



HAL
open science

Étude et mise en oeuvre d'un bioprocédé membranaire de production d'hydrogène combinant électromicrobiologie et fermentation sombre

D. Truong

► **To cite this version:**

D. Truong. Étude et mise en oeuvre d'un bioprocédé membranaire de production d'hydrogène combinant électromicrobiologie et fermentation sombre. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0376 . tel-04717862

HAL Id: tel-04717862

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04717862v1>

Submitted on 2 Oct 2024

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des
Molécules Procédés Produits et Énergie



Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Molécules, des Produits, des
Procédés, et de l'Énergie (SIMPPÉ)

Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP)
Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et
l'Environnement (LCPME)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Procédés biotechnologiques

Par **Delphine TRUONG**

Sous la direction de Emmanuel GUEDON et Mathieu ETIENNE

Etude et mise en œuvre d'un bioprocédé membranaire de production d'hydrogène combinant électromicrobiologie et fermentation sombre

18 décembre 2023

Membres du jury

Pr. Barbara ERNST	Professeure, CNRS, IPHC, Strasbourg – Présidente du jury et rapportrice
Dr. Frédéric BARRIERE	Maître de conférences, CNRS, ISCR, Rennes - Rapporteur
Dr. Frédérique CHANGEY	Maîtresse de conférences, CNRS, LCPME, Nancy – Examinatrice
Dr. Emmanuel GUEDON	Directeur de recherche, CNRS, LRGP Nancy – Directeur de thèse
Dr. Mathieu ETIENNE	Directeur de recherche, CNRS, LCPME, Nancy – Co-directeur de thèse

“Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts”

“Success is going from failure to failure without losing enthusiasm”

Winston Churchill

REMERCIEMENTS

Au terme de ces quatre années de thèse, je souhaiterais remercier tout d'abord mes deux directeurs de thèse, Emmanuel Guedon et Mathieu Etienne pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leur équipe respective : BioProMo au LRGP et ELAN au LCPME. Je les remercie également pour le temps qu'ils m'ont accordé et les conseils qu'ils m'ont apportés pendant ce projet de thèse, y compris dans les périodes difficiles liées à la pandémie, au Brexit ou les différents problèmes analytiques rencontrés.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Pr. Barbara Ernst, Dr. Frédéric Barrière et Dr. Frédérique Changey, qui ont accepté d'évaluer cette thèse et, par la même occasion, de me livrer ainsi leurs retours, avis, et conseils.

Je souhaite remercier Xavier Framboisier pour son écoute et son aide notamment pour toute la partie chromatographie en phase gazeuse et pour le couplage du bioréacteur en ligne. (Il a été difficile à mettre en place le système en place avec une bonne détection des gaz mais nous y sommes parvenus.)

Merci également à Gérard Paquot pour son aide sur le montage de bioréacteurs et pour m'avoir guidé sur la création du bioréacteur tubulaire. Ce dernier, même s'il demeure perfectible, s'est avéré être utile pour la compréhension du système mentionné ci-avant et la mise en place des différents essais expérimentaux.

Je remercie Benjamin Rivard et Adrienne Mangin de la ferme expérimentale de « La Bouzule », ainsi que Vincent Bourot et « Methanason » pour s'être rendus disponibles pour me permettre de prélever du digestat afin de mener à bien les expérimentations.

Je voulais également remercier l'ensemble de l'équipe BioProMo et ELAN, avec une pensée pour Ahmed qui est parti pour de nouvelles aventures, notamment pour les moments passés, leur écoute et les conseils reçus. Que ce soit de la part des permanents ou des contractuels et doctorants, leur soutien et les fous rires ont été un pilier tout le long de cette thèse, ce qui m'a permis d'avancer et de prendre du recul sur le sujet de thèse.

Je remercie sincèrement Julie et Damira pour leurs travaux durant la thèse lors de leurs stages au LRGP. J'ai été ravie de travailler avec vous, même s'il y a eu beaucoup d'échecs au niveau des expérimentations, c'est en apprenant de ses (et ces) erreurs qu'on évolue, ainsi vous avez été d'une grande aide dans le projet et vous avez apporté votre contribution à son avancement.

Je voudrais également remercier chaleureusement tous mes collègues de bureau Pilar, Laureline, Eusèbe, Chafik, Amani, Yaouba, en plus de Liliane et Ibrahima pour leur aide, leurs « conseils des anciens », nos échanges, notre solidarité et les moments passés dans ce bureau mais aussi en dehors du laboratoire.

Enfin, j'aimerais également exprimer ma gratitude auprès de tous mes proches et de ma famille, ainsi qu'auprès de Vincent et de Chloé, qui ont su m'épauler par leur bienveillance, leur soutien inconditionnel, leur patience et leur présence tout le long de la thèse.

Table des matières

INTRODUCTION	21
ETAT DE L'ART	29
1. La filière hydrogène H ₂	30
1.1. Les enjeux liés à l'hydrogène	30
1.2. L'hydrogène dans l'industrie mondiale aujourd'hui	31
1.3. Les principales méthodes de production d'hydrogène	32
2. Procédés de bio-production d'hydrogène	33
2.1. La biophotolyse.....	34
2.2. La photo-fermentation	36
3. La fermentation sombre	37
3.1. La fermentation sombre dans la méthanogénèse	37
3.2. Les principales voies de production d'H ₂	39
3.3. Voies concurrentes et consommatrices à la production d'hydrogène	41
3.4. L'hydrogénase.....	43
3.6. Les bioréacteurs anaérobies à membranes – AnBRM.....	47
3.7. Les membranes	48
3.8. Utilisation de gaz vecteurs pour une meilleure production d'hydrogène.....	51
3.9. Utilisation du vide pour une meilleure production d'hydrogène.....	52
3.10. Les principales populations microbiennes retrouvées dans les déchets agricoles propices à la fermentation sombre	53
4. Procédés électromicrobiologiques.....	54
4.1. Transfert d'électron extracellulaire	55
4.2. Transfert direct des électrons	56
4.3. Transfert indirect des électrons	57

4.4. Les biofilms microbiens	58
4.4. La <i>pile microbienne</i> (PM)	62
4.5. La <i>cellule d'électrolyse microbienne</i> (CEM).....	64
4.6. Les procédés de type <i>Snorkel</i> ou en court-circuit	66
4.7. Electrofermentation	66
4.8. Les potentiels redox possibles à la cathode	67
4.9. Les électrodes	69
5. Combinaison de la CEM et de la AnBRM.....	71
5.1. L'avantage des cultures mixtes.....	79
5.2. Conclusion de l'état de l'art.....	80
6. Objectifs de la thèse.....	82
MATERIELS ET METHODES	85
1. Matériels	85
1.1. Les membranes.....	85
1.2. Cellule à trois électrodes	85
1.3. Les réacteurs.....	86
1.4. Solutions et milieu utilisés pour la sélection de la membrane tubulaire, les essais d'extraction de l'H ₂ et les cultures en bioréacteur.....	88
2. Méthodes analytiques	89
2.1. Suivi et analyses électrochimiques	89
2.1.2. Analyse par voltamétrie cyclique – CV	90
2.2. Détection et mesure de H ₂ et de CH ₄ produit au cours du procédé	91
2.3. Analyse microbiologique	93
3. Designs des bioréacteurs utilisés	94
3.1. Tests préliminaires pour la production d'H ₂ par électrolyse forcée à courant imposé ...	94
3.2. Choix du design du système	95

Choix et caractérisation des matériaux et dispositifs analytiques mis en œuvre pour la production de bioH₂ dans des bioréacteurs combinant l'électromicrobiologie et à la fermentation sombre.	101
1. Choix des matériaux pour la constitution des électrodes	102
1.1. Caractéristiques des électrodes.....	102
1.2. Réactivité des membranes tubulaires à la cathode	106
1.3. Courbe de réduction des protons au niveau de la membrane silicone carbone (cathode) pour la production H ₂	108
2. Capacité d'extraction de l'hydrogène par la membrane tubulaire en silicone carbone – Utilisation d'un capteur à hydrogène	109
2.1. Mesure qualitative de l'hydrogène	110
2.2. Capacité d'extraction de la membrane tubulaire pour des courants faibles.....	116
3. Conclusion du chapitre	124
Mise en œuvre du procédé de production de bio-hydrogène dans un bioréacteur combinant la fermentation sombre et l'électrofermentation	127
1. Choix du design du bioréacteur	128
1.1. Introduction de l'article	128
1.2. Choix du design expérimental du système, suivi de production d'H ₂ et première approche de la population microbienne	130
2.1. Experimental design	134
2.2. Culture conditions	135
2.5. Microbial community analysis	137
1.3. Principaux résultats de l'article.....	161
2. Analyse bio-électrochimique et suivi de la production des gaz dans du digestat traité thermiquement avant culture.....	163
2.1. Effet du traitement thermique sur le digestat avant mise en culture dans le bioréacteur.....	163

2.2. Effet des conditions expérimentales sur les cinétiques de production de H ₂ et de CH ₄ dans le bioréacteur.....	166
3. Effet du traitement thermique sur la dynamique des populations microbiennes au cours du procédé.....	167
3.1. Abondance des populations retrouvées et homogénéité de ces dernières en fonction du digestat non traité ou traité thermiquement	167
3.2. Similarité entre les populations de chaque échantillon issu du bioréacteur en fonction des conditions expérimentales.	170
3.3. Principales classes de microorganismes retrouvées dans les échantillons prélevés dans le milieu traité et non traité au cours du procédé	171
4. Conclusions du chapitre :.....	175
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	177
Références bibliographiques.....	185

Liste des figures

- Figure 1-1** : Répartition des principales méthodes de production d'H₂ en France, selon la matière première utilisée (Rte, 2020).....19
- Figure 1-2** : Représentation schématique d'un couplage de la fermentation sombre et de l'électrolyse microbienne en deux étapes pour la production de bioH₂. La première étape est une fermentation des composés organiques en condition anaérobie permettant de produire une partie du bioH₂ et des acides organiques tels que l'acétate ou le butyrate. La seconde étape consiste à récupérer les effluents issus de la fermentation, contenant les acides afin de les oxyder à l'aide d'un biofilm électroactif sur l'anode. Dans ces conditions, des protons sont produits mais également un flux d'électrons dans un circuit électrique, qui est relié à une cathode où la réduction des protons en H₂ se réalise.22
- Figure 1-3** : Schéma récapitulatif des objectifs et du cheminement de la thèse.....25
- Figure 2-1** : Les principales voies biologiques de production d'hydrogènes selon deux principes – celles « dépendantes de la lumière », utilisant des microorganismes et les photons pour la production d'hydrogène comme la biophotolyse et la photofermentation ; celles « non dépendantes de la lumière », utilisant des microorganismes chimiotrophes pour la production d'hydrogène comme la fermentation sombre et la cellule d'électrolyse microbienne (Ghimire et al., 2015).....31
- Figure 2-2** : Schéma simplifié d'une biophotolyse directe. L'énergie lumineuse est utilisée pour le processus de photosynthèse libérant des molécules d'eau et des cofacteurs réduits. Ces derniers seront ensuite réoxydés par une hydrogénase pour la production d'H₂ (Hallenbeck et Benemann, 2002).....33
- Figure 2-3** : Voies générales de dégradation de la matière organique en conditions anaérobies (Trably et al., 2018).....37
- Figure 2-4** : Principales voies métaboliques en fermentation sombre, (Vasconcelos, 1991 ; Clion, 2016 ; Lopez, 2016 – modifié). La voie acidogénèse est la voie permettant la formation de cofacteurs réduits via les voies de production d'acides tels que l'acétate et le butyrate (rouge), permettant la production d'H₂ à l'aide de l'hydrogénase par réoxydation de ces cofacteurs. La

solvatogenèse est la voie concurrente produisant des solvants et des cofacteurs oxydés (bleu), ne permettant pas la production d'H₂.....38

Figure 2-5 : Echelle de pH simplifiée des voies métaboliques et de la production d'H₂ en fonction du pH (Fan, 2004 ; Ginkel et al., 2001 ; Nath and Das, 2004 ; Özgür et al., 2010). Le pH optimal pour la production d'H₂ se trouve entre 5,5 et 6. En dessous, les protons deviennent prédominants, pouvant limiter la production, jusqu'à l'inhiber. Au-dessus du pH 6, la production d'H₂ diminue et se rapproche de la consommation d'H₂ par d'autres microorganismes tels que les méthanogènes.....40

Figure 2-6 : Schéma des différents transferts d'électrons extracellulaires au niveau de l'anode. Transfert direct - a : par contact direct de la cellule sur l'électrode, b : par contact via des nanofils conducteurs. Transfert indirect - c : par des médiateurs solubles présents dans le milieu d : par des médiateurs excrétés dans le biofilm.....54

