon. L'incertitude de mesure varie de plus au moins 1 à 5%, selon le degré de cristallinité ou la dégradation de la structure notamment celles des minéraux argileux et des séries isomorphes l'erreur peut augmenter.

- Le diffractomètre PANalytical, Type : Empyrean a été utilisé, il est caractérisé par : un tube radiogène céramique à anticathode de cuivre, puissance du générateur à RX : 40 mA, 45 kV. Le logiciel pour l'acquisition et traitement des données est HighScore Plus de PANalytical Version 3.0. Les conditions de mesure ont été les suivantes : Angle de départ [2θ] : 3.0000, longueur d'onde $\text{CuK}\alpha$ [Å] : 1.5418, angle final [2θ] : 90.0000, taille du pas [2θ] : 0.013, temps du pas [s] : 248.370.

- Microscopie électronique à balayage et rayons X à dispersion d'énergie (MEB-EDX)

La microscopie électronique à balayage avec spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB-EDX) est la technique d'analyse de surface la plus connue et la plus utilisée. Des images à haute résolution de la topographie de surface, avec une excellente profondeur de champ, sont produites en utilisant un faisceau d'électrons (primaire) à balayage hautement focalisé.

Les nanomatériaux synthétisés au cours de cette étude ont été analysés par l'équipement MEB-EDX Thermoscientific ; Eucentric goniometer stage Quatro ESEM utilisé, ou plusieurs acquisitions d'images à haute résolution ont été effectuées.

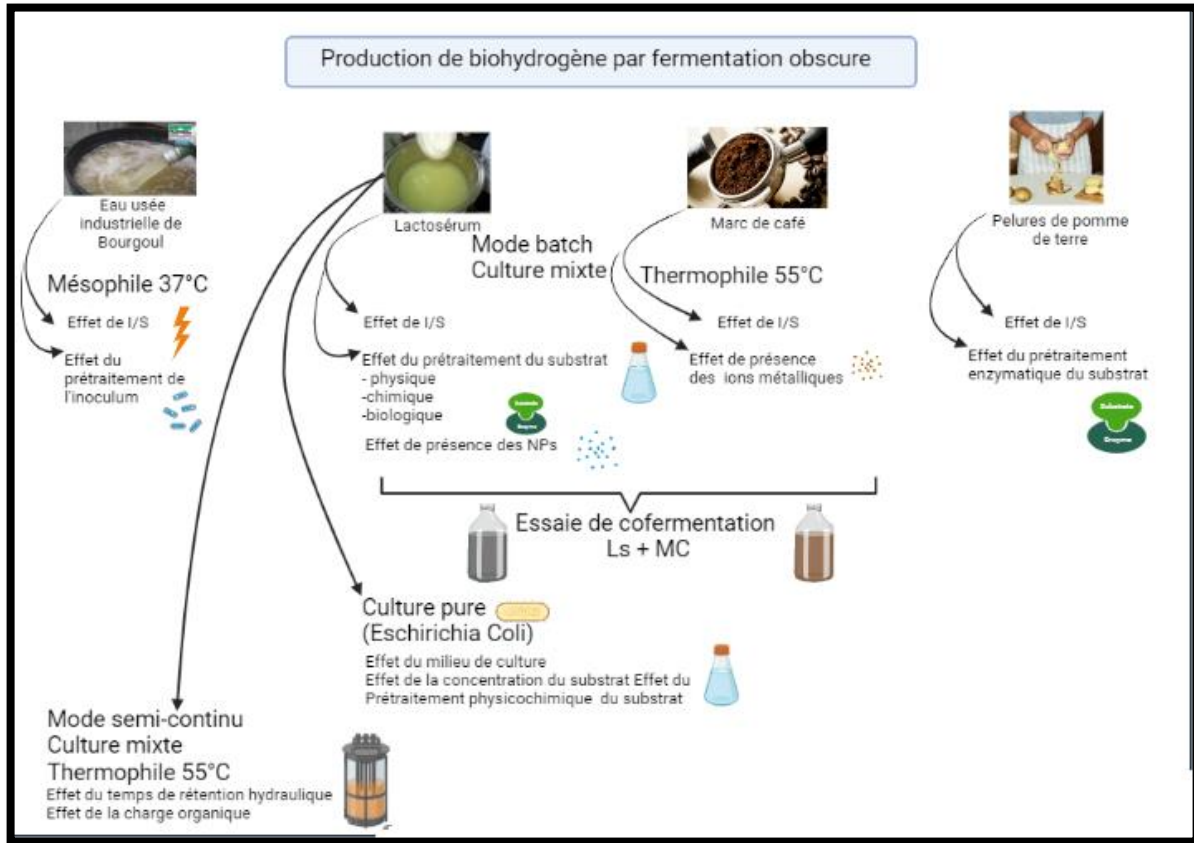


Figure 2.4. Plan expérimentale suivi dans cette étude.

CHAPITRE II :

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie A : Production de biohydrogène par fermentation obscure des eaux usées industrielles du BOURGOUL

Introduction

L'eau usée industrielle de Bourgoul a été utilisée pour la production de biohydrogène, les effets du rapport I:S ainsi que le prétraitement de l'inoculum sur le potentiel et la cinétique de production d'hydrogène ont été étudiés en même temps. Le prétraitement de la boue a été réalisé pour inhiber les bactéries consommatrices d'hydrogène et favoriser la présence de celles productrices de H₂. Les meilleurs résultats obtenus ont été modélisés par les modèles *Gompertz modifié* et *Logistique modifié*.

III.A.1. Caractérisation de l'inoculum

Les caractéristiques physicochimiques de la boue anaérobie ainsi que les différents inoculums utilisés sont représentées dans les tableaux 3.1 et 3.2.

Tableau 3.1 caractères physicochimiques de l'inoculum avant traitement.

Paramètre	Valeur	Unité
pH	8.24	-
Alcalinité pH6	1828	mg CaCO ₃ /L
Alcalinité pH4	1989	mg CaCO ₃ /L
TS	28.1	g/L
TVS	17.6	g/L
TVS/TS	62.63	%
DCOT	29.4	g/L
DCOS	2.00	g/L
DCOS/DCOT	6.80	%
Concentration cellulaire	1,87	g/L

La boue anaérobie a été prétraitée par chaleur et par ultrasons à différentes durées, les quatre inoculums obtenus ont été analysés, et leur degré de désintégration a été calculé par la relation suivante : $DD(\%) = \frac{DCO_i - DCO_f}{DCO_i} * 100$, avec : DCO_i et DCO_f sont les valeurs de la demande chimique en oxygène avant et après traitement respectivement.

Tableau 3.2 Caractéristiques physicochimiques de l'inoculum après traitements.

Méthodes de Prétraitement	Durée (min)	CC	TS (g/L)	TVS (g/L)	DCOT (g/L)	DCOS (g/L)	DCOS /DCOT	DD (%)
Thermique	5	1,67	29.345	19.409	37.12	14.080	0.379	44.15
Thermique	15	1,36	38.722	25.428	40.64	20.000	0.492	65.79
Ultrasonique	5	1,80	28.091	17.61	32.80	15.200	0.463	48.25
Ultrasonique	15	0,72	28.097	17.619	33.76	15.200	0.450	48.25
Control (blanc)	-	1,87	28.1	17.619	29.36	2.00	0.068	0

Les résultats ont clairement montré que les deux méthodes de prétraitement diminuaient la concentration cellulaire et augmentaient le niveau de solubilisation des boues (rapport DCOS/DCOT et DD). Le prétraitement thermique pendant 5 minutes a augmenté la solubilité de la matière volatile en suspension des boues, tandis que le prétraitement par ultrasons n'a pas affecté la solubilité des boues, le même résultat a été obtenu par (Pham et al., 2009). Et ils ont constaté que la DCO augmentait très peu en augmentant le temps de prétraitement des boues par ultrasons de 20 à 60 minutes. Après le prétraitement thermique, le TS et le TVS ont augmenté, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de la concentration de solides totaux dans l'inoculum en raison de l'évaporation de l'eau après avoir atteint la température d'ébullition de 100 °C (Bundhoo et al., 2015).

L'inoculum prétraité thermiquement (pendant 15 min) s'est révélé efficace à un DD (65,79%) et au rapport DCOS/DCOT (0,492%). Ainsi, la méthode de prétraitement T15 devrait donner lieu à la production de biohydrogène la plus élevée dans les expériences ultérieures.

III.A.2. Caractérisation du substrat

Les caractéristiques physicochimiques du substrat **EUB** sont regroupées dans le tableau **3.3**,

Tableau 3.3 Caractéristiques physicochimiques de l'eau usée industrielle de BOURGOUL **EUB**

Paramètre	Valeur	Unité
pH	7.07	-
Alcalinité pH6	138	mg CaCO ₃ /L
Alcalinité pH4	235	mg CaCO ₃ /L
TS	35,667	g/L
TVS	35,027	g/L

TVS/TS	98.2	%
TCOD	43.20	g/L
SCOD	38.56	g/L
SCOD/ TCOD	89,6	%
NTK	1.428	mg/L
Phosphore	39.69	g/L

Les valeurs caractéristiques du **EUB** présentées dans le tableau précédent représentent un pH neutre, un taux élevé de la matière volatile en suspension ainsi qu'un taux élevé de la matière biodégradable, un rapport C/N =30.25 favorisant la production d'hydrogène par fermentation obscure.

III.A.3. Effet de I/S et effet de prétraitement de l'inoculum

Les productions cumulées d'hydrogène à différents rapports I/S par différents inoculums prétraités en fonction du temps sont présentées à la **figure 3.1** Dans tous les essais, le biogaz généré a été composé d'hydrogène et de dioxyde de carbone. L'activité méthanogène n'as pas été observée en raison du pH de 5,5 non favorable à la croissance des bactéries méthanogènes (Yang et al., 2007). Pour les deux méthodes de prétraitement et le rapport I/S, il a été observé qu'au cours des trois premiers jours, aucune production d'hydrogène a été mentionnée. Il pourrait s'agir de l'adaptation et de la concentration de bactéries productrices d'hydrogène dans le milieu de fermentation (Yang et al., 2007). Ensuite, le BHP a augmenté progressivement au cours du 3 à 18^{ème} jours de fermentation obscure et de stabilisation qui ont montré que la dégradation complète du substrat dans le milieu a été déterminée entre 18 à 20 jours de fermentation (Kumar et al., 2016).

En utilisant l'inoculum prétraité par ultrasons, à mesure que le rapport I/S variait de 1/2 à 1/6 gVS/gVS, la production cumulée d'hydrogène augmentait. En d'autres termes, le BHP a augmenté avec l'augmentation du ratio I/S. Ce résultat peut être justifié par la plus grande disponibilité de matière organique dans les résidus alimentaires organiques, principalement sous forme de glucides solubles. De plus, (Nasr et al., 2013) et (Pan et al., 2008) ont obtenu des résultats semblables dans leur étude sur l'utilisation des eaux usées alimentaires comme substrat. Les rendements maximaux de la production cumulative d'hydrogène ont été

déterminés comme étant 76,01 mL et 18,66 mL **figure 3.1** (A,B), pour un rapport I/S de 1/6 gVS/gVS au 18^{ème} jour par le prétraitement par ultrasons pendant 5 et 15 minutes, respectivement. Les résultats ont montré que la courte durée du prétraitement ultrasonique favorisait le BHP, Il a été attribué que le temps d'exposition prolongé pourrait entraîner une diminution de l'activité des bactéries productrices d'hydrogène en raison de la destruction complète des parois cellulaires des bactéries consommatrices d'H₂ (Xie et al., 2009). De plus, ce résultat concorde avec la concentration cellulaire de l'inoculum prétraité par ultrasons.

D'autre part, le BHP a augmenté en utilisant l'inoculum prétraité thermiquement, les productions ont été diminuées dans les rapports I/S de 1/4 à 1/2 gVS/gVS pendant 5 min et de 1/3 à 1/2 gVS/gVS pendant 15 min. Toutefois, la production d'hydrogène la plus faible a été observée pour TP5 avec un rapport I/S de 1/6 gVS/gVS et pour le TP15, elles ont été nulles avec un rapport I/S de 1/4 et 1/6 gVS/gVS. Comme le montre la **figure 3.1** (D), la production cumulative maximale d'hydrogène a été de 103,91 mL pour le TP15 à un rapport I/S de 1/3 gVS/gVS au 16^{ème} jour de fermentation. Le deuxième BHP élevé a été de 98,27 mL pour le TP5 avec un rapport I/S de 1/4 gVS/gVS au 16^{ème} jour de fermentation. Le résultat actuel donne à penser qu'un rapport I/S supérieur à 1/6 gVS/gVS pour un prétraitement thermique de 15 min et un rapport 1/4 gVS/gVS pour 5 min défavorisent la production de biohydrogène par l'inoculum prétraité thermiquement. Il pourrait être due à l'inhibition des micro-organismes producteurs d'hydrogène par l'excès de substrat de BPIW (Pan et al., 2008). Les données expérimentales ont montré que les valeurs de production cumulées de H₂ variaient entre 2,52 et 103,91 mL H₂. L'ordre de la production cumulative de biohydrogène résultant des études préalables au traitement est décrit ci-dessous dans l'ordre décroissant. TP15 (103,91 mL H₂ à I/S=1/3) > TP5 (98,27 mL H₂ à I/S=1/4) > UP5 (76,01 mL H₂ à I/S=1/6) > UP15 (18,66 mL H₂ à I/S=1/6). Les différences des rapports I/S optimaux (gVS/gVS) peuvent être attribuées aux différences dans la méthode de prétraitement de l'inoculum. D'après ces résultats ça sera plus intéressant d'utiliser TP5 à I/S=1/4 parce qu'une durée de 5 minutes sera moins énergétique et moins coûteuse d'un point de vue économique en traitant une matière volatile en suspension égale à 4 fois celle de l'inoculum.

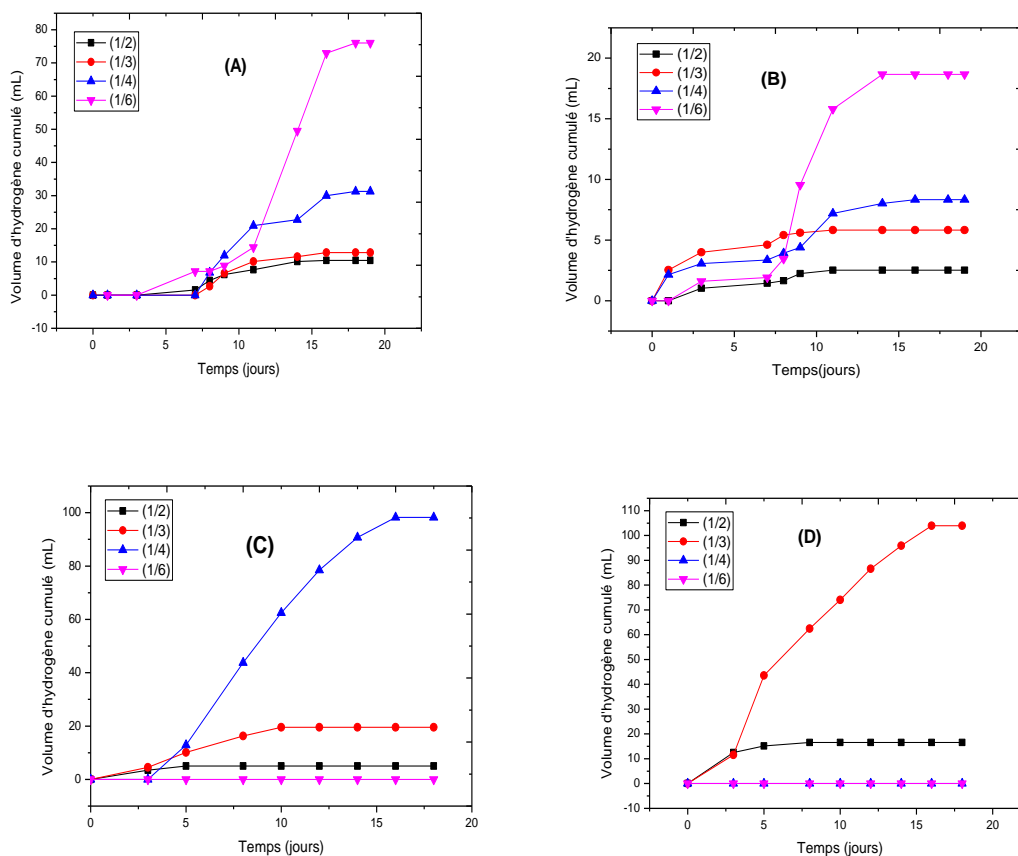


Figure 3.1 Production cumulative de biohydrogène par fermentation obscure de **EUB** avec différents pré-traitements de l'inoculum (A) par ultrasons (UP) pendant 5 min (B) de pré-traitement (UP) par ultrasons pendant 15 min (C) de pré-traitement thermique (TP) pendant 5 min (D) de pré-traitement (TP) pendant 15 minutes.

III.A.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

Les modèles de *Gompertz* et *Logistique* modifiés ont été utilisés pour modéliser l'évolution de la production cumulative d'hydrogène pour expliquer les résultats des essais du BHP test. Après modélisation mathématique, les données expérimentales concordaient étroitement avec celles simulées, comme le montre les **figures 3.2** et **3.4**. La cinétique des deux modèles de *Gompertz* et *Logistique* a été utilisée pour évaluer la détermination de la production cumulative d'hydrogène (**tableau 3.4**). Le coefficient de corrélation R^2 était supérieur à 0,97 pour toutes les données de *Gompertz* ainsi que celles du *Logistic*. Les essais BHP et les

valeurs du potentiel de production d'hydrogène simulé (H_{max}) par les deux modèles étaient semblables à celles obtenues expérimentalement. Par le modèle de *Gompertz* modifié les durées d'adaptation ont été de 7,894, 6,894, 4,213 et 1,349 jours pour UP5, UP15, TP5 et TP15 respectivement alors que celles du modèle *Logistique* modifié ont été 9,72772, 7,242095, 4,690607, 1,658321 jours pour UP5, UP15, TP5 et TP15 respectivement. La valeur de la plus faible durée d'adaptation a été observé par le prétraitement de l'inoculum TP15 peut s'expliquer par la présence de bactéries productrices d'hydrogène et l'absence des *Archèria* méthanogènes. Comme tous les inoculums avaient la même source, la phase stationnaire a été atteinte après environ 16 jours pour tous les types d'inoculum. La vitesse de production maximale d'hydrogène élevée a été déterminée après le traitement par UP5 et équivalent à 16,168 mL H₂/j prédit par le modèle de *Gompertz modifié*.

Tableau 3.4 Comparaison des résultats expérimentaux de la fermentation de l'ÉUB avec les données du modèle *Gompertz modifié* et du modèle *Logistique modifié*.

Méthodes de Prétraitement	Données Expérimentales		Données du modèle Gompertz modifiés				Données du modèle Logistique modifiés			
	BHP		H_{max} (mL H ₂)	λ (j)	R_m (mL H ₂ /j)	R	H_{max} (mL H ₂)	λ (j)	R_m (mL H ₂ /j)	R
	mLH ₂ /gVS	(mL H ₂)								
UP5	90,268	76.006	77.589	7.894	16.168	0,9769	80,65587	9,72772	11,95844	0,98927
UP15	22,139	18.662	19.129	6.894	3.143	0,99205	18,60864	7,242095	4,95804	0,99234
T5	167,44	98.271	104.861	4.213	11.306	0,99839	99,11144	4,690607	4,690607	0,99365
T15	178,89	103.905	109.535	1.349	9.622	0,98458	104,4778	1,658321	9,633376	0,97162

Les valeurs de H_{max} par le modèle du *Gompertz* modifiés et *Logistique* modifiés sont proches des valeurs expérimentales et les durées d'adaptation prédites par *Gompertz modifié* ont été plus courtes que celles obtenues par *Logistique modifié*.

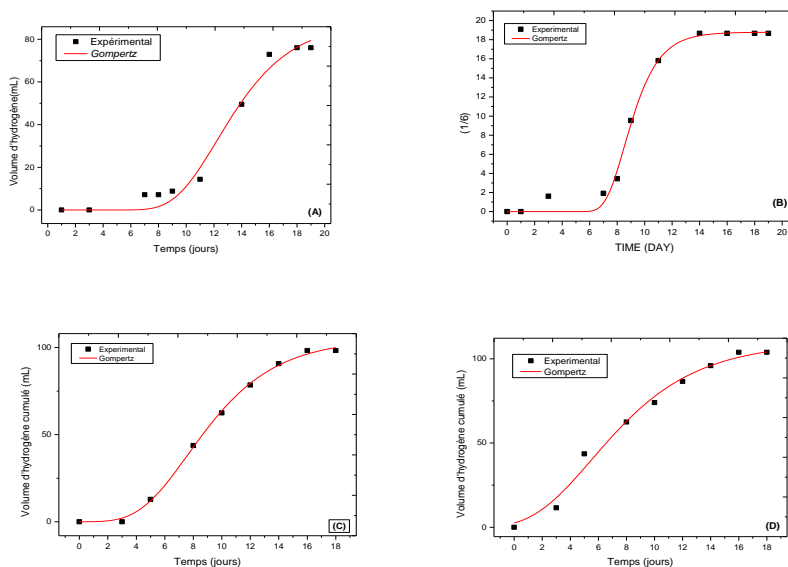


Figure 3.2 Équation de *Gompertz modifiée* adaptée à tous les inoculums : production maximale cumulative d’hydrogène. (A) par ultrasons (UP) pendant 5 min (B) de pré-traitement (UP) par ultrasons pendant 15 min (C) de pré-traitement thermique (TP) pendant 5 min (D) de pré-traitement (TP) pendant 15 minutes.

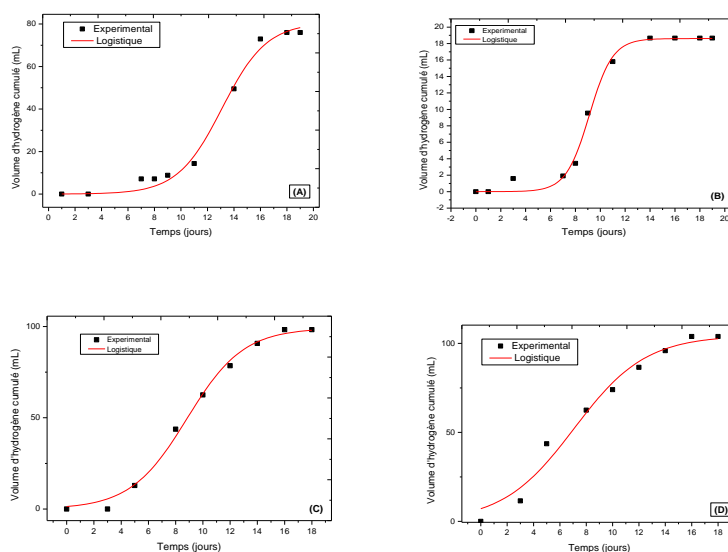


Figure 3.3 Équation de *Logistique modifiée* adaptée à tous les inoculums : production maximale cumulative d’hydrogène. (A) par ultrasons (UP) pendant 5 min (B) de pré-traitement (UP) par ultrasons pendant 15 min (C) de pré-traitement thermique (TP) pendant 5 min (D) de pré-traitement (TP) pendant 15 minutes.

Il a été observé que le pendement de production relative maximale de 178,89 mL/gVS a été obtenu en utilisant l'inoculum prétraitée thermiquement pendant 15 minutes tandis que le prétraitement ultrasonique a donné lieu à la plus faible production cumulée relative en biohydrogène de 22,139 mL/gVS.

III.A.5. Cinétique de production d'hydrogène

La production d'hydrogène par fermentation en fonction du temps par les rapports optimaux de I/S est représentée pour les différentes méthodes de prétraitement dans la **figure 3.4** Le volume maximum a été détecté à 34,15 mL H₂/gVS ajoutée pour UP5 au rapport 1/6 gVS/gVS d'I/S au 5^{ème} jour de fermentation, alors que la production maximale atteignait 2,095 mL de H₂ pour UP15 au rapport I/S de 1/6 gVS/gVS au 13^{ème} jour. D'autre part, le deuxième pic le plus élevé de génération d'hydrogène a été déterminé comme étant 8,42 mL H₂/gVS ajoutée pour le TP15 au rapport 1/3 gVS/gVS d'I/S au 8^{ème} jour de fermentation. Toutefois, la production la plus élevée était plus faible (7,87 mL de H₂/g de VS ajoutée) pour le TP5 au rapport 1/4 gVS/gVS d'I/S au 5^{ème} jour.

En ce qui concerne les inoculums TP5 et TP15, ils se sont comportés de la même façon avec un volume important obtenu par l'inoculum UP15. Il pourrait s'y attendre parce que les deux inoculums ont subi le même prétraitement et sont de la même source. Comme pour les inoculums ultrasoniques traités pendant 15 min, un pic plus large et plus bas que dans l'autre inoculum UP5 a été détecté. Les inoculums ultrasoniques traités pendant 5 min ont un comportement différent en raison du temps de traitement court et de la présence de plus de types de micro-organismes

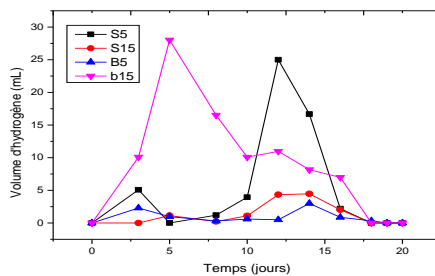


Figure 3.4 production optimale d'hydrogène par différents inoculums prétraités en fonction du temps

Conclusion

Dans la partie A, la production de biohydrogène à partir d'eaux usées de boulgour par fermentation obscure peut être une approche efficace, durable et respectueuse de l'environnement. En raison des valeurs de la DCOT et TVS élevées de **EUB**, ce dernier peut être valorisé par fermentation en biohydrogène. La génération d'hydrogène a été étudiée, en utilisant différents pré-traitements de l'inoculum avec différents rapports I/S où les essais ont été couronnés de succès dans tous les cas. Des différences ont été constatées dans la production d'hydrogène entre les quatre inoculums, les résultats ont révélé que les volumes cumulatifs relatifs d'hydrogène produits étaient de 90,268, 22,139, 167,44, 178,89 mL/gVS pour UP5, UP15, T5, T15, respectivement. Le taux maximal d'hydrogène a été observé en utilisant l'inoculum prétraité thermiquement pendant 15 min tandis que les rapport I/S supérieurs à 1/4 gVS/gVS n'ont pas produit d'hydrogène. Le prétraitement ultrasonique pour 5 min de boues semble rapide et résulte un bon rendement de production d'hydrogène pour tous les rapports I/S, ce qui se traduit par l'effet efficace de la chaleur pour la sélection des bactéries productrices d'hydrogène, bien que les ultrasons aient un effet plus faible.

L'utilisation des modèles de *Gompertz modifié* et *Logistique modifié* pour la détermination de l'évolution de la production cumulative d'hydrogène a montré clairement que les coefficients de corrélation R^2 étaient supérieur à 0,998 avec une meilleure approche du modèle *Gompertz modifié*.

Partie B : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Lactosérum

Introduction

L'eau usée issue l'industrie de lait et ses dérivés nommé *Lactosérum (LS)* a été largement utilisée comme substrat dans cette étude pour la production de biohydrogène, les effets du rapport I/S, des prétraitements physicochimiques et biologique du substrat ainsi que la présence des nanoparticules métalliques sur le potentiel et la cinétique de production d'hydrogène ont été étudiés. Les résultats obtenus ont été modélisés par les modèles de *Gompertz* et *Logistique* modifiés.

Le substrat brut a été utilisé sans prétraitement pour le fonctionnement discontinu dans un fermenteur CSTR, où les effets du HRT et ORL sur la production de biohydrogène ont été étudiés.

III.B.1. Caractérisation de l'inoculum

Le prétraitement thermique de la culture mixte sert à éliminer les bactéries consommatrices et non productrices d'hydrogène comme l'explique la **figure 3.5** et la culture prétraitée est utilisée comme inoculum.

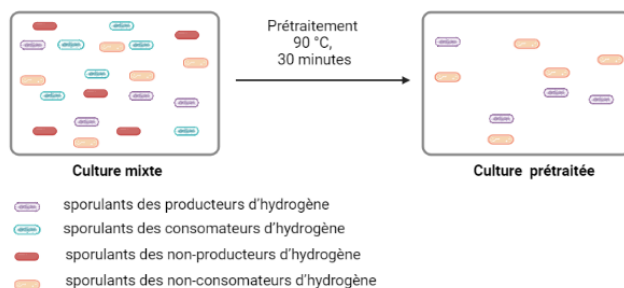


Figure 3.5 Effet du prétraitement thermique de la culture mixte adapté de (Bundhoo et al., 2015)

Les principales caractéristiques physicochimiques de l'inoculum utilisé avant et après le traitement sont présentées au **tableau 3.5** Selon ces résultats, le pH initial de l'inoculum a

été de 6,5 et il a été passé à 7,15 après le prétraitement thermique à 90°C pendant 30 minutes. Murillo (Murillo, 2004) a attribué que cette augmentation est due à la volatilisation de composés acides ou de libération du CO₂ dissous. Cependant, Morgan et al. ont interprété l'augmentation du pH après le traitement thermique de l'inoculum par désorption des protéines qui ont des groupes carboxyliques (Morgan et al., 1990).

Le prétraitement thermique a causé une augmentation de la DCO en raison de la désorption de certains composés initialement adsorbés par les particules solides de boues (Murillo, 2004) et de la solubilisation de composés intracellulaires comme l'azote, le phosphore et les carbohydrates solubles en raison de la rupture des parois cellulaires (Bougrier et al., 2005), permettant le transfert de matière organique à la phase liquide (Risberg et al., 2013). Cette augmentation est similaire aux résultats de l'étude d'(Ariunbaatar et al., 2015). Le prétraitement thermique à une température élevée (90 °C) a entraîné l'évaporation de l'eau contenue dans l'échantillon, ce qui a entraîné l'augmentation de la population cellulaire, en particulier les bactéries sporulées produisant de l'hydrogène (Parthiba Karthikeyan et al., 2018).

L'augmentation des valeurs TS et TVS peut s'expliquer par l'augmentation de la concentration de matière en suspension dans l'inoculum ainsi que l'augmentation de la fraction dissoute de DCO. La quantification accrue de valeurs de DCO, de TS, de TVS et de la concentration cellulaire confirme l'effet positif du traitement thermique sur la culture présente dans les boues aérobies (Murillo, 2004).

L'alcalinité de la boue après traitement est plus élevée, ce qui se traduit en augmentation du pouvoir tampon, les valeurs caractéristiques de cette dernière peuvent indiquer un bon déroulement de fermentation obscure par cet inoculum (Álvarez-Mateos et al., 2000).

Tableau 3.5 Caractéristiques physicochimiques de la boue avant et après le prétraitement thermique.

Paramètre	Avant traitement	Après traitement	Unité
pH	6.5	7.15	-
Alcalinité pH:6	1040	3920	mgCaCO ₃ /L
Alcalinité pH:4	2580	9580	mgCaCO ₃ /L
TS	29.15	35.96	g/L
TVS	23.47	20.86	g/L

DCOT	32	56	g/L
DCOS	16	48	g/L
DCOS/DCOT	50	86	%
AVT	3080	5660	mgCaCO ₃ /L
AGV	2580	4460	mgCaCO ₃ /L
Concentration Cellulaire	8.566	15.04	g/L

III.B.2. Caractérisation du substrat

Les caractéristiques physico-chimiques des eaux usées industriels du lait **LS** sont résumées dans le **tableau 3.6** Les valeurs caractéristiques du **LS** indiquent que le substrat utilisé est riche en matière organique biodégradable qui favorise les processus biologiques et le pourcentage élevé de TVS / TS présente le potentiel éventuel du substrat pour sa valorisation en biogaz (Alibardi & Cossu, 2015).

Les résultats montrent que ce substrat **LS** a un caractère acide à une turbidité élevée contenant une grande quantité de matière dégradable 44,8 g/L de DCO et 92,2 g/L de sucres totaux, à un taux très élevé de matière organique biodégradable DBO₅= 38,2 g/L et un pourcentage élevé de DCOS 80% qui favorise la croissance microbienne ; En outre, un pourcentage de TVS/TS de 97,30% montre la facilité de production de biogaz par fermentation obscure (Silva et al., 2019).

Tableau 3.6 Caractéristiques physicochimiques du **LS** brut.

Paramètre	Value	Unit
pH	4.68	-
Alcalinité pH6	0	mgCaCO ₃ /L
Alcalinité pH4	1297	mgCaCO ₃ /L
AVT	7820	mgCaCO ₃ /L
AGV	1297	mgCaCO ₃ /L
TS	49.24	g/L
TVS	43.33	g/L
TVS/ TS	87.97	%
DCOT	56	g/L
DCOS	44.8	g/L
DCOS/DCOT	80	%
Carbohydrates	92.2	g/L
Protéines	39	g/L
TKN	6,24	g/L
DBO₅	38,2	g/L
Turbidité	4170	NTU

III.B.3. Effet de I/S

La **figure 3.6** présente les résultats de mesure des volumes cumulés de biohydrogène produits par fermentation obscure du **LS** en fonction du temps et des rapports I/S, la fermentation obscure étant réalisée à 55°C, à pH 5,5. D'après cette figure, la production de biohydrogène a commencé après 72 heures (3 jours), cela s'explique par l'adaptation des micro-organismes de la culture mixte dans le milieu en synthétisant des enzymes adaptées au substrat pendant la phase d'adaptation. Par exemple, certaines souches de *Clostridium butyricum* et de *Clostridium acetobutylicum* produisent des enzymes qui peuvent hydrolyser les glucides contenus dans plusieurs déchets (Zagrodnik & Łaniecki, 2017).

La production maximale de biohydrogène de 59,96 mL a été obtenue pour un rapport I/S de ¼ gVS/gVS après 30 jours de fermentation, où le volume d'hydrogène a augmenté graduellement jusqu'à 24 jours. Le taux de production a diminué dans la période de 24 à 30 jours. Ensuite, l'hydrogène produit s'est arrêté après 31 jours de production en raison de l'épuisement du substrat dans le milieu de fermentation et de l'accumulation d'acides volatils (Jones & Woods, 1986). Le rapport I/S = 1/4 gVS/gVS a donné le meilleur rendement de production en raison de la faible concentration initiale de l'inoculum et de la concentration élevée du substrat, ce qui signifie que l'augmentation de la quantité de substrat favorise la production d'hydrogène mais l'excès de substrat inhibe sa consommation par les bactéries. Le rapport I/S = 1/5 conduit à la plus faible production d'hydrogène parce que les bactéries ne se sont pas adaptées au milieu ou elles ont été inhibées par les composés toxiques présents dans le substrat.