Figure 2-7 : Schéma montrant les étapes de la formation et la colonisation d'un biofilm sur une surface. Les microorganismes en suspension se déposent sur la surface (Dépôt) et s'y adhèrent afin de commencer à la coloniser (Adhésion). Les microorganismes vont par la suite excréter des composés permettant de former une structure tridimensionnelle et ainsi créer une structure permettant l'échange de molécules ou de nutriments au sein du biofilm (Maturation). Vient ensuite le décrochage d'une partie du biofilm lié à des événements environnementaux et à l'épaisseur du biofilm (Dispersion) qui viendra se déposer plus loin sur la même ou sur une autre surface (Propagation).....57

Figure 2-8 : Schéma d'une pile microbienne avec membrane échangeuse d'ion (Schaetzel et al., 2008). La chambre anodique est composée d'une électrode et d'un biofilm microbien fixé dessus permettant l'oxydation de la matière organique (substrat) afin de produire un flux d'électrons pouvant circuler dans un circuit électrique. Des protons sont également produits et, pour cet exemple, des ions passent à travers la membrane échangeuse d'ions entre la chambre anodique et la chambre cathodique. La chambre cathodique contient également une électrode qui peut réduire l'oxygène en eau ou réagir avec un autre accepteur d'électron.....61

Figure 2-9 : Schéma d'une cellule d'électrolyse microbienne sans membrane échangeuse d'ion. Les électrodes sont dans un seul et même compartiment. L'anode et la cathode sont séparées par l'électrolyte et un biofilm est implanté sur chaque électrode. La matière organique est oxydée à

l'anode, libérant des protons et un flux d'électrons issus du métabolisme microbien. Les protons sont ensuite réduits à la cathode à l'aide du flux d'électrons arrivant. Cette réaction nécessite un apport d'énergie supplémentaire par courant ou potentiel imposé à l'aide d'un générateur de puissance ou d'un potentiostat.....63

Figure 3-1 : A : Cellule électrochimique en plastique de 2,5 cm de diamètre contenant un trou de 0,5 cm au centre permettant le contact de l'électrode de travail avec les solutions utilisées lors des expérimentations préliminaires. B : Cellule électrochimique en plastique avec un bouchon en plastique par-dessus, limitant l'arrivée de l'O₂, avec un emplacement pour la contre-électrode, l'électrode de travail et une arrivée de gaz. Un flux d'azote de 0,39 L/min est introduit dans la solution pendant 15 min puis dans le ciel de la cellule pendant les mesures.....85

Figure 3-2 : Représentation d'une voltamétrie cyclique réalisée dans une solution contenant un couple redox ox/red avec I_{pa} : le courant maximal mesuré au niveau du pic d'oxydation, I_{pc} : le courant maximal observé au niveau du pic de réduction et ΔE_p : la différence de potentiel entre les deux pics (Smida, 2018, modifié).....89

Figure 3-3 : Design de l'expérimentation sur la capacité d'extraction de la membrane. La membrane entoure une grille d'inox. Le feutre de carbone se trouve autour des deux matériaux. Un flux d'azote est utilisé pour maintenir une anaérobiose dans le ciel du réacteur en début d'expérience avant d'être arrêté. Un flux d'azote à 0,11 L/min a par la suite été introduit en continu dans la membrane.....93

Figure 3-4 : Premier design expérimental du bioréacteur. Le flux de N₂ est introduit dans le ciel du réacteur pour établir une atmosphère anoxique avant d'être arrêté. Un flux d'air ou de N₂ à 0,11 L/min est utilisé comme gaz vecteur dans la membrane.....94

Figure 3-5 : Second design expérimental du bioréacteur. Le N₂ est utilisé en premier lieu pour créer les conditions anoxiques dans le ciel du réacteur. N₂ ou Ar est utilisé comme gaz vecteur à 0,11 L/min dans la membrane.....95

Figure 3-6 : Troisième design expérimental du bioréacteur. Le N₂ est d'abord utilisé dans le ciel du réacteur pour créer un environnement anoxique. Un vide a ensuite été créé dans la membrane afin de récupérer les gaz produits par le système.....96

Figure 4-1 : Membranes tubulaire composite sélectionnées pour la mise en place du procédé. (A) Silicone carbone (B) Silicone nickel.....	103
Figure 4-2 : Voltamétrie cyclique des membranes tubulaires en A. silicone carbone et B. silicone nickel dans une solution de 0,1 M KCl et 1 mM de ferrocène-méthanol. Vitesse de balayage : 5 mV/s.....	105
Figure 4-3 : Voltamétrie cyclique de la membrane tubulaire en silicone carbone 1 et 0,6 réalisée dans une solution de KCl 0,1M afin d'observer la courbe de réduction des protons en H ₂ en présence d'un flux de N ₂ . La vitesse de balayage est de 5 mV/s.....	106
Figure 4-4 : Montage de la cellule expérimentale permettant de détecter qualitativement le H ₂ produit avec 1 : contre-électrode en feutre de carbone, 2 : électrode de référence Ag/AgCl, 3 : électrode de travail en platine, 4 : entrée du gaz et 5 : sortie du gaz.....	109
Figure 4-5 : Réponse en courant du capteur à hydrogène en présence d'un flux de H ₂ à 80 % dans une solution de KCl et HCl 0,1 M.....	110
Figure 4-6 : Réponse en courant du capteur à hydrogène en fonction de la présence ou de l'absence des courants de -50 et -100 mA, -200 mA et -500 mA imposés à une grille en inox dans une solution de H ₂ SO ₄ 0,1 M.....	113
Figure 4-7 : (A) Montage de la cellule électrolytique composée de 1 : un feutre de graphite, 2 : une grille en inox, 3 : un séparateur poreux, 4 : une électrode de référence Ag/AgCl, 5 : digestat filtré, 6 : le capteur à hydrogène et 7 : la membrane tubulaire en silicone carbone fine 0,6 d'une longueur de 2m. (B) réponse en courant du capteur d'hydrogène lorsqu'aucun courant n'est imposé et lorsque les courants de 10 et 25 mA sont imposés.....	116
Figure 4-8 : Schéma du procédé utilisé en ligne avec la microGC. 1 : feutre de graphite ; 2 : membrane tubulaire en silicone carbone fine ; 3 : polymère isolant les deux électrodes ; 4 : digestat filtré ; 5: tube en inox isolé ; 6 : électrode de référence AgAgCl ; 7 : sortie de gaz de sécurité ; 8 : grille en inox.....	118
Figure 4-9 : Suivi de l'évolution du (A) potentiel de la membrane et de (B) la production de CH ₄ et de H ₂ en fonction des courants -25, -50, -100, -500, -1000, -2000, -3000, -4000, -5000, -25000 et -100000 µA imposés au montage du procédé pour une production de H ₂ à la membrane et une	

fois que chaque courant imposé est arrêté.....120

Figure 4-10 : Suivi du potentiel de la membrane tubulaire en silicone carbone 1 et du feutre en fonction des courants imposés.....121

Figure 5-1 : Evolution temporelle de la réponse électrochimique et analyses des gaz du procédé en fonction des multiples traitements thermiques réalisés sur le digestat après a : deux traitements thermiques à 80 °C pendant 45 min ; b : deux traitements thermiques à 80 °C pendant 45 min ; c : un traitement thermique à 80°C pendant 2h30 ; d : deux traitements thermiques à 121 °C pendant 20 min ; e : deux traitements thermiques à 121 °C pendant 20 min ; et f : 3 traitements thermiques à 121 °C pendant 1h. (A) Suivi du potentiel et du courant du bioréacteur en court-circuit, en présence de vide (courbe simplifiée) (B) Suivit de la production des gaz CH₄ et H₂ au niveau de la membrane tubulaire et (C) au niveau du ciel du bioréacteur.....163

Figure 5-2 : Détermination de l'index de Pielou et observation de l'abondance des populations retrouvées dans les échantillons provenant d'un milieu traité ou non traité thermiquement avec MST : milieu sans traitement thermique, T0 : prélèvement avant culture, T180h : prélèvement après 180h de culture, T600h : prélèvement après 600h de culture pour les bioréacteurs R1 et R2. * et ** montre si la différence est significative entre les échantillons.....167

Figure 5-3 : Carte de similarité des populations dans les échantillons issus d'un digestat traité (bleu) ou non (rouge) traité thermiquement et les milieux avant culture (vert) pour le bioréacteur R1 et R2 – test PCoA. L'ordonnée et l'abscisse montrent la distance de dissimilarité entre les échantillons.....169

Figure 5-4 : Distributions des principales classes de population microbiennes présentes dans les échantillons A: issus d'un bioréacteur dont le milieu n'a subi aucun traitement avec TOR1, le milieu initial ; MbR1, les biofilms de la membrane ; GFR1, les biofilms du feutre de graphite et MR1, le milieu en fin de culture et B : issu du bioréacteur dont le milieu a été traité thermique à 200h après avoir eu un pré-culture (bioréacteur discuté dans l'article) avec TOR2, le milieu initial ; MbR2, le biofilm issu de la membrane avant traitement ; GFR2, le biofilm issus du feutre de graphite avant traitement, MR2, le milieu avant traitement, MBTR2, le biofilm de la membrane en fin de culture, après traitement thermique du milieu, GFTR2, le biofilm du feutre de graphite en fin de culture,

après traitement thermique du milieu et MTR2, le milieu en fin de culture, après traitement thermique du milieu.....171

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des différentes membranes utilisées pour la production d' H_2 ainsi que leur avantage et inconvénients.....	50
Tableau 2: Matériaux principalement retrouvés en CEM à l'anode et la cathode	70
Tableau 3 : Liste exhaustive des différents systèmes étudiés combinant de la fermentation sombre (BRM) et la cellule d'électrolyse microbienne (CEM) ou la pile microbienne (PM).....	73
Tableau 4 : Référence et épaisseur des trois membranes tubulaires sélectionnées.....	85
Tableau 5: Résistivité volumique des matériaux utilisés pour la membrane tubulaire selon le fabricant (Getelec).	105

Liste des abréviations

ΔE_p : Différence de potentiel entre deux pics d'une voltamétrie cyclique d'un couple redox

ΔG_r° : Enthalpie de Gibbs

microGC : Micro-chromatographie à phase gazeuse

η_{EF} : Coefficient d'électrofermentation

AnBRM : Bioréacteurs anaérobies à membrane

ATP : Adénosine Triphosphate

bioH₂ : dihydrogène produit par voie biologique

CV : Voltamétrie cyclique

DF : *Dark fermentation*/ fermentation sombre

E : Potentiel d'équilibre du système

E_a : Potentiel d'équilibre à l'anode

E_c : Potentiel d'équilibre à la cathode

ECN : *Electrochemical noise*/bruit électrochimique

E_{éq} : Tension à ajouter

F : Constante de Faraday

FAD : Flavine adénine dinucléotique

Fd : Ferredoxine

GF : Echantillon de biofilm sur le feutre en graphite en fin de culture (issus des réacteurs R1 et R2)

GFT : Echantillon de biofilm sur le feutre en graphite après culture dans le digestat traité thermiquement (issu du réacteur R2)

H₂ : Dihydrogène non biologique

I : Intensité du courant

I_{pa} : Intensité maximale au pic d'oxydation en voltamétrie cyclique

I_{pc} : Intensité maximale au pic de réduction en voltamétrie cyclique

CEM : cellule d'électrolyse microbienne

PM : pile microbienne

M : Echantillons de milieu en fin de culture (issus des réacteurs R1 et R2)

MT : Echantillon de milieu après une culture dans le digestat traité thermiquement (issu du réacteur R2)

Mb : Echantillon de biofilm à la membrane en fin de culture (issus des réacteurs R1 et R2)

MbT : Echantillon de biofilm à la membrane après une culture dans le digestat traité thermiquement (issu du réacteur R2)

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

n_p : nombre de moles de produits

N_p : nombre de moles d'électrons disponibles

PAC : Pile à combustible

PCoA : Analyse des coordonnées principales

P_{H_2} : Pression partielle en H₂

Q_{e^-} : Transfert de charge

Q_p : Charge totale produit

R1 : Réacteur 1 dont le milieu n'a subi aucun traitement thermique

R2 : Réacteur 2 (le même que celui de l'article), dont le milieu a subi un traitement thermique après stabilisation du milieu

Silicone carbone 0,6 : Membrane tubulaire en silicone carbone avec 0,6 mm d'épaisseur

Silicone carbone 1 : Membrane tubulaire en silicone carbone avec 1 mm d'épaisseur

T₀MST R1 ou R2 : Echantillon du milieu prélevé à t₀ pour les réacteurs R1 ou R2

T_{600h} R1 ou R2 : Echantillon du milieu prélevé à t_{600h} pour les réacteurs R1 ou R2

T_{180h} R2 : Echantillon du milieu prélevé à t_{180h} pour les réacteurs R2

TECV : Transition énergétique pour la croissance verte

Tep : tonne équivalent pétrole

INTRODUCTION

La production et le stockage de l'énergie sont deux des plus grands enjeux du XXIème siècle. En effet, les besoins en énergie augmentent au fil des décennies. A l'heure actuelle, le pétrole est la principale source d'énergie dans le monde, représentant pour la France des millions de tonnes importées chaque année, avec 41 millions en 2022 (INSEE 2023). Cependant, cette énergie n'est pas une ressource renouvelable et sa combustion rejette une grande quantité de CO₂, un des principaux gaz à effet de serre.