La fin de la phase exponentielle qui est la fin de la production du biohydrogène a été observée au 24^{ème} jour de fermentation, ce qui est probablement due à la longue période requise par les bactéries jusqu'à la destruction totale des molécules de substrat et après cette phase, volume de biohydrogène cumulé est mentionné.

Les courbes de production cumulée de biohydrogène sont similaires aux courbes de croissance microbienne avec phases de latence, phases de croissance exponentielles, et phases stationnaires.

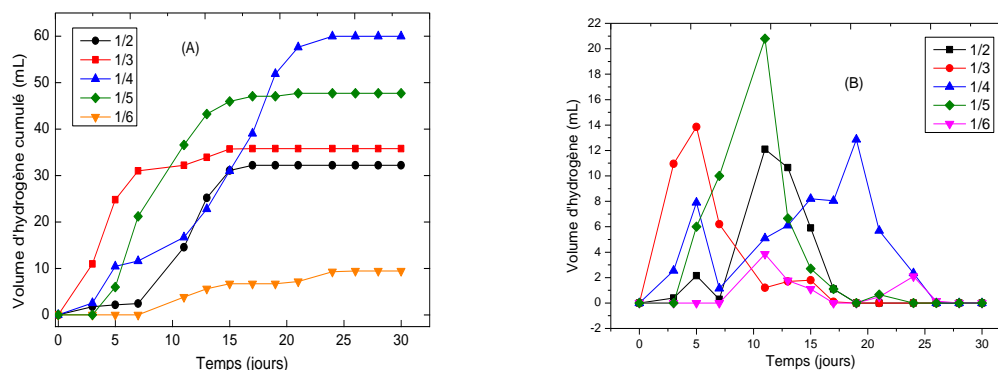


Figure 3.6 Production cumulative (A) et production (B) de biohydrogène pendant la fermentation obscure en fonction du temps et du rapport I/S à 55 °C et du pH 5,5.

III.B.4. Effet du prétraitement de substrat

III.B.4.1. Effet du prétraitement physicochimique

Afin d'améliorer la production du biohydrogène par fermentation obscure, des prétraitements physiques et chimiques ont été réalisés sur le substrat brut (Bundhoo et al., 2015):

- Prétraitements thermiques : effectués par choc thermique à 80, 90 et 100°C ;
- Prétraitements ultrasoniques : réalisés par exposition du substrat aux oscillations ultrasoniques pendant 5, 10 et 20 minutes ;
- Prétraitements acides : où le substrat subit un choc par un acide fort ou faible à un pH 2 ;
- Prétraitements basiques : avec le choc par une base forte ou faible d'un volume de substrat brut à un pH 11.

III.B.4.1.1. Caractérisation du substrat après prétraitements physico-chimiques

Les caractéristiques physicochimiques des eaux usées de transformation du lait **LS** avant et après prétraitements physico-chimiques sont présentées au **tableau 3.7** D'après les résultats présentés dans ce tableau, tous les prétraitements physicochimiques entraînent une augmentation des valeurs de DCO et une augmentation légère de TVS, seuls les prétraitements chimiques ont entraîné une diminution de la valeur du TVS de. Les valeurs de carbohydrates et protéines ont connues une légère augmentation par tous les prétraitements physiques (thermiques et ultrasoniques), contrairement les prétraitements thermique à 100°C

et chimiques ont entraîné la diminution de ces derniers l'étude de (Zhou et al., 2013) a résulté des observations similaires.

Avec le prétraitement thermique du **LS**, le pH et l'alcalinité ont été presque constants, et ce prétraitement a provoqué une augmentation de la DCO, DCOS, TS et TVS où les pourcentages les DCOS/DCO, TVS/TS, ont été maximales après le prétraitement thermique à 90 °C, mais le taux de sucre et protéines ont subi une augmentation par la chaleur mais l'augmentation de température à 100°C a résulté la diminution de ces derniers due à leur destruction, ce qui a été signalé par Pagliaccia et al. (Pagliaccia et al., 2016).

Le mécanisme de traitement par ultrasons est basé sur la cavitation acoustique où les ultrasons fournit une énorme densité de puissance en peu de temps et favorise les réactions chimiques qui contribue également à solubiliser le substrat donc des paramètres tels que la DCO, DCOS ont été varié et augmenté avec l'augmentation de la durée du prétraitement par ultrasons, tandis que le taux de protéines a augmenté mais il a diminué en prolongation de la durée de traitement due à la destruction cellulaire, des résultats similaires ont été observés dans l'étude de (Budiman & Wu, 2016). Le pH et l'alcalinité, restent presque constants, la variation de ces paramètres après un prétraitement ultrasonique de 5 min n'a pas été significative, car cette durée n'a pas été suffisante pour une destruction remarquable des sucres complexes car le prétraitement ultrasonique peut détruire les liaisons chimiques et générer des radicaux libres (Budiman & Wu, 2016). Le traitement chimique a donné lieu à une augmentation des valeurs de DCO, DCOS, une diminution a été observée pour les TS et TVS par ces prétraitements, le taux de carbohydrates et protéines ont diminué à cause de l'attaque chimique.

Le prétraitement acide a résulté des valeurs de TVS supérieures à celles après le prétraitement basique, presque aucune différence pour les taux de sucres, ces variations indiquent une forte décomposition des macromolécules du substrat, ce qui facilite la consommation et la digestion par les micro-organismes (Hendriks & Zeeman, 2009).

Tableau 3.7 Caractéristiques physicochimiques du substrat avant et après les prétraitements physicochimiques.

Caractéristiques	LS sans traitement	Après traitement									
		Thermique (°C)			Ultrasons (min)			Acide		Alcalin	
		80	90	100	5	10	20	HCl	CH ₃ COOH	NaOH	Ca(OH) ₂
pH	4.68	5.1	5.6	5.9	4.8	4.2	4.7	2	2	11	11
DCOT (gO₂/L)	56	107	147	160	128	151	160	80	80	144	58
DCOS (gO₂/L)	44.8	100	143	149	121	129	139	57	62	135	55
DCOS/DCOT (%)	80	93.45	97.27	93.13	94.5	85.4	86	71.2	77.5	93.7	94.8
TS (g/L)	49.24	57.8	60.19	58.9	48.8	49.3	52.6	38.6	37.48	30.35	35.2
TVS (g/L)	43.33	52.4	54.66	53.2	47.2	47.40	48.3	34.86	33.87	28.97	33.1
TVS/TS (%)	87.9	90.6	90.8	90.3	96.72	96.15	91.82	90.31	90.37	95.45	94.03
Protéines (g/L)	39	56	98	31	54	48	41	12	22	17.1	28.5
Carbohydrates(g/L)	15,21	17	22.2	12.2	15,3	19	22	13.2	10.3	8.2	8.0
Alcalinité pH6 (mgCaCO₃/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/
Alcalinité pH4 (mgCaCO₃/L)	1297	1107	983	1202	958	964	880	963	1028	1189	768

III.B.4.1.2. Effet du prétraitement thermique

Les effets des prétraitements thermiques ont été réalisés avec la valeur optimale de I/S=1/4, à pH 5.5 en thermophile 55°C. Dans la **figure 3.7**, les volumes cumulés (A) et les volumes (B) de biohydrogène produits par fermentation du **LS** prétraité thermiquement aux températures (80, 90, 100°C) en fonction du temps sont illustrés. Ces traitements contribuent à améliorer la production de biohydrogène entre 60 et 162 mL du deuxième au 11^{ème} jour avec une valeur maximale de 162 mL. La production par traitement à 100 °C stagne à 96 mL le 5^{ème} jour, ce qui est la valeur minimale notée ; les rendements d'amélioration des trois prétraitements varient entre 96 à 142%.

Le traitement thermique à 90°C conduit à la meilleure production de biohydrogène 170,1801 mL car cette température semble idéale pour limiter l'hydrolyse sans destruction totale des molécules du **LS**, car dans le cas d'un prétraitement à 80°C, la température est suffisamment

élevée, mais elle n'est pas suffisante pour permettre une hydrolyse complète du substrat afin d'obtenir une production maximale et, dans le cas d'un prétraitement à 100 °C, le substrat a subi une hydrolyse excessive qui a causé la destruction totale de ce dernier et la génération d'inhibiteurs de fermentation (Pagliaccia et al., 2016) et une évaporation de l'eau présent dans le LS, en tant que précurseur de la production du biohydrogène et la culture mixte a arrêté la production le 5^{ème} jour en manque du substrat. D'après la **figure 3.7** (B), le biohydrogène a été généré initialement après 2 jours de fermentation de trois substrats prétraités par la chaleur plus tôt que pour la fermentation du substrat non traité, la fermentation a duré une période de 8 jours pour les 3 substrats, l'allure des courbes de la production d'hydrogène est similaire dans les trois courbes, ce qui indique que le traitement thermique affecte énormément le substrat et a un impact indirect sur la durée de la phase d'hydrolyse.

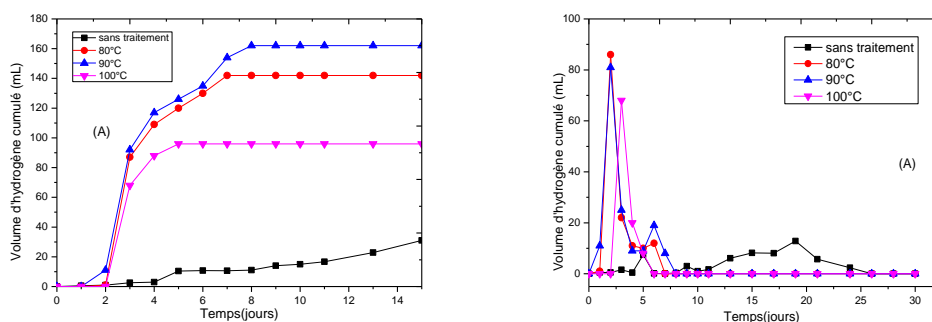


Figure 3.7 Production cumulative (A) et production de biohydrogène (B) pendant la fermentation obscure en fonction de température du prétraitement thermique avec I/S=1/4 gVS/gVS à 55 °C et du pH 5,5.

III.B.4.1.3. Effet du prétraitement ultrasonique

La **figure 3.8** montre l'évolution du volume cumulé (A) et le volume (B) de biohydrogène en fonction du temps et en fonction des différentes durées de prétraitement ultrasonique. Les résultats montrent que les 3 prétraitements améliorent la production de biohydrogène à un intervalle de 60 à 68 mL, ou cette amélioration augmentent proportionnellement avec la durée du traitement et varie entre 0,9173 et 14,8432 %. La production maximale d'hydrogène a été obtenue par le prétraitement ultrasonique de 20 minutes qui sert à diminuer le temps

requis pour la phase d'hydrolyse du substrat et facilite la consommation de substrat pour la production d'hydrogène, alors qu'une durée moyenne de 10 min de prétraitement ultrasonique améliore le rendement en hydrogène par 2,8352 % mais n'excédant pas l'amélioration due au même prétraitement pendant 20 minutes de prétraitement ultrasonique car une durée de 10 minutes n'est pas suffisante à une destruction totale des carbohydrates mais une durée très élevée de ce prétraitement peut résulter la production de certains composés inhibiteurs tels que les furanes et les composés phénoliques (Prabakar et coll., 2018). Le prétraitement ultrasonique du substrat pendant 5 minutes résulte une production cumulée d'hydrogène similaire à celle réalisée par fermentation du substrat brut car la durée de 5 minutes est de très faible impact sur les macromolécules du substrat (carbohydrates, lipides, protéines, etc.) D'après la **figure 3.8** (B), le biohydrogène a été généré initialement après 5 jours (phase d'adaptation) de fermentation des trois substrats prétraités par ultrasons de même que pour la fermentation du substrat non traité, la phase exponentielle s'est terminée en période de 30 jours pour les 4 substrats, ce qui indique que le traitement par ultrasons n'affecte pas énormément le substrat et n'a pas une forte influence sur la durée de la phase d'hydrolyse.

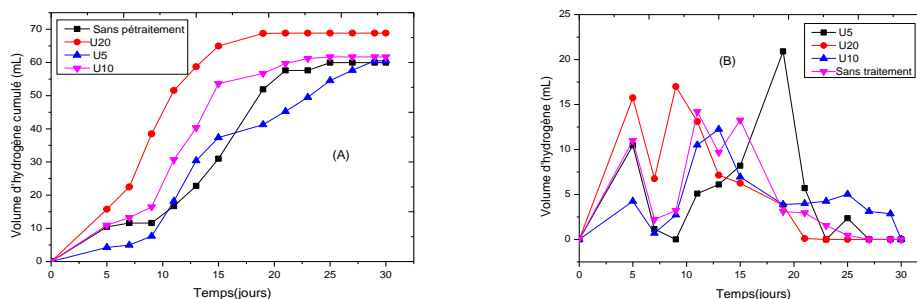


Figure 3.8 Production cumulative (A) et production de biohydrogène (B) pendant la fermentation obscure du LS en fonction de la durée du prétraitement ultrasonique avec I/S=1/4 gVS/gVS à 55 °C et du pH 5,5.

III.B.4.1.4. Effet du prétraitement chimique

La **figure 3.9** représente l'évolution du volume cumulé (A) et le volume (B) de biohydrogène en fonction du temps et en fonction des substrats prétraités par les quatre traitements chimiques ; les résultats montrent une amélioration du volume totale cumulé de 105 mL à

165,33 mL après 11 jours de fermentation ce qui est équivalent à 105 et 165,33% d'amélioration, à la fin de fermentation la valeur maximale de 165,5 mL a été obtenue par traitement alcalin en utilisant la base faible $Ca(OH)_2$.

La fermentation du substrat traité chimiquement avec l'acide faible CH_3COOH a entraîné la production du volume cumulé la plus faible 105 mL de biohydrogène à la fin du procédé par rapport aux autres prétraitements chimiques et par rapport au prétraitement par acide fort (125 mL H_2). La production d'hydrogène en milieu acide a commencé après deux jours, cela peut s'expliquer par l'adaptation rapide des souches de cultures mixtes au milieu acide et la difficulté d'adaptation dans le milieu de basique, où la bioconversion à l'hydrogène est plus rapide en milieu acide, mais la production s'est arrêtée au 5^{ème} jour.

La production de biohydrogène a été très bien amélioré par les prétraitements alcalins où celui réalisé par base faible a donné lieu la production la plus élevée 165,33 mL tandis que celle réalisé par la base forte a résulté une production cumulée de 148,5 mL entre le 4^{ème} et le 11^{ème} jour.

D'après la **figure 3.9** (B), le biohydrogène a été généré initialement après le 2 et le 3^{ème} jours de fermentation des deux substrats prétraités par les acides, aucune production n'a été observée après fermentation des deux substrats prétraités par les bases jusqu'au 8^{ème} au 10^{ème} jours de fermentation, la fermentation des substrats prétraités chimiquement par l'acide a duré une période de 6 jours alors que celle des substrats prétraités par la base a duré environ 12 jours, , ce qui indique que le traitement acide a une forte influence sur le substrat c'est-à-dire un impact indirect sur la diminution de la durée de la phase d'hydrolyse, des travaux de recherche précédents indiquent les même observations (Parthiba Karthikeyan et al., 2018).

Aussi (Kucharska et al., 2020) ont étudié l'effet du prétraitement basique par $NaOH$ et $Ca(OH)_2$ sur la fermentation obscure de épis usés de maïs qui ont un effet améliorant observé sur la production de biohydrogène avec une excellence de la base faible due à son effet hydrolytique réduit par rapport à la base forte (Kucharska et al., 2020).

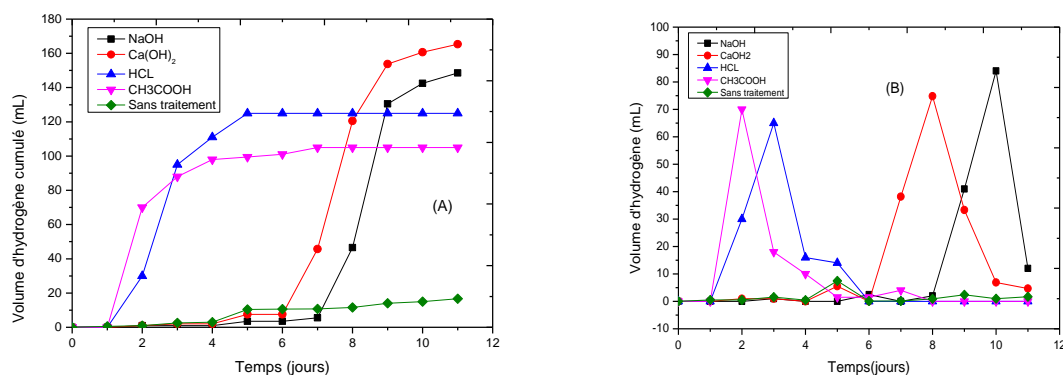


Figure 3.9 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS en fonction du temps à 55 °C, pH de 5,5 avec prétraitements chimiques et I/S=1/4 gVS/gVS.

III.B.4.2. Effet du prétraitement biologique

III.B.4.2.1. Hydrolyse Enzymatique

Le prétraitement enzymatique a été utilisé pour maximiser la concentration en sucres simples solubles dans le substrat afin d'être plus accessibles aux micro-organismes, ce qui implique une diminution de la durée de la phase d'hydrolyse, c'est-à-dire l'amélioration de la production d'hydrogène. Dans cette étude, deux enzymes ont été utilisées pour prétraiter les eaux usées de l'industrie de transformation du lait, *la lactase et le glucose oxydase*.

Selon la **figure 3.11**, la concentration de glucides a diminué de façon spectaculaire pour les deux enzymes testées. Une observation semblable a également été signalée par (Quéméneur et al., 2012) qui ont constaté une diminution de la concentration en glucides pendant le prétraitement enzymatique de la paille de blé. Les sucres de décomposition simples obtenus sont immédiatement utilisés comme source de carbone par les microorganismes de substrat natifs pour leurs croissance et besoin énergétique. Cependant, une étape de stérilisation est nécessaire pour éviter la dégradation immédiate des glucides par ces microorganismes. Les résultats ont confirmé l'efficacité et la capacité du prétraitement enzymatique à rendre les substrats complexes plus accessibles aux micro-organismes d'inoculum productrice d'hydrogène.

Les résultats montrent que le **LS** brut contenait 15,21 g/L de sucres totaux. Après les prétraitements enzymatiques, les taux de sucres réducteurs ont augmenté à 33,89 g/L et 16,95 g/L de glucides après hydrolyse enzymatique par lactase et glucose oxydase respectivement, le processus étant schématisé dans la **figure 3.10** Ces valeurs ont été obtenues juste après l'ajout instantané de l'enzyme c'est-à-dire le premier contact entre l'enzyme et le substrat. Lorsque le temps d'hydrolyse augmente de 0 à 23 h, le taux des sucres réducteurs diminue rapidement à 12,31 g/L et 11,67 g/L par la lactase et le glucose oxydase respectivement (**figure 3.11**). Le temps de prétraitement enzymatique optimal est de zéro. La lactase a été sélectionnée comme meilleur enzyme pour les essais de prétraitement enzymatique du **LS** avant de produire du biohydrogène par fermentation obscure.

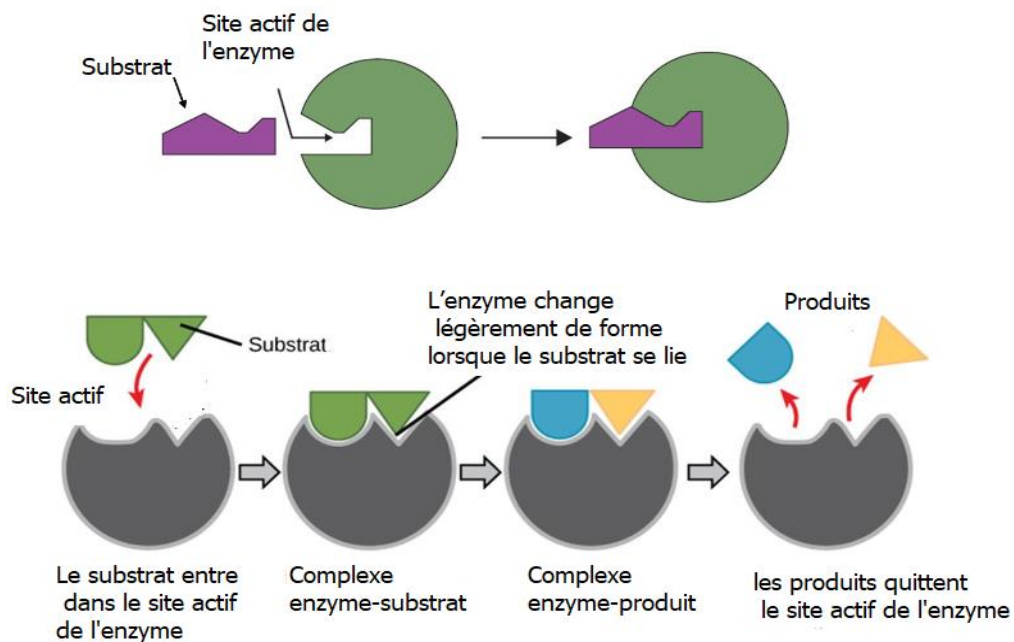


Figure 3.10 Mécanisme d'hydrolyse enzymatique adapté d'après (Olkiewicz et al., 2021).

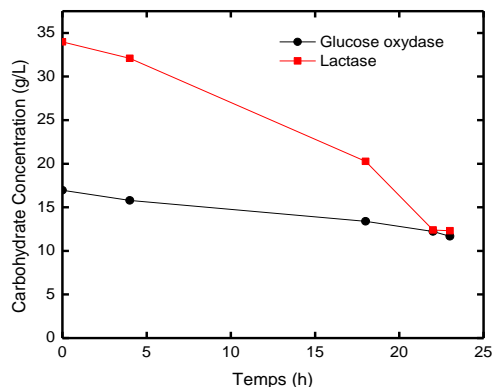


Figure 3.11 Concentration de sucres libérées par l'hydrolyse enzymatique du LS à 37 °C et à pH 6 en utilisant Lactase et glucose oxydase.

III.B.4.2.2. Effet du prétraitement enzymatique par la lactase sur le BHP

La **figure 3.12** représente l'évolution du volume cumulé (A) et le volume (B) de biohydrogène par fermentation du LS prétraité biologiquement par la lactase en fonction du temps. Selon ces résultats, la production d'hydrogène a augmenté jusqu'à un volume cumulatif total de 254 mL après 18 jours de fermentation. Environ 50% du biohydrogène a été produit dans les 72 premières heures, et environ 30% du biohydrogène a été produit après le 9^{ème} jour de fermentation.

L'augmentation de la production de biohydrogène est relative à la consommation de sucres réduits présents comme source de carbone pour les bactéries productrices d'hydrogène et plus particulièrement *Clostridium sporogènes* (Jung et al., 2010). Le volume de biohydrogène produit par LS brut a été de 59,96 mL après 30 jours. Bien que, le prétraitement enzymatique par lactase ait amélioré ce volume à 254 ml dans la moitié de cette période (15 jours). Cela confirme l'efficacité du prétraitement enzymatique en améliorant le rendement en H₂ produit par le lactosérum avec un facteur de 4,23 fois l'équivalent de 323,62%, grâce à la libération d'unités de glucides simples supplémentaires (glucose et galactose) dans le milieu et la minimisation de la durée de fermentation.

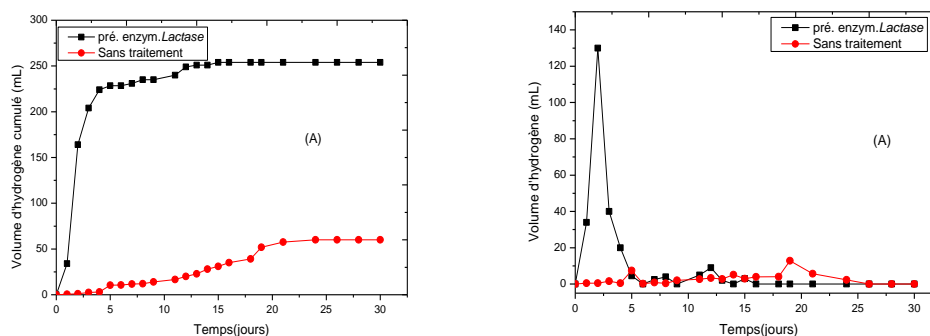


Figure 3.12 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure en fonction du temps avec prétraitements enzymatique en utilisant la *Lactase* à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/4 gVS/gVS

Ces résultats concordent avec les observations de (Cui et al., 2010), qui ont signalé une augmentation significative du rendement en H₂ des feuilles de peuplier avec un prétraitement enzymatique à l'aide de la *Vicozyme L* à 2 %.

Après fermentation et épuisement totale du substrat, le contenu des réacteurs a été analysé afin de déterminer les changements des paramètres physicochimiques et biologiques. Le **tableau 3.8** montre les principales caractéristiques du surnageant et du digestat après la fermentation obscure et arrêt de la production de biogaz.

Les résultats obtenus après le traitement montrent que les valeurs de pH sont passées de 4,68 à 5,93 due à l'accumulation des AGV et CO₂ dissout. L'augmentation de la concentration cellulaire est due à la consommation de produits de la phase d'hydrolyse des macromolécules favorisant ainsi la croissance bactérienne.

Le taux de glucides a été considérablement réduit parce qu'il a été utilisé comme source de carbone par les bactéries présentes dans le milieu. Cette constatation concorde avec les recherches de (Van Ginkel et al., 2005) (C. Li & Fang, 2007a) qui ont constaté que les glucides sont les substrats les plus couramment utilisés pour produire de l'hydrogène.

La valeur DCO a diminué après la fermentation due à la consommation d'une grande proportion de la matière organique par les bactéries. La quantité restante représente la matière minérale non-oxydables par voie biologique (Degrémont, 1978).

Tableau 3.8 Caractérisation du surnageant et du digestat après une fermentation sombre

Paramètre	1/4 gVS/gVS
Surnageant	
pH	5.93
Alcalinité totale (mgCaCO ₃ /L)	2160
AVT (mgCaCO ₃ /L)	3900
VFA (mgCaCO ₃ /L)	2160
TDCO (g/L)	16
Carbohydrates (g/L)	1.55
Protéines (g/L)	0.46
Digestat	
Concentration Cellulaire (g/L)	19.50
Protéines (g/L)	17.79

L'augmentation de la teneur en protéines dans le digestat est liée à la croissance cellulaire, où les bactéries produisent différents constituants de la nature peptidique tels que : hormones, antibiotiques, enzymes, etc. Bien que, la fraction protéique trouvée au niveau du surnageant présente des protéines solubles libérées ou dégradées par les bactéries (Degrémont, 1978)..

III.B.4.3. Comparaison des effets des différents prétraitements physicochimiques et biologique

L'effet des différents prétraitements du substrat sur le rendement de la production de biohydrogène est présenté à la **figure 3.13**, tous les prétraitements thermiques (80, 90 et 100 °C) augmentent le potentiel biochimique de biohydrogène du **LS**, mais 90 °C semble être la température optimale de traitement thermique résultant la valeur cumulative maximale du biohydrogène, aussi le prétraitement par ultrasons (5, 10 et 20 min), entraîne de légères augmentations du potentiel d'hydrogène du lactosérum ont été observées. De plus, pour les prétraitements chimiques, tous les alcalis et acides utilisés ont été efficaces. une forte augmentation du potentiel d'hydrogène a été observée pour le prétraitement par $Ca(OH)_2$. Contrairement aux prétraitements acides, basiques et ultrasoniques, le niveau le plus élevé

de production de biohydrogène a été observé pour le prétraitement enzymatique utilisant la *lactase* comme enzyme d'hydrolyse.

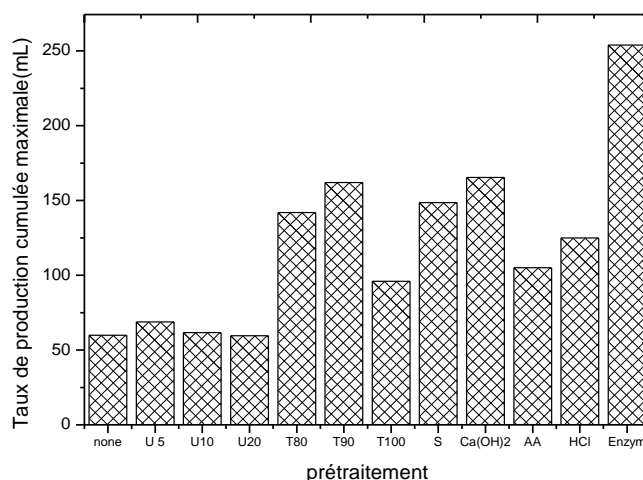


Figure 3.13 Histogramme comparatif entre le rendement de l'hydrogène produit à l'aide des 11 prétraitements du LS.

III.B.4.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

La modélisation cinétique de la fermentation obscure du LS pour la production de biohydrogène fournit les informations essentielles sur la caractéristique théorique du rendement maximal de production de biohydrogène. Cette analyse est un outil impératif qui sert à étudier la mise à l'échelle de la fermentation par lots expérimentales en production industrielle (Wang & Wan, 2009). Les données expérimentales ont été équipées de deux modèles cinétiques différents : le modèle de *Gompertz* et le modèle *logistique modifiés*, pour étudier les paramètres cinétiques tels que le temps d'adaptation des cultures productrices de l'hydrogène (λ), le potentiel maximal de rendement d'hydrogène (H_{max}) et la vitesse maximale de production d'hydrogène (R_m).

Comme le montre le **tableau 3.9**, les deux modèles décrivent la production de biohydrogène efficacement, ce qui ressort clairement de leur valeur de R^2 . Le potentiel de production d'hydrogène et la vitesse de production d'hydrogène ont augmenté avec le prétraitement du substrat. Des vitesses maximales de production d'hydrogène de 120,6392 mL H₂ et

126,5575mL H₂ ont été obtenues pour le prétraitement enzymatique par l'enzyme Lactase dans les deux modèles *Gompertz* et *logistique* modifié respectivement.

De plus, les modèles prédisaient une réduction drastique de la phase d'adaptation de fermentation en raison du prétraitement enzymatique, thermique et acide. Remarquablement, le modèle de *Gompertz* a estimé un délai de phase d'adaptation plus court que celui du modèle *logistique modifié*.

Tableau 3.9 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du LS, par différent prétraitement.

Prétraitement	H _{max}		Pourcentage d'amélioration (%)	Modèle : <i>Modified Gompertz</i>				Modèle : <i>Modified Logistic</i>			
	Experimentale			H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (d)	R	H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²
	(mL)	(mL/gVS)									
/	59,96	143,72	/	69,98268	3,572216	5,29167	0,9672	63,4673	4,1393	6,9158	0,9820
U 5	68,86	165,0527	0,9173	69,7953	7,3154	6,9835	0,9944	69,0737	7,0550	3,5873	0,9975
U10	61,66	147,7948	2,8352	63,4706	5,2646	4,8430	0,9830	61,8386	5,51987	5,4321	0,9913
U20	59,51	142,6414	14,8432	67,2369	3,0763	5,2271	0,9684	62,0714	3,11660	5,8008	0,9573
T80	142	340,3643	136,8246	139,9429	62,2291	1,7564	0,9900	138,3997	61,9190	1,8038	0,9801
T90	162	388,3030	170,1801	156,4602	57,4186	1,7263	0,9676	153,7622	57,8803	1,7797	0,9510
T100	96	230,1055	60,1067	95,5792	84,8817	1,1564	0,9978	95,1425	126,5243	1,4526	0,99545
NaOH	148,5	355,9444	147,6651	146,7564	121,725	7,6164	0,9980	146,4620	102,1111	7,5514	0,9988
Ca(OH) ₂	165,33	396,2848	175,7338	165,8387	83,2272	6,4366	0,9976	163,3559	78,95725	6,4466	0,9988
CH ₃ COOH	105	251,6779	108,4723	124,7985	70,4186	1,5649	0,9980	124,1041	68,94197	1,6132	0,9955
HCl	125	299,6165	75,1167	102,3331	75,5766	1,0831	0,9886	101,4059	108,8427	1,3554	0,9821
Enzym	254	608,8207	323,6157	240,7118	120,6392	0,6888	0,9818	239,1962	126,5575	0,7863	0,9749

En général, la production de biohydrogène se développe entre la phase d'adaptation et la phase stationnaire de la courbe de croissance bactérienne (Swathy et al., 2020). La période de d'adaptation a été réduite par le prétraitement enzymatique à un niveau considérable et la

durée de production de biohydrogène a été prolongée. Cela a permis d'améliorer les caractéristiques de production de biohydrogène.

Le rendement maximal théorique en hydrogène pour le prétraitement optimal a été calculé comme étant 240,7118 mL H₂ et 239,1962 mL H₂ par les modèles *Gompertz* et *Logistic modifiés* respectivement. La modélisation de la production fermentative de biohydrogène est une technique facile et efficace qui projette la technologie de fermentation de l'échelle de laboratoire à l'échelle industrielle pour répondre à la demande croissante d'énergie.

III.B.5. Effet de la présence des nanoparticules métalliques

Cette partie d'étude représente l'effet de la présence des nanoparticules métalliques (Ag) ou nanoparticules d'oxydes métalliques (Fe, Mn, Ag, Hg, Cu, Zn) sur la production fermentative d'hydrogène à partir du lactosérum **LS** brut par culture mixte. Ces nanoparticules (NP) ont été synthétisées au laboratoire par la méthode *hydrothermique* et ont été ajoutés en très faible concentration variant entre 0,5 et 3 mg/L, la fermentation a été réalisée à 55°C, à pH 5,5 et le rapport I/S a été fixé à ¼ gVS /gVS (la valeur optimale de production de Bio-H₂ par **LS** brut sans aucun prétraitement).