La transition énergétique proposée par le ministère de la transition écologique met en lumière la nécessité de réduire nos émissions de gaz à effet de serre dans tous les secteurs liés à l'énergie que ce soit au niveau de son utilisation (par exemple pour les transports ou les habitations) comme de sa production (Légifrance 2015).

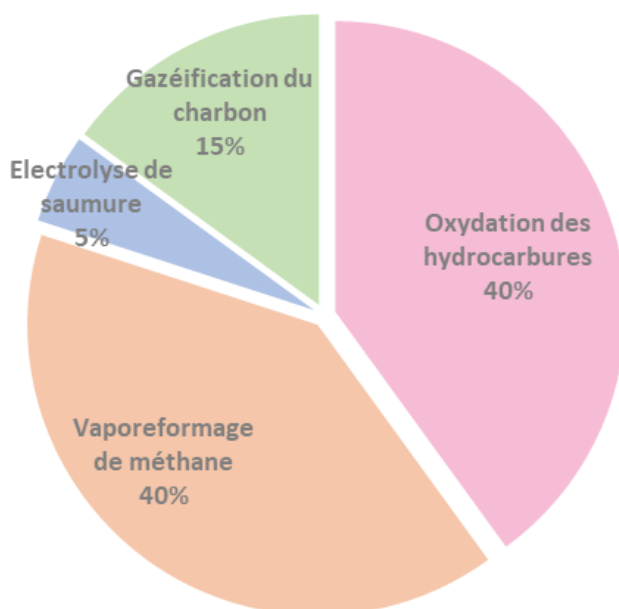


Figure 1-1 : Répartition des principales méthodes de production d'H₂ en France, selon la matière première utilisée (Rte, 2020).

L'hydrogène possède des propriétés chimiques intéressantes pour plusieurs secteurs industriels tels que le textile, les écrans plats, l'agroalimentaire ou les engrais. Il est également une bonne alternative aux ressources fossiles comme le pétrole ou le charbon, car son utilisation ne produit pas de CO₂ et la molécule est un bon vecteur énergétique pouvant être utilisé, *in fine*, dans le transport de poids lourds comme les camions ou les bateaux (Ministère de la transition écologique 2018). Cependant, même si son utilisation est décarbonée, son mode de production ne l'est pas encore. En effet, en France, l'hydrogène est produit par l'oxydation des hydrocarbures (40%), le vaporeformage de gaz naturel (40%), la gazéification du charbon (15%) et l'électrolyse de la saumure (5%), démontrant ainsi que se sont des méthodes productrices de gaz à effet de serre qui sont majoritairement utilisées (Ministère de la transition écologique 2018; Rte 2020) (figure 1-1).

L'utilisation de méthodes utilisant des ressources renouvelables est nécessaire afin de réduire l'impact environnemental de la filière hydrogène. L'utilisation de méthodes biologiques notamment par voie fermentaire en culture mixte ou par électrolyse microbienne est une solution. La production par voie fermentaire utilise des cultures mixtes pour oxyder des ressources carbonées, généralement d'origines végétales, en condition anaérobies pour produire théoriquement $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} / \text{mol}_{\text{glucose}}$. Cependant, ce taux théorique est rarement atteint, en raison de populations microbiennes consommatrices d'hydrogène diminuant le taux de production d'hydrogène mais également en raison de la méthode de production d'H₂ qui peut ne pas être optimale (augmentation de la pression partielle en hydrogène dans le milieu qui inhibe la production) (Chen, Sung, et Chen 2009; Mohan et al. 2013). Afin de prendre en compte cette limite, de nouveaux types de réacteurs utilisant des membranes, tels que ceux utilisant des fibres creuses, ont commencé à être étudiés afin de favoriser l'extraction de l'hydrogène en réduisant la pression partielle du gaz dans le milieu et ainsi éviter l'inhibition de l'hydrogénase, enzyme productrice d'hydrogène. Ces membranes permettent de séparer le milieu et les gaz produits à l'aide de l'utilisation d'un gaz vecteur ou du vide (D. Kim et al. 2006; Nualsri et al. 2017; Lee et al. 2012), Cependant, les milieux utilisés sont généralement des boues d'eaux usées, des déchets alimentaires ou agricoles, contenant déjà une population microbienne qui est utilisée comme inoculum également. De ce fait, un traitement du milieu de culture permet également de limiter

la population de consommateurs d'hydrogène afin d'augmenter le taux de production en favorisant les producteurs d'hydrogène sporulants.

Il existe également des microorganismes dits électroactifs qui ont la capacité d'échanger des électrons avec le milieu extérieur et qui peuvent être aérobies ou anaérobies strictes (Logan et al. 2019). Ces microorganismes peuvent être utilisés dans des biofilms, fixés sur des électrodes dans un système électromicrobiologique (CEM). Ce dernier consiste à utiliser les microorganismes électroactifs comme catalyseurs de réactions. Les biofilms électroactifs peuvent ainsi être présents sur l'anode pour l'oxydation de matières organiques et/ou à la cathode pour la production d'un produit d'intérêt par réduction d'un composé présent dans l'environnement. La production de bioH₂ par utilisation d'une cellule d'électrolyse microbienne (CEM) est un des systèmes électromicrobiologiques existants. La méthode consiste à utiliser des biofilms électroactifs, uniquement sur l'anode ou sur l'anode et la cathode. Ces derniers vont oxyder la matière organique présente afin de générer un flux électronique permettant alors la production de l'hydrogène au niveau de la cathode par réduction des protons. Contrairement à une électrolyse de l'eau impliquant l'oxydation de l'eau, l'électrolyse microbienne est moins énergivore car elle nécessite une tension plus faible (0,13 V vs 1,4 V) en raison de la présence des microorganismes (Liu et al. 2012; Thapa et al. 2021). De façon avantageuse, la CEM peut utiliser de nombreux substrats tels que des effluents issus de la fermentation sombre qui produit principalement des acides gras à courte chaîne ou AGV (acides gras volatils) tels que l'acétate ou le butyrate.

Ainsi, afin de pouvoir augmenter la quantité d'hydrogène produite et oxyder au maximum les composés organiques, certaines recherches commencent à combiner la fermentation sombre et l'électrolyse microbienne (Katuri et al. 2014; Lalaurette et al. 2009; Du et al. 2019). Cela permettrait de produire, du point de vue stœchiométrique, jusqu'à 12 mol_{H₂}/mol_{hexose} avec une fermentation pouvant obtenir 4 mol_{H₂}/mol_{glucose} par la voie de l'acétate et la CEM permet de produire également 4 mol_{H₂}/mol_{acétate}, en tenant compte des 2 moles d'acétate produites pour une mole de glucose. Cependant, ces méthodes nécessitent d'imposer une tension pour augmenter la

production du gaz, même si la tension imposée est plus faible que pour une électrolyse de l'eau (Lim et al. 2018) (figure 1-2).

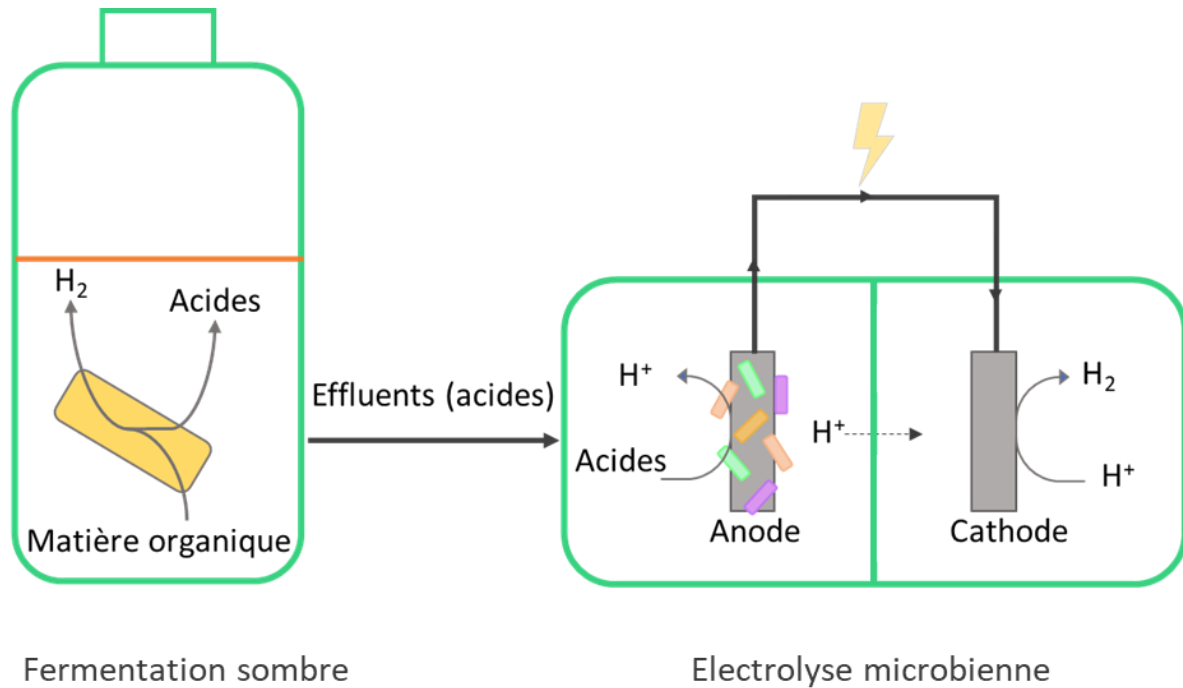


Figure 1-2 : Représentation schématique d'un couplage de la fermentation sombre et de l'électrolyse microbienne en deux étapes pour la production de bioH₂. La première étape est une fermentation des composés organiques en condition anaérobie permettant de produire une partie du bioH₂ et des acides organiques tels que l'acétate ou le butyrate. La seconde étape consiste à récupérer les effluents issus de la fermentation, contenant les acides afin de les oxyder à l'aide d'un biofilm électroactif sur l'anode. Dans ces conditions, des protons sont produits mais également un flux d'électrons dans un circuit électrique, qui est relié à une cathode où la réduction des protons en H₂ se réalise.

Une autre approche électromicrobiologique est également possible, c'est l'électrofermentation. L'électrofermentation est une méthode qui se base sur le faible courant produit par les microorganismes, ou imposé, afin de favoriser un environnement au voisinage de chaque électrode pour les microorganismes présents. Cet environnement permettrait de contrôler le métabolisme microbien, notamment en influençant la réduction de cofacteurs suite au changement du potentiel redox au niveau des cellules, favorisant ainsi la production d'hydrogène. Ainsi, le courant circulant dans la CEM n'est pas directement proportionnel à la production d' H_2 , mais favorise un environnement redox permettant cette production.

L'objectif de la thèse est d'évaluer le couplage des processus liés à la fermentation sombre et à l'électrolyse microbienne dans un seul et même système, idéalement autonome, afin de produire du $bioH_2$. Ce travail de thèse s'est également attaché à étudier une éventuelle spécialisation des microorganismes au niveau des biofilms microbiens présents sur l'anode et la cathode, en fonction des conditions expérimentales utilisées.

Pour cela, le manuscrit est divisé en plusieurs chapitres (Figure 1-3) :

- Chapitre 1 : l'état de l'art. Cette partie va permettre de faire une mise au point sur les connaissances actuelles liées à la production d' H_2 , les différents matériaux utilisés dans l'électrolyse microbienne et sur les procédés déjà existants combinant la fermentation sombre et l'électrolyse microbienne ;
- Chapitre 2 : le matériel et les méthodes. Ce chapitre présentera les matériaux, produits et équipements utilisés ainsi que l'ensemble des méthodes analytiques électrochimiques mais également d'analyse de gaz et d'analyse métagénomique de l'écologie microbienne qui a été externalisée ;
- Chapitre 3 : Choix et caractérisation des matériaux et dispositifs analytiques mis en œuvre pour la production de $bioH_2$ dans des bioréacteurs combinant l'électromicrobiologie et à la fermentation sombre. Cette première partie des résultats présentera les membranes

sélectionnées et le choix réalisé pour le système au travers des différents essais afin de valider la réactivité des matériaux et en particulier la capacité de la membrane tubulaire choisie à extraire les gaz ;

- Chapitre 4 : Mise en œuvre du procédé de production de bio-hydrogène dans un bioréacteur combinant la fermentation sombre et l'électrofermentation. Ce deuxième chapitre de résultats proposera les différents designs expérimentaux du système permettant d'obtenir un courant cathodique et potentiel bas afin de favoriser une électrofermentation au voisinage des électrodes. Une étude plus approfondie du design expérimental retenu en présence de traitements thermiques est réalisée afin de suivre et améliorer la production d' H_2 mais également de favoriser une population microbienne spécialisée au niveau des biofilms sur chaque électrode ;
- Chapitre 6 : Conclusions et perspectives. Cette dernière partie permettra de faire le point sur les résultats obtenus durant la thèse et d'émettre des perspectives.