III.B.5.1. Caractérisation des nanoparticules synthétisés

- Diffraction à rayons X

Les nanoparticules synthétisées à base de fer, manganèse, cuivre, argent et zinc ont été caractérisées par DRX afin de déterminer leur nature. Le test de diffraction des rayons X sur poudre a été effectué en utilisant X'PERT Philips ; diffractomètre avancé dans la gamme 2 theta de 10 à 90 degrés. Après analyse, les diagrammes de diffraction des rayons X des échantillons des particules obtenues sont représentés dans les **figures 3.14 à 3.18** :

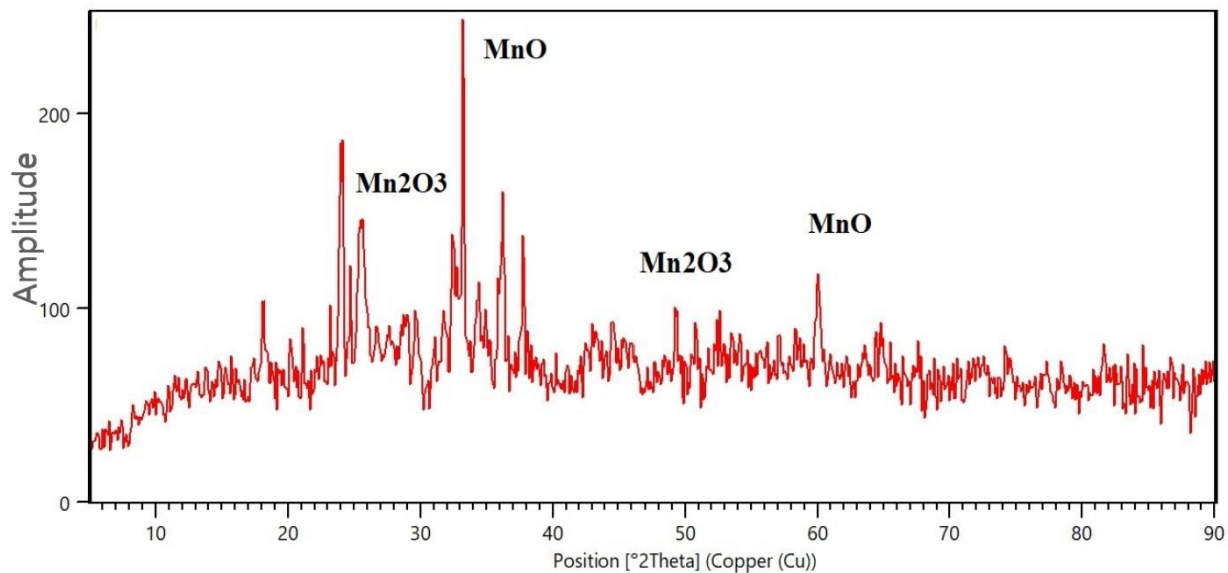


Figure 3.14 Les diagrammes de diffraction des rayons X des nanoparticules à base de manganèse.

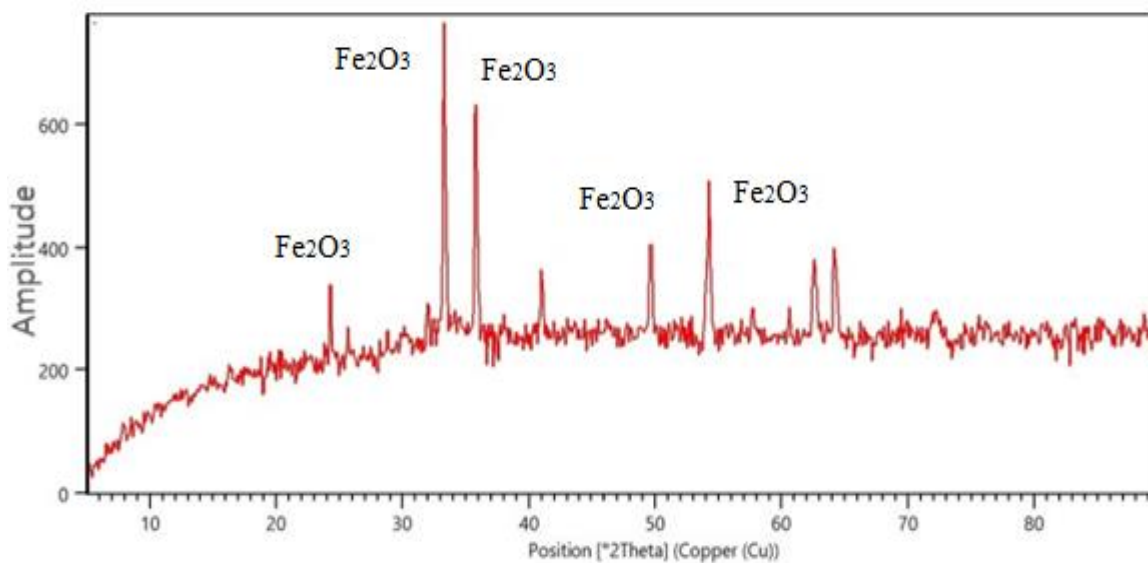


Figure 3.15 Diagramme de diffraction des rayons X des nanoparticules à base de fer

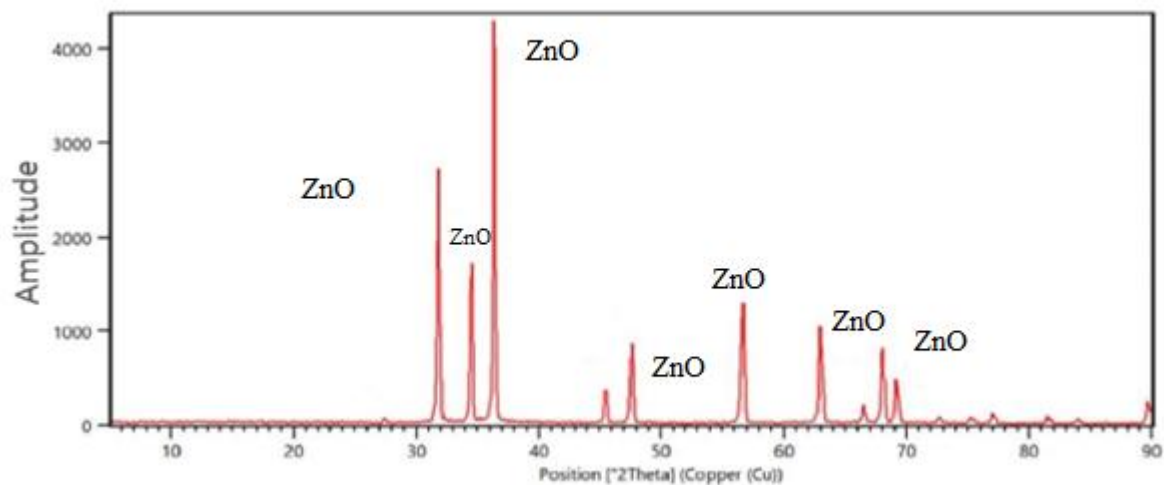


Figure 3.16 15 Diagramme de diffraction des rayons X des nanoparticules à base de zinc

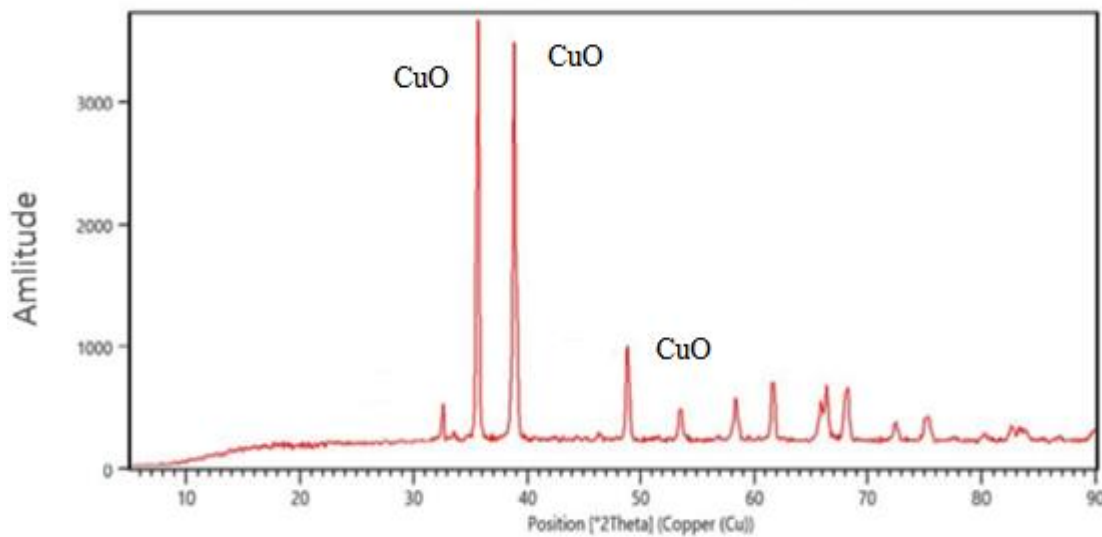


Figure 3.17 15 Diagramme de diffraction des rayons X des nanoparticules à base de cuivre

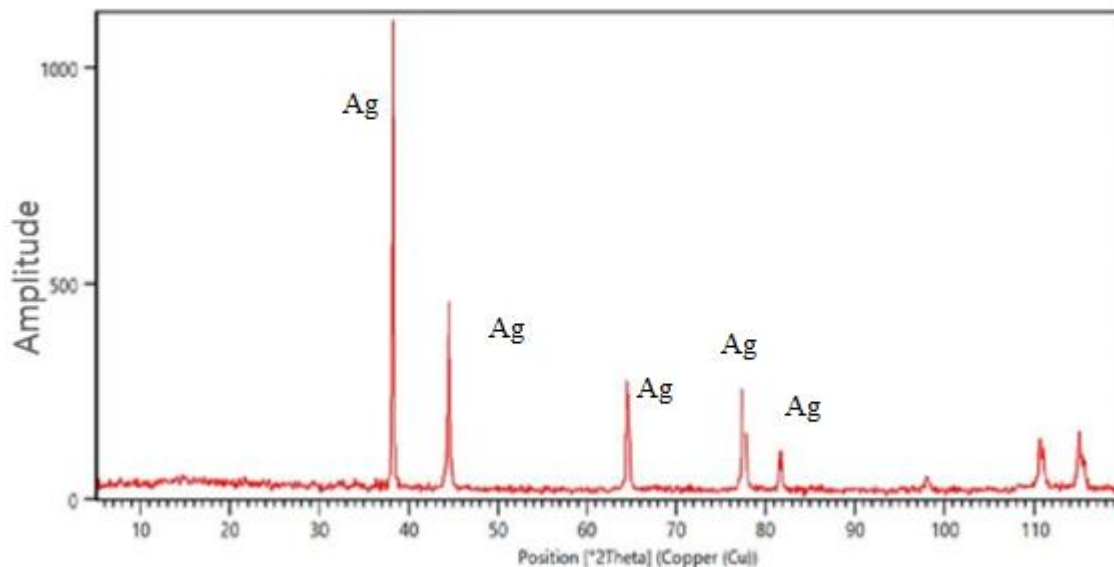


Figure 3.18 15 Diagramme de diffraction des rayons X des nanoparticules à base d'argent

D'après ces figures, les spectres montrent que le spectre DRX du fer montre que le produit synthétisé est de l'oxyde de fer (III) Fe_2O_3 présent à environ 34° de 2 thêta (Kumar et al., 2018), aussi cinq pics correspondant à l'argent métallique (Ag) avec le pic de diffraction est à 37° (Hui et al., 2016), de même cinq pics présentent l'oxyde de cuivre (CuO) dont le pic de diffraction est à 35° et 36° (Anwaar et al., 2016). Dix pics représentent l'oxyde de Zinc (ZnO) où le pic de diffractions 36° et 37° (Alrokayan, 2012) ; la synthèse par le chlorure de manganèse a donné lieu à la production d'un mélange de mono-oxyde de manganèse MnO et l'oxyde de manganèse (III) Mn_2O_3 dont les pics de diffraction sont à 33° et 49° respectivement (Wu et al., 2016).

La taille des cristallites des NPs de métaux et celle des oxydes de métaux sont considérées très similaires à la taille des NPs (Alrokayan, 2012), la détermination de cette caractéristique a été réalisée par le HighScore (le logiciel idéal pour l'identification de phase, l'analyse de phase semi-quantitative, le traitement de modèle, l'ajustement de profil dans la diffraction à rayons X).

Les tailles des différents NPs analysées par XRD sont représentées dans le **tableau 3.10** ; comme montre ce tableau les NPs présentent de très petites tailles où les NPs de CuO sont les plus petites à 24,7 nm tandis que les NPs de Fe_2O_3 ont une taille de 145 nm.

-Microscopie Electronique à Balayage couplée à une sonde EDX

Les images du microscope électronique à balayage MEB illustrés dans la **figure 3.19** de l'oxyde de manganèse (Mn_2O_4) montrent que le matériau est bien formé et présente des particules cristallines clairement développées. D'une façon générale, les particules sont de morphologie polyédrique irrégulière qui forment des agglomérats de 1 à 3 μm de diamètre. Les rapports Mn/O atomiques obtenus à partir des déterminations EDX étaient très semblables à ceux attendus de la stœchiométrie théorique du composé chimique (Mn_2O_4).

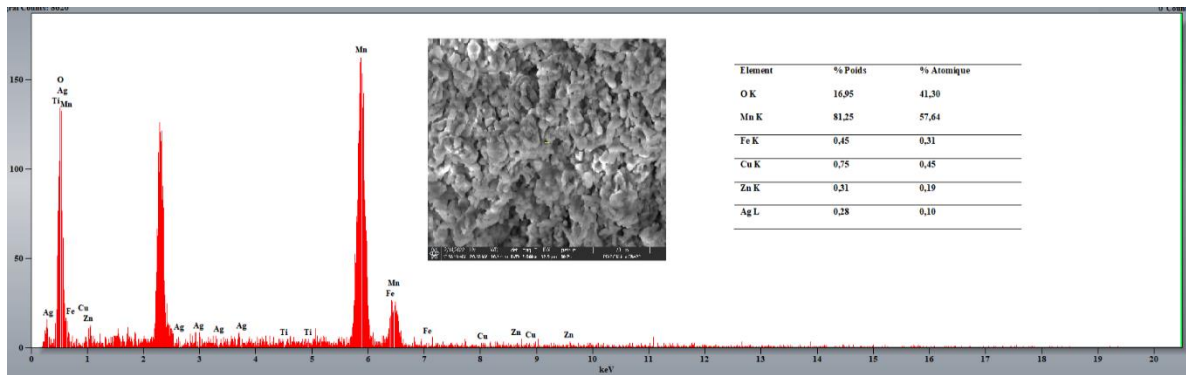


Figure 3.19 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de manganèse

Aussi, les morphologies de surface des échantillons préparés de nanoparticule Fe_2O_3 présentent une structure sphérique de la surface extérieure avec des agglomérations dans la profondeur probablement due à la création des noyaux de l'hématite, la teneur en Fe dans cette agrégation limite la taille des particules d'hématite. Tandis l'analyse EDX confirme la nature de ces nanoparticules est l'hématite pure.

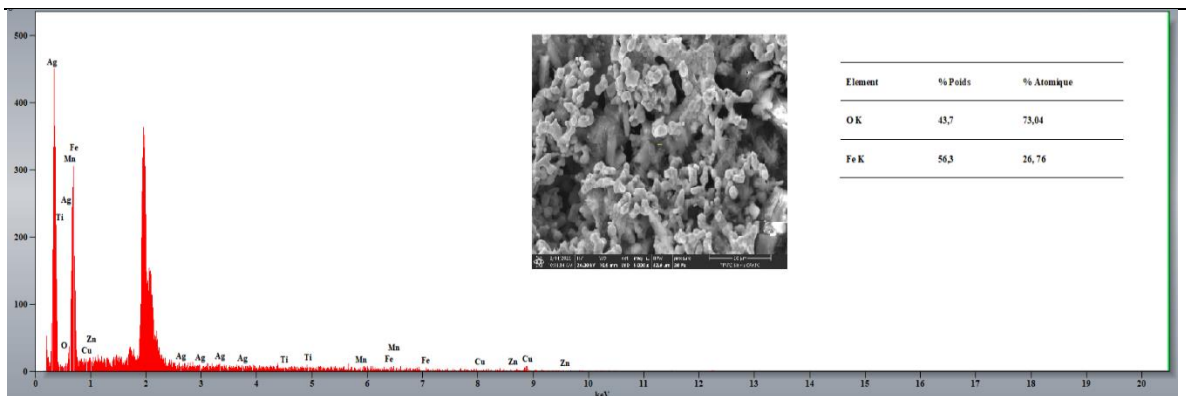


Figure 3.20 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de fer

La caractérisation des nanoparticules à base de cuivre sont illustrés dans la **figure 3.21** d'après les images de MEB il a été observé que les nanoparticules CuO agglomérées par une structure de fleur. Cette agglomération s'est résulté en raison du chauffage brusque de la solution durant la synthèse. La composition représentée montre que les particules obtenues présentent un degré très élevé de pureté avec des traces de manganèse et de fer de moins de 0.2% du poids.

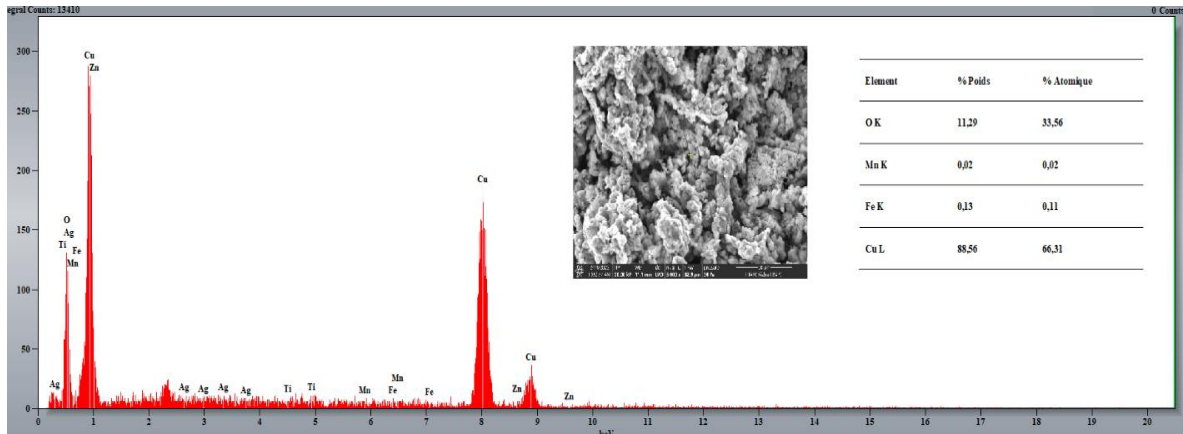


Figure 3.21 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de cuivre. Les images de MEB montrent des nanoparticules individuelles caractérisant ZnO ainsi qu'un nombre d'agrégats. La **figure 3.22** illustre des particules sphériques distinctes en forme et qui se regroupent en particules plus grosses sans morphologie bien définie. Les images de MEB montrent que la taille des nanoparticules ZnO allant de moins de 1 μm à 2 μm . Les résultats donnés par les spectres EDX montrent une grande pureté du composé formé.

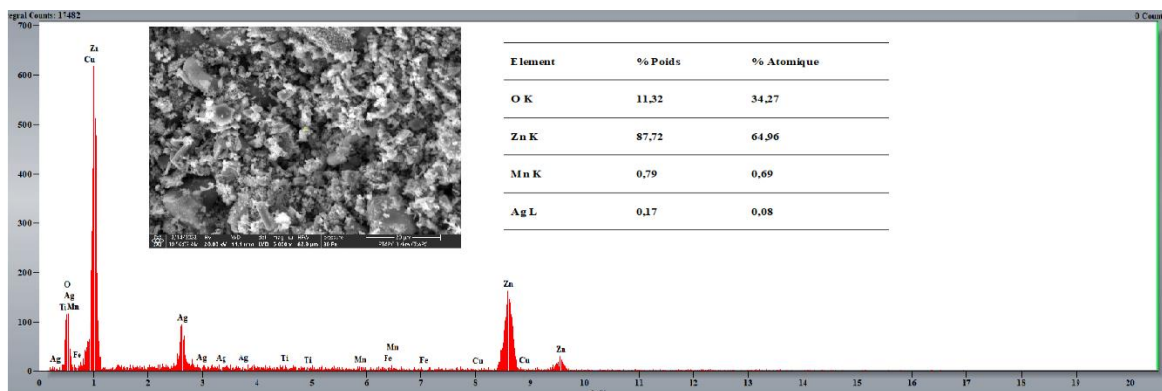


Figure 3.22 La morphologie et la composition élémentaire des nanoparticules de l'oxyde de zinc

III.B.5.2. Effet de présence des NPs sur la production de Biohydrogène par fermentation du lactosérum

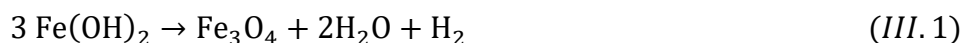
La série des courbes présentes dans la **figure 3.23** illustre les effets de la présence des NPs synthétisés sur les volumes cumulés et les volumes produit de biohydrogène en fonction du temps et en fonction des concentrations des nanoparticules présents (0 à 3 mg/L).

Pour tous les figures présentant le volume d'hydrogène cumulé en fonction du temps et en fonction de la concentration des NPs, le profil du volume cumulé en H₂ avec le temps de fermentation a montré des courbes de croissance typiques avec des phases d'adaptations, exponentielles, stationnaires. L'ajout des nanomatériaux a démontré des effets évidents sur l'activité de la des micro-organismes, et donc sur la production de H₂. L'ajout de des NPs d'oxyde de cuivre à 2,5 mg/L a significativement augmenté le taux de production d'hydrogène jusqu'à 324 mL, ce qui est équivalent à une amélioration de 449,152% de la production en absence de nanomatériaux tandis que la présence des NPs à base de mercure a résulté une diminution jusqu'à 12 mL par une concentration de 3 mg/L, l'équivalent à un pourcentage de réduction de 20,19%.

- Effet de présence des NPs à base de fer

La dose de 1,5 mg/L de NPs de Fe a entraîné la plus forte promotion du rendement en H₂ de 357,63 % par rapport au test témoin. En conséquence, le taux de production de H₂ le plus élevé porté à 4,53 fois (270 mL) après 8 jours de fermentation (**figure 3.23 (A,B)**). La production d'hydrogène maximale a été 137 mL produite le 5-ème jours en présence de la même dose 1,5 mg/L (**figure 3.23 (B)**) ; en variant la concentration de NPs de Fe de 0,5 à 3 mg /L avec un pas de 0,5 mg /L, le taux de production a augmenté jusqu'à la valeur maximale 270 mL et commence à diminuer à 109 mL en présence de 2 mg /L et continue à diminuer jusqu'à 52 mL en ajoutant 3 mg/L dans le milieu de fermentation. En outre, l'amélioration du rendement de production en H₂ et la cinétique de production avec l'ajout des NPs à base de fer étaient probablement attribuables à l'augmentation de l'activité hydrogénase, l'amélioration de l'efficacité du transfert d'électrons des cellules de bactéries productrices d'hydrogène et celles enrichies (Zhang et al., 2017)(Lin et al., 2016). Il a été constaté que le

élément fer (Fe) a été lentement libéré des NPs de Fe₂O₃ à l'aide des acides gras volatiles (AGV) produits au cours du processus bio-H₂ (Jagadevan et al., 2012). Étant donné que les enzymes hydrogénase comprenaient principalement l'hydrogénase [Ni-Fe] et [Fe-Fe], la concentration et l'état appropriés de Fe (p. ex., Fe⁰, Fe²⁺ et Fe³⁺) pourrait fournir l'élément essentiel pour la croissance des bactéries et la synthèse d'hydrogénase, ce qui encore facilite l'augmentation du taux de production de H₂. Aussi, la corrosion anaérobie pourrait provoquer la génération de Fe²⁺, réagissant avec la matrice d'eau pour former l'hydroxyde de fer Fe(OH)₂, il pourrait ensuite être transformé en Fe₃O₄ par la réaction de *Schikorr*, comme décrit dans l'Eq. (III.1) (Odziemkowski et al., 1998) :



Ainsi, une petite quantité de H₂ a été produite par l'équation (III.1) qui facilite le rendement en H₂. D'autre part, les NPs de Fe₂O₃, avec une petite partie de Fe²⁺ au cours du processus microbien, pourraient servir de sels ferreux et de support pour la croissance cellulaire et l'attachement microbien (Zhang et al., 2017), et comme conducteurs d'électrons pour améliorer le transfert d'électrons pendant le processus de production de H₂. Il a été également constaté que les NPs de Fe₂O₃ pouvaient accroître l'activité de la ferrédoxine oxydoréductase en améliorant le taux de transfert d'électrons en raison de l'élargissement de la surface, qui augmentait la production de H₂ pendant le processus de fermentation obscure (Mohanraj et al., 2014).

- Effet de présence des NPs à base de manganèse

D'après **la figure 3.23 (C,D)**, l'ajout des NPs d'oxyde de manganèse résulte une amélioration de la production de biohydrogène de 202 mL en présence de 0,5 mg/L après 8 jours de fermentation face à 59,96 mL en absence des NPs pendant 30 jours de fermentation, ce qui correspond un pourcentage d'amélioration de 222,03% (3,39 fois). Le rendement de production de biohydrogène est inversement proportionnel à la dose de NPs de Manganèse, ce rendement diminue jusqu'à 11 mL en présence de 3 mg/L inférieur à la production d'hydrogène en absence de NPs. Dans la littérature les NPs de manganèse n'ont pas été utilisé sous leurs formes oxydés sauf quelques études où l'ajout des NPs de MnFe₂O₄ ont été

utilisées pendant la fermentation mésophile et thermophile et ont augmenté de façon significative la production de H₂, peut-être parce que les NPs MnFe₂O₄ ont amélioré la structure de la communauté microbienne et augmenté l'activité de l'hydrogénase et l'efficacité du transfert d'électrons (Lin et coll., 2013). Des études antérieures ont suggéré que l'ajout des NPs de MnFe₂O₄ à une concentration appropriée dans un système anaérobie peut augmenter le rendement de bio-H₂ en améliorant le transfert d'électrons, l'activité hydrogénase et la composition microbienne et dans le processus de production de bio-H₂ anaérobie, l'accumulation de Fe et de Mn dans les NPs de MnFe₂O₄ provoque une libération lente dans l'environnement, fournissant des éléments essentiels à l'hydrogénase et aux micro-organismes (Han et coll., 2011). L'hydrogénase est reconnue comme une enzyme clé dans le processus de fermentation de l'hydrogène, et l'hydrogénase [Fe Fe] a reçu beaucoup d'attention pour sa forte activité (Karadag et Puhakka, 2010). Les NPs de Mn₂O₄ sont caractérisés par leur grande surface spécifique, leur stabilité, leur structure spinelle et leur conductivité électrique et servent de bons supports dans la production de bio-H₂ (Zhang et al., 2019).

- Effet de présence des NPs à base de zinc

La dose de 1,5 mg/L de NPs de ZnO a entraîné la plus forte promotion du rendement en H₂ de 222,03 % par rapport au témoin. En conséquence, le taux de production de H₂ le plus élevée porté à 3,19 fois (190 mL) après 8 jours de fermentation (**figure 3.23 (E,F)**). La production d'hydrogène maximale a été 90 mL produite le 3-ème jour en présence de la même dose 2 mg/L ; en variant la concentration des NPs de ZnO de 0,5 à 3 mg /L avec un pas de 0,5 mg /L, le taux de production a augmenté jusqu'à la valeur maximale 190 mL par une dose de 2 mg/L et commence à diminuer à 84 mL en présence de 2,5 mg /L et continue à diminuer jusqu'à 61 mL en ajoutant 3 mg/L dans le milieu de fermentation.

(Mu & Chen, 2011) ont démontré que le rendement en méthane produit par digestion anaérobie a été réduit de 18,3 % et de 75,1 % lorsqu'il était exposé à 30 et 150 mg/g de TSS des NPs de ZnO, accompagné de la diminution des activités des enzymes clés liées à l'hydrolyse et à la méthanisation (protéase et F420). Récemment, les NPs de ZnO ont été découvert pour favoriser la production de biohydrogène par fermentation des eaux usées

industrielles (Elreedy et al., 2018), d'après la recherche de (Elreedy et coll., 2019), Le rôle crucial de Zn peut être lié à son implication dans les ADHs dépendants de Zn, qui facilitent la synthèse de coenzyme NAD⁺ nécessaire pour la conversion de l'éthanol en acétaldéhyde, ce qui augmente la disponibilité du proton (H⁺) dans le milieu. De plus, la plus forte croissance des producteurs d'hydrogène (1507,0 % par rapport au témoin) a été enregistrée lorsque des NPs à ZnO de 1 mg/L ont été utilisés.

- Effet de présence des NPs à base de mercure

D'après la **figure 3.23 (G,H)**, L'ajout des NPs d'oxyde de mercure résulte une diminution de la production de biohydrogène variant entre 12 à 49 mL en présence de 3 et 0,5 mg/L respectivement après 9 jours de fermentation, ce qui correspond un pourcentage de diminution de 16,94 à 20,16 %.

L'effet indésirable des NPs à base de mercure a été remarqué et probablement due au pouvoir inhibiteur ou toxique des ions Hg²⁺. Malgré que le mercure soit moins étudié dans le domaine de la production d'hydrogène par FO, le Hg peut sérieusement inhiber la production d'hydrogène. À mesure que la concentration de Hg augmentait de 0,5 mg/L à 100 mg/L, la production cumulative d'hydrogène diminuait de 215,7 mL à 55,3 mL (Sharma & Melkania, 2018) puisque le mercure est bioaccumulable et peut interagir avec les enzymes et les groupes de protéines sulfhydriques pour inactiver la fonction cellulaire (Kumari et al., 2020).

- Effet de présence des NPs à base de cuivre

D'après la **figure 3.23 (I,J)**, L'ajout des NPs d'oxyde de cuivre résulte une amélioration de la production de biohydrogène à 324 mL en présence de 2,5 mg/L après 16 jours de fermentation face à 59,96 mL en absence des NPs dans 30 jours, ce qui correspond un pourcentage d'amélioration de 449,152% (5,44 fois). Le rendement de production de biohydrogène diminue jusqu'à 94 mL en présence de 0,5 mg/L supérieur 1,579 fois à la production d'hydrogène en absence de NPs.

Cette amélioration peut être due à la petite taille de ces NPs, la taille étant inversement proportionnel à la surface spécifique de la même quantité. En outre, une étude antérieure a

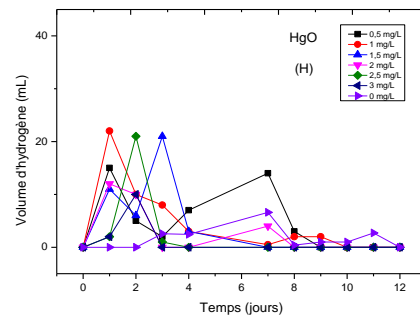
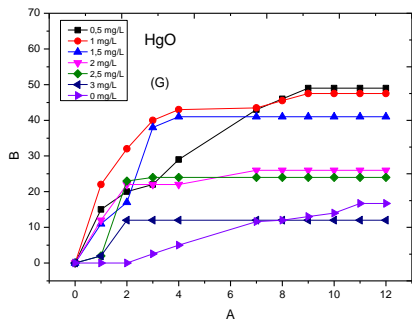
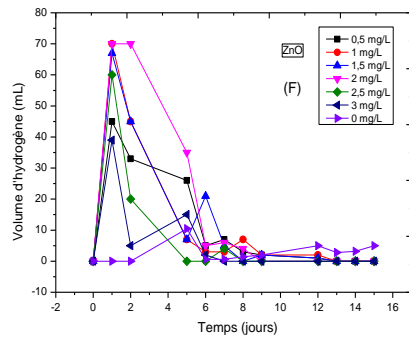
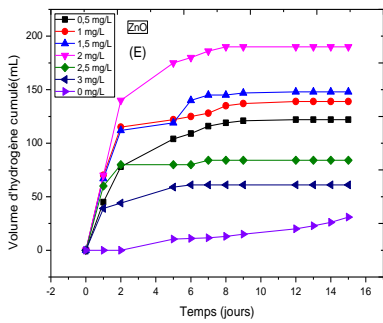
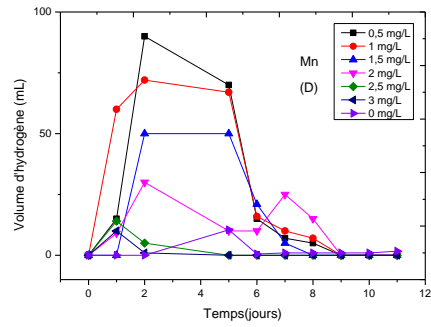
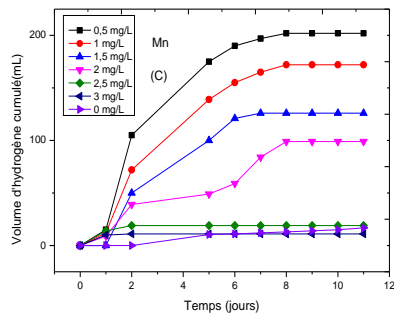
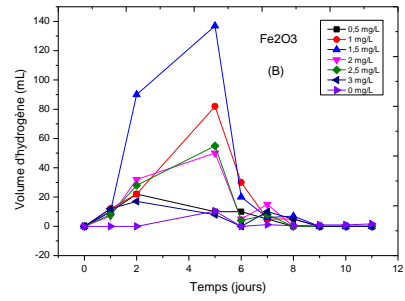
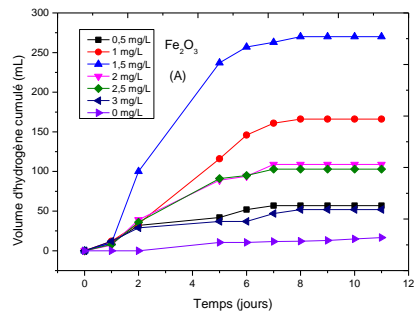
conclu que les méthanogènes consommant du H₂ étaient considérablement inhibés à des concentrations relativement élevées de NPs de CuO. La toxicité a probablement été causée par les NPs CuO eux-mêmes et les ions de cuivre libérés dans le milieu de culture (Otero-González et al., 2014). Le cuivre aide à l'activation des enzymes suivants : Acétyl-CoA synthase, Nitrite réductase, Ammonium monooxygénase ; de plus c'est un activant des enzymes métalliques (Zhang et al., 2019).

- Effet de présence des NPs à base d'argent

D'après la **figure 3.23 (k,L)**, l'ajout des NPs d'argent résulte une amélioration de la production de biohydrogène de 223 mL en présence de 1,5 mg/L après 13 jours de fermentation face à 59,96 mL en absence des NPs dans 30 jours, ce qui correspond à un pourcentage d'amélioration de 277,96% (3,74 fois). Le rendement de production de biohydrogène diminue jusqu'à 174 mL en présence de 3 mg/L supérieure à la production d'hydrogène en absence de NPs. Bien que les nanoparticules d'argent montrent une activité antimicrobienne mais la faible concentration peut-être une raison pour laquelle il n'avait pas d'effet inhibiteur sur la production de cellulase. Ces NPs catalyse la réduction du taux de génération de biomasse stimulée et réduit la phase de latence pour la production d'hydrogène (Pugazhendhi et al., 2019) mais le mécanisme catalytique n'est pas encore bien expliqué.

D'après (Zhao et al., 2013), l'ajout de nanoparticules d'argent pourrait améliorer efficacement la bio-activité des bactéries productrices d'hydrogène. Autrement dit, les nanoparticules d'argent pourraient non seulement améliorer la cinétique de la production de biohydrogène, mais augmenter son taux de production.

De la **figure 3.23 (M,N)**, L'ajout des NPs d'oxyde d'argent résulte une amélioration de la production de biohydrogène de 241 mL en présence de 1 mg/L après 15 jours de fermentation face à 59,96 mL en absence des NPs dans 30 jours, ce qui correspond un pourcentage d'amélioration de 308,474 % (4,05 fois). Le rendement de production de biohydrogène est inversement proportionnel à la dose de NPs d'AgO, ce rendement diminue jusqu'à 73 mL en présence de 3 mg/L supérieur 1,22 fois à la production d'hydrogène en absence de NPs.



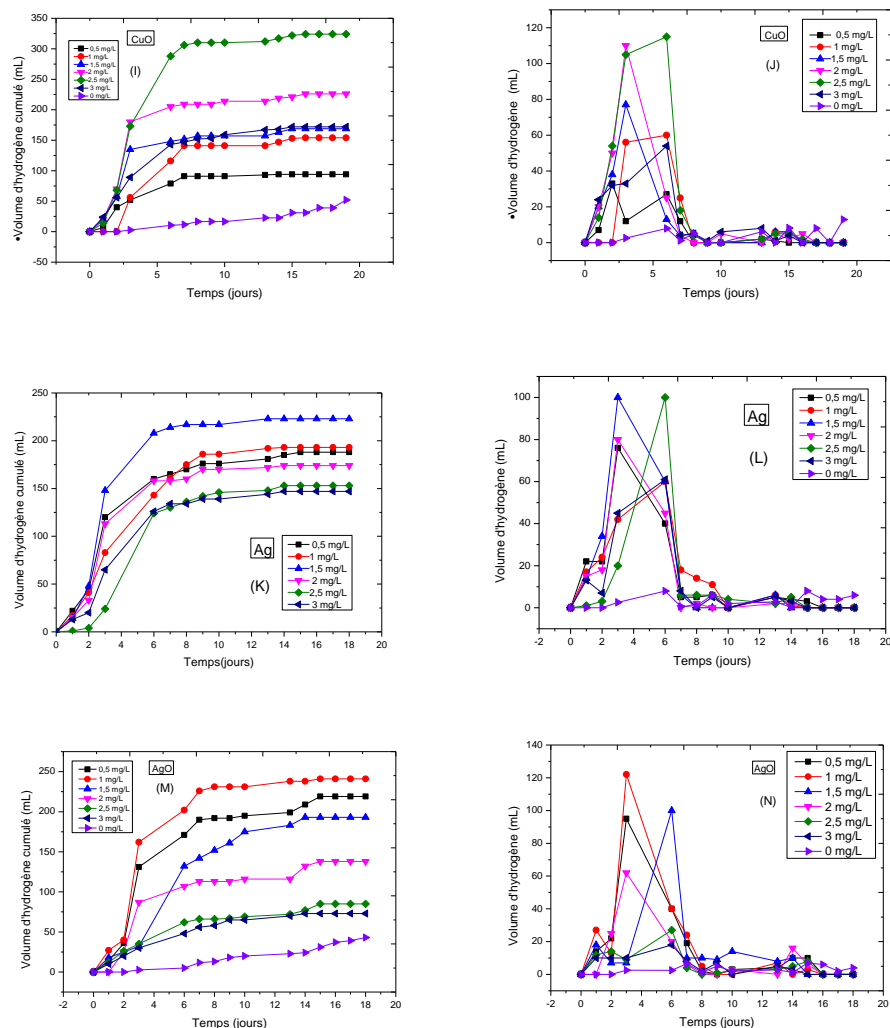


Figure 3.23 Effet de la présence des différentes nanoparticules sur la production cumulée de l'hydrogène et la production de l'hydrogène en fonction du temps et en fonction de la concentration en NPs.

Wimonsong et Nitisoravut (Wimonsong & Nitisoravut, 2015) ont synthétisé et essayé différents matériaux de Au/Fe, Au/Zn, Au/Mg, Au/Al, Au/O connus sous le nom d'hydrotalcites qui renforcent la catalyse assistée des NPs aurifères dans leur capacité à modifier la production de biohydrogène.

Généralement, il est conclu que la présence des NPs à base des éléments métalliques non toxiques à la croissance cellulaire améliore la production de biohydrogène mais leur

concentration ne doit pas être excessive. Par contre les éléments métalliques connus par leur toxicité provoquent l'inhibition des cultures par la présence de leur NPs. Certains chercheurs ont constaté que les NPs servaient de « ponts » pour favoriser le transfert d'électrons extracellulaires entre les cellules interconnectées de la DGPS. Les nanoparticules pourraient nuire à l'activité des microbes par le stress oxydatif, ainsi qu'à la pénétration et à la rupture de la paroi cellulaire à une concentration excessive de NPs (Zhang et al., 2018) conduit aux rendements faibles en hydrogène liés à l'impact inhibiteur des NPs (Pugazhendhi et al., 2019).

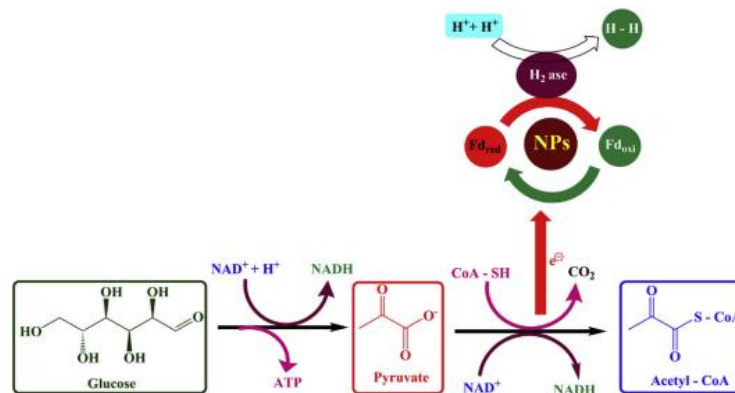


Figure 3.24 Mécanisme de production de biohydrogène par fermentation sombre en présence des nanoparticules inorganiques (Pugazhendhi et al., 2019).

III.B.5.3. Comparaison des effets de la présence des différents NPs dans le milieu de fermentation

En comparant les effets des différents NPs présents dans le milieu, le **tableau 3.10** illustre les valeurs optimales des concentrations ainsi que les taux d'amélioration. D'après ces résultats, les effets améliorant de la production peuvent être classés par ordre décroissant comme suit CuO, Fe₂O₃, AgO, Ag, Mn₂O₃ et MnO, ZnO, HgO.

Tableau 3.10 Effets de la présence des NPs sur les volumes cumulés maximales de biohydrogène en présence des nanomatériaux.

NPs	Taille (nm)	Concentration optimale (mg/L)	Durée de fermentation (jours)	Volume maximal cumulé produit (ml)	% d'amélioration	
					Après fermentation totale	Dans la même durée
/	/	0	30	59,96	-	-
Fe ₂ O ₃	145	1,5	8	270	357,627	2150
Mn ₂ O ₃ ; MnO	10-26,3	0,5	8	202	242,37	1453,84
ZnO	62,9	2	8	190	222,03	1361,53
HgO	/	0,5	9	49	-16,94	276,92
CuO	24,7	2,5	16	324	449,152	945,16
Ag	47,5	1,5	13	223	277,966	878,07
AgO	/	1	15	241	308,474	677,41

D'après le **tableau 3.10** et la **figure 3.25**, il a été observé que la présence des NPs a réduit la durée de fermentation avec des doses optimales variantes, les NPs de CuO ont été les plus petites et les plus efficaces à une concentration de 2,5 mg/L aussi l'ajout de 1,5 mg/L de NPs de Fe₂O₃ a donné lieu à une seconde amélioration de production avec une minimisation de la durée de fermentation de 30 à 8 jours, cet effet favorable a été due à la nature de ces NPs. Il a été aussi observé que les NPs de HgO ont un effet indésirable sur le BHP à cause à la nature

inhibitrice du mercure. Il est clairement conclu que l'effet de la présence des nanomatériaux dans le milieu de fermentation dépend de la taille, la nature et la dose des NPs ajoutées.

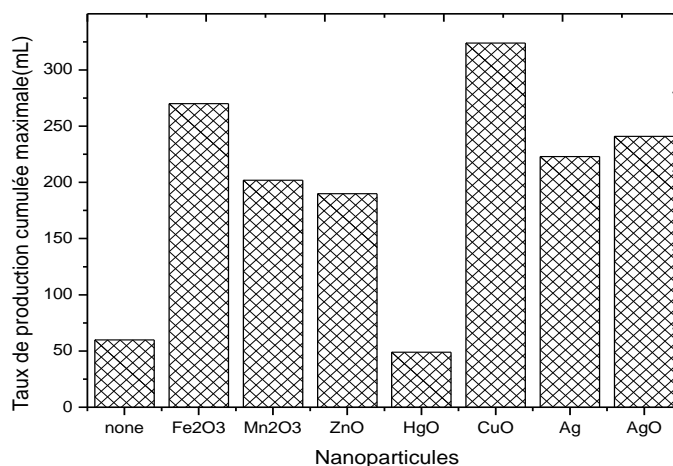


Figure 3.25 Histogramme comparatif entre les effets de la présence des différents NPs résultants le taux maximal de production de l'hydrogène.

III.B.5.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

Comme déjà cité la modélisation cinétique de la fermentation obscure fournit les informations essentielles sur la caractéristique théorique du rendement maximal de production de biohydrogène. Les données expérimentales ont été équipées de deux modèles cinétiques différents : le modèle de *Gompertz* et le modèle *logistique modifiés*, pour étudier les paramètres cinétiques tels que le temps d'adaptation des cultures productrice de l'hydrogène (λ), le potentiel maximal de rendement d'hydrogène (H_{\max}) et la cinétique maximale de production d'hydrogène (R_m).

Les résultats de modélisation résumés dans le **tableau 3.11** montre que les deux modèles décrivent la production de biohydrogène efficacement, ce qui ressort clairement de leur valeur de R^2 . Le potentiel de production d'hydrogène et la cinétique de production d'hydrogène ont été modifiés par la présence des nanoparticules dans le milieu de fermentation. Des taux maximaux de production d'hydrogène de 317,7056 mL H₂ et 314,7356 mL H₂ ont été obtenus par la présence des nanoparticules de cuivre dans les modèles *Gompertz* et *logistiques modifiés* respectivement.

De plus, les modèles prédisaient une réduction immense de la phase de latence (adaptation) de fermentation en raison de la catalyse forte de la croissance cellulaire et de dégradation de la matière organique. Remarquablement, le modèle de *Gompertz* a estimé un délai de phase d'adaptation plus court que celui du modèle *logistique modifié*. Généralement, le biohydrogène se produit entre la phase d'adaptation et la phase stationnaire de la courbe de croissance bactérienne.

Le rendement minimal théorique en hydrogène a été calculé dans la présence des NPs d'oxyde de mercure comme étant 51,35836 mL H₂ et 49,66236 mL H₂ par les modèles *Gompertz* et *Logistic modifiés*. La modélisation de la production fermentative de biohydrogène est une technique facile et efficace qui projette la technologie de fermentation de l'échelle de laboratoire à l'échelle industrielle pour répondre aux besoins croissants d'énergie.

Tableau 3.11 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du LS, en présence des différents NPs.

NPs	Concentration optimale	EXPERIMENTAL		Modèle de <i>Gompertz</i> modifié				Modèle de <i>Logistique</i> Modifié			
		H _{max}		H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²	H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²
		(mL H ₂)	(mLH ₂ /gVS)								
/	/	59,96	130,3478	69,9827	3,5722	5,2917	0,9672	63,4673	4,1393	6,9158	0,9820
Fe ₂ O ₃	1,5	270	647,1716	268,2720	83,9412	7,2884 E-35	0,9963	262,4619	173,1133	1,4274	0,9899
Mn ₂ O ₃ ; MnO	0,5	202	484,1802	171,9530	40,6218	1,3373 E-16	0,9882	170,4023	37,3019	0,6192	0,9744
ZnO	2	190	455,4171	186,9660	87,4736	5,4313 E- 37	0,9926	186,5872	89,3496	0,3117	0,9855
HgO	0,5	49	117,4497	51,3584	24,0284	3,4489E- 09	0,9726	49,6624	6,8914	0,3565	0,9658
CuO	2,5	324	776,6059	317,7056	90,0587	2,22E-37	0,9970	314,7356	113,9225	1,5055	0,9937
Ag	1,5	223	534,5158	219,5841	101,0798	5,205E-42	0,9953	219,2572	105,1294	1,5883	0,9966
AgO	1	241	577,6606	233,0555	129,7653	2,635E-54	0,9782	232,9464	123,7143	1,6992	0,9806

III.B.5.5. Application en mode discontinu

Plusieurs paramètres influencent le rendement de la production d'hydrogène par fermentation obscure tel que le temps de rétention hydraulique (HRT), la concentration de la charge organique (ORL), le type de fermenteur et le type d'inoculum.

Dans cette section, le lactosérum brut **LS** a été utilisé comme substrat de fermentation obscure en mode discontinu à 55°C et pH 5,5 dans un réacteur agité en continu CSTR, deux effets différents ont été étudiés :

- L'effet du temps du rétention hydraulique à un taux de charge organique constant ;
- L'effet du taux de charge organique à un temps de rétention hydraulique constant (la valeur optimale issue de l'expérience précédente).

Le fermenteur a été mis en marche en mode batch en absence de substrat et lorsque la production de biohydrogène a atteint son maximum (après 3 jours), le réacteur a été alimenté en discontinu.

III.B.5.5.1. Effet du temps du rétention hydraulique

Dans cette partie de l'étude, l'effet du HRT sur la production de l'hydrogène a été étudié en conservant le taux de DCO journalier constant de (10 g DCO/L/j), en variant la valeur du HRT de 1, 2 et 4 jours (**Figure 3.26**). Le fermenteur a été exploité pendant 168 heures (7 jours) avec une réduction du HRT de 4 jours à 1 jour à la fin de l'expérience. Une fois de plus, les fluctuations de tous les paramètres pH, Concentration cellulaire, pourcentage de réduction de DCO ont été suivies.

Le HRT initial a été fixé à 4 jours (96 h) où la production totale de biohydrogène variait entre 0,1 et 1,8 L (0,8 à 4,3 L/jour). Aucun méthane, n'a été détecté tout au long de l'étude. Le taux de production d'hydrogène variait entre 0,53 et 2,87 L H₂/L/j avec une valeur moyenne de 1,68 LH₂/L/j. L'efficacité d'élimination de la DCO était de 8 % à 48 % pendant cette période. Les valeurs du pH ont augmenté jusqu'à 6,7, ce qui est défavorable pour la production d'hydrogène (De Sá et al., 2013) et la concentration cellulaire a augmenté jusqu'à 7,3 g/L.

Le taux de production d'hydrogène a considérablement augmenté lorsque la valeur de HRT diminue à 2 jours (48 h) et 2,7 L à 144 h, l'intervalle de production d'hydrogène a été observé entre 4 et 7,2 L/jour, l'équivalent à 2,66 et 4,8 L H₂/L/j où la valeur moyenne était 3,73 L H₂/L/j. Les taux de conversion de la DCO des deux HRT ont fluctué entre 17,5 % et 60 %.

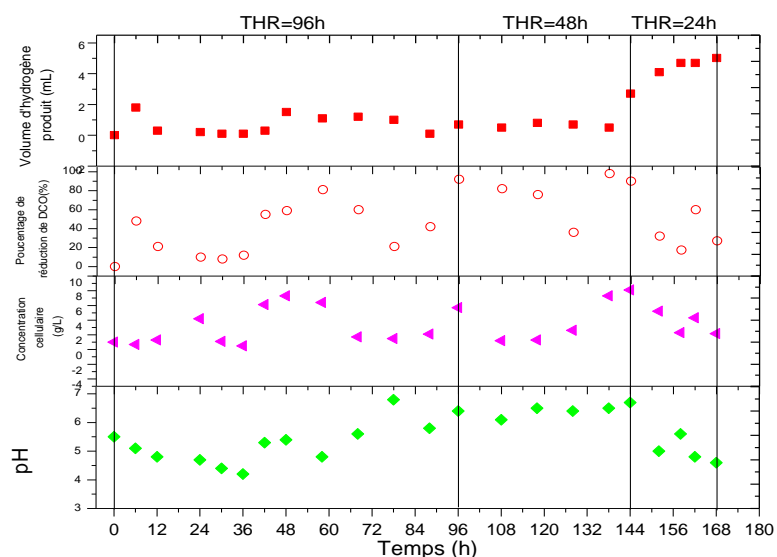


Figure 3.26 Effet du temps de rétention hydraulique sur la production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à pH 5,5 en mode discontinue en fonction du temps

Lorsque la valeur de HRT diminue à 1 jour (24 h), Le taux de production d'hydrogène a augmenté. La production totale de biohydrogène variait entre 3,7 et 5,1 L. Aucun méthane, n'a été détecté, la production d'hydrogène variait entre 3,7 et 5,1 L H₂/j, la production totale a été 22,7 L/j correspondant 12,53 L H₂/L/j. L'efficacité d'élimination de la DCO était de 56 % à 98 % pendant cette période.

Une légère concentration de méthane (1,6– 4,2 %) dans l'espace de tête a été observée de temps à autre, lorsque le pH du milieu dépasse la valeur de 6, l'espace de tête s'est estompé. Il a été spéculé que, bien que le temps de rétention hydraulique est court, les bactéries méthanogènes présentes sur les parois du bioréacteur auraient pu rester actives et produire du méthane (Yang et al., 2007).

D'après ces résultats, il est clair que le temps de rétention hydraulique optimal donnant lieu la meilleure production d'hydrogène est de 24 h, une étude similaire réalisée sur le même axe

en utilisant l'eau usée de l'industrie fromagère où le HRT a été varié de 12 à 24 h et les résultats ont montré que le HRT =24 h correspond à la valeur optimale (Ferraz et al., 2014).

Plusieurs études précédentes ont été concentré sur l'étude de l'effet du HRT sur la production de biohydrogène par fermentation obscure de différents substrats, les valeurs optimales n'ont pas été fixées à une valeur constante car ces derniers s'influencent par la nature du substrat, le volume et le type de fermenteur, la température de fermentation et la nature d'inoculum (Li & Fang, 2007).

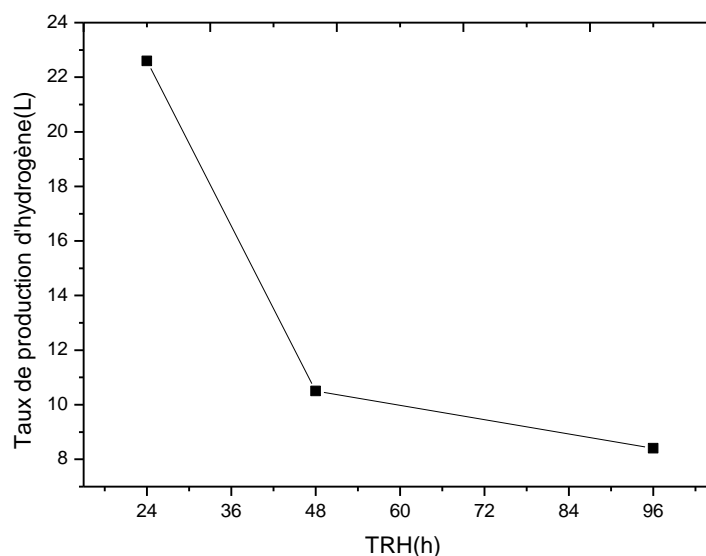


Figure 3.27 Effet du temps de rétention hydraulique sur le taux de production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à ph 5,5 en mode discontinue.

Le temps de rétention hydraulique étant la période pendant laquelle un volume spécifique de substrat doit être retenu dans le volume de travail du réacteur, il est en relation inverse avec le rapport substrat-inoculum (S/I). Par conséquent, un HRT trop long ou trop court entraînera des activités métaboliques défavorables des microorganismes. La production d'hydrogène a augmenté pour atteindre une valeur plus élevée avec l'augmentation du HRT lorsque les micro-organismes ont eu suffisamment de temps pour traiter les substrats (Ferraz et al., 2014). Toutefois, un déclin de la fermentation obscure a été constaté lorsque la HRT était trop long. Il a été attribué à un changement de flux métabolique qui pourrait se produire après

la transition d'un haut à un HRT plus court où plus de substrat est déplacé vers des produits finaux de réaction au lieu de croissance bactérienne ou de maintien, conduisant à une augmentation de rendement de la production de l'hydrogène (Kim et al., 2008).

Dans les procédés sans prétraitement des boues et sans ajustement du pH, par exemple lorsque les valeurs de ORL sont élevées et/ou que les HRT sont faibles, les activités méthanogènes seront inhibées en raison du taux acidogène plus élevé. Parallèlement, la baisse du pH (<5,0) due aux activités acidogènes favorisera le processus de génération d'hydrogène (Yang et al., 2007). D'autre part, la teneur en hydrogène du biogaz diminue en raison de l'augmentation de HRT due au détournement des réactions de production d'hydrogène. Toutefois, dans certains cas, la concentration faible du substrat a entraîné une augmentation du rendement lorsque le HRT était constant (Ntaikou et al., 2009).

Une valeur de HRT très faible entraîne le lavage du réacteur, ce qui signifie que tous les micro-organismes actifs s'échappent du réacteur. Au contraire, une valeur de HRT adéquate produit des rendements abondants en hydrogène. Ce paramètre est lié aux taux de croissance spécifiques des différents des bactéries productrices d'hydrogène. Un faible HRT a favorisé le lavage des méthanogènes, garantissant la survie des producteurs d'hydrogène. Par conséquent, un HRT faible et un pH acide léger (environ de 6) représentent la meilleure condition pour la production d'hydrogène ; au contraire, le modèle de fermentation de l'hydrogène peut passer à un modèle méthanogène lorsque le HRT augmente

Le choix du HRT optimal est clairement influencé par la complexité des molécules organiques : les substrats complexes nécessitent plus de HRT pour garantir un temps de décomposition suffisant. Dans les cuves CSTR, le traitement typique des déchets organiques solides appliqué par HRT est de l'ordre de 2 à 5 jours (Marie et al., 2022), alors qu'avec d'autres configurations de fermenteur ou des substrats facilement biodégradables, il est possible d'utiliser un HRT inférieur (jusqu'à quelques heures). Il n'y a toutefois pas de critère général pour déterminer le HRT, car la fermentation est également influencée par d'autres conditions limites. Quoi qu'il en soit, les données de la littérature montrent que le taux maximal de production d'hydrogène peut être obtenu pour les HRT <3 jours (Li & Fang, 2007).

III.B.5.5.2. Effet de la concentration de la charge organique

La production fermentative de H₂ a été réalisée avec différents taux de charge organique (ORL), le HRT est maintenu constant de 24 heures. Cette expérience a été la succession de l'expérience précédente (effet du HRT). Le fermenteur a été exploité pendant 72 h soit 3 jours avec OLR croissante de 10, 20 et 30 g DCO/L/jour (**figure 3.28**). Pendant la première période des expériences (d'une durée de 24 heures) au cours de laquelle l'OLR a été maintenu à 10 g DCO/L/jour, la production en H₂ a été de 3,7 à 5,1 L

Lorsque la valeur de l'OLR a été augmenté à 20 g DCO/L/j, la production de biohydrogène a augmenté considérablement à 5,1 à 7,3 L ou le pH était légèrement inférieur à 5, la DCO a diminué de 51 à 85 %. À un OLR supérieur (30 g DCO/L/j), un rendement relativement faible a été observé de 0,8 à 3,9 L H₂.

Une autre façon de sélectionner les micro-organismes producteurs d'hydrogène est de contrôler l'OLR. Si un HRT court permet le lavage de l'*Archéa* méthanogène, qui utilise l'hydrogène pour synthétiser le méthane, des valeurs OLR élevées contribuent à la surcharge du réacteur, avec une augmentation conséquente des AGV dans le milieu de fermentation qui réduisent le pH. Ces conditions inhibent les méthanogènes et l'hydrogène peut être accumulé ; par exemple Lee et al. (Lee et al., 2010) ont observé la variation de la production de H₂ en maintenant le THS à 4 jours et un pH à 6 dans un réacteur CSTR, augmentant l'OLR de 19 à 28 kg COD/m³ j. En conséquence, la production spécifique d'hydrogène de 20,2 à 38,8 L H₂/kg de DCO a été observé.

Les valeurs OLR typiques sont dans la gamme de 15 - 40 kg VS/m³ d alors que dans cette étude la valeur optimale est de 7,18 kg VS/m³ ; il est important de noter que, lorsque le contrôle du pH n'est pas assuré, OLR élevé ne conduit pas à une bonne production d'hydrogène spécifique. Au contraire, le contrôle du pH garantit que des concentrations élevées d'acides organiques pourraient avoir des effets néfastes sur la fermentation du H₂. En effet, dans ces conditions, les acides non dissociés agissent comme des séparateurs qui permettent aux protons d'entrer dans la cellule, en évitant leur accumulation dans le milieu de fermentation, ce qui génère habituellement un effondrement du gradient de pH à travers la membrane cellulaire (Marie et al., 2022).

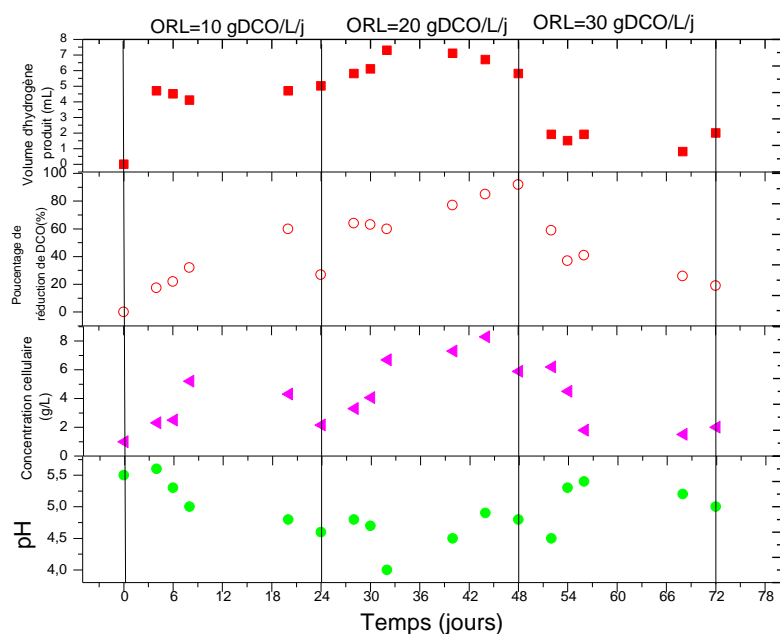


Figure 3.28 Effet de la concentration de la charge organique sur la production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à pH 5,5 en mode discontinue en fonction du temps

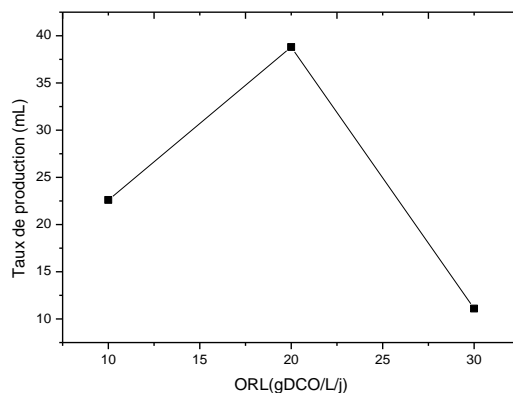


Figure 3.29 Effet du taux de charge organique sur le taux de production du biohydrogène par fermentation obscure en thermophile à pH 5,5 en mode discontinue.

Conclusion

Dans cette partie d'étude, il a été conclu que le **LS** comme substrat brut peut être valorisé en biohydrogène par fermentation obscure avec un taux de production de 143,72 mL/gVS, les

essaies d'amélioration du taux de production par prétraitements du substrat ont réussis avec une meilleure amélioration par le prétraitement enzymatique à 608,82 mL/gVS aussi la catalyse métallique par les NPs a donné lieu à une augmentation du rendement de production dont la valeur maximale a été obtenue en présence des NPs de CuO à un taux de production de 776,6059 mL/gVS, la seconde amélioration a été réalisée en présence des NPs d'oxyde de fer correspondante au rendement de 647,1716 mL/gVS.

D'après ces résultats aussi il est facile à appliquer le prétraitement en mode discontinu pour traiter des volumes immenses de **LS** rejetés, le temps de rétention hydraulique court rend la production de biohydrogène plus rapide.

Partie C : Production de biohydrogène par fermentation obscure du lactosérum en utilisant la culture pure : *Escherichia coli*.

Introduction

Dans cette partie, l'étude et l'optimisation de la production de biohydrogène par la souche anaérobie facultative : *Escherichia coli* par fermentation obscure du LS ont été réalisées en mésophile (37°C). L'effet du type de milieu de culture et la concentration de substrat ainsi que les essais d'amélioration de du potentiel de production de biohydrogène par prétraitements physicochimiques du substrat ont été évalués.

III.C.1. Croissance bactérienne d'*E. coli*

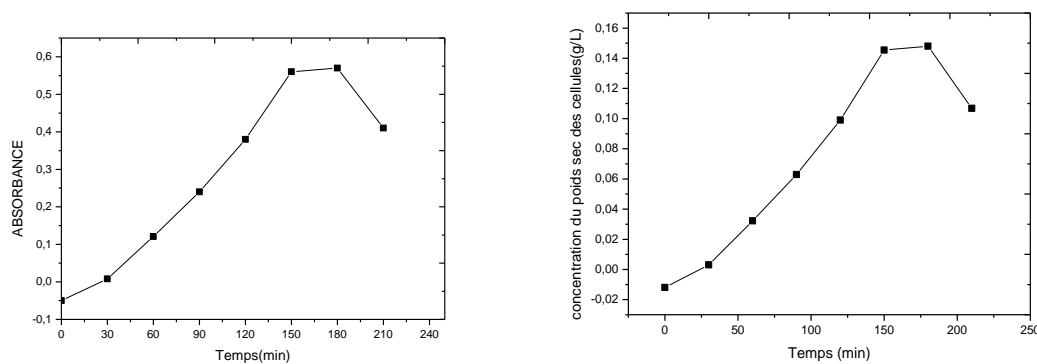


Figure 3.30 Courbe de croissance bactérienne de la souche *Escherichia coli*.

La culture a été réalisée par ensemencement sur du gélose nutritif ; après 24 h, une apparition des colonies a été observée. Une solution bactérienne a été préparée à partir d'une colonie dans de l'eau physiologique, 1 mL de cette suspension a été ajouté à 10 mL du milieu peptone ou la bactérie s'est développée aérobiquement en mésophile 37°C, à pH 7,0, la croissance cellulaire a été suivie par spectrophotométrie à 600 nm, les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 3.30**.

Comme montre la **figure 3.30**, l'allure de la courbe est similaire aux courbes de croissance bactérienne avec une phase d'adaptation, phase de croissance exponentielle ainsi que la phase de ralentissement et la phase de déclin. La culture a été prélevée après 30 min de croissance et considéré comme inoculum pour tous les essais réalisés dans cette partie.

III.C.2. Effet du type de milieu de culture et de concentration de la charge organique sur le potentiel biochimique de production de biohydrogène

La production de biohydrogène par fermentation obscure du lactosérum brut en utilisant la culture pure *E. Coli* a été réalisée en utilisant deux milieux de culture différents : ISP9 et l'eau physiologique en variant en même temps la concentration de la charge organique.

La **figure 3.31** représente les effets du type du milieu nutritif ainsi que l'effet de la charge organique traitée, comme montre cette dernière, en utilisant le milieu minimum ISP9, la meilleure production cumulée de 3 mL en H₂ a été obtenue par la concentration de la charge organique de 0,43g DCO/L, tandis que l'utilisation de l'eau physiologique, la production maximale cumulée a résulté une production de 15 mL par la même concentration en substrat. En présence de l'eau physiologique, le taux de charge organique de 0,5 g DCO/L a donné lieu à une production nulle par contre lorsque sa valeur égale 0,4 g DCO/L une production de 6 mL de H₂ a été observée ; ces résultats indiquent que la fermentation de substrat avec une dose faible génère une faible quantité d'hydrogène ce qui peut être expliqué par la faible quantité de substrat mais lorsque la dose de substrat soit excessive, elle peut inhiber la croissance bactérienne, c'est à dire la réduction de la production du biohydrogène (répression catabolique)(Poladyan et al., 2020).