Ce travail de thèse a été mené dans le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP – CNRS – Nancy) et le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (LCPME – CNRS – Nancy) et a permis de réaliser 35 bioréacteurs dont 32 à cultures longues de plus d'un mois.

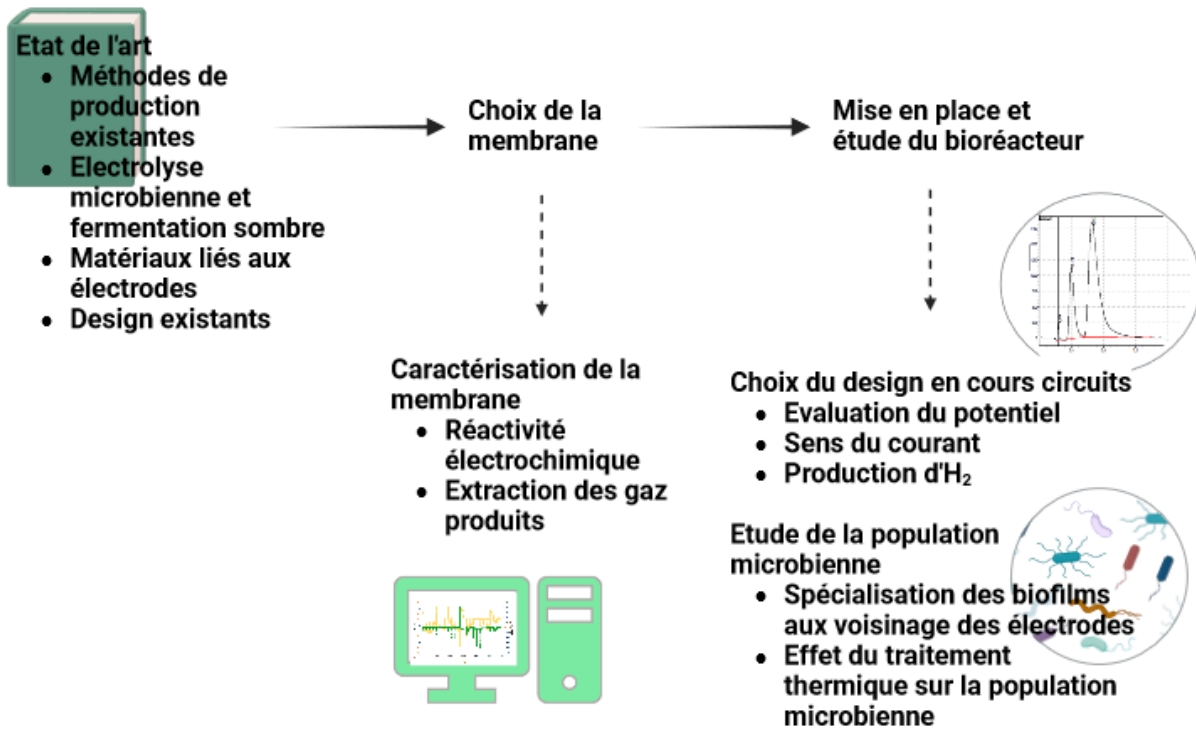


Figure 1-3 : Schéma récapitulatif des objectifs et du cheminement de la thèse.

ETAT DE L'ART

Pour répondre aux enjeux sociétaux et environnementaux du XXI^{ème} siècle, le développement des énergies renouvelables fait partie des objectifs de la loi n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte (TECV) (adoptée le 22 juillet 2015). Cette loi a pour objectif de diminuer la consommation énergétique finale de la France de 50 % en 2050 par rapport à la référence de 2012, favorisant des procédés énergétiques plus sobres et respectueux de l'environnement, avec pour paliers : de porter la part des énergies renouvelables à 33 % au moins de la consommation finale brute en 2030, et de réduire la consommation énergétique primaire des énergies fossiles de 40 % en 2030 par rapport à l'année de référence 2012. La TECV prévoit ainsi réduire les émissions de gaz à effet de serre de 40 % entre 1990 et 2030 (Légifrance 2023).

Dans ce cadre réglementaire, la filière hydrogène est en pleine expansion car elle a de nombreux atouts pour permettre cette transition énergétique. Aujourd'hui, cependant, la production de la molécule H₂ est très polluante et génère une grande quantité de CO₂. Il est ainsi nécessaire de réduire le coût énergétique de cette production et de diminuer les quantités de CO₂ associées, par la mise en place de méthode moins polluantes.

Une de ces méthodes les plus prometteuses aujourd'hui est l'électrolyse de l'eau, ne produisant pas de CO₂. Cette méthode décarbonée représente toutefois une faible part de production dans le monde (cf. introduction) et il est nécessaire de prendre en compte d'autres méthodes afin de compléter la production. Leur mise en place reste en cours de développement et présente différents aspects techniques et verrous qui restent encore à débloquent, notamment en termes de matériaux mais également d'énergie utilisés pour les nouvelles méthodes ou encore en termes de rendement de production du gaz, inférieur par rapport aux méthodes conventionnelles.

Dans cette partie, l'hydrogène est présenté sous différents aspects permettant de situer les procédés de fabrications déjà existants (filiale industrielle, électrolyse de saumure, ...) et les procédés en cours de recherche, en lien avec la transition énergétique (procédés de

bioproduction). L'étude bibliographique montrera également les différents aspects scientifiques, notamment liés à la fermentation sombre et à la cellule électrolytique microbienne. Les stratégies de la thèse seront également présentées dans ce chapitre.

1. La filière hydrogène H₂

1.1. Les enjeux liés à l'hydrogène

L'hydrogène atomique est l'élément le plus abondant sur terre, participant à la composition de la plupart des molécules existantes dans le monde. Son utilisation dans le monde sous la forme dihydrogène est donc intéressante comme présenté dans la partie 1.2. Cependant, bien qu'abondant d'un point de vue chimique dans le monde, son utilisation comme vecteur énergétique requiert une véritable transition sociétale, technologique et industrielle.

Le développement d'une filière hydrogène est ainsi essentiel, autant d'un point de vue industriel qu'environnemental, pour nous permettre de diminuer les volumes de gaz à effet de serre produits par la France qui s'est donnée pour objectif une baisse de 55 % les émissions d'ici 2030 par rapport à 1990 (AFHYPAC 2021). En effet, aujourd'hui, la majorité de la production d'hydrogène utilise des énergies fossiles et seulement 5% sont issus de filières décarbonées. Il est ainsi nécessaire, dans le plan énergétique de la France pour les prochaines années et décennies de pouvoir remplacer les énergies fossiles liées au pétrole mais également au charbon ou au gaz naturel par des méthodes à bas-carbone ou décarbonées, qui peuvent également être couplées aux moyens de production d'énergie électrique renouvelable déjà existants tels que l'éolien ou les panneaux photovoltaïques.

Un défi associé à la transition écologique d'une manière générale, et plus particulièrement au développement de cette filière hydrogène, est la nécessité de relever un défi économique, notamment dans le domaine de l'énergie, afin de réduire les coûts de production de l'électricité par rapport aux énergies fossiles d'ici 2030. Cela semble possible si l'on considère par exemple la production d'électricité d'origine photovoltaïque, dont les coûts ont diminué par 10, ou d'origine

éolienne dont les coûts ont baissé de 70 % entre 2009 et 2019. Nous pouvons alors espérer une baisse importante des coûts de production et de stockage et d'utilisation de l'hydrogène grâce à une recherche très dynamique sur l'hydrogène comme vecteur énergétique, notamment dans le domaine des matériaux (AFHYPAC 2021).

1.2. L'hydrogène dans l'industrie mondiale aujourd'hui

1.2.1. Place de l'hydrogène dans l'industrie chimique

L'hydrogène est utilisé depuis plusieurs décennies pour ses propriétés chimiques. En 2016, la majorité de l'hydrogène moléculaire est utilisée par l'industrie pétrolière (44%) et par l'industrie des engrais pour la production d'ammoniac (38%) (AFHYPAC 2016). La production d'ammoniac se fait principalement par la méthode d'hydrotraitement. Ce procédé utilise des hydrocarbures riches en azote et en soufre en présence d' H_2 pour produire de l'ammoniac. L'hydrogène est également utilisé dans le raffinage pétrolier pour la production de carburants normalisés tels que le kérosène ou l'essence. La molécule se retrouve dans beaucoup de processus de raffinage le produisant ou l'utilisant comme les processus d'hydrocracking (cassage d'hydrocarbure à longue chaîne pour des hydrocarbures plus légers), hydrotraitement ou désulfuration. L'hydrogène est également utilisé pour la production d'autres composés non liés à l'industrie pétrolière, comme la production d'eau oxygénée, ou la fabrication d'huiles alimentaires ou encore la production de verres pour écrans plats (AFHYPAC 2016).

1.2.2. Place de l'hydrogène dans l'industrie énergétique

L'hydrogène moléculaire est également un excellent vecteur énergétique. En effet, un kilogramme d' H_2 a une énergie de combustion trois fois supérieure à un kilogramme de pétrole, ce qui suscite un grand intérêt dans les études portant sur la production et le stockage des énergies renouvelables (Ministère de la transition écologique 2018). En 2016, près de 61 Mt d'hydrogène a été produit dans le monde dont 1 Mt en France, représentant une énergie totale de 171 Mtep (tep = tonne équivalent pétrole où $1 \text{ tep} \approx 4,19 \cdot 10^{10} \text{ J}$). Cependant seulement 1,3% est utilisé sous

forme d'énergie dans le monde, représentant 13 100 Mtep consommé, le reste étant utilisé pour ses propriétés chimiques (AFHYPAC 2016).

Une alternative à la combustion thermique est l'utilisation de la molécule H_2 dans une pile à combustible (PAC) en présence d' O_2 , qui permet la production d'électricité, avec de l'eau comme seul co-produit (Ministère de la transition écologique 2018). Plus spécifiquement, le principe de la PAC repose sur l'utilisation de deux électrodes dans un électrolyte, séparées par une membrane échangeuse d'ions. L'hydrogène alimente l'anode pour pouvoir être oxydé en protons. L' O_2 alimente quant à lui la cathode pour être réduit en H_2O .

1.3. Les principales méthodes de production d'hydrogène

Afin de pouvoir subvenir aux besoins en hydrogène de l'industrie, la principale méthode de production est aujourd'hui le vaporeformage qui peut être réalisé de deux manières :

- Le vaporeformage des hydrocarbures consiste à exposer les hydrocarbures à de la vapeur d'eau en présence d'un catalyseur tel que le nickel ou la platine, à des températures allant de 840 à 920 °C, sous une pression de 20 à 30 bars. Il est utilisé pour la formation d'hydrogène, de CO_2 et de gaz de synthèse.
- Le vaporeformage de gaz naturel consiste à casser une molécule de gaz naturelle comme le méthane en présence d'un catalyseur métallique en utilisant de la vapeur d'eau sous pression de 20 à 30 bars à une température de 900 °C, produisant du CO puis du H_2 et du CO_2 (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques 2021).

2. Procédés de bio-production d'hydrogène

Il a été vu précédemment que la production d'hydrogène nécessite beaucoup d'énergie dans des procédés lourds utilisant principalement les composés fossiles et produisant également une grande quantité de CO₂. Pour pallier ces problèmes et diminuer la production de ce gaz à effet de serre, de nombreuses recherches sont actuellement en cours visant à diminuer l'impact environnemental de la filière hydrogène. Parmi les méthodes en cours de développement, certaines sont biologiques (Figure 2-1). Cette partie va présenter rapidement les méthodes biologiques dépendantes de la lumière. Dans une autre partie, les méthodes « non-lumière dépendantes » seront plus approfondies.