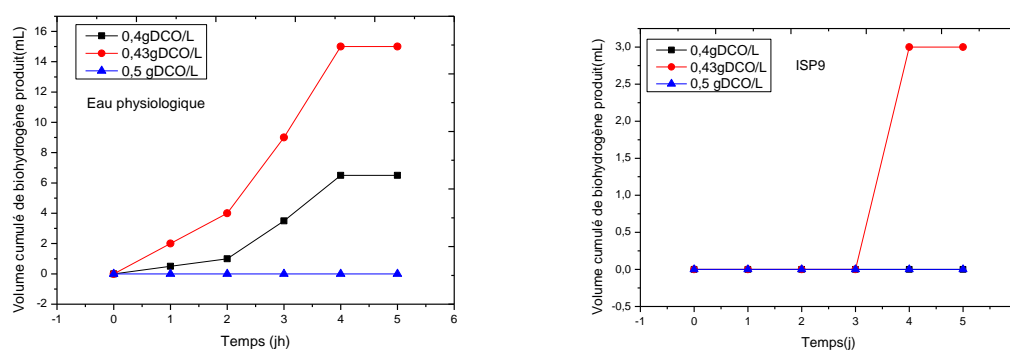


Figure 3.31 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS par la souche pure *E. coli* en fonction du type du milieu et en fonction de la charge organique.

III.C.3. Effet du pH

L'effet du pH initial sur production cumulée de biohydrogène par fermentation obscure de **LS** brut à une charge de 0,43 g DCO/L, en utilisant la culture pure *E. Coli* a été réalisée par l'eau physiologique comme milieu.

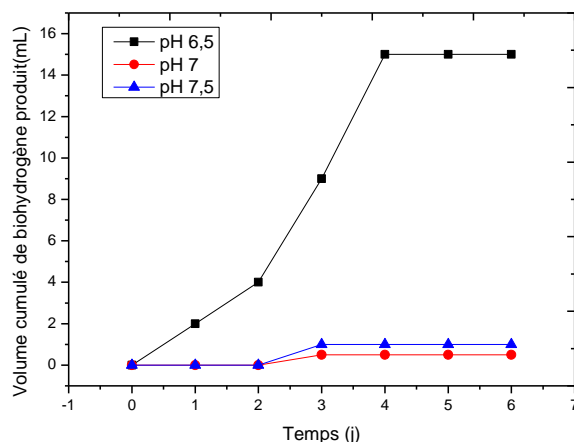


Figure 3.32 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du **LS** par la souche pure *E. coli* en fonction du temps et du pH à 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.

La valeur de pH initial a été variée dans la plage d'activité de la souche *E. coli* de [6,5 à 7,5], l'étude a montré que le pH optimal favorisant la production de biohydrogène est de 6,5.

Un résultat similaire a été obtenu par une étude réalisée sur la production de biohydrogène par fermentation obscure du glucose en utilisant la souche pure *E. coli* et en évaluant l'effet du pH initial, dans un intervalle de [5,5 à 7,5] où la valeur optimale était de 6,5 (Akroum-amrouche et al., 2014).

III.C.4. Effet du prétraitement du substrat sur le potentiel biochimique de production de biohydrogène

Afin d'améliorer la production fermentative de biohydrogène par *E. coli*, plusieurs essais de prétraitement physicochimique du substrat ont été réalisés.

Les prétraitements du substrat ont été réalisés par la même méthode citée dans la partie B (Voir page 99)

III.C.4.1. Effet du prétraitement thermique

Les effets des prétraitements thermiques ont été réalisés sur le **LS** brut aux températures (80, 90, 100°C). Dans la **figure 3.33**, les volumes cumulés de biohydrogène produits par fermentation du **LS** prétraité thermiquement aux températures (80, 90, 100°C) en fonction du temps sont illustrés. Ces traitements contribuent à améliorer la production de biohydrogène de 15 à 36 mL, et cela était du deuxième au 6^{ème} jour avec un traitement à 90 °C, au-delà du 7^{ème} jour un volume de 36 mL a été observé, ce qui correspond à un taux d'amélioration de 140%. La production d'hydrogène a été ce 18,5 et 17,5 mL par prétraitement de substrat à 100°C et 80°C respectivement.

Le traitement thermique à 90°C conduit à la meilleure production de biohydrogène car cette température semble idéale pour limiter l'hydrolyse sans destruction totale des molécules du **LS**, car dans le cas d'un prétraitement à 80°C, la température est suffisamment élevée, mais elle n'est pas suffisante pour permettre une hydrolyse complète du substrat afin d'obtenir une production maximale et, dans le cas d'un prétraitement à 100 °C, le substrat a subi une hydrolyse excessive qui a causé la destruction totale de ce dernier, la génération d'inhibiteurs de fermentation (Pagliaccia et al., 2016) et une évaporation de l'eau présent dans le **LS**, en tant que précurseur de la production du biohydrogène (Rodríguez-reyes et al., 2021).

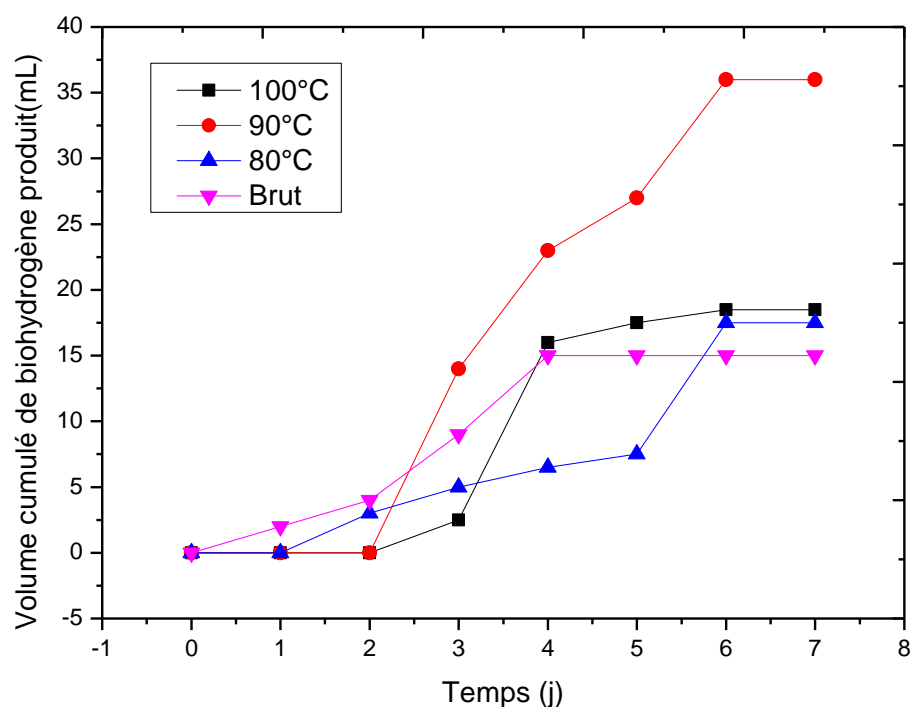


Figure 3.33 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS (prétraité thermiquement) par *E. Coli* en fonction de température de traitement à pH 6,5 et 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.

III.C.4.2. Effet du prétraitement ultrasonique

La **figure 3.34** montre l'évolution du volume de biohydrogène cumulé en fonction du temps et en fonction de la durée du prétraitement ultrasonique. Les résultats montrent que les 3 prétraitements améliorent la production de biohydrogène à un intervalle de 15,5 à 25,5 mL, où cette amélioration augmente proportionnellement avec la durée du traitement et varie entre 3,33 et 70 %. La production maximale d'hydrogène a été obtenue par le prétraitement ultrasonique de 20 minutes qui sert à diminuer le temps requis pour la phase d'hydrolyse du substrat et facilite la consommation de substrat pour la production d'hydrogène, alors qu'une durée moyenne de 10 min de prétraitement ultrasonique améliore le rendement en hydrogène par 26,66 % mais n'excédant pas l'amélioration due au même prétraitement pendant 20 minutes. Une durée de 10 minutes n'est pas suffisante à une hydrolyse totale des carbohydrates contrairement une durée très élevée de prétraitement ultrasonique qui peut

résulter à la production de certains composés inhibiteurs tels que les furanes et les composés phénoliques (Prabakar et coll., 2018). Le prétraitement ultrasonique du substrat pendant 5 minutes donne lieu à une production cumulée d'hydrogène presque similaire à celle réalisée par fermentation du substrat brut car la durée de 5 minutes est de très faible impact sur les macromolécules du substrat (carbohydrates, lipides, protéines, etc.).

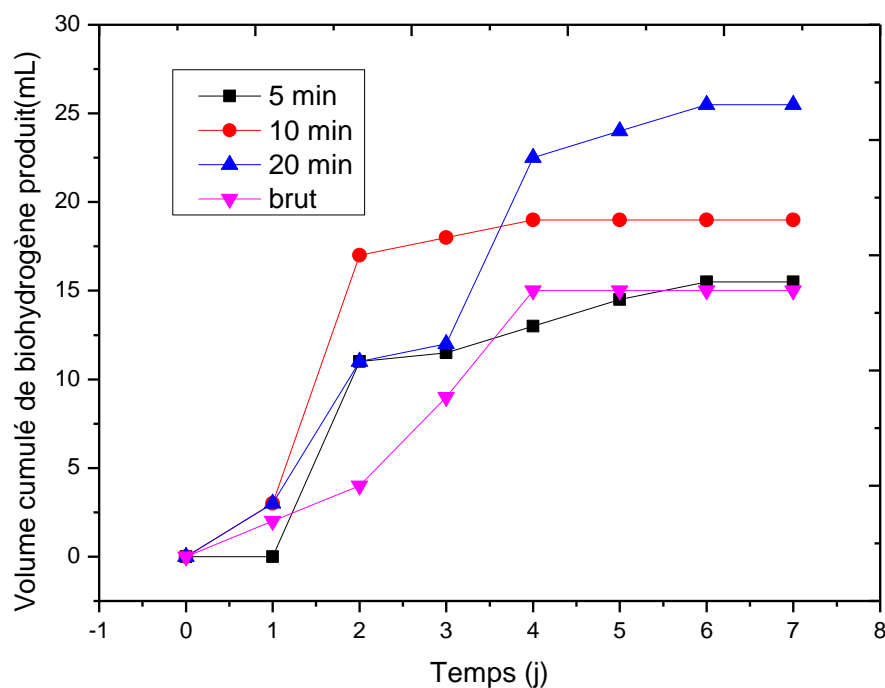


Figure 3.34 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS (prétraité par ultrasons) par *E. Coli* en fonction de durée de traitement à pH 6,5 et 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.

III.C.4.3. Effet du prétraitement chimique

La **figure 3.35** montre la production de biohydrogène et la production cumulée par fermentation des substrats prétraités par les deux traitements chimiques acide et basique en fonction du temps ; les résultats montrent une stabilisation du volume totale cumulé par le prétraitement acide de 14,5 mL après 6 jours, à la fin de la fermentation, la valeur maximale

de production obtenue par choc chimique à l'aide de la base faible $Ca(OH)_2$ a été de 2,5mL. Aucune étude dans le même axe n'a été publiée.

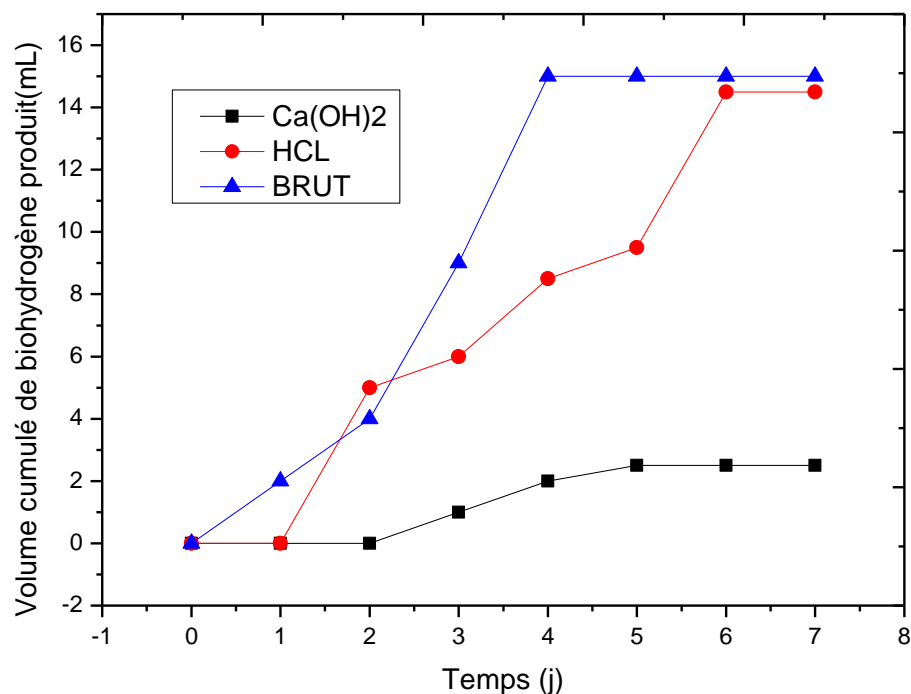


Figure 3.35 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du **LS** (prétraité chimiquement) par *E. Coli* en fonction de température de traitement à pH 6,5 et 0,43 DCO/L en présence de l'eau physiologique.

L'Histogramme comparatif représenté à la **figure 3.36** clarifie les différences des taux de production de biohydrogène en fonction du prétraitement, il est clair que le prétraitement par méthodes physiques sert à améliorer la production de biohydrogène par contre le prétraitement chimique a un effet indésirable sur ce derniers.

Il se peut que les prétraitements physiques n'influencent pas la culture comme les prétraitements chimique car ces derniers servent à introduire des produits chimiques inhibiteurs à la culture pure présente au sein du milieu de fermentation.

Tous les prétraitements thermiques (80, 90 et 100 °C) augmentent le potentiel biochimique de biohydrogène, mais celle de 90 °C semble être la température optimale qui a donné lieu à la valeur cumulative maximale du biohydrogène, aussi le prétraitement par ultrasons (5, 10 et 20 min), entraîne de légères augmentations du potentiel biochimique d'hydrogène du lactosérum. Pour les prétraitements chimiques, tous les alcalis et acides utilisés n'ont pas été efficaces.

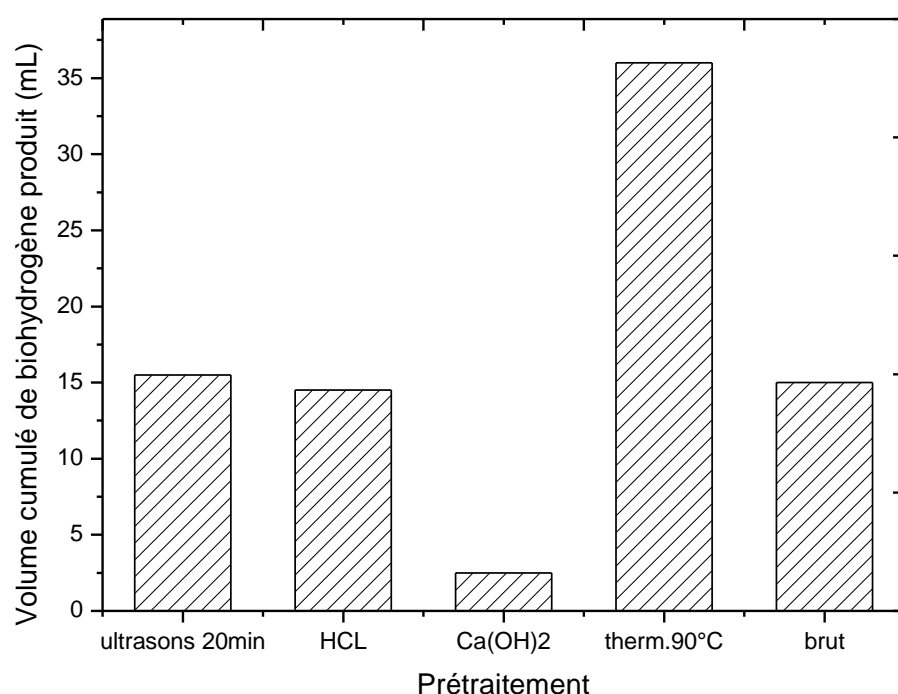


Figure 3.36 Histogramme comparatif des productions cumulées de biohydrogène par la fermentation obscure du **LS** prétraité (par différents prétraitements physicochimiques) par *E. Coli*.

III.C.5. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

La modélisation cinétique de la fermentation obscure du **LS** pour la production de biohydrogène fournit les informations essentielles sur la caractéristique théorique de rendement maximal de production de biohydrogène. Cette analyse est un outil impératif qui sert à étudier la mise à l'échelle de la fermentation par lots expérimentaux en production

industrielle (Wang & Wan, 2009). Les données expérimentales ont été équipées de deux modèles cinétiques différents : le modèle de *Gompertz modifié* et le modèle *logistique modifié*, pour étudier les paramètres cinétiques tels que le temps d'adaptation des cultures productrices de l'hydrogène (λ), le potentiel maximal de rendement d'hydrogène (H_{\max}) et le taux maximal de production d'hydrogène (R_m).

Tableau 3.12 Paramètres cinétiques pour la production de biohydrogène par fermentation obscure du LS brut et prétraités par chaleur en utilisant la culture pure *E.Coli*.

	EXPERIMENTAL		Modèle de <i>Gompertz</i> Modifié				Modèle de <i>Logistic</i> Modifié			
	H_{\max} (mLH ₂)	H_{\max} (mLH ₂ /gVS)	H_{\max} (mL H ₂)	R_m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R^2	H_{\max} (mL H ₂)	R_m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R^2
/	15	45,55	18,09374	5,1632	0,0903	0,9629	16,1994	5,9095	1,3765	0,9799
Thermique 90°C	36	109,32	37,3955	11,5031	0,0006	0,9796	35,8718	11,5455	2,0686	0,9654

Comme le montre le **tableau 3.12**, les deux modèles décrivent la production de biohydrogène efficacement, ce qui ressort clairement de leur valeur R^2 supérieur à 0,96. Le potentiel de production d'hydrogène et le taux de production d'hydrogène ont augmenté avec le prétraitement thermique à 90°C du substrat. Des taux maximaux de production d'hydrogène de 37,3955 mL et 35,8718 mL ont été obtenus. Pour les deux modèles *Gompertz* et *logistiques modifiés* respectivement. De plus, les modèles prédisaient une réduction drastique de la phase d'adaptation de fermentation en raison du prétraitement thermique à 90°C. Remarquablement, le modèle de *Gompertz* a estimé un délai de phase d'adaptation plus court que celui du modèle *logistique modifié*. En général, la production de biohydrogène se développe entre la phase d'adaptation et la phase stationnaire de la courbe de croissance bactérienne (Swathy et al., 2020). La modélisation de la production fermentative de biohydrogène n'est pas une technique difficile, par contre elle est efficace qui projette la technologie de fermentation de l'échelle de laboratoire à l'échelle industrielle pour répondre à la demande croissante d'énergie.

Conclusion

Les résultats de la partie D montre que la production de biohydrogène par souche pure *E.Coli* est applicable mais la productivité de cette culture pure reste faible devant autres souches cités dans la littérature comme la famille *Clostridium* (Lee et al., 2011) ; en revanche la fermentation par les cultures pures présente un inconvénient immense qui est l'assurance des conditions de stérilisation. La majorité des études réalisées pour produire le biohydrogène fermentative par culture pure ont cité comme substrat des solutions synthétiques de sucres simples, servant à comprendre les mécanismes biochimiques impliqués (Baeyens et al., 2020).

Partie D : Production de biohydrogène par fermentation obscure du Marc du café

Introduction

Le marc de café **MC** a été utilisé comme substrat dans cette partie pour la production de biohydrogène, les effets du rapport I/S et de la présence des ions métalliques sur le potentiel et la cinétique de production d'hydrogène ont été étudiés. Les résultats obtenus ont été modélisés par les modèles de *Gompertz* et *Logistique* modifiés.

L'inoculum utilisé est la culture mixte prétraitée thermiquement (**tableau 3.5, page 36**), c'est le même utilisé pour la production de biohydrogène par fermentation du **LS** (Partie B).

III.D.1. Caractérisation du substrat

Après collecte, la densité du marc de café a été mesurée à 0,704 (kg/L) ; les caractéristiques physico-chimiques du **MC** sont résumées dans le **tableau 3.13**.

Tableau 3.13 Caractéristiques physicochimiques de **MC**.

Paramètre	Avant traitement	Unit
pH	6.6	-
Alcalinité pH:6	100	mg CaCO ₃ /L
Alcalinité pH:4	520	mgCaCO ₃ /L
TS	389,89	g/kg
TVS	366,479	g/kg
TVS /TS	93,99	(%)
DCOT	61	mg O ₂ /L
DCOS	42	mg O ₂ /L
SCOD/TCOD	68	%
NTK	46,22	mg/g
AVT	2580	mg CaCO ₃ /L
AGV	1080	mgCaCO ₃ /L
Carbohydrates	460,646	g/L
Protéines	287,904	g/kg

D'après le tableau précédent, les caractéristiques indiquent que le **MC** est riche en matière organique biodégradable, ce qui favorise les processus biologiques ainsi que le pourcentage élevé de TVS / TS présente le potentiel éventuel du substrat pour sa valorisation en biogaz

(Alibardi & Cossu, 2015). Aussi le **MC** a un caractère légèrement acide à une concentration élevée de matière dégradable de 61 g/L de DCO et 460,646 g/L de sucres totaux et un pourcentage élevé de DCOS de à 68% favorisant la croissance microbienne ; aussi un pourcentage de TVS/TS : 93% montre la facilité de production de biogaz par fermentation (Silva et al., 2019). Plusieurs caractérisations du marc de café ont été réalisées, il a été observé que les résultats obtenus sont proche de la littérature (Online, 2015) (Kim et al., 2016)(Orfanoudaki et al., 2020).

III.D.2. Effet de I/S sur la production de Biohydrogène

La **figure 3.37** présente les résultats de la mesure des volumes cumulés de biohydrogène (A) et les volume produits (B) par fermentation obscure du **MC** en fonction du temps et des rapports I/S, la fermentation obscure étant réalisée à 55°C, à pH 5,5. Aucun méthane n'a été détecté dans le biogaz produit, à partir de la **figure 3.37 (A)**, la production de biohydrogène a commencé après 48 heures (2 jours) **figure 3.37 (B)**, cela s'explique par l'adaptation des micro-organismes de la culture mixte dans le milieu en synthétisant des enzymes adaptées au substrat pendant la phase d'adaptation.

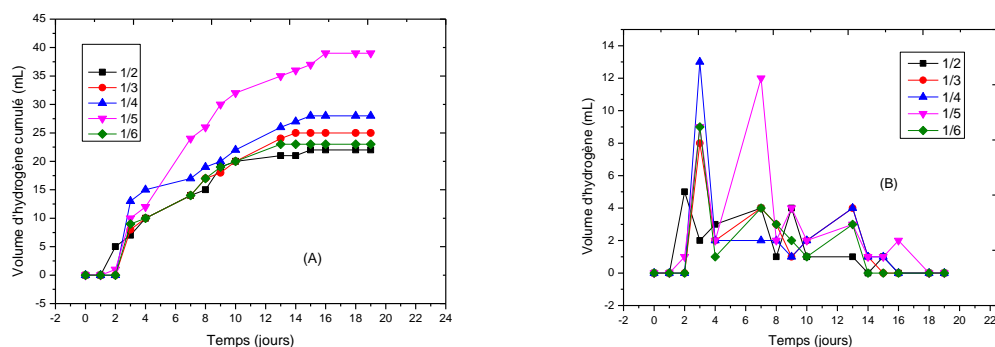


Figure 3.37 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du **MC** en fonction du temps à 55 °C, pH de 5,5 et en fonction des rapports I/S du café.

La production maximale de biohydrogène de 39 mL a été obtenue pour un rapport I/S de $1/5$ gVS/gVS après 16 jours de fermentation. Ensuite, l'hydrogène produit s'est arrêté après cette période de production en raison de l'épuisement du substrat dans le milieu de fermentation

et de l'accumulation d'acides volatils (Jones & Woods, 1986). Le rapport I/S = 1/5 gVS/gVS a résulté le meilleur rendement production en raison de la faible concentration initiale de l'inoculum et de la concentration élevée en substrat, ce qui signifie que l'augmentation de la quantité de substrat favorise la production d'hydrogène mais l'excès de substrat inhibe sa consommation par les bactéries. Le rapport I/S = 1/6 gVS/gVS conduit à une faible production d'hydrogène parce que les bactéries ne se sont pas adaptées au milieu ou elles ont été inhibées par les composés toxiques présents dans le substrat (Keskin et al., 2018). La fin de la phase d'adaptation qui représente la période du début de la production du biohydrogène a été observée après 2^{ème} jour de fermentation, ce qui est probablement due à la longue période requise par les bactéries pour la synthèse des enzymes responsables de la destruction totale des molécules de substrat et après cette phase, le volume de biohydrogène cumulé est mesuré. Les courbes de production cumulée de biohydrogène en fonction du temps (**figure 3.37 (A)**), sont similaires aux courbes de croissance microbienne avec des phases de latence, phases de croissance exponentielles et phases stationnaires.

III.D.3. Effet de la présence des ions métalliques sur la production d'H₂

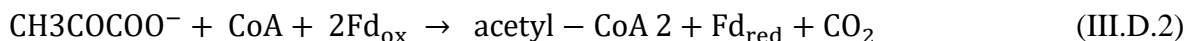
Les sels de métaux ont été ajoutés au milieu de fermentation afin d'évaluer leur effet inhibiteur sur l'activité microbienne, ce qui se résulte par la production d'hydrogène et la production cumulée en fonction du temps. Trois sels de métaux ont été présents *sulfates de fer*, *sulfates de cuivre* et *sulfates d'argent* avec des doses variant de 0,5 à 3 mg /L. La fermentation obscure a été réalisée par le rapport I/S de 1/5 gVS/ gVS, en thermophile 55°C à pH 5,5.

III.D.3.1. Effet de présence des ions Ferreux Fe²⁺ (sulfates de Fer)

D'après la **figure 3.38**, l'ajout des sulfates de ferreux entraîne une réduction minimale de la production de biohydrogène de 39 mL sans ions métalliques à 31 mL en présence de 1,5 mg/L après 15 et 7 jours respectivement, ce qui correspond un pourcentage d'abaissement de 20,51 %. Le rendement de production de biohydrogène est inversement proportionnel à la dose des sulfates de Fer, ce rendement diminue jusqu'à 11 mL en présence de 3 mg/L, ce qui est équivalent à une réduction de 71,79 %. D'après la **figure 3.39**, il est clair que la dose de 1,5 mg/L provoque la faible toxicité par les ions Fe²⁺ et les ions SO₄²⁻, une étude similaire

utilisant le sucrose comme substrat et les boues d'épuration comme inoculum pour la production de biohydrogène par FO, d'après les résultats obtenus la dose minimale de toxicité était 0,6 mg/L pour une production de 3,52 mol d'H₂ (Lin & Lay, 2005). Tandis qu'une autre étude réalisée par (Lee et al., 2009) qui ont signalé une diminution des activités d'hydrogénase au-dessus du seuil de concentration de 4,0 mg/L des ions Fe²⁺ ce qui réduit les rendements en bio-hydrogène. Aussi Srikanth et Venkata Mohan (Srikanth & Mohan, 2012) ont lié l'inhibition de la production biohydrogène de 100 mg/L des ions Fe²⁺, cette différence de dose toxique est due aux différences de substrat et de culture utilisés.

Malgré qu'une dose de 0,5 mg /L de chlorure de fer est présente et introduite dans la solution nutritive, et sa présence en de trace est nécessaire sous forme de ferrédoxines (ou protéines de fer-soufre) aide au transfert d'électrons pour l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA sous la voie du *Pfor* (*Pyruvate ferrédoxine oxidoreductase*) dans les processus de FO (Eq. (III-2)) avant de production d'hydrogène.



En outre, le fer est également une exigence importante pour la croissance bactérienne, pour la biosynthèse des enzymes (la formation des hydrogénases) qui sont responsables de la production de H₂ à partir de la réduction des protons dans le processus de FO (Bundhoo & Mohee, 2016).

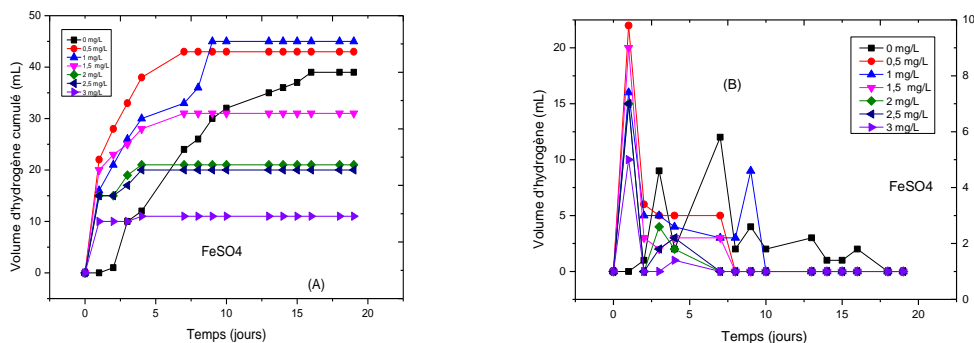


Figure 3.38 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du **MC** en fonction du temps et en fonction de la dose de sulfates de fer à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/5 gVS/gVS.

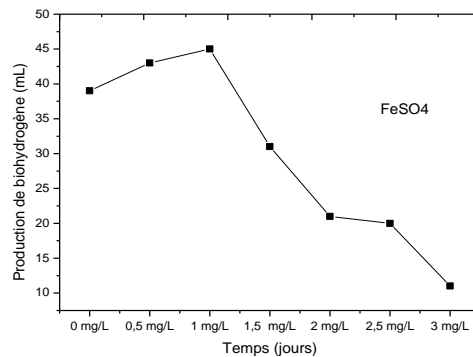


Figure 3.39 Evolution de taux de production de biohydrogène en fonction de la dose des sulfates de fer.

III.D.3.2. Effet de présence des ions de cuivre Cu²⁺(sulfates de cuivre)

D'après les **figures 3.40** et **3.41**, l'ajout des sulfates de cuivre entraîne une réduction de la production de biohydrogène de 39 mL à 21 mL en présence de 1 mg/L après 7 jours de fermentation, ce qui correspond un pourcentage d'abaissement de 46,15 %. Le rendement de production de biohydrogène augmente jusqu'à 46 mL en présence de 0,5 mg/L puis diminue progressivement avec l'augmentation de la dose des sulfates de cuivre, ce rendement diminue jusqu'à 4 mL en présence de 3 mg/L, l'équivalent de 89,74 %.

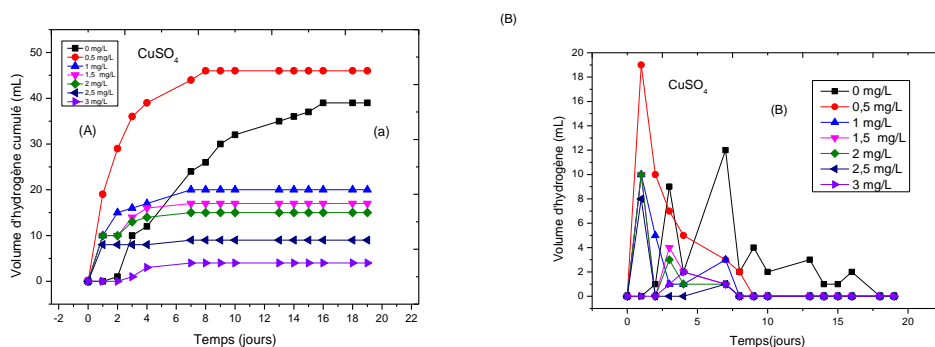


Figure 3.40 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du MC en fonction du temps et en fonction de la dose de sulfates de cuivre à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/5 gVS/gVS.

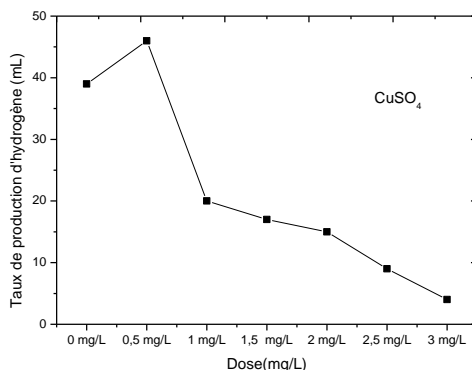


Figure 3.41 Evolution de taux de production de biohydrogène en fonction de la dose des sulfates de cuivre.

D'après ces résultats, il est clair que les ions cuivriques sont plus toxiques que les ions ferreux comme déjà cité dans une étude précédente pour produire de biohydrogène par fermentation obscure du glucose ou il a été conclu que la dose minimale de réduction du taux de production de H_2 de 200 mg/dcm^3 (Zheng & Yu, 2004). Une autre étude réalisée par (Li & Fang, 2007) a prouvé que la dose de 30 mg/L des ions cuivriques est la dose minimale de toxicité et il ont classé l'effet inhibiteur des plusieurs métaux lourds sur la production de biohydrogène par FO de la façon suivante : Cu (plus toxique) > Ni - Zn > Cr > Cd > Pb (Li & Fang, 2007).

III.D.3.3. Effet de présence des ions d'argent Ag^+ (sulfates d'argent)

D'après les **figures 3.42** et **3.43**, l'ajout des sulfates de fer entraîne une réduction de la production de biohydrogène de 39 mL à 20 mL en présence de $0,5 \text{ mg/L}$ après 7 jours de fermentation, ce qui correspond un pourcentage d'abaissement de $48,71 \%$. Le rendement de production de biohydrogène est inversement proportionnel à la dose des sulfates d'argent, ce rendement diminue jusqu'à 5 mL en présence de 3 mg/L de ces ions, ce qui est équivalent à $87,17 \%$.

Aucune étude n'a été trouvée sur l'effet indésirable des ions métalliques d'argent mais, les métaux lourds toxiques comme le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni) et le plomb (Pb) qui peuvent être présents dans les déchets solides industriels et municipaux perturbent et peuvent échouer les réacteurs anaérobies (Li & Fang, 2007).