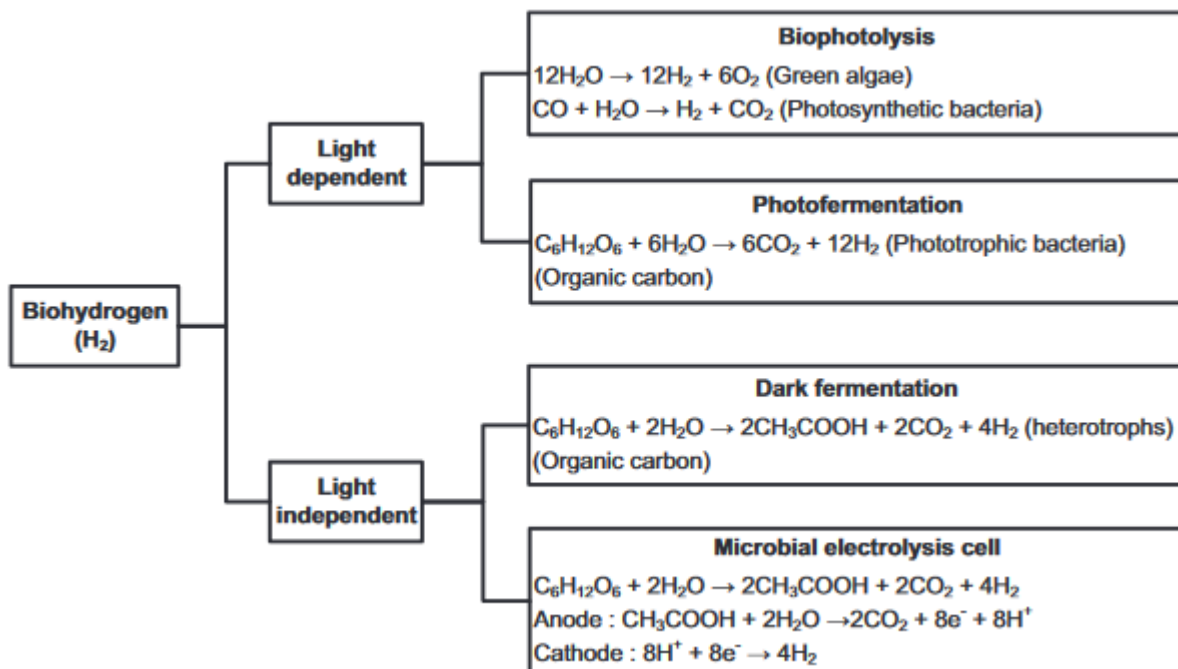


Figure 2-1 : Les principales voies biologiques de production d'hydrogènes selon deux principes – celles « dépendantes de la lumière », utilisant des microorganismes et les photons pour la production d'hydrogène comme la biophotolyse et la photofermentation ; celles « non dépendantes de la lumière », utilisant des microorganismes chimiotrophes pour la production d'hydrogène comme la fermentation sombre et la cellule d'électrolyse microbienne (Ghimire et al., 2015).

2.1. La biophotolyse

Il existe certaines algues et bactéries, présentes dans le sol et dans l'eau, pouvant produire de l'hydrogène par lyse des molécules d'eau en O_2 et H_2 à l'aide d'une source lumineuse. Ce procédé est appelé la « photolyse ». Les microorganismes les plus répandus ayant ce métabolisme sont les cyanobactéries et les algues vertes (Menia et al. 2019; Chandrasekhar, Lee, et Lee 2015).

La biophotolyse peut être directe ou indirecte :

- Biophotolyse directe :

La biophotolyse directe consiste à utiliser la lumière via deux systèmes photosynthétiques afin de récupérer de l'énergie pour la lyse de molécules d'eau, résultant en la production d' H_2 à travers une activité hydrogénase utilisant de la ferredoxine (Fd) (figure 2-2). Cette méthode permet ainsi de convertir 22 % des photons récupérés, soit 10 % de la lumière solaire (P C Hallenbeck et Benemann, s. d.; Chandrasekhar, Lee, et Lee 2015). Ce métabolisme peut être observé en laboratoire, en réalisant des co-cultures avec des bactéries issues de boues activées ou par ajout de composés anti-oxydants tels que l'acide ascorbique ou l'hydroquinone (Oey et al. 2016; Marquez-Reyes, et al. 2015; Hallenbeck et Benemann, s. d.).

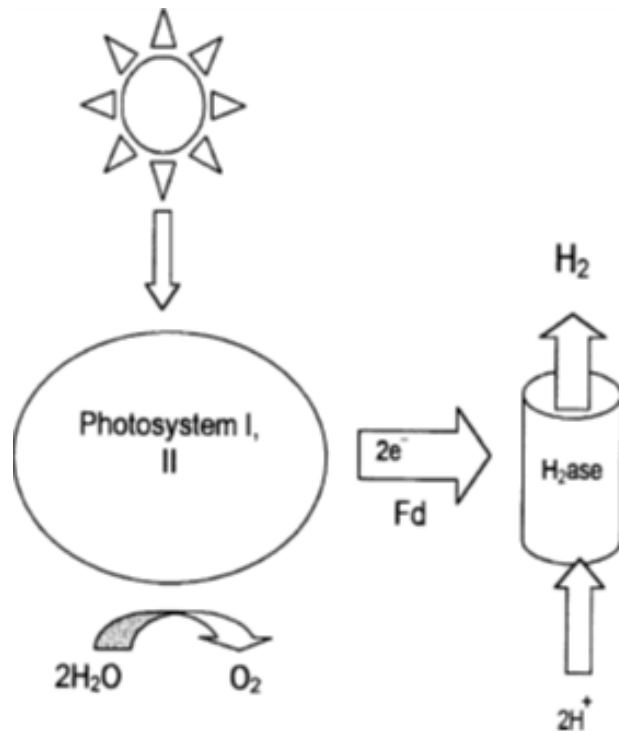
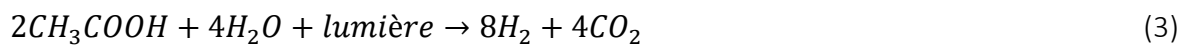
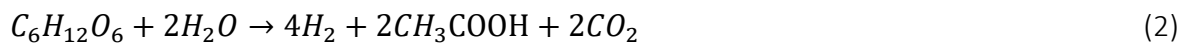
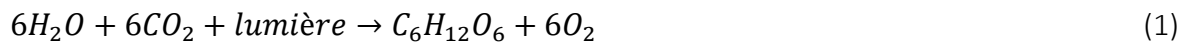


Figure 2-2 : Schéma simplifié d'une biophotolyse directe. L'énergie lumineuse est utilisée pour le processus de photosynthèse libérant des molécules d'eau et des cofacteurs réduits. Ces derniers seront ensuite réoxydés par une hydrogénase pour la production d' H_2 (Hallenbeck et Benemann, 2002).

- Biophotolyse indirecte :

Ce métabolisme transforme l'énergie solaire en énergie chimique à travers deux étapes pouvant dépendre de la lumière (équations 1 et 3) ou non (équation 2). La lumière est tout d'abord récupérée afin de produire du glucose à partir du CO_2 et de l'eau. Elle est ensuite utilisée par les microorganismes en absence de lumière par voie fermentaire afin de produire 4 moles d' H_2 par mole de glucose et 2 moles d'acétate qui, en présence de lumière, seront par la suite transformés en 8 moles de bio H_2 . Au total, cela équivaut à un total de 12 moles de bio H_2 pour 12 molécules d' H_2O .



L'avantage de ce processus photo-autotrophique à plusieurs étapes est la non-limitation du substrat (H_2O) pour la production d'hydrogène ainsi qu'un bilan neutre, voire consommateur de CO_2 s'agissant de celui engagé dans la suite réactionnelle. En effet, les microorganismes peuvent ainsi utiliser le CO_2 présent dans l'atmosphère afin de produire l'énergie nécessaire à leur croissance, une partie du carbone étant dédiée à la biosynthèse de biomasse (Menia, 2019). Cependant, ce processus nécessite beaucoup d'énergie pour une faible production d'hydrogène. En effet, le rendement théorique est de 100% mais le manque ou l'excès de lumière diminue drastiquement celui-ci jusqu'à atteindre 4% (Hallenbeck et Benemann, 2002).

Du point de vue biologique l'utilisation des deux processus, biophotolyse directe et indirecte, reste difficile à mettre en place au laboratoire car l'hydrogénase utilisée par les microorganismes biophotolytiques a un rendement de conversion de la lumière de 3 %, ce qui diminue le taux de production d'hydrogène par voie biophotolytique (Melitos, Voulkopoulos, et Zabaniotou 2021).

2.2. La photo-fermentation

Il existe certaines bactéries telles que *Rhodobacter sp.*, *Halobacterium* ou *Desulfuromonas acetoxidans* pouvant fermenter des acides organiques en H_2 et CO_2 , en condition anaérobie stricte et en présence de lumière à l'aide d'une nitrogénase – une enzyme ayant des fonctions et propriétés similaires à l'hydrogénase (Basak et Das 2007; Azwar, Hussain, et Abdul-Wahab 2014). La nitrogénase est moins sensible à l' O_2 que l'hydrogénase, ce qui permet aux bactéries aérofacultatives de réaliser une photo-fermentation dans un milieu sans oxygène ou faiblement oxygéné (Basak et Das 2007). Théoriquement, la nitrogénase peut convertir les composés organiques en H_2 et CO_2 en présence de lumière. Cependant, elle a une faible activité catalytique

et une sensibilité au NH_4^+ en présence d'une grande quantité d'azote dans le milieu. Cet azote pourrait être utilisé pour la production d'ammoniac, inhibant la nitrogénase au niveau de la transcription du gène codant l'enzyme ou au niveau de la post transcription de celui-ci (Yakunin et Hallenbeck 1998; 2002; Darnajoux et al. 2022; Dixon et Kahn 2004). Son fonctionnement au sein de ces bactéries dépend également de la quantité d'ATP produit à partir de la photosynthèse, ce qui rend le rendement de production d' H_2 non constant (Brentner, et al. 2010; Koku et al. 2002). La photo-fermentation, tout comme les autres méthodes « lumière dépendantes », nécessite une source d'énergie importante et l'intensité de la lumière est un des paramètres cruciaux influençant la production d' H_2 (Yin and Wang, 2022).

3. La fermentation sombre

La fermentation sombre fait partie des étapes importantes de l'environnement participant à l'oxydation de la matière organique en anaérobiose et permettant la production de bioH_2 . La molécule H_2 est par la suite utilisée par d'autres microorganismes afin de produire d'autres composés d'intérêt tels que les méthanogènes ou les bactéries sulfato-réductrices (Trably et al. 2018).

3.1. La fermentation sombre dans la méthanogénèse

La méthanisation est un processus anaérobie retrouvé dans le milieu naturel où cette condition est respectée. Elle est généralement présentée comme un processus permettant la valorisation des boues d'eaux usées et des déchets agroalimentaires et agricoles. Plusieurs études ont montré l'intérêt de produire du méthane pour ses propriétés énergétiques mais également pour la valorisation des déchets (Kakuk et al. 2021; Hassan, et al. 2020). Contrairement à l' H_2 , le CH_4 n'est pas un métabolisme intermédiaire et sa production peut se réaliser simplement sans traitement au préalable, là où pour la production d' H_2 différents paramètres physico-chimiques et/ou microbiologiques, dont les populations hydrogénotrophes, doivent être contrôlés (figure 2-3).

La digestion anaérobie de la méthanisation se réalise selon plusieurs étapes successives (Patriarca et al. 2016; Trably et al. 2018) :

- La dégradation des composés organiques complexes tels que les composés lignocellulosiques. Cette étape est réalisée à partir de bactéries hydrolytiques.
- L'acidogénèse ou la production d'acide comme l'acétate ou le butyrate, par fermentation sombre permettant la production de CO_2 et d' H_2 . Cette étape est réalisée à partir de bactéries acidogènes.
- L'acétogénèse utilise les acides gras volatiles pour la production d'acétate ou de H_2 et CO_2 . Cette étape est réalisée par des bactéries homoacétogènes.
- La méthanogénèse qui est l'étape finale de production du méthane lors de la transformation de l' H_2 et du CO_2 et/ou de l'acétate. Cette étape est le fait d'archées méthanogènes.