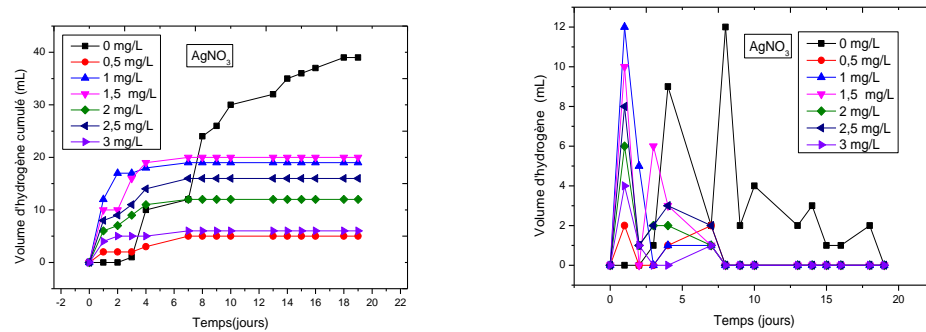


Figure 3.42 (A) Production cumulée de biohydrogène (B) Production de biohydrogène pendant la fermentation obscure du MC en fonction du temps et en fonction de la dose de sulfates d'argent à 55 °C, pH de 5,5 et I/S=1/5 gVS/gVS.

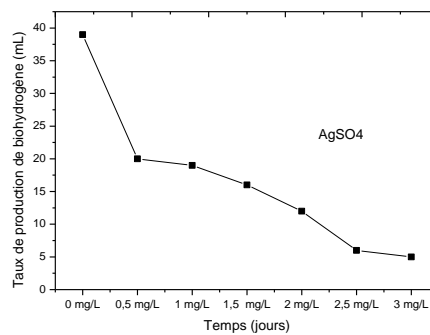


Figure 3.43 Evolution de taux de production de biohydrogène en fonction de la dose des sulfates d'argent.

Plus que la nature de ces ions métalliques étant des métaux lourds toxiques, il est reconnu depuis longtemps qu'une forte concentration de sulfate dans les eaux usées interfère avec les bactéries productrices de biogaz. Au cours des deux dernières décennies, le rôle des bactéries sulfato-réductrices (BSR) a été mieux défini, ce qui a été signalé à l'origine comme étant la toxicité des sulfates pour la bactéries productrice d'hydrogène est maintenant discuté comme étant la concurrence entre bactéries productrices d'hydrogène BH et les BSR pour l'hydrogène et l'acétate, ainsi que l'inhibition par le sulfure, produit de la réduction des sulfates (Mccartney & Oleszkiewicz, 1988).

Le **tableau 3.14** illustre une comparaison entre les effets indésirables des différents sels de

métaux, d'après ce tableau il est bien clair que les ions d'argent plus toxiques

Tableau 3.14 Comparaison de l'effet de la concentration minimale réductrice des sels métalliques sur le taux de production de biohydrogène.

Sel métalliques	Concentration minimale toxique(mg/L)	Durée de fermentation (jours)	Volume maximal cumulé produit (mL)	% de réduction
/	0	16	39	-
FeSO ₄	1,5	7	31	20,51
CuSO ₄	1	7	21	46,15
AgNO ₃	0,5	7	20	48,71

III.D.4. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

Les résultats de modélisation résumés dans le **tableau 3.15** montre que les deux modèles décrivent la production de biohydrogène efficacement, ce qui ressort clairement de leur valeur de R² supérieure à 0,9. Le potentiel de production d'hydrogène a été modifié par la présence des sels de métaux dans le milieu de fermentation.

Tableau 3.15 Paramètres cinétiques de la production de biohydrogène par fermentation obscure du MC, en présence de des sels de métaux.

Ions	Dose minimale toxique	EXPERIMENTAL		Modèle de <i>Gompertz</i> Modifié				Modèle de <i>Logistic</i> Modifié			
		H _{max} (mLH ₂)	(mLH ₂ /gVS)	H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²	H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²
/	0	39	282,6087	39,0464	4,3969	0,2146	0,9908	37,9578	4,5399	1,9487	0,9819
FeSO ₄	1,5	31	224,6377	30,4665	13,5375	8,8E-06	0,9346	30,2954	12,8116	0,2028	0,9024
CuSO ₄	1	21	152,1739	20,9988	4,9248	0,0581	0,9250	20,9707	4,3124	0,7609	0,9072
AgNO ₃	0,5	20	144,9275	20,0493	5,7394	0,0110	0,9527	20,0169	5,3535	0,1976	0,9434

D'après ces résultats, la durée de la phase d'adaptation a été réduite en présence de tous les sels de métaux, la vitesse de production maximale a augmenté progressivement ou la valeur la plus élevée a été observée en présence de sulfate de fer. Les valeurs de coefficient de

corrélations R^2 sont plus faibles par rapport à celle en absence des sels de métaux due au fonctionnement perturbé par la toxicité des ions inhibiteurs.

Conclusion

Dans cette partie d'étude, le marc de café a été un substrat valorisable par fermentation obscure à un taux de production de 282, 17 mL H₂/gVS, il a été aussi prouvé que la présence des ions de métaux lourds Fe²⁺, Cu²⁺ et Ag⁺ ainsi que les sulfates améliore la production de biohydrogène par fermentation obscure du MC mais à un seuil observé, alors que l'excès de doses de ces ions défavorisent l'activité des micro-organismes productrices d'hydrogène, les toxicités ont été classées par ordre décroissant Ag > Cu > Fe. L'analyse cinétique par les modèles de *Gompertz* et *Logistic* Modifiés a bien déterminé l'évolution de la production cumulée en hydrogène.

Partie E : Production de biohydrogène par co-fermentation obscure du Lactosérum et du marc de café

Introduction

Le *marc de café* (MC) et le *lacto-sérum* (LS) ont été utilisés comme substrats de la co-fermentation obscure et production de biohydrogène, l'effet du rapport LS/MC (L/C) (gVS/gVS) a été évalué. La co-fermentation a été réalisée en traitant une concentration constante de 5 gVS/L sans ajustement de pH et en absence des solutions nutritives et tampons. Les résultats obtenus ont été modélisés par les modèles de *Gompertz* et *Logistique* modifiés.

III.E.1. Effet du rapport L/C sur la production de biohydrogène

La **figure 3.44** présente les résultats de la mesure des volumes cumulés de biohydrogène produits (A) et les volumes produits (B) par fermentation obscure des co-substrats MC+LS en fonction du temps et en fonction des rapports L/C, la co-fermentation obscure étant réalisée à 55°C, à pH 5,5. À partir de la **figure 3.44** (B), la production de biohydrogène a commencé après 24 heures (1 jour), cela s'explique par l'adaptation rapide des micro-organismes de la culture mixte dans le milieu de fermentation en synthétisant des enzymes responsables de l'hydrolyse des substrats. La fin de la production de biohydrogène a été observée après 14 jours de co-fermentation due à l'appauvrissement des substrats. Le biogaz produit a été essentiellement constitué de H₂ et CO₂ et aucun méthane n'a été détecté. Il a été remarqué que le rapport L:C de 80:20 résulte la maximale production cumulée de 156 mL de biohydrogène après 14 jours de co-fermentation tandis que les deux productions minimales ont été mesurées en fermentation des substrats bruts c'est-à-dire lorsque L:C égal 00 :100 et 100:00 les taux de production ont été 52 et 46 mL respectivement.

la production maximale de 100 mL H₂ a été signalée au 12 jours de co-fermentation avec le rapport L:C de 80:20 (**figure 3.44** (B)) ; par contre la co-fermentation par les autres rapports L/C a donné lieu au volumes allant jusqu'à 31 mL. Ce qui indique que le rapport L/C optimal de co-fermentation a été de 80 :20 c'est-à-dire 80% LS mélangé avec 20 % de MC.

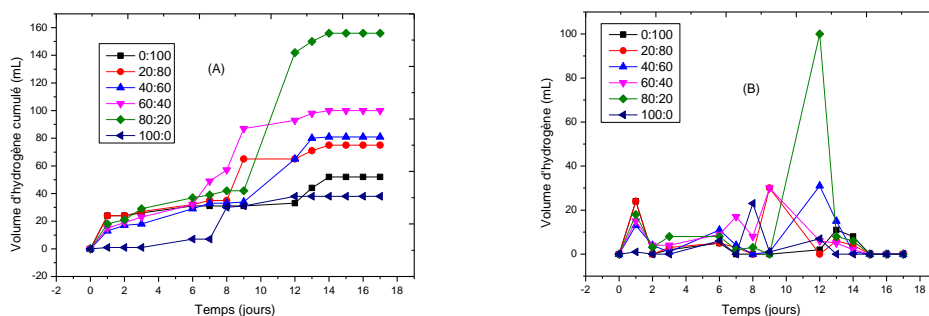


Figure 3.44 Effet du rapport L/C sur la production d'hydrogène cumulée (A) et (B) la production en fonction du temps.

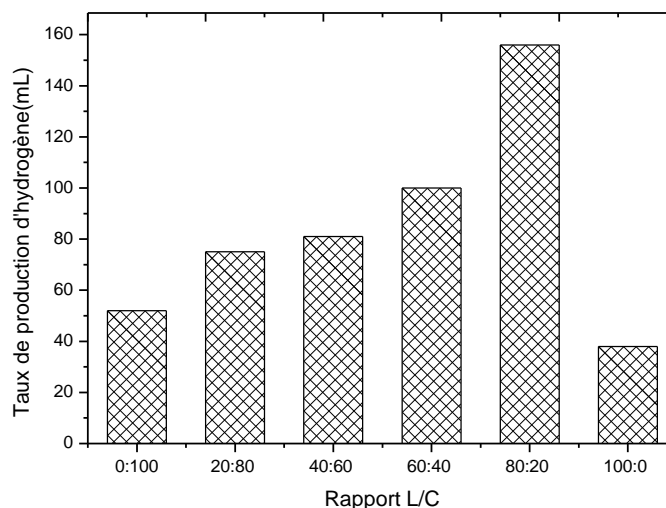


Figure 3.45 Histogramme comparatif des taux de production de biohydrogène par fermentation obscure du LS et MC en fonction du rapport L/C.

D'après ces résultats la co-fermentation du couple **LS** et **MC** à 80% en **LS** a résulté une production maximale relative de 474,6269 mL/gVS face à 155,2239 et mL/gVS et 137,3134 mL/gVS par fermentation du **MC** et **LS** bruts respectivement, cette amélioration était prévisible grâce aux caractéristiques physicochimiques complémentaires des deux substrats (voir tableau 3.6 page 97 et tableau 3.13 page 146), malgré que le pH initial n'ait pas été ajusté et sa valeur était comprise entre 4 à 6 ; l'alcalinité élevée du **MC** a amélioré le pouvoir tampon dans le milieu de co-fermentation aussi le taux élevé d'azote total kjeldhal du marc

de café de 46,22 mg/g (c'est le cas de la majorité des substrat d'origine végétale) ce qui compense le manque d'azote présent dans le **LS**.

Comme déjà cité dans la partie bibliographique la co-fermentation améliore le rendement en bioH₂ en minimisant les effets inhibiteurs présents dans les substrats et en améliorant la capacité tampon du substrat aussi en fournissant les éléments nutritifs manquants ou insuffisamment présents et le réglage du rapport carbone/azote (C/N) des substrats (Luostarinen et al., 2009)(Wang et al., 2011).

III.E.2. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

Les résultats de modélisation résumés dans le **tableau 3.16** montre que les deux modèles décrivent la production de biohydrogène efficacement, ce qui ressort clairement de leurs valeurs des coefficients R² supérieures à 0,9. Le potentiel de production d'hydrogène a été modifié par l'amélioration de caractéristiques physicochimiques par mélange des deux substrats.

Tableau 3.16 Paramètres cinétiques de la production de biohydrogène par co-fermentation obscure du **LS** et **MC**.

L/C	EXPERIMEN TAL mL H ₂	EXPERIMEN TAL mL H ₂ /gVS	Modèle de <i>Gompertz Modifié</i>				Modèle de <i>Logistique Modifié</i>			
			H _{max} ^a (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²	H _{max} (mL H ₂)	R _m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R ²
80:20	156	465,6716	180,2910	20,7784	2,98E-07	0,9219	170,8104	20,3115	5,6264	0,9450

Conclusion

La co-fermentation de **LC** et **MC** a résulté une amélioration de la production de biohydrogène de 474,62 mL/gVS ce qui correspond à un pourcentage élevé d'amélioration, tandis que la fermentation du **LS** brut a généré un volume 155,2239 mL/gVS et celle du **MC** a résulté 137,31 mL/gVS. D'après ces résultats, la co-fermentation est une voie promotrice d'amélioration de production de biohydrogène en valorisant plus d'un substrat sans ajustement de pH et sans ajout des solutions nutritive et tampon.

Les modèles de de *Gompertz* et *Logistique Modifiés* ont bien décrit la cinétique de production de biohydrogène par co-fermentation obscure du **LS** et **MC**.

Partie F : Production de biohydrogène par fermentation obscure de pelures de pomme de terre

Introduction

Dans cette partie, les pelures de pommes de terre **PPT** ont été utilisées comme substrat pour la production de biohydrogène par fermentation obscure en thermophile 55°C et à pH 5.5, l'effet du rapport I/S sur le potentiel biochimique et la cinétique de production d'hydrogène a été étudié. Aussi l'effet de l'hydrolyse enzymatique par cellulase, amylase et leurs mélange équivalent volumique a été évalué en utilisant le rapport I/S optimal conclu précédemment. Les résultats obtenus ont été modélisés par les modèles de *Gompertz* et *Logistique* modifiés.

L'inoculum utilisée est le même utilisé pour la production de biohydrogène par fermentation du **LS** et **MC** (Parties B, D et E), sa caractérisation est représentée au (**tableau 3.5 page 96**).

III.F.1. Caractérisation du substrat

Les caractéristiques physico-chimiques des pelures de pommes de terre sont représentées dans le **tableau 3.17**, plusieurs études antérieures ont été concentré sur la caractérisation et la valorisation de ce déchet et les valeurs obtenues de la caractérisation des **PPT** ont été proches de celles mesurées dans les études de (Liang & Mcdonald, 2015) et (Evaluation, 2019).

Tableau 3.17 Caractéristiques physicochimiques des **PPT**.

Paramètre	Avant traitement	Unit
Ph	7.43	-
Alcalinité pH:6	-	mg CaCO ₃ /L
Alcalinité pH:4	-	mgCaCO ₃ /L
TS	140,49	g/kg
TVS	116.97	g/kg
TVS /TS	83,25	(%)
DCOT	128	mg O ₂ /L
DCOS	115,6	mg O ₂ /L
DCOS/DCOT	90,31	%
DBO5	92,5	mg O ₂ /L
NTK	26,3	mg/g
Carbohydrates	24.1	g/L
Protéines	163,52	g/kg

Ces valeurs caractéristiques indiquent que les **PPT** sont riches en matière organique biodégradable ce qui favorise leur traitement par processus biologiques, aussi les

pourcentages élevés de TVS/TS et DCOS/DCOT présentent la possibilité de valorisation de ce substrat en biogaz (Parthiba Karthikeyan et al., 2018).

III.F.2. Effet de I/S sur la production d'hydrogène

La **figure 3.46** représente les résultats de la mesure des volumes cumulés de biohydrogène produit (A) ainsi que la production (B) de biohydrogène par fermentation obscure des **PPT** en fonction du temps et en fonction des rapports I/S. D'après cette **figure**, la production de biohydrogène a commencé après 48 heures due à l'adaptation des micro-organismes au milieu de culture en synthétisant des enzymes adaptées au substrat pendant la phase de latence. Par exemple, certaines souches de *Clostridium butyricum* et de *Clostridium acetobutylicum* produisent des amylases responsables à la dégradation l'amidon contenu dans plusieurs déchets agricoles (Zagrodnik et Laniecki, 2017).

D'après la **figure 3.46 (A)**, la production cumulée maximale de 131,5 mL a été obtenue par le rapport I/S de 1/6 gVS/gVS et la durée de production était 33 jours tandis que la production cumulée minimale a été 27 mL remarquée par le rapport I/S de 1/4 gVS/gVS après 33 jours de fermentation. Il a été aussi observé que la fermentation obscure en variant le rapport I/S de 1/2 à 1/6 a généré (par tous les rapport) un biogaz constitué de H₂ et CO₂ et exempt de CH₄ et la production s'est arrêtée au 33^{ème} jour de fermentation en raison de l'épuisement du milieu de fermentation et de l'accumulation d'acides gras volatils dans le milieu (Jones et Woods, 1986).

Un rapport I/S le 1/6 gVS/gVS reflète une faible concentration initiale de l'inoculum et une concentration élevée du substrat aussi a une meilleure production mesurée de biohydrogène de 47 mL a été obtenue par ce rapport I/S de 1/6 gVS/gVS à t= 24 jours probablement due à la longue période requise par les bactéries jusqu'à la destruction des molécules de substrat et la fermentation accélérée donnant un volume de biohydrogène maximum.

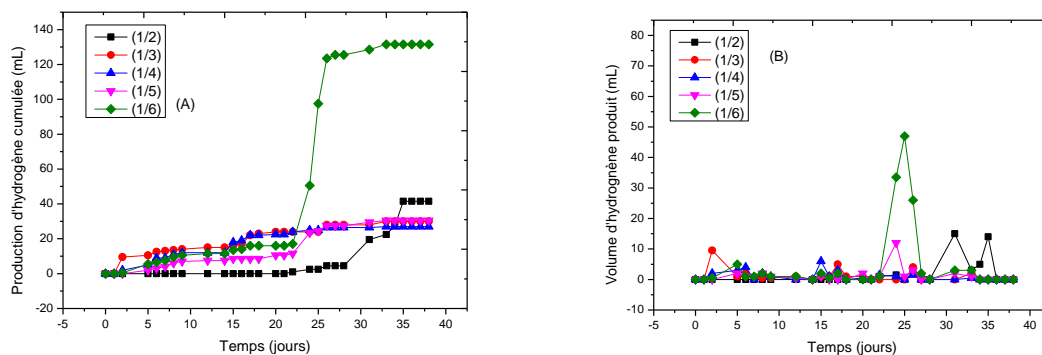


Figure 3.46 Production cumulée (A) et production (B) de biohydrogène pendant la fermentation obscure des PPT en fonction du temps et du rapport I/S à 55 °C et du pH 5,5.

III.F.2. Effet de prétraitement biologique (*hydrolyse enzymatique*)

Le prétraitement enzymatique a été utilisé pour maximiser la concentration de glucides solubles (sucres) dans les substrats afin d'être plus accessibles aux micro-organismes, ce qui implique une diminution de la phase d'hydrolyse réalisée par ces derniers résultant l'amélioration de la production d'hydrogène. Dans cette étude, deux enzymes ont été utilisées pour prétraiter les déchets de pommes de terre : α -Amylase et la Cellulase ainsi que le mélange équivolumique de ces deux enzymes.

L'évolution du taux de carbohydrates pendant l'hydrolyse enzymatique en fonction de la nature de l'enzyme et en fonction du temps est représentée à la **figure 3.47**, il a été observé que le prétraitement avec l' α -Amylase a réussi à dégrader le taux de carbohydrates de 24,1 g/L à 53,47 g/L après 3 heures de contact ce qui correspond à la meilleur décomposition des macromolécules de sucres tandis que l'hydrolyse enzymatique par la cellulase ou le mélange des deux enzymes a résulté deux augmentations instantanées à 48,25 et 48,75 g/L respectivement puis une diminution de ce taux. La concentration maximale de glucides a été atteinte après 3h d'hydrolyse par α -Amylase correspond à une amélioration de concentration de sucres réducteurs par un pourcentage de 121,86%. À mesure que l'hydrolyse progresse au-dessus de 3h, la concentration de glucides a diminué de façon spectaculaire pour toutes les enzymes testées, cette diminution de taux de sucres observé a été résulté de la consommation de cette source de carbone par l'enzyme même (Quéméneur, Bittel, et al.,

2012), où Quéméneur et al. (2012) ont également observé une diminution de la concentration en glucides pendant le prétraitement enzymatique de la paille de blé. Les sucres simples issues de la décomposition sont immédiatement utilisés comme source de carbone par les microorganismes de substrat natifs pour leur croissance. Cependant, une étape de stérilisation du substrat peut être nécessaire pour éviter la dégradation immédiate des glucides par les bactéries indigènes.

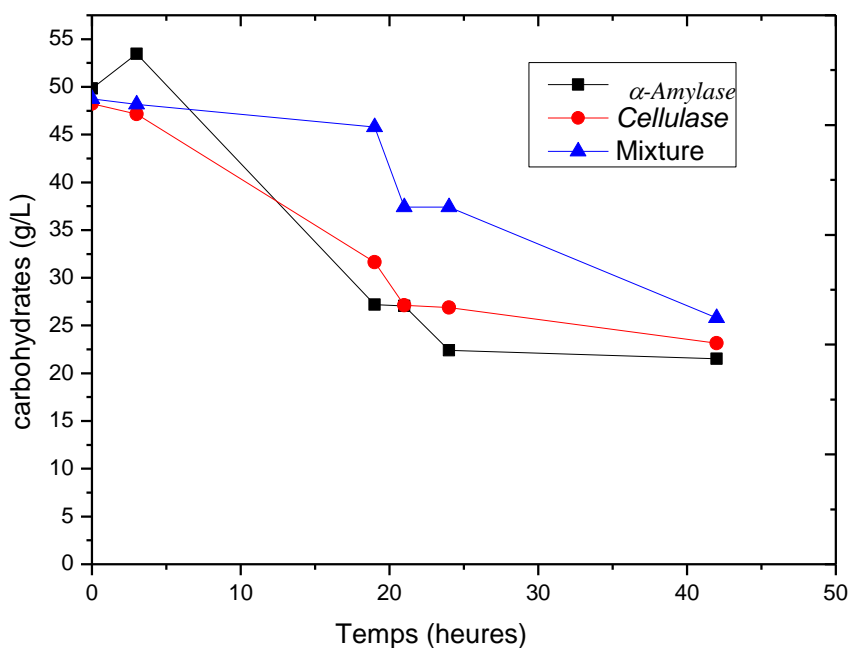


Figure 3.47 Taux de sucres libérés par hydrolyse enzymatique des déchets de **PPT** à 37 °C et pH 6 en utilisant *α-Amylase*, *Cellulase* Amylase, *Cellulase* et leur mélange.

Le **tableau 3.18** explique les différentes valeurs conclues après hydrolyse enzymatique des **PPT** dont les taux de sucres maximaux obtenus, et les durées d'obtention de ces taux ainsi que les pourcentages de dégradation correspondants. Les résultats ont confirmé l'efficacité et la capacité du prétraitement enzymatique à rendre les substrats complexes plus assimilables aux micro-organismes producteurs d'hydrogène. *L'α-Amylase* a été sélectionnée pour sa grande capacité à décomposer les sucres complexes contenus dans les

pelures de pommes de terre en sucres simples dans un temps d'hydrolyse optimal de 3 h. Ce système enzymatique convertit efficacement les polymères d'amidon en glucides simples.

Tableau 3.18 Taux de sucres libérés par hydrolyse enzymatique des déchets des **PPT** à 37 °C et pH 6 en utilisant α -Amylase, Cellulase Amylase, Cellulase et leur mélange.

Enzymes	Taux de sucres maximal (g/L)	Durée (h)	Pourcentage de dégradation (%)
α -Amylase	53,47	3	121,86
Cellulase	48,25	0	100
α -Amylase +Cellulase	48,75	0	102,28

- Effet du prétraitement par α -Amylase sur la production de biohydrogène

La fermentation obscure des **PPT** a été réalisée après hydrolyse enzymatique par α -Amylase en utilisant le rapport optimal I/S de 1/6 gVS/ gVS à pH 5,5 et à T=55°C. La **figure 3.48** présente la production cumulée (A) et la production (B) de biohydrogène avec et sans prétraitement enzymatique en fonction du temps. Selon cette **figure**, la production d'hydrogène a augmenté jusqu'à un volume cumulatif total de 1088 mL après 16 jours de fermentation au lieu de 131,5 mL après 33 jours de fermentation obscure des **PPT** non traitées, cette augmentation de production de H₂ est relative à la consommation de sucres simples présents en plus (comme source de carbone) par les bactéries productrices d'hydrogène et plus particulièrement *Clostridium sporogenes* (Kim et coll., 2009).

D'après la **figure 3.48** (A), En comparant les résultats avec ceux obtenus sans prétraitement enzymatique, il a été constaté qu'après 16 jours de production, il n'y avait que 14 mL d'hydrogène produit sans prétraitement enregistrant une amélioration d'environ 78 fois pendant la même période.

D'après la **figure 3.48** (B) la production de l'hydrogène a été très élevée dans les dix premiers jours, alors que la fermentation du substrat non traité n' a pas encore généré un volume élevé de biohydrogène jusqu'au 24^{ème} jour de fermentation, il est clair que ce prétraitement a

amélioré la production de biohydrogène et a réduit la durée du procédé de fermentation, ces observations sont similaires aux résultats obtenus par (Han et al., 2017).

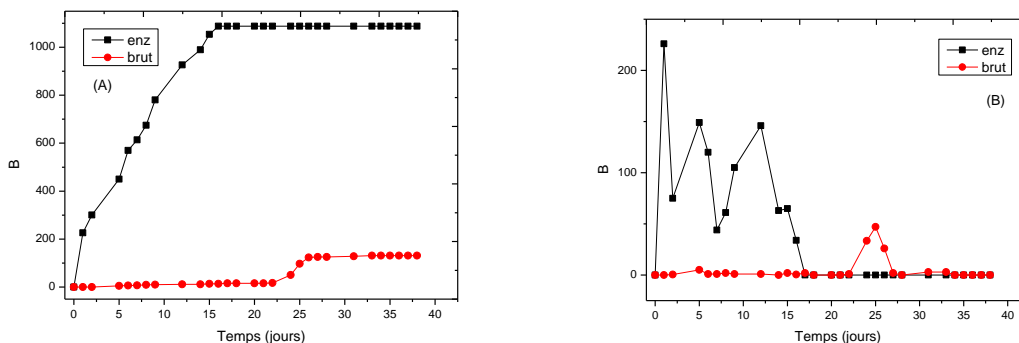


Figure 3.48 Production cumulée de biohydrogène pendant la fermentation obscure du LS en fonction du temps à 55 °C et pH 5,5 sans et avec prétraitement par α -Amylase : I/S=1/6 gVS/gVS.

À la fin de la fermentation, le digestat et le surnageant ont été analysés et le **tableau 3.19** représente les principales caractéristiques des deux phases obtenues après une fermentation obscure par prétraitement enzymatique α -Amylase en utilisant le rapport I/S=1/6 gVS /gVS. Les résultats obtenus après le traitement montrent que la valeur du pH a été réduite en raison de l'accumulation des résidus organiques (Dogan et al., 2009) et de la production d'acides gras volatils et de CO₂ (Jones et Woods, 1986).

La concentration cellulaire du digestat obtenue a augmenté à la fin de la production, due à la croissance bactérienne (les bactéries se sont bien adaptées aux conditions environnementales en raison de la présence de nutriments nécessaires à leur énergie et à leur synthèse cellulaire). Le taux de glucides a été considérablement réduit parce qu'il a été utilisé comme source de carbone et d'énergie par les bactéries présentes dans le milieu.

D'autre part, une faible quantité de glucides a été présente parce que la fermentation se poursuivait toujours à un cinétique de production réduite dans la phase stationnaire qui avait lieu après le 15^{ème} jour de fermentation, la valeur de la DCO a diminué après la fermentation mais il existe toujours une quantité présente, ce qui peut s'expliquer par la quantité de **PPT** non traitées, ou par la présence de matière minérale non oxydables par voie biologique (Arikan et al., 2020), cette diminution est due à l'oxydation de la matière organique présente dans le milieu par les bactéries. La forte concentration de protéines dans le digestat s'explique

par la présence de cellules microbiennes, et différents composants protéiques tels que les enzymes, les hormones, les antibiotiques, etc.)(Swathy et al., 2020). D'autre part, la quantité détectée dans le surnageant combine les protéines solubles libérées ou dégradées par les bactéries, D'après (Quéméneur, Bittel, et al., 2012) la fraction protéique présente es protéines extracellulaires solubles (Quéméneur, Bittel, et al., 2012).

Tableau 3.19 Caractérisation du surnageant et digestat obtenus après fermentation obscure du substrat prétraité par hydrolyse enzymatique en utilisant α -Amylase.

Paramètre	valeurs
Surnageant	
pH	4.94
Alcalinité (mgCaCO ₃ /L)	2800
AVT (mgCaCO ₃ /L)	7230
VFA (mgCaCO ₃ /L)	2800
DCOT (g/L)	20.3
Carbohydrates (mg/L)	16.13
Proteins (g/L)	40.23
Digestat	
Concentration cellulaire (g/L)	36.44
Protéines (g/L)	86.65

III.F.3. Modélisation de la cinétique de production d'hydrogène

Les paramètres cinétiques du processus de fermentation obscure sont utilisés pour comprendre les mécanismes améliorants et inhibiteurs de la fermentation obscure. En considérant que le biohydrogène produit est une fonction de la croissance bactérienne dans les fermenteurs en batch, les équations de *Gompertz* et *Logistique* modifiées donnent une relation entre la production cumulative de biohydrogène et le temps de fermentation par le potentiel de rendement du biohydrogène (H_{max}), la cinétique de production maximale de biohydrogène (R_m) et la durée de la phase d'adaptation (λ).

Pour quantifier analytiquement les paramètres de la courbe de croissance en mode batch, les équations de *Gompertz* et *Logistique* modifiées ont été ajustées aux données de production de biohydrogène cumulées, les valeurs des paramètres obtenus sont résumées dans le **tableau 3.20**.

Il a été observé que la production cumulative de biohydrogène correspondait bien aux équations de *Gompertz* et *Logistique* modifiées, comme le montre le coefficient de corrélation R^2 (0,97 - 0,98) entre les valeurs expérimentales et prévues ainsi que les estimations des durées de la phase de latence (λ) ont été plus courtes dans le cas de prétraitement enzymatique. La production maximale en biohydrogène a été signalée par les deux modèles pour la fermentation du substrat prétraité par hydrolyse enzymatique.

Il a été clair que le prétraitement enzymatique sert à diminué la phase d'adaptation de la culture bactérienne ainsi que l'amélioration de la cinétique de production maximale, ce qui est conclu par les deux modèles utilisés

Tableau 3.20 Paramètres cinétiques de la production de biohydrogène par fermentation obscure des **PPT** brutes et prétraitées par α -Amylase.

Prétraitement	EXPERIMENTAL		Modèle de <i>Gompertz</i> Modifié				Modèle de <i>Logistic</i> Modifié			
	H_{max} (mLH ₂)	H_{max} (mLH ₂ /gVS)	H_{max}^a (mL H ₂)	R_m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R^2	H_{max} (mL H ₂)	R_m (mL H ₂ /j)	λ (j)	R^2
/	131,5	210,13	130,5449	58,7574	1,121E-22	0,9727	131,7625	32,0657	22,0485	0,9761
Enzymatique	1088	1738,575	1104,8220	89,9089	8,6636E-38	0,9858	1093,9374	87,4548	0,1452	0,9874

Conclusion

Dans la partie F, la production de biohydrogène par fermentation obscure des pelures de pommes de terre peut être une approche efficace, durable et respectueuse de l'environnement. En raison de la DCOT et TVS élevées des **PPT**, elles peuvent être valorisées par fermentation en biohydrogène et le taux maximal d'hydrogène a été obtenus par fermentation des **PPT** brutes à un rapport I/S de 1/6 gVS/gVS. L'essai d'amélioration de cette production en utilisant le pré-traitement par hydrolyse enzymatique de substrat a été réalisé avec succès et il a donné lieu à une amélioration de production de 8,27 fois. Bien que les prétraitements enzymatiques soient efficaces mais leur application à l'échelle industrielle reste difficile et coûteuse.

L'utilisation des modèles *Gompertz* et *Logistique modifiés* pour la détermination de l'évolution de la production cumulative d'hydrogène a montré clairement que le coefficient de corrélation R^2 était supérieur à 0,97 pour toutes les données obtenues.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La production de biohydrogène par voie biologique, et plus particulièrement par fermentation obscure, est actuellement, une technologie largement étudiée et malgré que, le biohydrogène est régulièrement cité comme l'un des moyens qui permettra, au futur, la diversification des sources d'énergies, la production d'hydrogène par le traitement des eaux usées et des déchets joue un rôle important dans la réduction de l'immense volume déchets organiques domestiques et industrielles.

Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à l'étude d'application du bioprocédé de production de biohydrogène par fermentation obscure par différents déchets organiques et l'amélioration du rendement de production et poursuivant l'objectif d'une application future à plus grande échelle. Ces travaux expérimentaux montrent une transition entre une approche fondamentale (cultures mixtes, techniques de contrôle et de maintien de la production d'hydrogène par différents substrats) et une approche plus appliquée (essaie d'amélioration du taux de production par différentes techniques, prétraitement du substrat, co-fermentation, présence des nanomatériaux, utilisation des cultures pures, optimisation des paramètres de culture pure, aussi l'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne de la culture productrice d'hydrogène et l'essai de fermentation en mode discontinu a été réalisé).

D'un point de vue fondamental, ces travaux ont mené à la réussite de la production de biohydrogène par les différents substrats et l'amélioration des performances de production de l'hydrogène. Les taux de productions obtenus par fermentation de substrat brut ont été 143,178.89, 210, 282, 178.89 mL/gVS générés par **LS**, **EUB**, **PPT** et **MC** respectivement ; ce qui indique que le taux de production est proportionnel à la valeur de la matière volatil en suspension présente dans le substrat. Les techniques de sélection des cultures productrices d'hydrogène à partir de la culture mixte ont été efficaces avec excellence de la méthode thermique ; il a été aussi observé que tous les prétraitements réalisés sur les substrats ont conduit à l'amélioration du taux de production de l'hydrogène ainsi que la minimisation de la durée de fermentation. L'amélioration de ce bioprocédé par différents prétraitements physicochimiques et biologique semble efficace avec une augmentation élevée du taux d'hydrogène en utilisant les enzymes comme agent responsables à l'hydrolyse du substrat mais les inconvénients majeurs de cette technique sont le coût élevé de ces agents et la

difficulté d'application à grande échelle ; aussi l'ajout des nanomatériaux dans le milieu de culture comme catalyseur a provoqué une bonne augmentation du taux de production de biohydrogène, tandis que les nanomatériaux à base de métal toxique ont provoqué la réduction du fonctionnement de la culture ce qui indique la diminution du rendement de biohydrogène. Ses résultats ont montré aussi que la co-fermentation est une méthode d'amélioration efficace et plus rentable d'un point de vue économique sans nécessité de présence de plus de produits chimiques. La fermentation obscure par culture pure a donné lieu à de bons résultats mais la nature de la souche et sa faible productivité n'ont pas résulté des rendements très élevés. Il a été observé que l'application de la fermentation obscure en mode discontinu a été simple et efficace à des valeurs faibles de temps de rétention hydraulique et de concentration de charge organique.