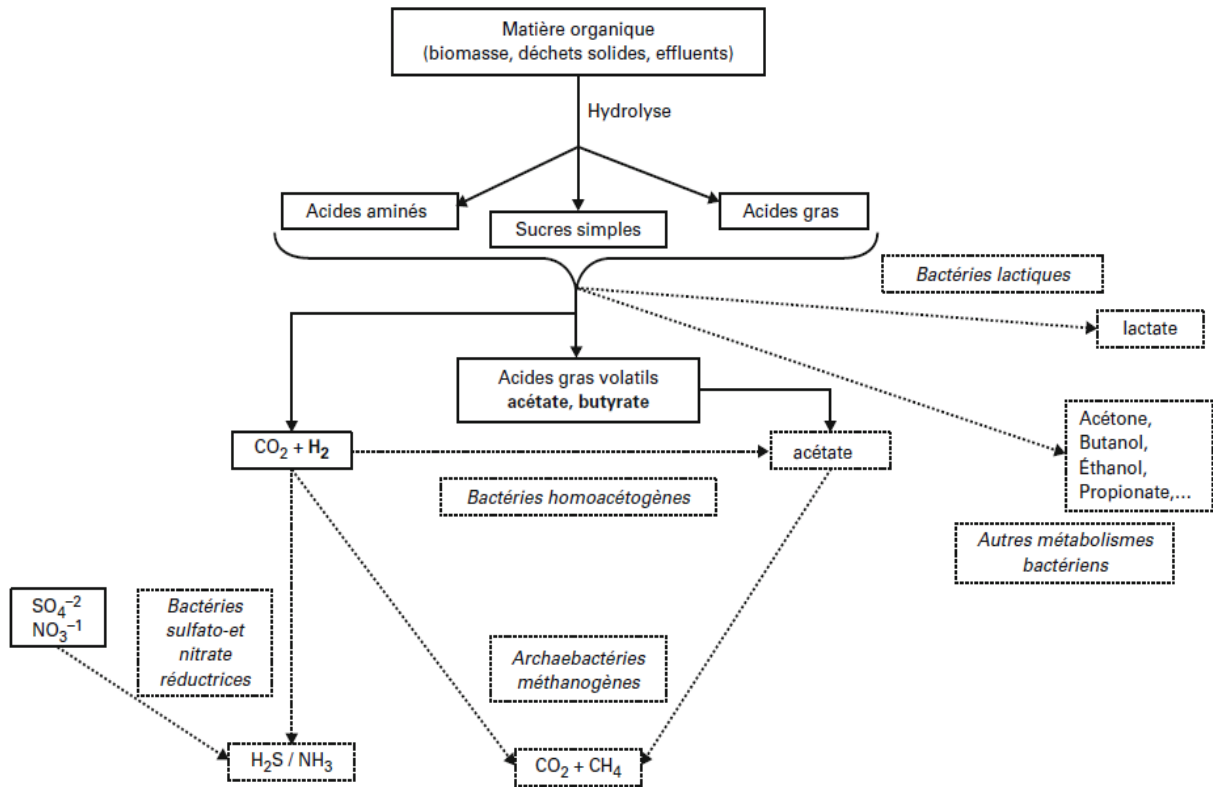


Figure 2-3 : Voies générales de dégradation de la matière organique en conditions anaérobies (Trably et al., 2018).

3.2. Les principales voies de production d'H₂

La glycolyse est une des principales voies métaboliques, aboutissant au pyruvate (Mohan et al. 2013). Elle se base sur des échanges d'électrons avec des cofacteurs issus du métabolisme bactérien (ex : NADH, FADH, ...). En effet, lors de l'oxydation d'une source de carbone et d'énergie, deux voies métaboliques principales sont possibles après la glycolyse, en fonction des conditions de l'environnement : la voie de l'acidogénèse (produisant de l'acétate et du butyrate, ou d'autres acides carboxyliques) et la voie de la solvatogénèse (produisant principalement du butanol, de l'acétone ou de l'éthanol).

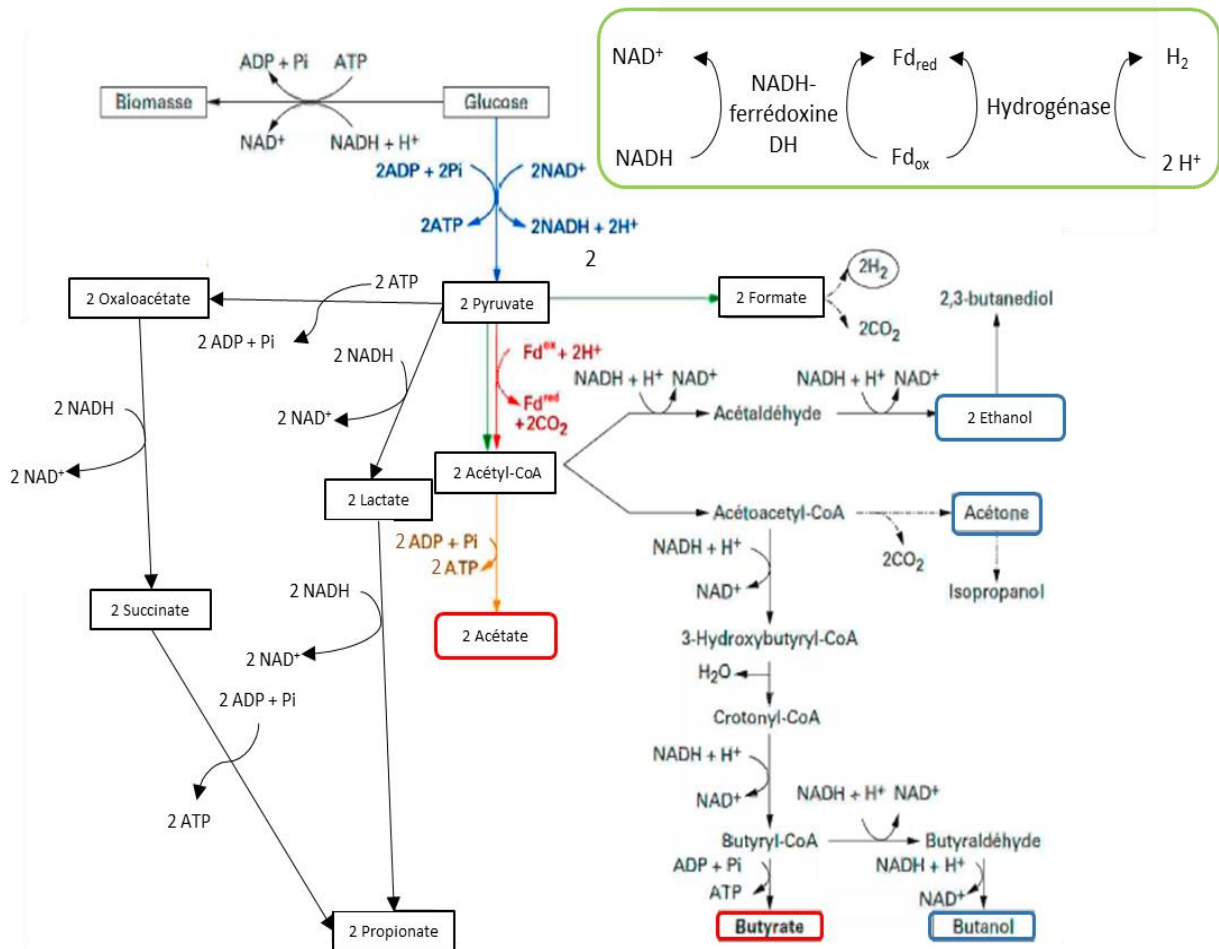


Figure 2-4 : Principales voies métaboliques en fermentation sombre, (Vasconcelos, 1991 ; Clion, 2016 ; Lopez, 2016 – modifié). La voie acidogénèse est la voie permettant la formation de cofacteur réduits via les voies de production d'acides tels que l'acétate et le butyrate (rouge), permettant la production d' H_2 à l'aide de l'hydrogénase par réoxydation de ces cofacteurs. La solvatogénèse est la voie concurrente produisant des solvants et des cofacteurs oxydés (bleu), ne permettant pas la production d' H_2 .

Sur la figure 2-4 sont présentées les principales voies métaboliques de la fermentation sombre. Lors de la glycolyse jusqu'au pyruvate, de l'Adénosine Triphosphate (ATP) ainsi que du NADH sont formés. Le pyruvate est ensuite converti en Acétyl-CoA, réduisant la férredoxine (Fd_{ox} en Fd_{red}). Ce dernier est réoxydé directement par l'hydrogénase permettant en parallèle une réduction des protons en H_2 . Une autre méthode de production d' H_2 possible par les microorganismes est

l'oxydation du NADH par la NADH-ferredoxine déshydrogénase permettant la formation de Fd_{red} qui sera par la suite réoxydée par l'hydrogénase. Ces deux méthodes nécessitent des cofacteurs réduits qui peuvent être formés lors de l'acidogénèse. L'ensemble des voies nécessitant la réduction de cofacteurs sont ainsi des voies concurrentes à la production d' H_2 , c'est notamment le cas de la solvatogénèse produisant de l'acétone ou butanol par exemple.

La production de $bioH_2$ en fermentation sombre, contrairement aux méthodes photo-dépendantes, ne nécessite pas de lumière pour la production d' H_2 . Ainsi, la culture nécessite moins d'énergie et est plus simple à mettre en place. Elle permet un plus grand taux de production d'hydrogène que les méthodes utilisant la lumière car les voies fermentaires permettent de produire théoriquement $4 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{glucose}$ par la voie de l'acétate (Chandrasekhar, Lee, et Lee 2015). Dans les conditions de culture en anaérobiose et en absence de lumière, les rendements de production d' H_2 atteignent seulement 33 % (Abo-Hashesh et Hallenbeck 2012).

3.3. Voies concurrentes et consommatrices à la production d'hydrogène

Comme indiqué plus haut, l'hydrogène entre dans la production de plusieurs processus chimiques pour la production de produits destinés à l'utilisation humaine. Dans l'environnement, l'hydrogène est également utilisé pour le métabolisme microbien. Il fait partie des molécules intermédiaires permettant la production d'autres composés tels que le méthane.

Comme montré sur la figure 2-4, deux voies métaboliques peuvent être utilisées lors de la fermentation sombre, pour la production d'hydrogène selon l'orientation du flux du carbone et des électrons transitant dans les différents embranchements métaboliques. Chez les espèces du genre *Clostridium*, la fermentation sombre a été bien étudiée. La phase acidogène permet des flux d'électrons vers la formation de cofacteur réduits. Cependant, en fonction des conditions physico-chimiques du milieu, le microorganisme peut favoriser la voie solvatogénèse chez les bactéries comme les *Clostridium*, utilisant les cofacteurs réduits pour cette voie métabolique. Le schéma ci-dessous (figure 2-5) montre l'impact du pH sur l'orientation du métabolisme. Le choix de la voie

métabolique dépend également du milieu, de la présence d'oxygène mais également de l'accumulation de produits comme l' H_2 , produit qui a un effet inhibiteur sur sa propre production (Fan 2004; Ginkel, et al., 2001; Nath et Das 2004; Özgür et al. 2010).

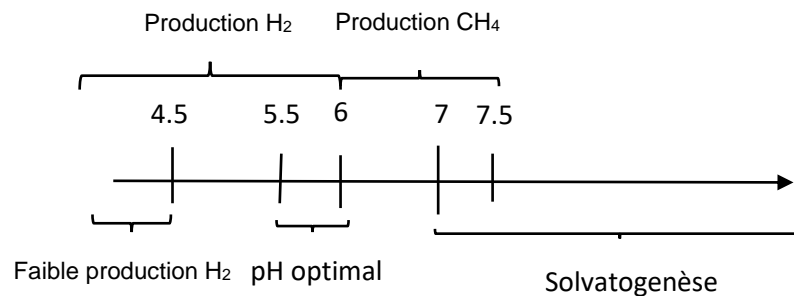
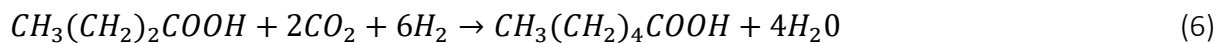
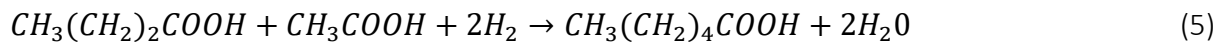


Figure 2-5 : Echelle de pH simplifiée des voies métaboliques et de la production d' H_2 en fonction du pH (Fan, 2004 ; Ginkel et al., 2001 ; Nath and Das, 2004 ; Özgür et al., 2010). Le pH optimal pour la production d' H_2 se trouve entre 5,5 et 6. En dessous, les protons deviennent prédominants, pouvant limiter la production, jusqu'à l'inhiber. Au-dessus du pH 6, la production d' H_2 diminue et se rapproche de la consommation d' H_2 par d'autres microorganismes tels que les méthanogènes.

Dans une culture mixte, en plus des voies métaboliques concurrentes, d'autres réactions peuvent également consommer l'hydrogène produit, en fonction des conditions physico-chimiques. C'est notamment le cas avec les espèces homoacétogènes, présentées dans la partie 3.1. de ce chapitre (Latrille, et al., 2011) :



La production d' H_2 est associée à la formation d'acides tels que l'acétate ou le butyrate. Certaines bactéries peuvent également utiliser ces acides afin de former d'autres acides tels que le caproate ou le propionate (Latrille, et al., 2011) :



D'autres microorganismes présents dans des écosystèmes anaérobies comme dans les sédiments ou le tube digestif des ruminants sont dits sulfato-réducteurs car ils peuvent utiliser une faible quantité d'hydrogène pour la réduction d'ions sulfates selon l'équation suivante (Muyzer et Stams 2008) :



Par ailleurs, la méthanation, principalement issue des archées peut utiliser l'hydrogène et le CO₂ produit afin de former du méthane. Ce phénomène est retrouvé naturellement dans l'environnement, notamment dans les déchets agricoles. De ce fait, le temps de séjour de l'hydrogène est court une fois qu'il est produit car il est directement consommé par les microorganismes concurrents. Le méthane est par ailleurs thermodynamiquement plus favorisé que la production d'hydrogène (-135,6 kJ/mol), selon l'équation suivante :



3.4. L'hydrogénase

3.4.1. Généralités

L'hydrogénase est une métalloenzyme située dans le cytoplasme ou même au niveau de la membrane ou au niveau des organelles telles que les chloroplastes. Elle a été découverte en 1930

chez des bactéries pouvant réduire de nombreux substrats tels que le bleu de méthylène ou les nitrates (Stephenson et Stickland 1930).

Cette enzyme participe au métabolisme de l'hydrogène et est ainsi présente dans plusieurs microorganismes anaérobies, catalysant la synthèse d'H₂ de façon réversible, en fonction des conditions physico-chimiques de l'environnement (Stephenson et Stickland 1930; Adams 1990), selon la formule :



La production d'H₂ est réalisée par oxydation des cofacteurs réduits comme la ferredoxine et la flavodoxin (Krasna 1979) issus du métabolisme microbien. Le potentiel redox de la production de l'H₂ est de -414 mV vs. SHE à pH 7 (P C Hallenbeck et Benemann, s. d.; Krasna 1979). L'oxydation des cofacteurs réduits permet de se rapprocher du potentiel redox de la production d'H₂ et de diminuer l'énergie nécessaire pour la réaliser (ferredoxine et flavodoxin ont un potentiel redox de -398 et -371 mV vs. SHE respectivement) (Thauer, et al., 1977).

Il existe deux principales hydrogénases qui se différencient par la nature du métal présent dans leur site actif :

- La Ni-hydrogénase contient du nickel sous forme de [NiFe] ou [NiFeSe]. La forme [NiFe] est retrouvée dans la plupart des microorganismes, notamment les bactéries et archées (Tillmann Stiebritz et Reiher 2012). Elle possède un atome de nickel et de fer sur son site actif avec pour certains microorganismes, du sélénium en plus (He et Angenent 2006; Demuez 2009). Cette hydrogénase transfère directement ou indirectement les électrons pour la réduction de cofacteurs solubles comme le FAD (P C Hallenbeck et Benemann, s. d.; Tillmann Stiebritz et Reiher 2012). Elle permet préférentiellement aux cellules d'utiliser

l' H_2 comme source d'énergie en produisant une force proton motrice au niveau de la membrane et permettant la réoxydation des cofacteurs réduits.

- La Fe-hydrogénase contient seulement du fer [Fe] sur son site actif qui est la moins distribuée parmi les microorganismes mais elle est principalement présente dans les microorganismes fermentaires anaérobies stricts. Elle permet préférentiellement, contrairement à la Ni-hydrogénase, de diminuer l'excès des équivalents réducteurs, et donc la production d' H_2 . Cette enzyme est souvent retrouvée chez certaines bactéries comme *Clostridium sp.*, *Desulfovibrio sp.*, mais également chez les micro-algues, protozoaires et certains champignons (Stiebritz et Reiher 2012).

3.4.2. Facteurs limitants à la production d'hydrogène

- La pression partielle en H_2 (P_{H_2})

Plusieurs études ont démontré l'inhibition réversible de l'hydrogénase liée à la P_{H_2} et ce, dès les années 1970. En effet, les études de Chung, 1976 ont montré que la présence d'une grande quantité d' H_2 diminuait le développement des bactéries capables de le produire. Dans l'environnement, cette P_{H_2} est régulée par les consommateurs d' H_2 tels que les méthanogènes et autres hydrogénéotrophes. (Chung 1976).

Par la suite, d'autres études ont montré qu'une trop forte P_{H_2} induit une réorientation du métabolisme de l'acidogénèse, produisant des acides tels que l'acétate ou le butyrate, vers la solvatogénèse produisant des solvants comme le butanol, l'éthanol ou même l'acétone, réduisant ainsi la production de $bioH_2$ (Chen, et al., 2009).

Afin de palier à ce facteur limitant, des recherches ont montré que l'utilisation de gaz vecteur en balayage dans une culture par exemple, permettait de diminuer la P_{H_2} , augmentant ainsi la quantité d' H_2 produit. Ce fut le cas pour l'équipe de Mizuno et al., 2000, qui, par barbotage d'azote

dans le milieu de culture, a permis d'augmenter le taux d'H₂ produit à 68% à partir d'un consortium bactérien anaérobie, en présence de 10 g/L de glucose et de sels minéraux (Mizuno et al. 2000).

- Effet du pH

L'activité de la plupart des enzymes dépend des conditions physico-chimiques du milieu dont le pH. Celui-ci a un rôle de régulateur des voies métaboliques fermentaires dans la production de bioH₂ et permet également de changer la physiologie des cellules vis-à-vis de l'équilibre ionique entre le milieu intracellulaire et extracellulaire de la bactérie (Antonopoulou et al. 2008). Le pH a donc un rôle important dans l'activité microbienne et permet de limiter la croissance de consommateurs d'hydrogène comme les méthanogènes mais également de favoriser la production d'H₂ en orientant le métabolisme vers l'acidogénèse.

A un pH inférieur à 6, la production d'H₂ est favorisée mais cette production est ensuite limitée en dessous du pH 4,5. Entre pH 6 et pH 7,5, la production de méthane est favorisée par les bactéries méthanogènes (Y. Fan 2004; Zhu et Béland 2006; Nath et Das 2011). Le pH optimal de production d'H₂ quant à lui se situe entre 5,5 et 6,0, limitant également les bactéries méthanogènes (Mohan et al. 2013; Ginkel, et al., 2001). Au-dessus de pH 7, la voie solvatogénèse est favorisée (Mohan et al. 2013).

- La température

Tout comme le pH, la température optimale est propre à chaque souche. Cependant, dans une culture mixte, la température optimale change pour chaque microorganisme présent (Wang et Wan 2008; Yokoyama et al. 2009). La plupart des études s'intéressent aux bactéries mésophiles, généralement plus faciles à cultiver (Li et Fang 2007) permettant d'avoir une température optimale de production de bioH₂ entre 35 et 40 °C (Wang et Wan, 2008). Toutefois, la température optimale de l'hydrogénase a été déterminée à 50°C (Adams et Morteson, 1984).

- Présence d'O₂

Il a été rapporté dans la littérature que la présence d'oxygène a un impact important sur la production de bioH₂. En effet, la production d'H₂ se fait à l'aide de microorganismes aéro-anaérobies, voire anaérobies stricts. En 1954, Fisher et al. étaient les premiers à étudier la sensibilité de l'hydrogénase à certains gaz comme l'oxygène. Il a été montré que ce gaz pouvait inhiber de façon réversible ou irréversible l'enzyme. La [NiFe] hydrogénase est inhibée de façon réversible par l'O₂ qui se fixe sur le site actif de l'enzyme. Pour les hydrogénases [FeFe], l'oxygène inhibe de façon réversible l'activité enzymatique en changeant la configuration du site actif, le rendant ainsi inactif (Kubas et al. 2017; Stiebritz et Reiher 2012; Fisher, Krasna, et Rittenberg 1954).

3.6. Les bioréacteurs anaérobies à membranes – AnBRM

Comme vu précédemment, l'hydrogène est produit naturellement dans l'environnement, notamment lors du processus de fermentation sombre. Des recherches ont été menées pour pouvoir utiliser ce métabolisme à des fins de production. Pour cela, des réacteurs anaérobies ont été mis en œuvre, notamment des réacteurs anaérobies à membrane (AnBRM). Ces derniers utilisent des membranes afin d'extraire les gaz produits par les microorganismes et ainsi diminuer la pression partielle en H₂ présente dans le milieu. Ces membranes sont généralement utilisées à l'aide d'un gaz vecteur ou du vide sur un côté de la membrane (généralement au niveau de la lumière) qui est perméable aux gaz, et de l'autre, se trouve le milieu où les gaz sont produits. Pour cela, différentes membranes existent et seront présentées dans cette partie.

3.7. Les membranes

Comme le présente (Remigy et Desclaux 2007), il existe plusieurs géométries de membranes, en fonction des utilisations :

- **Plane** : la membrane est composée 2 couches de polymères identiques ou différentes (une peau semi-perméable et une sous-couche) sur un support mécanique. Un seul sens de filtration est possible car la membrane n'a pas de résistance mécanique. Ces types de membranes sont adaptés aux pressions faibles. Elles ont l'avantage d'avoir un entretien simple mais elles nécessitent une préfiltration de la solution afin d'éviter le colmatage rapide de la membrane (Aimar et Daufin 2004). Ces membranes planes peuvent également être utilisées sous une forme spiralée afin d'augmenter la surface d'échange. Cette forme a un entretien plus difficile mais ne peut accueillir un gros débit de fluide (Aimar et Daufin 2004).
- **Tubulaire** : de forme cylindrique, cette membrane peut être monocanal ou multicanal. Le diamètre du support tubulaire est ainsi de plusieurs cm. Une couche active est déposée sur la paroi des canaux. Cette géométrie est adaptée aux fluides à haute pression car cela favorise un régime turbulent au sein des canaux. Cependant le risque d'abraser la membrane est grand si les particules du fluide sont dures (Aimar et Daufin 2004).
- **Fibre creuse** : ces membranes sont souvent composées d'un seul matériau, contenant des fibres creuses, elles-mêmes contenant une peau et une sous-couche poreuse. Leur fabrication peut faire varier l'emplacement de la peau qui peut être interne, externe ou à double peau (une interne et une externe). Le perméat peut ainsi être récupéré soit à l'extérieur, soit à l'intérieur de la fibre, en fonction du sens de la peau. Il est possible de faire une filtration ou un rétro-lavage dans le sens opposé de la fibre afin de décolmater les membranes car elles sont plus résistantes. Cette configuration permet de résister à de fortes pressions en fonction du diamètre des fibres. Elle permet également la filtration

d'un fluide sans suspension sur une plus grande surface que les géométries planes et tubulaires.

Plusieurs études ont testé des géométries de membranes différentes afin d'augmenter la production d'hydrogène avec ou sans tentative de purification. Pour cela, ils ont fait varier les matériaux de ces membranes avec des caractéristiques différentes présentées dans le tableau 1.

Du point de vue pratique, la fibre creuse semble être la plus adéquate dans l'utilisation d'un bioréacteur. En effet, celle-ci permet d'avoir une grande surface d'échange due à la succession de microfibrilles la composant et à une bonne résistance mécanique. Les membranes tubulaires et les membranes planes ne permettent pas une grande surface mais sont plus simple d'entretien contrairement à la fibre creuse. Le matériau de la membrane a également une grande importance pour l'extraction des gaz. D'après le tableau 1, les matériaux en silicone ou en polyamide semblent les plus intéressants car ils ont une bonne perméabilité aux gaz. Le silicone serait toutefois préférable car la perméation du polyamide au gaz dépend de la température et peut donc ne pas être stable.