Enfin, l'analyse cinétique des résultats expérimentaux par les modèles du *GOMPERTZ* et *LOGISTIQUE* modifiés a montré une bonne approche et détermination de l'évolution de la production cumulée d'hydrogène et le modèle *GOMPERTZ* modifié était le plus approprié.

Généralement, les objectifs de cette thèse de doctorat ont été atteints, en plus d'une meilleure compréhension de ce bioprocédé, la mise en évidence de l'amélioration des performances de la production en biohydrogène, et de minimiser la durée de fermentation. Toutefois, ces perspectives spécifiques de recherches consistent en quelques pistes mises en lumière au cours de ces travaux de thèse et peuvent être définies pour la suite :

- La sélection des microorganismes productrices d'hydrogène à partir des cultures mixtes par d'autres techniques chimiques comme l'ajout du *BESA*.
- L'évaluation du potentiel de production d'hydrogène en essayant autres substrats ou eaux usées pourront enrichir cet axe de recherche ;
- L'isolement et la purification d'une souche productrice d'hydrogène, l'identifier et l'utiliser comme culture pure pour l'amélioration de la production d'hydrogène. Cette étude devra faire l'objet d'une étude au niveau de la biologie moléculaire fin de pouvoir identifier la souche résultante ;
- L'identification des cultures persistantes après fermentation obscure et épuisement totale du substrat, les techniques de *qPCR* et *RT-qPCR* pourront s'avérer d'une grande aide dans ce domaine.

- L'évaluation de la rentabilité du système de production du biohydrogène par Lactosérum devra être également faire l'objet d'une étude complète. Par ailleurs, le procédé pourra aussi faire l'objet d'une étude environnementale en comparaison avec d'autres procédé de production et/ou de traitement des eaux usées.
- La combinaison avec d'autre procédé tel que la photo-fermentation pour augmenter le taux de production pourra évaluer ;
- L'utilisation de la fermentation obscure comme pour la production d'autre produits tel que le bioplastique, acides gras volatils.
- L'évaluation d'autre nanomatériaux pour amélioration de la production de biohydrogène par les substrats utilisés dans cette thèse ou autres substrats.
- L'étude de la toxicité d'autres métaux et métalloïdes lourds et les composés organiques comme les phénols (*Bisphénol A*), les furanes...etc.
- L'étude des effets de la viscosité du digestat et des conditions d'agitation su le potentiel de production de biohydrogène et les performances du procédé de fermentation obscure en mode discontinu.

Références bibliographiques

A

- Achkar, J. El, El, J., Méthanisation, A., De, D., Saint, L. U., Beyrouth, J. De, Achkar, J. El, Abboud, P. M., Louka, P. N., Maroun, P. R., Lanoisellé, P. J., & Salameh, D. (2018). *Méthanisation de marc de raisin . Caractérisation et optimisation du procédé et des prétraitements . To cite this version : HAL Id : tel-01868544 Présentée par.*
- Adnan Khdaïr 1, 2, & Abu-Rumman, G. (2020). *Sustainable Environmental Management and.* 1–22.
- Akinbomi, C. J. (2015). *Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy Fermentative hydrogen and methane productions using membrane bioreactors Julius Gbenga Akinbomi.*
- Akroum-amrouche, D., Lounici, H., Abdi, N., & Mameri, N. (2014). *Dark fermentative hydrogen production rate from glucose using facultative anaerobe bacteria E coli.* *March*, 14–16.
- Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Management*, 36, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>
- Alrokayan, S. A. (2012). *Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species.* 845–857.
- Álvarez-Mateos, P., Pereda-Marín, J., Carta-Escobar, F., Duran-Barrantes, M. M., & Guillén-Jiménez, E. (2000). Influence of inoculum and initial pH on dairy effluent biodegradation and mineralization. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 14(3), 101–106.
- Anburajan, P., Pugazhendhi, A., Park, J. H., Kumar, G., Choi, C. S., & Kim, S. H. (2017). Inhibitory effect of 5-hydroxymethylfurfural on continuous hydrogen fermentation by mixed culture in a fixed bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(45), 27570–27576. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.143>
- André, P., Cesar, S., Gustavo, J., Weiser, T., Dieter, J., & Teleken, J. (2019). Industrial Crops & Products Influence of inoculum to substrate ratio on the anaerobic digestion of a cassava starch polymer. *Industrial Crops & Products*, 141(August), 111709. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111709>
- Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(15), 5227–5233. <https://doi.org/10.1021/ie071622x>
- Anwaar, S., Maqbool, Q., Jabeen, N., Nazar, M., & Abbas, F. (2016). *The Effect of Green Synthesized CuO Nanoparticles on Callogenesis and Regeneration of Oryza sativa L.* 7(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01330>

- APHA. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- Archdaily. (2012). *Stacking green / Vo Trong Nghia Architects*.
- Arikan, E. B., Bouchareb, E. M., & Dizge, N. (2020). Investigation of fungal treatment potential for bulgur cooking process wastewater. *Bioresource Technology Reports*, 11, 100468. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100468>
- Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprof, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass and Bioenergy*, 75(0), 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.011>
- Ariunbaatar, J., Panico, A., Yeh, D. H., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). Enhanced mesophilic anaerobic digestion of food waste by thermal pretreatment: Substrate versus digestate heating. *Waste Management*, 46, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.045>
- Arooj, M. F., Han, S., Kim, S., Kim, D., & Å, H. S. (2008). *Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate*. 33, 3289–3294. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.04.022>
- Aspiranti, G. (2014). *INFLUENCE OF CHEMICAL COMPOSITION OF ORGANIC WASTE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION Supervisor*.
- Astals, S., Romero-Güiza, M., & Mata-Alvarez, J. (2013). Municipal solid waste: Energy recovery from the organic fraction based on anaerobic digestion. *Advanced Structured Materials*, 34(1), 1–26. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40680-5_1
- Ayhan Demirbas. (2008). *Green Energy and Technology*.
- Azeitona, D. (2012). *Efeitos de Pré-tratamentos Térmicos na Digestão Anaeróbia Termófila de Resíduos de Casca de Batata*. 142.
- Azeitona, L. (2012). *Effets des prétraitements thermiques sur la digestion Anaérobie thermophile des résidus d ' écorce*.
- B**
- Badiei, M., Jahim, J. M., Anuar, N., & Sheikh Abdullah, S. R. (2011). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production from palm oil mill effluent in anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(10), 5912–5919. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.054>
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131(October). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Bakouri, Y., Abdelhamid, M., Tebibel, H., & Khellaf, A. (2019). *Production d'hydrogène par procédés biologiques Sabah*. 34.
- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In *Biohydrogen: Vol. #volume#* (1st ed., pp. 103–144).

- Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4>
- Bao, M., Su, H., & Tan, T. (2012). Biohydrogen production by dark fermentation of starch using mixed bacterial cultures of *Bacillus* sp and *Brevumdimonas* sp. *Energy and Fuels*, 26(9), 5872–5878. <https://doi.org/10.1021/ef300666m>
- Battista, F., Mancini, G., Ruggeri, B., & Fino, D. (2016). Selection of the best pretreatment for hydrogen and bioethanol production from olive oil waste products. *Renewable Energy*, 88, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.055>
- Baykara, S. Z. (2018). Hydrogen: A brief overview on its sources, production and environmental impact. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(23), 10605–10614. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.022>
- Beckers, L., Hiligsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., & Thonart, P. (2012). Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor. *Energy Procedia*, 29, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2012.09.006>
- Bougrier, C., Carrère, H., & Delgenès, J. P. (2005). Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical Engineering Journal*, 106(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2004.11.013>
- Bourque, B. (2008). *T0315_Production de biohydrogène par digestion anaérobie dans un réacteur UASB*.
- Budiman, P. M., & Wu, T. Y. (2016). Ultrasonication pre-treatment of combined effluents from palm oil, pulp and paper mills for improving photofermentative biohydrogen production. *Energy Conversion and Management*, 119, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.03.060>
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071–9077. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). ScienceDirect Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production : A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.006>
- Bundhoo, Z. M. A. (2017). Effects of microwave and ultrasound irradiations on dark fermentative bio-hydrogen production from food and yard wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(7), 4040–4050. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.10.149>
- By, E. (2014). *Handbook of Hydrogen Energy Hydrogen Energy*.

C

- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A. F., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H. O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., ... Zaiat, M. (2019). A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(48), 26237–26247. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.124>
- CEA. (2020). *Le CEA Rapport financier*.
- Cervulle, M., Quemener, N., Vörös, F., & Mines, P. (2017). *Cultural Studies , théories féministes et décoloniales*.
- Chairattananamokorn, P., Penthamkeerati, P., Reungsang, A., Lo, Y. C., Lu, W. Bin, & Chang, J. S. (2009). Production of biohydrogen from hydrolyzed bagasse with thermally preheated sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(18), 7612–7617. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.034>
- Cheng, X. Y., & Liu, C. Z. (2012). Fungal pretreatment enhances hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk. *Applied Energy*, 91(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.09.014>
- Chezeau, B. (2018). *Production de biohydrogène par fermentation sombre : cultures , impact des hétérogénéités spatiales et modélisation d ' un bioréacteur anaérobie To cite this version : HAL Id : tel-02402287 ECOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L ' INGENIEUR Thèse présentée à l ' .*
- Chezeau, B., & Vial, C. (2019). Modeling and Simulation of the Biohydrogen Production Processes. In *Biohydrogen*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64203-5.00019-8>
- Chuang, Y. S., Lay, C. H., Sen, B., Chen, C. C., Gopalakrishnan, K., Wu, J. H., Lin, C. S., & Lin, C. Y. (2011). Biohydrogen and biomethane from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fermentation: Effects of substrate concentration and incubation temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14195–14203. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.188>
- Coll, T., Jové, M., Rodríguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sánchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C., & Vázquez-Carrera, M. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor- κ B activation. *Diabetes*, 55(10), 2779–2787. <https://doi.org/10.2337/db05-1494>
- Compendium of Chemical Terminology Volume 64 (Gold Book)*. (2012).
- Contreras-Dávila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatrisme-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671–679.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>

Cristina Cavinato. (2011). *Optimization of two phases thermophilic anaerobic digestion of biowaste for bio- hythane production.*

Cui, M., Yuan, Z., Zhi, X., Wei, L., & Shen, J. (2010). Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(9), 4041–4047. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.02.035>

D

Das, D. (2020). *Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano- metal oxides assisted dark fermentation Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation University of Nottingham Malay.* 0–34.

Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046–6057. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>

De Sá, L. R. V., Cammarota, M. C., De Oliveira, T. C., Oliveira, E. M. M., Matos, A., & Ferreira-Leitão, V. S. (2013). Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(7), 2986–2997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.103>

Del Pilar Anzola-Rojas, M., Da Fonseca, S. G., Da Silva, C. C., De Oliveira, V. M., & Zaiat, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, 5(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>

Denimal, E. (2018). *l ' étude des gradients : Applications à l ' agroalimentaire.*

Dhar, B. R., Elbeshbishy, E., Hafez, H., & Lee, H. S. (2015). Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, 198, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.048>

Dieter Deublein, J., & Angela Steinhauser, K. (2008). *Biogas from Waste and Renewable Resources.*

Dincer, I., & Acar, C. (2014). ScienceDirect Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>

Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., & Hamza, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, 173–174, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.12.018>

Dogan, E., Dunaev, T., Erguder, T. H., & Demirer, G. N. (2009). Performance of leaching bed reactor converting the organic fraction of municipal solid waste to organic acids

and alcohols. *Chemosphere*, 74(6), 797–803.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.028>

Dreschke, G. (2018). *Optimization of fermentative biohydrogen production by Thermotoga neapolitana*. 1–122.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167.
<https://doi.org/10.1038/168167a0>

E

Elbeshbishy, E., Hafez, H., & Nakhla, G. (2010). Enhancement of biohydrogen producing using ultrasonication. *Renewable Energy*, 35(12), 6184–6193.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.119>

Elreedy, A., Fujii, M., Koyama, M., Nakasaki, K., & Tawfik, A. (2018). Enhanced fermentative hydrogen production from industrial wastewater using mixed culture bacteria incorporated with iron, nickel, and zinc-based nanoparticles. *Water Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.043>

Emilio, & Miranda. (2019). *Hydrogen Energy : Sustainable and Perennial*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814251-6.00001-0>

Evaluation, K. (2019). *Biogas Potential from the Anaerobic Digestion of Potato Peels : Process Performance and*.

F

Fabien Monnet. (2003). Biogas purification process to increase gen - Set efficiency. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1169, Issue November).
<https://doi.org/10.1063/1.3243250>

Fang, H. H. P., Liu, H., & Zhang, T. (2002). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(1), 44–52.
<https://doi.org/10.1002/bit.10174>

Ferraz, N., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2014). *ScienceDirect Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors b*. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.017>

Flor, A. P. C. P. (2006). *Comportamento de reatores anaeróbios tratando a fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos António Pedro Conde Pinto Flor Comportamento de reatores anaeróbios tratando a fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos*.

Franco, A., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., & Roca, E. (2007). Learning to Operate Anaerobic Bioreactors. *University of Santiago, January*, 618–627.

Francois-lopez, E. (2016). *Production de biohydrogène par fermentation obscure : potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne*.

G

- Gadhe, A., Sonawane, S. S., & Varma, M. N. (2015). Influence of nickel and hematite nanoparticle powder on the production of biohydrogen from complex distillery wastewater in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 10734–10743. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.198>
- Gadow, S. I., Li, Y., & Liu, Y. (2012). Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15465–15472. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.128>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Giuliano, A., Bolzonella, D., Pavan, P., Cavinato, C., & Cecchi, F. (2013). Bioresource Technology Co-digestion of livestock effluents , energy crops and agro-waste : Feeding and process optimization in mesophilic and thermophilic conditions. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 128, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.002>
- Guillou, H., PELISSIER, J. P., & GRAPPIN, R. (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, 66(2), 143–175. <https://doi.org/10.1051/lait:198629>
- Guo, X. (2020). *Biohydrogen production and metabolic pathways in dark fermentation related to the composition of organic solid waste To cite this version.*
- Guo, X. M. (2012). *PhD thesis 2012 Biohydrogen production and metabolic pathways in dark fermentation related to the composition of organic solid waste.*

H

- Hagelqvist, A. (2013). Batchwise mesophilic anaerobic co-digestion of secondary sludge from pulp and paper industry and municipal sewage sludge. *Waste Management*, 33(4), 820–824. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.11.002>
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Hamilton, C., Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., & Thonart, P. (2010). Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(3), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.073>
- Han, S. K., & Shin, H. S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(6), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.001>
- Han, W., Liu, W. X., Yu, C. M., Huang, J. G., Tang, J. H., & Li, Y. F. (2017). BioH2

- production from waste bread using a two-stage process of enzymatic hydrolysis and dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(50), 29929–29934. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.221>
- Hanaoka, T., Yoshida, T., Fujimoto, S., Kamei, K., Harada, M., Suzuki, Y., Hatano, H., Yokoyama, S. Y., & Minowa, T. (2005). Hydrogen production from woody biomass by steam gasification using a CO₂ sorbent. *Biomass and Bioenergy*, 28(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.03.009>
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1339–1347. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00090-3)
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- HILIGSMANN, S. (2012). *Production de biohydrogène par fermentation anaérobie chimiotrophe de substrats carbohydratés*. 123.
- Hogan, F., Mormede, S., Clark, P., & Crane, M. (2004). Ultrasonic sludge treatment for enhanced anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 50(9), 25–32. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0526>
- Hollmuller, P., Lachal, B., Romerio, F., Weber, W., & Zraggen, J. (2005). *L'HYDROGÈNE, FUTUR VECTEUR ÉNERGÉTIQUE ? Actes de la 15 Journée du Cuepe Colloque du cycle de formation du Cuepe 2004-2005*.
- Hsia, S. Y., Wang, C. H., & Chou, Y. T. (2014). Study on biohydrogen production of dark fermentation with the stimulation of ultrasonic. *Applied Mechanics and Materials*, 479–480, 451–456. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.479-480.451>
- Hui, Y., Yan-yu, R., Tao, W., & Chuang, W. (2016). Results in Physics Preparation and antibacterial activities of Ag / Ag + / Ag₃ + nanoparticle composites made by pomegranate (*Punica granatum*) rind extract. *Results in Physics*, 6, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2016.05.012>
- Hwang, J. H., Kabra, A. N., Kim, J. R., & Jeon, B. H. (2014). Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent. *Energy*, 78, 887–894. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.10.086>
- I**
- IAEA. (1999). IAEA-TECDOC-1085: Hydrogen as an energy carrier and its production by nuclear power. *Iaea-Tecdoc-1085*, May.

J

- Jagadevan, S., Jayamurthy, M., Dobson, P., & Thompson, I. P. (2012). A novel hybrid nano zerovalent iron initiated oxidation - Biological degradation approach for remediation of recalcitrant waste metalworking fluids. *Water Research*, *46*(7), 2395–2404. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.006>
- Jenkins, S. H. (1982). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In *Water Research* (Vol. 16, Issue 10). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90249-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90249-4)
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., Choe, W. S., & Park, J. M. (2008). Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technology*, *99*(6), 2061–2066. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.027>
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, *99*(14), 6666–6672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.067>
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, *50*(4), 484–524. <https://doi.org/10.1128/mmbr.50.4.484-524.1986>
- Jung, K. W., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2010). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(24), 13370–13378. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.120>

K

- Kao, P. M., Hsu, B. M., Huang, K. H., Tao, C. W., Chang, C. M., & Ji, W. T. (2014). Biohydrogen production by immobilized co-culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*. *Energy Procedia*, *61*, 834–837. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.11.976>
- Kehal, M. B. S. (2001). *Production de Méthane à Partir des Boues des Stations d'Épuration des Eaux Usées : Potentiel Existant en Algérie*.
- Keskin, T., Arslan, K., Nalakth Abubackar, H., Vural, C., Eroglu, D., Karaalp, D., Yanik, J., Ozdemir, G., & Azbar, N. (2018). Determining the effect of trace elements on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, *43*(23), 10666–10677. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.028>
- Keskin, T., Arslan, K., & Nalakth, H. (2018). ScienceDirect Determining the effect of trace elements on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.028>
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., & Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, *31*(8), 1737–1744.

- <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>
- Kim, D. H., Kim, S. H., & Shin, H. S. (2009). Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.013>
- Kim, J. K., Oh, B. R., Chun, Y. N., & Kim, S. W. (2006). *Effects of Temperature and Hydraulic Retention Time on Anaerobic Digestion of Food Waste*. 102(4), 328–332. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.328>
- Kim, J., Kim, H., Baek, G., & Lee, C. (2016). Anaerobic co-digestion of spent coffee grounds with different waste feedstocks for biogas production. *Waste Management*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.015>
- Kim, M., Ahn, Y., & Speece, R. E. (2002). *Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion ; mesophilic vs . thermophilic*. 36, 4369–4385.
- Kim, M. S., & Lee, D. Y. (2010). Fermentative hydrogen production from tofu-processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium. *Bioresource Technology*, 101(1 SUPPL.), S48–S52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.040>
- Kim, M., Yang, Y., Morikawa-Sakura, M. S., Wang, Q., Lee, M. V., Lee, D. Y., Feng, C., Zhou, Y., & Zhang, Z. (2012). Hydrogen production by anaerobic co-digestion of rice straw and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(4), 3142–3149. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.10.116>
- Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(15), 1607–1616. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.02.018>
- Kim, S., Han, S., & Shin, H. (2008). *Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time*. 43, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.007>
- Kongjan, P. (2010). Biohydrogen production from sugar rich substrates using the dark fermentation process. In *PhD Thesis* (Issue June).
- Korbekandi, H., Irvani, S., & Abbasi, S. (2009). Production of nanoparticles using organisms Production of nanoparticles using organisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(4), 279–306. <https://doi.org/10.3109/07388550903062462>
- Korres, N. E., & Nizami, A. S. (2013a). Variation in anaerobic digestion: Need for process monitoring. In *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using Agricultural Biomass and Organic Wastes* (Vol. 9780203137, Issue August 2013). <https://doi.org/10.4324/9780203137697>
- Korres, N. E., & Nizami, A. S. (2013b). Variation in anaerobic digestion: Need for process monitoring. In *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using Agricultural Biomass and Organic Wastes* (Vol. 9780203137, Issue May). <https://doi.org/10.4324/9780203137697>
- Kotay, S. M., & Das, D. (2009). Novel dark fermentation involving bioaugmentation with

- constructed bacterial consortium for enhanced biohydrogen production from pretreated sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7489–7496. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.109>
- Krus, C., & Lucas, G. (2014). Biogas Production from Potato Peel Waste. *Waste Management*, 2, 56–102.
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Ho, I., Ł, D. K.-, Kami, M., & Cie, H. (2020). *Biomass and Bioenergy Influence of alkaline and oxidative pre-treatment of waste corn cobs on biohydrogen generation efficiency via dark fermentation*. 141(June 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105691>
- Kulasekara, Vaithehi. (2019). *A review of geothermal energy for future power generation*. 26–28.
- Kumar, A. P., Sudhakar, K., Praveen Kumar, A., Prem Kumar, B., Raghavender, A., Ravi, S., Kenie, N., & Lee, Y.-I. (2018). Synthesis of γ -Fe₂O₃ Nanoparticles and Catalytic activity of Azide-Alkyne Cycloaddition Reactions Asian Journal of Nanoscience and Materials. *Asian Journal of Nanoscience and Materials*, 1(4), 172–182.
- Kumar, G., Mudhoo, A., Sivagurunathan, P., Nagarajan, D., Ghimire, A., Lay, C. H., Lin, C. Y., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2016). Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 219, 725–737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.065>
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Thi, N. B. D., Zhen, G., Kobayashi, T., Kim, S. H., & Xu, K. (2016). Evaluation of different pretreatments on organic matter solubilization and hydrogen fermentation of mixed microalgae consortia. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21628–21640. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.195>
- Kumari, S., Amit, Jamwal, R., Mishra, N., & Singh, D. K. (2020). Recent developments in environmental mercury bioremediation and its toxicity: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 13, 100283. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100283>
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A. J., Hawkes, F. R., Premier, G. C., & Hawkes1, D. L. (2006). Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of Anatomy*, 189 (Pt 3(Ii), 503–505. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Kyazze, G., Martinez-Perez, Dinsdale, R., Premier, G. C., Hawkes, F. R., Guwy, A. J., & Hawkes1, D. L. (2005). Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of Anatomy*, 189 (Pt 3(Ii), 503–505. <https://doi.org/10.1002/bit>
- L**
- Lavagnolo, M. C., Giroto, F., Rafieenia, R., Danieli, L., & Alibardi, L. (2018). Two-stage anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste – Effects of process conditions during batch tests. *Renewable Energy*, 126, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.039>

- Lee, D., Ebie, Y., Xu, K., Li, Y., & Inamori, Y. (2010). Bioresource Technology Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresource Technology*, *101*(1), S42–S47. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.037>
- Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. (2011). Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*, *102*(18), 8393–8402. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.041>
- Lee, D., Li, Y., Oh, Y., Kim, M., & Noike, T. (2009). Effect of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(3), 1244–1252. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.093>
- Lee, H., Vermaas, W. F. J., & Rittmann, B. E. (2010). Biological hydrogen production : prospects and challenges. *Trends in Biotechnology*, *28*(5), 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.007>
- Lee, K., Chen, S., Lin, C., & Chang, J. (2021). ScienceDirect Converting waste molasses liquor into biohydrogen via dark fermentation using a continuous bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(31), 16546–16554. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.02.101>
- Lee, Y. J., Miyahara, T., & Noike, T. (2002). Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *77*(6), 694–698. <https://doi.org/10.1002/jctb.623>
- Lettinga, G., & Hulshoff Pol, L. W. (1991). USAB-process design for various types of wastewaters. *Water Science and Technology*, *24*(8), 87–107. <https://doi.org/10.2166/wst.1991.0220>
- Levin, D. B., Zhu, H., Beland, M., Cicek, N., & Holbein, B. E. (2007). Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Bioresource Technology*, *98*(3), 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.027>
- Li, C., & Fang, H. H. P. (2007a). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *37*(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Li, C., & Fang, H. H. P. (2007b). *Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge*. *67*, 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.005>
- Li, Y., Zhu, J., Wu, X., Miller, C., & Wang, L. (2010). *The Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from Swine Wastewater Supplemented with Glucose*. 1286–1296. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8914-3>
- Liang, S., & McDonald, A. G. (2015). Anaerobic digestion of pre-fermented potato peel wastes for methane production. *WASTE MANAGEMENT, May 2012*, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.09.029>

- Lin, C., & Wu, C. (2006). *Recovery of municipal waste incineration bottom ash and water treatment sludge to water permeable pavement materials*. 26, 970–973. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.09.014>
- Lin, C. Y., & Chang, R. C. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(6), 498–500. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199906\)74:6<498::AID-JCTB67>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199906)74:6<498::AID-JCTB67>3.0.CO;2-D)
- Lin, C. Y., & Jo, C. H. (2003). Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(6), 678–684. <https://doi.org/10.1002/jctb.848>
- Lin, C. Y., & Lay, C. H. (2005). *A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge micro ora*. 30, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.03.002>
- Lin, R., Cheng, J., Ding, L., Song, W., Liu, M., Zhou, J., & Cen, K. (2016). Enhanced dark hydrogen fermentation by addition of ferric oxide nanoparticles using *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, 207, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.009>
- Lin, R., Deng, C., Cheng, J., & Murphy, J. D. (2020). Low concentrations of furfural facilitate biohydrogen production in dark fermentation using *Enterobacter aerogenes*. *Renewable Energy*, 150, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.106>
- Liu, J., Olsson, G., & Mattiasson, B. (2006). Extremum-seeking with variable gain control for intensifying biogas production in anaerobic fermentation. *Water Science and Technology*, 53(4–5), 35–44. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.108>
- Luostarinen, S., Luste, S., & Sillanpää, M. (2009). Increased biogas production at wastewater treatment plants through co-digestion of sewage sludge with grease trap sludge from a meat processing plant. *Bioresource Technology*, 100(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.029>
- M**
- Ma, J., Ke, S., & Chen, Y. (2008). Biological hydrogen production by anaerobic fermentation from carbohydrate-containing waste. *Journal of Biotechnology*, 136, S661. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1532>
- Marbán, G., & Valdés-Solís, T. (2008). Corrigendum to “Towards the hydrogen economy?” [Int. J. Hyd. Energy 32(12) (2007) 1625-1637] (DOI:10.1016/j.ijhydene.2006.12.017). *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 927. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.11.002>
- Marie, C., Magdalena, J. A., Bernet, N., & Escudi, R. (2022). *Enhanced Fermentative Hydrogen Production from Food Waste in Continuous Reactor after Butyric Acid Treatment*. 1–18.
- Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R., & Guwy, A. (2008). Hydrogen production from sewage

- sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, 99(14), 6325–6331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.012>
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)
- Mccartney, D. M., & Oleszkiewicz, J. A. (1988). *Competition between methanogens and sulfate reducers : effect of COD- . sulfate ratio and acclimation*. 655–664.
- Ming-Ju Chen, Kreuter, J. Y.-T. K. (1996). Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of Anatomy*, 189 (Pt 3(Ii), 503–505. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Mohan, S. V., Chiranjeevi, P., & Mohanakrishna, G. (2012). A rapid and simple protocol for evaluating biohydrogen production potential (BHP) of wastewater with simultaneous process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(4), 3130–3141. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.10.109>
- Mohanraj, S., Kodhaiyolii, S., Rengasamy, M., & Pugalenti, V. (2014). Phytosynthesized iron oxide nanoparticles and ferrous iron on fermentative hydrogen production using *Enterobacter cloacae*: Evaluation and comparison of the effects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(23), 11920–11929. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.027>
- Moletta, R. (2002). La digestion anaérobique des déchets municipaux. *Eau, l'INDUSTRIE, Les Nuisances*, 257, 75–82.
- Morgan, J. W., Forster, C. F., & Evison, L. (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Research*, 24(6), 743–750. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90030-A](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90030-A)
- Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A. A. Y., Ngan, M. A., Fakhru, A., Iyuke, S. E., & Bakir, A. M. (2004). *Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic micro ora*. 29, 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.009>
- Moussa, R. N., Moussa, N., & Dionisi, D. (2022). *Hydrogen Production from Biomass and Organic Waste Using Dark Fermentation : An Analysis of Literature Data on the Effect of Operating Parameters on Process Performance*.
- Mu, H., & Chen, Y. (2011). Long-term effect of ZnO nanoparticles on waste activated sludge anaerobic digestion. *Water Research*, 45(17), 5612–5620. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.022>
- Mudhoo, A., Forster-Carneiro, T., & Sánchez, A. (2011). Biohydrogen production and bioprocess enhancement: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 250–263. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.525497>
- Mullai, P., Yogeswari, M. K., & Sridevi, K. (2013). Bioresource Technology Optimisation and enhancement of biohydrogen production using nickel nanoparticles – A novel

approach. *Bioresource Technology*, 141, 212–219.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.082>

MURILLO, M. M. (2004). *Caracterisation De L ' Effet D ' Un Traitement Au Peroxyde D ' Hydrogene Sur Une Boue.*

NNasr, M., Tawfik, A., Ookawara, S., & Suzuki, M. (2013). Biological hydrogen production from starch wastewater using a novel up-flow anaerobic staged reactor. *BioResources*, 8(4), 4951–4968. <https://doi.org/10.15376/biores.8.4.4951-4968>

Nath, K., & Das, D. (2003). Hydrogen from biomass. *Current Science*, 85(3), 265–271.
<https://doi.org/10.1016/b978-008043947-1/50003-x>

N

Nazlina, H. M. Y., Aini, A. R. N., Ismail, F., Yusof, M. Z. M., & Hassan, M. A. (2009). Effect of Different Temperature, Initial pH and Substrate Composition on Biohydrogen Production from Food Waste in Batch Fermentation. In *Asian Journal of Biotechnology* (Vol. 1, Issue 2, pp. 42–50). <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2009.42.50>

Neal, E. G., Chaffe, H., Schwartz, R. H., Lawson, M. S., Edwards, N., Fitzsimmons, G., Whitney, A., & Cross, J. H. (2008). The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*, 7(6), 500–506.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70092-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70092-9)

Nisman, B. (1954). *Pr ~ vot.* 1(10), 16–42.

Ntaikou, I., Kourmentza, C., Koutrouli, E. C., Stamatelatou, K., Zampraka, A., & Kornaros, M. (2009). Bioresource Technology Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production. *Bioresource Technology*, 100(15), 3724–3730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.001>

O

O-Thong, S., Prasertsan, P., & Birkeland, N. K. (2009). Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, 100(2), 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.036>

Odziemkowski, M. S., Schuhmacher, T. T., Gillham, R. W., & Reardon, E. J. (1998). Mechanism of oxide film formation on iron in simulating groundwater solutions: Raman spectroscopic studies. *Corrosion Science*, 40(2–3), 371–389.
[https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(97\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(97)00141-8)

Olkiewicz, M., Tylkowski, B., Montornés, J. M., Garcia-Valls, R., & Gulaczyk, I. (2021). Modelling of enzyme kinetics: Cellulose enzymatic hydrolysis case. *Theoretical and Computational Chemistry: Applications in Industry, Pharma, and Materials Science*, 181–204. <https://doi.org/10.1515/9783110678215-006>

Online, V. A. (2015). *RSC Advances grounds and excess sludge : long term process stability and energy production.* 26452–26460. <https://doi.org/10.1039/C4RA15581E>

- Orfanoudaki, A., Makridakis, G., Maragkaki, A., Fountoulakis, M. S., Kallithrakas-Kontos, N. G., & Manios, T. (2020). Anaerobic Co-digestion of Pig Manure and Spent Coffee Grounds for Enhanced Biogas Production. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9), 4613–4620. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00796-6>
- Otero-González, L., Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2014). Inhibition of anaerobic wastewater treatment after long-term exposure to low levels of CuO nanoparticles. *Water Research*, 58, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.067>
- OTTMAR EDENHOFER, (2011). *Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation*.
- Ozkan, L., Erguder, T. H., & Demirel, G. N. (2011). Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.006>
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2011). Dark fermentative bio-hydrogen production from waste wheat starch using co-culture with periodic feeding: Effects of substrate loading rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(12), 7089–7093. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.071>

P

- Pagliaccia, P., Gallipoli, A., Gianico, A., Montecchio, D., & Braguglia, C. M. (2016). Single stage anaerobic bioconversion of food waste in mono and co-digestion with olive husks: Impact of thermal pretreatment on hydrogen and methane production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(2), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.061>
- Pan, J., Zhang, R., El-Mashad, H. M., Sun, H., & Ying, Y. (2008). Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(23), 6968–6975. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.130>
- Panwar, N. L., Kaushik, S. C., & Kothari, S. (2011). Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 15, Issue 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.037>
- Parthiba Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J. W. C., & Carrere, H. (2018). Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresour Technol*, 249, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.105>
- Patel, A. K., Vaisnav, N., Mathur, A., Gupta, R., & Tuli, D. K. (2016). Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production. *Renewable Energy*, 98, 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.039>
- Pays-bas, A. (n.d.). *Production de bioplastique à partir des eaux usées CHIMIE DU VEGETAL : L ' UNITE PILOTE D ' AROMATIQUES BIOSOURCES*. 1–27.
- Pham, T. T. H., Brar, S. K., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2009). Ultrasonication of

wastewater sludge-Consequences on biodegradability and flowability. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2–3), 891–898.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.091>

Pharmacopoeia, E., & Ii, S. (2005). 4.1.3. *buffer solutions* (pp. 3–8).

Poladyan, A., Margaryan, L., Trchounian, K., & Trchounian, A. (2020). Biomass and biohydrogen production during dark fermentation of *Escherichia coli* using office paper waste and cardboard. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(1), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.246>

Pugazhendhi, A., Shobana, S., Nguyen, D. D., Banu, J. R., Sivagurunathan, P., Chang, S. W., Ponnusamy, V. K., & Kumar, G. (2019). Application of nanotechnology (nanoparticles) in dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(3), 1431–1440. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.114>

Puhulwella, R. G., Beckers, L., Delvigne, F., Grigorescu, A. S., Thonart, P., & Hilgsmann, S. (2014). ScienceDirect Mesophilic biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in trickling biofilter reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30), 16902–16913. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.087>

Pyzik, A., Ciekowska, M., Krawczyk, P. S., Sobczak, A., Drewniak, L., Dziembowski, A., & Lipinski, L. (2018). Comparative analysis of deep sequenced methanogenic communities: Identification of microorganisms responsible for methane production. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1043-3>

Q

Qu, D. U., Pr, B. E. C. R., Qu, D. U., Comme, R. E. S., Partielle, E., Maitrise, D. E. L. A., Sciences, E. N., Mat, N. I. E. D. E. S., Lignocellulosiques, R., Sanae, P. A. R., & Harche, E. (2015). *Université du québec rapport présenté*.

Quéméneur, M., Bittel, M., Trably, E., Dumas, C., Fourage, L., Ravot, G., Steyer, J. P., & Carrère, H. (2012). Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(14), 10639–10647. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.083>

Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J. P., Carrre, H., & Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(4), 3150–3159. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033>

R

Radjaram, B., & Saravanane, R. (2011). Assessment of optimum dilution ratio for biohydrogen production by anaerobic co-digestion of press mud with sewage and water. *Bioresource Technology*, 102(3), 2773–2780. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.075>

Rafieenia, R., Giroto, F., Peng, W., Cossu, R., Pivato, A., Raga, R., & Lavagnolo, M. C. (2017). Effect of aerobic pre-treatment on hydrogen and methane production in a two-

- stage anaerobic digestion process using food waste with different compositions. *Waste Management*, 59, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.028>
- Ramachandran, R., & Menon, R. K. (1998). An overview of industrial uses of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(7), 593–598. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(97\)00112-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(97)00112-2)
- Rambabu, K., Bharath, G., Thanigaivelan, A., Das, D. B., Show, P. L., & Banat, F. (2021). Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation. *Bioresource Technology*, 319(October 2020), 124243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124243>
- Rambabu, K., Show, P. L., Bharath, G., Banat, F., Naushad, M., & Chang, J. S. (2020). Enhanced biohydrogen production from date seeds by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(42), 22271–22280. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.133>
- Ramírez-morales, J. E., Tapia-venegas, E., & Toledo-alarcón, J. (2015). *Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation*. May. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>
- Ramprakash, B., & Muthukumar, K. (2014). Comparative study on the production of biohydrogen from rice mill wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(27), 14613–14621. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.029>
- Risberg, K., Sun, L., Levén, L., Horn, S. J., & Schnürer, A. (2013). Biogas production from wheat straw and manure - Impact of pretreatment and process operating parameters. *Bioresource Technology*, 149, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.054>
- Roberge, M. T., Finley, J. W., Lukaski, H. C., & Borgerding, A. J. (2004). Evaluation of the pulsed discharge helium ionization detector for the analysis of hydrogen and methane in breath. *Journal of Chromatography A*, 1027(1–2), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.083>
- Robert Foster, Majid Ghassemi, Alma Cota Jeanette Moore, V. N. (2011). *Solar Energy: renewable Energy and the Environment*.
- Rodier, J. (2009). L'analyse de l'eau. In *International Journal of Biological and Chemical Sciences* (Vol. 1, Issue 1).
- Rodríguez-reyes, J. J., García-depraect, O., Castro-muñoz, R., & León-becerril, E. (2021). Dark fermentation process response to the use of undiluted tequila vinasse without nutrient supplementation. *Sustainability (Switzerland)*, 13(19), 1–14. <https://doi.org/10.3390/su131911034>
- Roger, L., Thapon, J. L., Maubois, J. L., Brule, G., Roger, L., Thapon, J. L., Maubois, J. L., & Hydrolyse, G. B. (1976). *Hydrolyse du lactose contenu dans l'ultrafiltrat de lait ou de lactosérum en réacteur enzymatique à membrane*.
- Rosa, P. R. F., Santos, S. C., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2014). The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen

from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(25), 13118–13127. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.152>

Rughoonundun, H., Mohee, R., & Holtzapfle, M. T. (2012). Influence of carbon-to-nitrogen ratio on the mixed-acid fermentation of wastewater sludge and pretreated bagasse. *Bioresource Technology*, 112, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.081>

Ruzza, A. (2013). *Hydrogen and Methane Productions From Organic Waste*.

S

Salerno, M. S., Gomes, L. A. D. V., Da Silva, D. O., Bagno, R. B., & Freitas, S. L. T. U. (2015). Innovation processes: Which process for which project? *Technovation*, 35, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2014.07.012>

Saraphirom, P., & Reungsang, A. (2010). Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13435–13444. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.122>

Scoma, A., Bertin, L., & Fava, F. (2013). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen and volatile fatty acids production during acidogenic digestion of dephenolized olive mill wastewaters. *Biomass and Bioenergy*, 48, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.028>

Shah, S. (2014). *Department of Biotechnology and Chemical Technology Master's Programme in Process Systems Engineering HYDROGEN PRODUCTION PROCESSES FROM BIOMASS Title of final project Hydrogen production processes from biomass. December*.

Sharma, P., & Melkania, U. (2018). Impact of heavy metals on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *E. Coli*. *Waste Management*, 75, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.005>

Show, K.-Y., Yan, Y., & Lee, D.-J. (2019). Biohydrogen Production: Status and Perspectives. In *Biohydrogen*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64203-5.00016-2>

Siddique, F., Hussain, I., Mahmood, M. S., Ahmed, S. I., & Iqbal, A. (2014). Isolation and characterization of a highly thermostable α -amylase enzyme produced by *Bacillus licheniformis*. *51(2)*, 309–314.

Silva, F. T. M., Bessa, L. P., Vieira, L. M., Moreira, F. S., de Souza Ferreira, J., Batista, F. R. X., & Cardoso, V. L. (2019). Dark fermentation effluent as substrate for hydrogen production from *Rhodobacter capsulatus* highlighting the performance of different fermentation systems. *3 Biotech*, 9(4), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1676-x>

Sinha, P., & Pandey, A. (2011). *An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production*. 6. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>

- Sittijunda, S., & Reungsang, A. (2012). Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(18), 13789–13796. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.126>
- Skonieczny, M. T., & Yargeau, V. (2009). Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3288–3294. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.044>
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2009). *Cellulase production from Aspergillus niger MS82 : effect of temperature and pH*. 25(6), 437–441. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.002>
- Sotelo-navarro, P. X., Poggi-varaldo, H. M., & Turpin-marion, S. J. (2017). *Biohydrogen production from used diapers : Evaluation of effect of temperature and substrate conditioning*. <https://doi.org/10.1177/0734242X16677334>
- Srikanth, S., & Mohan, S. V. (2012). *RSC Advances Regulatory function of divalent cations in controlling the acidogenic biohydrogen production process*. 6576–6589. <https://doi.org/10.1039/c2ra20383a>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Kushwaha, D., Gupta, V. K., Manikanta, A., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2017). Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by *Clostridium pasteurianum* (MTCC116). *Bioresource Technology*, 238, 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.077>
- Sterling, M. C., Lacey, R. E., Engler, C. R., & Ricke, S. C. (2001). Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. *Bioresource Technology*, 77(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00138-3)
- Steyer, J., Guo, X. M., Trably, E., & Latrille, E. (2010). *Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation : A review*. 5. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Stoeglehner, G., Ertl, T., Narodoslawsky, M., & Neugebauer, G. (2016). Renewable energy from wastewater - Practical aspects of integrating a wastewater treatment plant into local energy supply concepts. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.08.168>
- Swathy, R., Rambabu, K., Banat, F., Ho, S. H., Chu, D. T., & Show, P. L. (2020). Production and optimization of high grade cellulase from waste date seeds by *Cellulomonas uda* NCIM 2353 for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(42), 22260–22270. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.171>

T

- Taghinazhad, J., Abdi, R., & Adl, M. (2017). Kinetic and enhancement of biogas production for the purpose of renewable fuel generation by co-digestion of cow manure and corn straw in a pilot scale CSTR system. *International Journal of Renewable Energy Development*, 6(1), 37–44. <https://doi.org/10.14710/ijred.6.1.37-44>

- Tawfik, A., & El-Qelish, M. (2012). Continuous hydrogen production from co-digestion of municipal food waste and kitchen wastewater in mesophilic anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technology*, *114*, 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.016>
- Thungklin, P., Reungsang, A., & Sittijunda, S. (2011). Hydrogen production from sludge of poultry slaughterhouse wastewater treatment plant pretreated with microwave. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(14), 8751–8757. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.073>
- Tondro, H., Musivand, S., Zilouei, H., Bazarganipour, M., & Zargoosh, K. (2020). Biological production of hydrogen and acetone- butanol-ethanol from sugarcane bagasse and rice straw using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*, *142*(September), 105818. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105818>
- Tou, I., & Touzi, S. I. A. (2001). *Production de Biométhane à Partir des Déjections Animales*. 103–108.

U

- Umamaheswari, A., Saranraj, P., G, R. K., Elumalai, S., & Sangeetha, T. (2017). *Bioenergetics : Open Access Synthesis of Bioethanol by Dark Fermentation Using Marine Seaweed Acanthophora spicifera (Vahl .) Borgesen as a Cheap Substrate*. *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2167-7662.1000146>

V

- Van Ginkel, S. W., & Logan, B. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, *39*(16), 3819–3826. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.021>
- Van Ginkel, S. W., Oh, S. E., & Logan, B. E. (2005). Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, *30*(15), 1535–1542. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.017>
- Van Veldhoven, P. P., & Mannaerts, G. P. (1987). Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Analytical Biochemistry*, *161*(1), 45–48. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90649-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90649-X)

W

- Wang, J., & Wan, W. (2009). Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(8), 3313–3323. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.031>
- Wang, W., Xie, L., Chen, J., Luo, G., & Zhou, Q. (2011). Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. *Bioresource Technology*, *102*(4), 3833–3839. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.012>
- Weemaes, M., Grootaerd, H., Simoens, F., & Verstraete, W. (2000). Anaerobic digestion of ozonized biosolids. *Water Research*, *34*(8), 2330–2336.

[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00373-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00373-5)

- Wimonsong, P., & Nitisoravut, R. (2015). Comparison of Different Catalysts for Fermentative Hydrogen Production. *Journal of Clean Energy Technologies*, 3(2), 128–131. <https://doi.org/10.7763/jocet.2015.v3.181>
- Wu, S. Y., Lin, C. N., & Chang, J. S. (2003). Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. *Biotechnology Progress*, 19(3), 828–832. <https://doi.org/10.1021/bp0201354>
- Wu, X., Gao, X., Xu, L., Huang, T., Yu, J., Wen, C., Chen, Z., & Han, J. (2016). ScienceDirect Mn 2 O 3 doping induced the improvement of catalytic performance for oxygen reduction of MnO. *International Journal of Hydrogen Energy*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.216>

X

- Xiao, L., Deng, Z., Fung, K. Y., & Ng, K. M. (2013). Biohydrogen generation from anaerobic digestion of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(32), 13907–13913. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.072>
- Xie, B., Liu, H., & Yan, Y. (2009). Improvement of the activity of anaerobic sludge by low-intensity ultrasound. *Journal of Environmental Management*, 90(1), 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.09.004>
- Xu, S., Selvam, A., & Wong, J. W. C. (2014). Optimization of micro-aeration intensity in acidogenic reactor of a two-phase anaerobic digester treating food waste. *Waste Management*, 34(2), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.038>
- Xuan, J., Leung, M. K. H., Leung, D. Y. C., & Ni, M. (2009). A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. 13, 1301–1313. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.09.027>

Y

- Yang, G., Hu, Y., & Wang, J. (2019). Bioresource Technology Biohydrogen production from co-fermentation of fallen leaves and sewage sludge. *Bioresource Technology*, 285(April), 121342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121342>
- Yang, G., Wang, J., & Shen, Y. (2019). Antibiotic fermentation residue for biohydrogen production using different pretreated cultures: Performance evaluation and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, 292(June), 122012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122012>
- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A., & Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4761–4771. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.038>

Zagrodnik, R., & Łaniecki, M. (2017). Hydrogen production from starch by co-culture of

- Clostridium acetobutylicum* and *Rhodobacter sphaeroides* in one step hybrid dark- and photofermentation in repeated fed-batch reactor. *Bioresource Technology*, 224, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.060>
- Zhang, C., Su, H., Wang, Z., Tan, T., & Qin, P. (2015). Biogas by Semi-Continuous Anaerobic Digestion of Food Waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(8), 3901–3914. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1559-5>
- Zhang, J., Fan, C., & Zang, L. (2017). Improvement of hydrogen production from glucose by ferrous iron and biochar. *Bioresource Technology*, 245(August), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.198>
- Zhang, J., Fan, C., Zhang, H., Wang, Z., Zhang, J., & Song, M. (2018). Ferric oxide/carbon nanoparticles enhanced bio-hydrogen production from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(18), 8729–8738. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.143>
- Zhang, J., Fan, C., Zhao, W., & Zang, L. (2019). Improving bio-H₂ production by manganese doped magnetic carbon. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(49), 26920–26932. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.148>
- Zhang, Y., Liu, G., & Shen, J. (2005). Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(8), 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.05.009>
- Zhao, W., Zhang, Y., Du, B., Wei, D., Wei, Q., & Zhao, Y. (2013). Bioresource Technology Enhancement effect of silver nanoparticles on fermentative biohydrogen production using mixed bacteria. *Bioresource Technology*, 142, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.042>
- Zheng, X., & Yu, H. (2004). Biological Hydrogen Production by Enriched Anaerobic Cultures in the Presence of Copper and Zinc. *Journal of Environmental Science and Health , Part A : Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering*, September 2014, 37–41. <https://doi.org/10.1081/ESE-120027370>
- Zhou, P., Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2013). Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. *Bioresource Technology*, 130, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.069>

ANNEXES

Annexe A Préparation des milieux

- **Solution tampon phosphate pH 5.5**

Solution I. Dissoudre 13,61 g de dihydrogène de phosphate potassium dans l'eau distillée et diluer à 1000,0 mL avec le même solvant.

Solution II. Dissoudre 35,81 g d'hydrogène phosphate disodique dans l'eau et diluer à 1000,0 mL avec le même solvant.

Mélanger 96,4 mL de la solution I et 3,6 mL de la solution II.

- **Solution tampon phosphate pH 6.5**

Dissoudre 13,80 g de dihydrogénophosphate de sodium monohydraté R dans 900 ml d'eau distillée R. Ajuster le pH à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium de 400 g/l R. Diluer à 1000 ml avec de l'eau distillée R.

- **Solution tampon phosphate pH 7**

Jusqu'à 1000 ml d'une solution contenant 18 g/l de phosphate d'hydrogène disodique R et 23 g/l de chlorure de sodium R, ajouter suffisamment (environ 280 ml) d'une solution contenant 7,8 g/l de phosphate de dihydrogène de sodium R et 23 g/l de chlorure de sodium R pour ajuster le pH. Dissoudre dans la solution suffisamment d'azide de sodium R pour donner une solution de 0,2 g/l.

- **Solution tampon phosphate pH 7.5**

Dissoudre 27,22 g de dihydrogénophosphate de potassium R dans 930 ml d'eau R, ajuster le pH à 7,5 avec une solution d'hydroxyde de potassium R de 300 g/l et diluer à 1000,0 ml avec de l'eau R

Annexe B Méthodes de dosage

1. Dosage d'alcalinité (TA et TAC) et de l'acide volatile totale (AVT)

- Centrifuger l'échantillon 8000 tour/min pendant 5 min.
- Recueillir 25 ml de surnageant.
- Mesurer le pH initial de surnageant pH_0 .
- Titrer jusqu'à pH 6 par une solution de HCl (0.1N).
- Noter le volume de HCl consommé (V).
- Continuer le titrage jusqu'à pH 4, puis noter le volume de HCl consommé (V').
- Continuer le titrage jusqu'à pH 3,5.
- Bouillir l'échantillon pendant 3min.
- Laisser refroidir.
- Titrer jusqu'à pH 4 par une solution de NaOH (0.1N).
- Noter le volume de NaOH consommé (V₂).
- Continuer le titrage jusqu'à pH 7.
- Noter le volume de NaOH consommé (V₃).

Calcul :

$$\text{Alcalinité TA (mg CaCO}_3\text{/L) (pH}_6\text{)} = \frac{(V \text{ (ml)} \times \text{Normalité de HCl} \times 50000)}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

$$\text{Alcalinité TAC (mg CaCO}_3\text{/L) (pH}_4\text{)} = \frac{(V' \text{ (ml)} \times \text{Normalité de HCl} \times 50000)}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

$$\text{AVT} = \frac{(V_3 - V_2) \text{ (ml)} \times \text{Normalité de HCl} \times 50000}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

$$\text{AGV} = (\text{TAC} - \text{TA})$$

Où :

50000 =masse équivalent de CaCO₃

Normalité de HCL = 0.1 N.

2. Dosage de TS et TVS

- Peser un creuset vide préalablement séché (M₀.)

- Peser le creuset remplie d'une quantité de l'échantillon (M_1).
- Placer le creuset dans l'étuve à 105°C pendant 24 h.
- Refroidir le creuset dans un dessiccateur.
- Puis peser le creuset après refroidissement (M_2) (la masse restante correspond aux matières sèches TS).
- Placer le creuset dans un four à moufle à 550°C pendant 2 h.
- Refroidir le creuset dans un dessiccateur.
- Peser le creuset après refroidissement (M_3) (La matière restante dans le creuset correspond à la matière minérale).

Calcul

$$\text{TS} \left(\frac{\text{g TS}}{\text{L}} \right) = \frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \times 10^3$$

$$\text{TVS (g TVS/L)} = \frac{(M_2 - M_0) - (M_3 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \times 10^3$$

3. Mesure de la demande chimique on oxygène (DCO) totale et soluble

- Dans un tube spécifique au thermo-réacteur, ajouter 1.5 ml de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) à 0.1 N et 3.5 ml d'acide sulfurique pure à 98%.
- Ajouter 2.5 ml de l'échantillon dilué ou de l'eau distillée pour le blanc.
- Préparer 2 répétitions pour le blanc et pour chaque échantillon.
- Placer les échantillons dans le thermo-réacteur à 150°C pendant 2h.
- Après refroidissement, verser le contenu des tubes dans des petits béchers.
- Ajouter à chaque bécher une goutte d'indicateur coloré (Ferroïne).
- Titrer avec le FAS 0.1 N (Sel de Mohr $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) jusqu'au virage de couleur (couleur noir cidre) et noter le volume consommé V.
- La détermination de la DCO soluble se fait en suivant les mêmes étapes, après filtration de l'échantillon par un filtre de 0.45µm avant la dilution.

$$\text{DCO (mg/L)} = (V \text{ blanc} - V \text{ échantillon}) \cdot \text{Molarité de (FAS)} \cdot \text{F} \cdot 8000$$

Où :

F : facteur de dilution,

8000 : nombre équivalent de l'oxygène.

4. Concentration cellulaire

- Remplir la cuve de spectrophotomètre avec l'échantillon.

- Lire l'absorbance (DO : densité optique) à 600 nm.

$$DCW = (0.258 \times DO) + 0.001$$

5. Dosage des carbohydrates

- Mettre 0.5 ml d'échantillon dans un tube à essai ;
- Ajouter 0.5 ml de phénol à 5% (5 g de phénol dans 100 ml d'eau distillée),
- Homogénéiser le mélange par un vortex ;
- Ajouter 2.5 ml d'acide sulfurique concentré 98% ;
- Agiter et laisser reposer 10 min à l'obscurité à température ambiante ;
- Lire l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (le spectrophotomètre utilisé est : PERSEE - T6U-T6V).
- Les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage.
- La courbe d'étalonnage est réalisée par dix solutions étalons de concentration allant de 0 à 50 mg/ml d'une solution étalon de glucose (w/v), (1 ml pour chaque solution) ; l'eau physiologique est utilisée comme diluant.

Courbe d'étalonnage

Tableau 01 : Courbe d'étalonnage des sucres

Sucre (g/L)	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,5
Densité optique	0,213	0,336	0,471	1,016	1,636	3,37

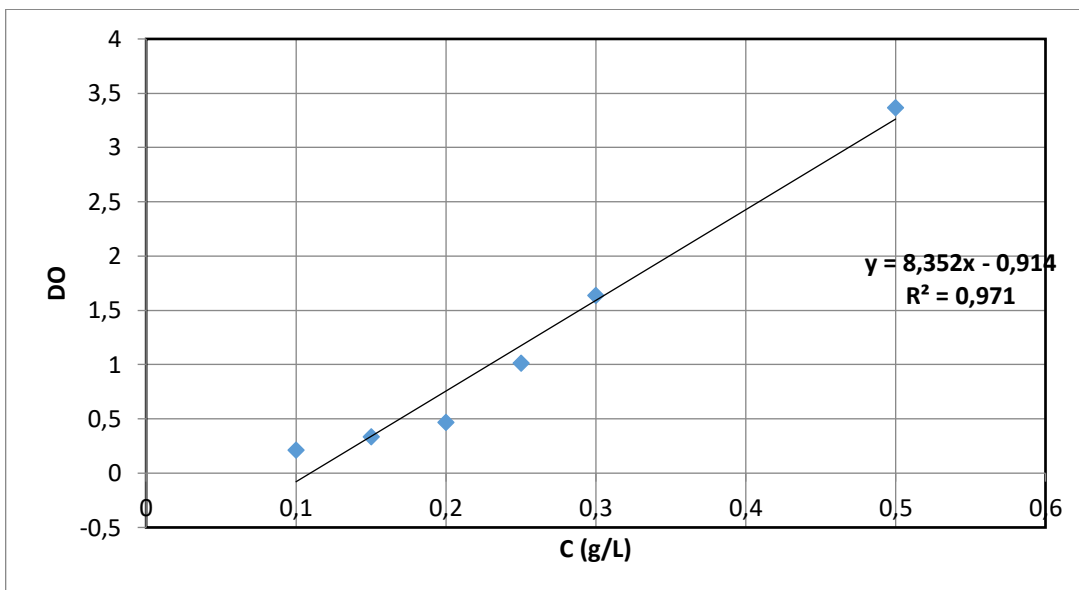


Figure 18 : Courbe d'étalonnage des carbohydrates

6. Dosage des protéines

Réactifs

- **A** : Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH 0,1 N.
- **B** : tartrate double de Na et K à 2% dans l'eau distillée.
- **C** : $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau distillée.
- **M**: Un mélange constitué de quantité égale de 3 solutions précédentes (1:1:1)(A:B:C).
- **Réactif de Folin** dilué à 1/3.

Protocole

- Mettre 1 ml d'échantillon dans un tube à essai ;
- Ajouter 5 ml de solution M ;
- Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante ;
- Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin ;
- Agiter et laisser reposer 30 min à température ambiante à l'obscurité ;
- Lire l'absorbance à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (le spectrophotomètre utilisé est : PERSEE - T6U-T6V).

- Les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de protéine par référence à une courbe d'étalonnage.
- Le courbe étalon est établi avec une solution de sérum albumine bovine (BSA).

Courbe d'étalonnage

Tableau 02 : courbe d'étalonnage des protéines

Protéine (g/L)	0	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Densité optique	0	0,191	0,225	0,23	0,263	0,352	0,418

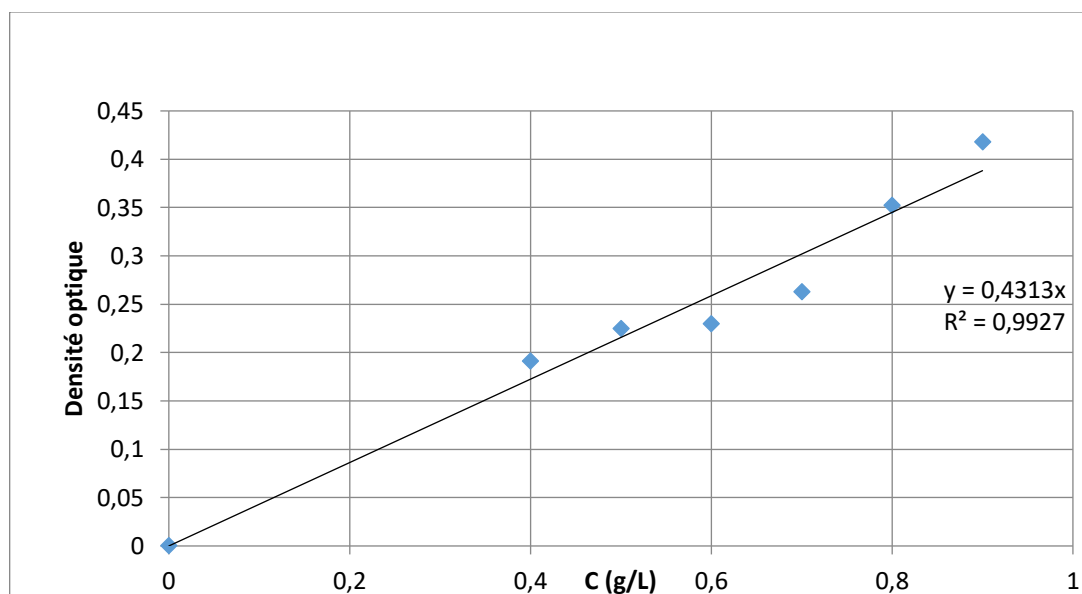


Figure 19 : Courbe d'étalonnage des protéines

7. Mesure de la densité

- Mettre dans une éprouvette une masse de solide de broyée équivalente à un volume V_1 de 1 ml.
- Noter la masse m_1 (g).
- Calculer la masse volumique apparente.

$$\rho_a = \frac{m_t}{V_t} = \frac{m_1}{V_1}$$

- Ajouter du méthanol jusqu'à atteindre un volume total de V_2 de 2 ml correspondant à une masse totale.

- Noter la masse m_2 .
- Calculer la porosité au moyen de l'équation suivante :

$$\text{La porosité } (\varepsilon) = \frac{\frac{m_2 - m_1}{\rho_{\text{méthanol}}} - V_2}{V_t} \times 100$$

Où :

$$V_2 = V_t - V_1 = 1 \text{ mL}$$

$\rho_{\text{méthanol}}$ = masse volumique de méthanol (kg/L ou g/ml)

- Calculer la masse volumique réelle

$$\rho_r = \frac{\rho_a}{(1 - \varepsilon)}$$

8. Mesure de l'azote total kjeldahl

1. Phase d'incinération

- Peser environ 1 g d'échantillons.
- L'échantillon pesé est placé dans les tubes Kjeldahl.
- 1 comprimé Kjeldahl est jeté dans les tubes Kjeldahl ajoutés comme catalyseur.
- 10 mL de H₂SO₄ à 98 % y sont ajoutés et brûlés pendant 80 minutes à 4200C sur l'unité d'incinération.

2. Phase de distillation

Les tubes Kjeldahl retirés de l'unité d'incinération pendant un certain temps (15-20dk.) avant de passer à la phase de distillation, laisser refroidir.

Il est ensuite placé dans l'unité de distillation en ajoutant 25 ml d'eau pure dans les tubes.

Il est placé dans l'unité de distillation de fusion contenant 25 ml de solution d'acide borique correspondant à chaque tube Kjeldahl.

Ensuite, en appuyant sur le bouton NaOH de l'unité de distillation, on ajoute 50 ml de tubes Kjeldahl de la solution de NaOH à 35 % à environ 125 ml de vapeur (gaz ammoniacal).

3. Phase de titrage

10 gouttes de solution rouge de méthyle sont ajoutées au distillat sortant de l'unité de distillation.


La couleur se transforme en vert herbe, puis la couleur est vibrée avec 0,2 moles HCl jusqu'à ce qu'il soit gris et rose flasque et la charge est enregistrée.

Solutions utilisées


Acide borique (4 %).

Annexe C : Articles scientifiques.

ENERGY SOURCES, PART A: RECOVERY, UTILIZATION, AND ENVIRONMENTAL EFFECTS
<https://doi.org/10.1080/15567036.2021.1877853>



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group



Production of bio-hydrogen from bulgur processing industry wastewater

Esma Mahfouf Bouchareb^{ab,c}, Derbal Kerroum^d, Ezgi Bezirhan Arıkan^e, Zelal Isik^c, and Nadir Dizge^c

^aFaculty of Process Engineering, Salah Boubnider University, Constantine, Algeria; ^bNational High School of Biotechnology, Toufik Khaznadar, Constantine, Algeria; ^cDepartment of Environmental Engineering, Mersin University, Mersin, Turkey; ^dNational High School of Polytechnic, Malek Bennabi, Constantine, Algeria

ABSTRACT

Hydrogen as a clean energy source has a great attention worldwide due to decreasing fossil fuel reserves and rising environmental pollution. Although many types of wastewater have been tested as a cheap substrate in biohydrogen production, the bulgur processing industry wastewater which contains high organic matter has not yet evaluated. This study highlights bulgur processing industry wastewater as a potential substrate for biohydrogen production by dark fermentation. The effects of anaerobic sludge pretreatment methods (thermal and ultrasonic), applying durations (5 and 15 min) for these pretreatment methods, and the ratio of inoculum: substrate (I:S) (1:2, 1:3, 1:4, 1:6 gVS.g⁻¹VS) were investigated in lab-scale batch reactors (at 35°C, pH = 5.5, 16 days of incubation time). Biochemical hydrogen potential (BHP) test results showed that the maximum cumulative bio-hydrogen production of 90.83 mL H₂ g⁻¹ VS_{added} was obtained from inoculums thermally pretreated and a ratio of I:S ratio = 1:3 on day 16. In addition, the highest yield of bio-hydrogen was 54.076 mL H₂ g⁻¹ VS_{added} obtained from inoculums pretreated by ultrasonic method and ratio of I:S = 1:6. Kinetics from the Gompertz model was used to evaluate the determination of cumulative hydrogen production. Gompertz model showed that BHP tests and simulated hydrogen production potential (H_{max}) values were approximately similar to the experimental ones.

ARTICLE HISTORY

Received 26 October 2020
 Revised 8 January 2021
 Accepted 12 January 2021



KEYWORDS

Anaerobic sludge pretreatment; biochemical hydrogen potential; bulgur wastewater; dark fermentation

Introduction

The presence of the gap between energy demand and availability (Yadav et al. 2020) is increased constantly due to population growth, progressive industrialization, and the development of technologies (Guo et al. 2010). Presently, the main part of the produced total energy in the world is obtained from fossil fuels which is a nonrenewable energy source (Ren et al. 2020). But, it is known that the combustion of fossil fuels releases pollutants into the atmosphere which causes health problems and global climate change (Keskin et al. 2018). Therefore, to meet the increasing energy demands and reduce environmental pollutions (Ren et al. 2020), the use of clean energy sources such as hydrogen, biomass, wind, and solar has gained great attention recently (Hosseini and Wahid 2016).

Among the clean energy sources, hydrogen generation is considered an effective and economic alternative due to its advantages including its higher energy yield (142 kJ.g⁻¹) (Ghimire et al. 2015), production of zero carbon emissions, and higher energy-carrying efficiency (Rambabu et al. 2021). In addition to that, it can be utilized in chemical cells or internal combustion engines for producing electricity (Cremonese et al. 2019). At present, hydrogen is used in many industrial areas such as

CONTACT Nadir Dizge  ndizge@mersin.edu.tr  Department of Environmental Engineering, Mersin University, Mersin, 33343, Turkey.

© 2021 Taylor & Francis Group, LLC



Nom et Prénom : MAHFOUF Esmâ ep BOUHAREB

Titre : Utilisation des déchets organiques biodégradables pour la production de biohydrogène par fermentation obscure

Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat Science en Génie des Procédés en Génie de l'environnement

Résumé

La production de biohydrogène par fermentation obscure est considérée comme voie prometteuse permettant l'utilisation d'énergie propre et renouvelable ; parallèlement les déchets municipaux et industriels générés quotidiennement en quantités élevées présentent un immense problème de pollution environnementale. Cette étude est concentrée sur la valorisation de quatre déchets (les eaux usées industrielles de Bourgoul, les eaux usées de l'industrie laitière, le marc de café et les pelures de pomme de terre) en biohydrogène par culture mixte ainsi que l'amélioration des taux de production obtenus par différentes techniques : prétraitements physicochimiques et biologiques du substrat, la catalyse par les nanoparticules métalliques, la cofermentation ainsi que l'utilisation d'une culture pure productrice d'hydrogène (*Escherichia coli*) ; l'effet inhibiteur de quelques sels métalliques a été aussi évalué. L'analyse cinétique des résultats expérimentaux a été réalisée par les modèles du *GOMPERTZ* et *LOGISTIQUE* modifiés.

Les résultats expérimentaux ont montré que tous les substrats bruts utilisés peuvent être valorisés en biohydrogène avec des taux de 143.72, 178.89, 210.13, 282.61 mL/gVS générés par les eaux usées de l'industrie laitière, les eaux usées industrielles de Bourgoul, les pelures de pomme de terre et le marc de café respectivement ; les essais d'amélioration du taux de production de biohydrogène ont été réussis avec succès avec un maximum d'amélioration par le prétraitement enzymatique de 4,236 et 8,27 fois en utilisant les eaux de l'industrie laitière, les pelures de pomme de terre respectivement. Il a été aussi observé que la présence des nanoparticules métalliques dans le milieu de fermentation des eaux de l'industrie laitière améliore le rendement de production jusqu'à 5,4 fois en utilisant les nanoparticules d'oxyde de cuivre. L'essai d'amélioration par cofermentation des eaux de l'industrie laitière et le marc de café a conduit à une amélioration de 2,65 fois. Enfin l'utilisation de la culture pure (*Escherichia coli*) a résulté un rendement moyennement faible de production de biohydrogène et son utilisation combinée par le prétraitement thermique du substrat a donné lieu à l'augmentation du taux d'amélioration de 0,76 fois. La présence des sels de métaux dans le milieu de fermentation obscure du marc de café a engendré des toxicités variées de la culture productrice d'hydrogène avec des différences dues à leur nature différente.

La modélisation des résultats expérimentaux a montré une bonne approche et une excellente détermination de l'évolution de la production cumulée d'hydrogène et le modèle *GOMPERTZ* modifié a été le plus approprié.

Mots clés : biohydrogène, fermentation obscure, culture mixte, *Escherichia coli*, déchets alimentaires.

Directeur de thèse : Kerroum DERBAL – Ecole Nationale Polytechnique de Constantine

Année Universitaire : 2022-2023