Tableau 1: Liste des différentes membranes utilisées pour la production d'H₂ ainsi que leur avantage et inconvénients

Géométrie de la membrane	Matériaux	Utilisation	Avantages	Inconvénients	Sources
Tubulaire (immergé)	Polypropylène hydrophobe	Extraction H ₂	Bonne sélectivité H ₂ (H ₂ /CO ₂ = 3,8/4,0)	Surface tubulaire insuffisante, seule la partie non en contact avec la paroi du réacteur était active	Lee, et al. 2016
Tubulaire	Silicoaluminimonophosphate microporeux (SAPO34) zeolite	Séparation H ₂ /CO ₂	H ₂ dans le perméat	La zéolite est coûteuse, encrassement rapide	Ramirez-Maralez, et al., 2013
Plane	Polyethersulfone (PTFE)	Extraction des gaz et production H ₂	Bonne extraction d'H ₂ à partir d'un biofilm microbien	Faible résistance mécanique, flux de H ₂ diminue rapidement	Zheng, et al., 2010
Fibre creuse	Zeolite + acétate de cellulose	Séparation H ₂ /CO ₂	Particules de zéolites sont échangeuses de cation	La zéolite est coûteuse, encrassement rapidement	Ohs, et al., 2018
Fibre creuse	Polyethersulfone (PTFE)	Production H ₂	Développement d'un biofilm sur les fibres, bonne production d'H ₂	Colmatage dû aux biofilms (lavage nécessaire pour enlever une partie)	Renaudie, 2019
Fibre creuse	Silicone (PDMS)	Séparation gaz/liquide, séparation H ₂ /CO ₂	Diminue la pression partielle des biogaz, H ₂ dans le retentât	Grande perméabilité au CO ₂	Liang, et al., 2002 ; Ramirez-Moralez, et al., 2013 ; 2019 ; Bakonyi, et al., 2017
Fibre creuse	Polyamide	Extraction et séparation H ₂ /CO ₂	Bonne résistance mécanique	La perméation de la membrane dépend de la température	Bakonyi, et al., 2012

3.8. Utilisation de gaz vecteurs pour une meilleure production d'hydrogène

Van Andel et al., 1985 et son équipe ont démontré qu'utiliser un flux d'azote ou de dioxyde de carbone dans le milieu de culture permet de diminuer la pression partielle des gaz présents quel que soit le taux de croissance de la *C. butyricum*. Par ailleurs, à des taux de croissance supérieurs à 0.05 h^{-1} , la production d'acétate et de butyrate augmente, augmentant parallèlement la production d' H_2 , probablement en raison d'une plus grande activité de la NADH-ferredoxine oxydoréductase (van Andel et al. 1985).

Par la suite, certaines études ont également essayé de diminuer la P_{H_2} en utilisant un gaz vecteur pour augmenter la production de bio H_2 , comme par exemple l'équipe de Kim et al. qui, en 2006 ont comparé la production d' H_2 en utilisant un flux de N_2 ou de CO_2 à partir de boues issues d'un digesteur anaérobie de graines traitées à $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Ils ont observé que l'utilisation de CO_2 a permis d'augmenter la production de bio H_2 passant d'une production de 3,20 à 6,89 $\text{L}_{\text{H}_2}/\text{g}/\text{j}$ contre 3,96 $\text{L}_{\text{H}_2}/\text{g}/\text{j}$ pour l'utilisation d'azote au même flux de 300 mL/min (Kim et al. 2006).

Du biogaz peut être également utilisé comme Nualsri et al., ont pu faire en 2017 avec deux bioréacteurs, un permettant la production d' H_2 avec *Clostridium butyricum* TISTR1032 avec du sirop de canne à sucre et le second est utilisé pour la production de CH_4 avec des boues issues d'eaux usées de brasserie. Les gaz produits dans le bioréacteur à CH_4 sont introduits dans le bioréacteur contenant les *Clostridium*. Par cette méthode, la production est passée de 17 L/L/j à 23 L/L/j (Nualsri et al. 2017).

3.9. Utilisation du vide pour une meilleure production d'hydrogène

De même que pour le flux d'azote, un vide peut également être utilisé pour réduire la pression partielle d' H_2 dans le milieu. En 2015, l'équipe de Rajhi et al. a appliqué un vide au niveau du ciel de réacteur et a pu observer un meilleur développement des *Clostridium* spp. ainsi qu'une augmentation de la consommation de substrats tels que le lactate pour une meilleure production de bio H_2 . Par ailleurs, l'utilisation du vide a également permis de montrer qu'en présence de méthanogène, la production de bio H_2 est plus favorisée que la production de CH_4 passant de 0 $mg_{H_2}/COD/L$ pour 3016 $mg_{CH_4}/COD/L$ produit, sans vide à 3223 $mg_{H_2}/COD/L$ pour 767 $mg_{CH_4}/COD/L$ produit en présence vide pour des eaux usées industrielles, suggérant ainsi l'efficacité de l'extraction de l' H_2 par l'utilisation du vide (Rajhi et al. 2016).

De même, en 2012, Lee et al. ont étudié l'impact de différentes pressions appliquées sous vide sur la production d' H_2 dans une culture en continu. Ils ont observé que la pression imposée par le vide peut avoir un impact sur le taux de production d' H_2 . En effet, pour 101 kPa, le taux de production était de 0,348 mol/L/j mais augmente légèrement de 8% lorsque la pression appliquée par le vide baisse jusqu'à 50 kPa (Lee et al. 2012).

Cette observation a également été faite par Mandal et Nath en 2006 pour une culture d'*Enterobacter cloacae* passant de 6 $\mu mol/l/h$ à 101 kPa à 17 $\mu mol/L/h$ pour 50 kPa qui semble être la pression optimale de production. En effet d'autres pressions ont été étudiées montrant qu'une pression plus faible à 44 kPa ou plus forte à 73 kPa permettaient d'avoir des taux de production maximale de 12 $\mu mol/h/l$ et 15 $\mu mol/h/l$, respectivement (Mandal, et al., 2006).

3.10. Les principales populations microbiennes retrouvées dans les déchets agricoles propices à la fermentation sombre

Il existe dans l'environnement des microorganismes capables de produire de l'hydrogène naturellement en réduisant deux protons dans des conditions d'anaérobiose stricte. Comme dit dans la partie 3.2 de ce chapitre, ces microorganismes interagissent pour former un écosystème permettant la dégradation de la matière organique.

Au niveau expérimental, les souches mésophiles sont intéressantes car elles nécessitent le moins d'énergie ajoutée durant la fermentation sombre. Il est possible de produire du bioH₂ à partir d'une seule souche ou par l'utilisation d'un consortium microbien dont les souches seront directement ou indirectement liées à la production (Chandrasekhar, Let al., 2015).

Comme discuté plus haut, le métabolisme de la production d'H₂ est présent naturellement chez certains microorganismes, dans l'environnement. Le H₂ est ensuite utilisé par d'autres microorganismes pour la production d'autres composés tels que le H₂S ou le CH₄.

La plupart des souches de microorganismes producteurs d'hydrogène sont anaérobies strictes ou aéro/anaéro facultatives, mésophiles ou thermophiles. La majorité appartient au phyla des *Firmicutes* et des *Proteobacteria*. Les bactéries anaérobies strictes sporulantes sont considérées comme les principales productrices d'hydrogène, suivies des bactéries anaérobies non sporulantes puis des espèces anaérobies facultatives. En culture mixte, ces bactéries peuvent croître, en présence d'autres microorganismes dans des conditions d'interaction symbiotique. C'est notamment le cas avec les Enterobactéries qui ont la capacité de consommer l'O₂ du milieu pour maintenir les conditions d'anaérobiose (Cabrol et al. 2017).

Dans le cas des déchets agricoles, l'apport de microorganismes provient d'animaux. Ainsi, trois phyla sont retrouvés dans les déchets agricoles utilisés : les *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et

Proteobacteria. Les proportions peuvent varier en fonction de l'alimentation de l'animal (Jami et al. 2013; Wang et al. 2020). *Clostridium* et *Bacillus* pour les *Firmicutes* mais également *Escherichia* sont les genres les plus souvent retrouvés dans les déchets agricoles.

Cependant, dans les cultures mixtes, même si elles sont faciles d'utilisation car les conditions d'asepsie ne sont pas essentielles et permettent d'utiliser plusieurs types de substrats, des producteurs d'H₂ sont retrouvés mais également des consommateurs d'H₂. C'est notamment le cas avec les bactéries lactiques, les méthanogènes, les homoacétogènes qui diminuent le rendement de conversion du substrat en hydrogène (Ntaikou, et al., 2010; Guo et al. 2010). Ces microorganismes ne sont pas forcément des bactéries, la plupart des méthanogènes étant des archées. Par ailleurs, les consommateurs d'hydrogène ne sont pas sporulants, contrairement à certaines espèces bactériennes acidogènes comme les *Clostridium* ou *Bacillus*. Les spores étant plus résistantes que les microorganismes planctoniques, un traitement thermique à 80°C est un moyen efficace de réduire significativement la charge microbienne des consommateurs d'hydrogène (Ntaikou, et al., 2010). Un traitement chimique peut également être réalisé notamment avec des agents oxydants, acides ou basiques (Monlau et al. 2013). Cependant l'utilisation de ces agents chimiques pourrait également perturber le milieu en changeant la composition initiale et perturber le métabolisme microbien.

4. Procédés électromicrobiologiques

Il existe des microorganismes et des biofilms dits électroactifs pouvant échanger des électrons avec leur environnement. Cette propriété du vivant peut être utilisée par exemple dans une pile microbienne qui consiste à générer une force électromotrice par oxydation de la matière organique catalysée à l'anode par des biofilms électroactifs couplée à la réduction d'un accepteur d'électron à la cathode, le plus souvent l'oxygène (Smida, 2018). L'électrolyse microbienne utilise également cette propriété, cependant le système n'est généralement pas producteur d'énergie, mais de l'énergie est apportée au système électrochimique pour permettre les réactions d'électrolyse. La pile microbienne et l'électrolyse microbienne sont toutes deux des technologies électromicrobiennes permettant donc de produire de l'énergie

et/ou des composés d'intérêts tels que l' H_2 ou le CH_4 , à l'aide de microorganismes électroactifs comme catalyseurs.

4.1. Transfert d'électron extracellulaire

Les microorganismes dits électroactifs sont retrouvés aussi bien chez les bactéries et les archées (Logan et al. 2019). Ces derniers permettent de catalyser des réactions, augmentant le transfert des électrons entre une molécule donneuse d'électron et l'électrode. Dans une cellule d'électrolyse, cette catalyse permet de diminuer la tension de la cellule à imposer, permettant la production d'une molécule d'intérêt. C'est notamment le cas pour la production d' H_2 où, par électrolyse de l'eau, la tension à appliquer doit être de 1,7 V contre 0,3 V en présence d'un biofilm microbien électroactif sur l'anode (Bhagchandani et al. 2020).

Ces microorganismes électroactifs oxydent la matière organique en un produit métabolique plus oxydé et en CO_2 . Les électrons issus du métabolisme oxydatif sont pris en charge transitoirement par des cofacteurs présents dans la cellule tels que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), la flavine adénine dinucléotique (FAD) et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ($NADP^+$) qui deviendront ainsi réduits. Cependant, comme indiqué précédemment, les bactéries électroactives ont la capacité de libérer l'excès d'électrons dans le milieu extérieur, à l'aide de molécules médiatrices telles que des cytochromes ou quinones ou à l'aide d'un support (figure 2-6). Pour cela, 2 modes de transfert sont décrits dans la littérature (Bhagchandani et al. 2020).

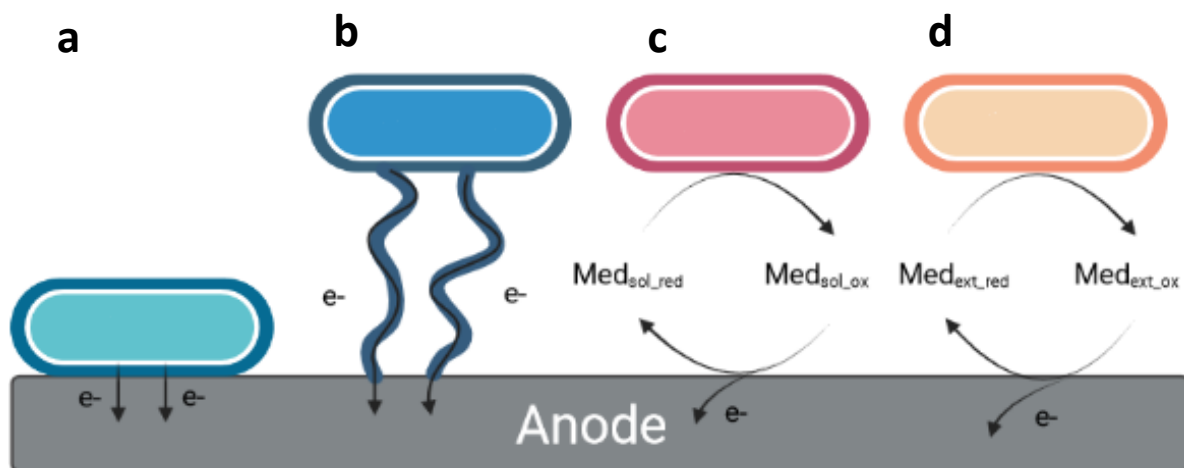


Figure 2-6 : Schéma des différents transferts d'électrons extracellulaires au niveau de l'anode. Transfert direct - a : par contact direct de la cellule sur l'électrode, b : par contact via des nanofils conducteurs. Transfert indirect - c : par des médiateurs solubles présents dans le milieu d : par des médiateurs excrétés dans le biofilm

4.2. Transfert direct des électrons

Le mécanisme de transfert direct peut se faire à partir de deux méthodes : par contact direct de la membrane cytoplasmique avec le support ou par utilisation d'appendices appelés *nanowires*. La plupart des études se sont concentrées sur *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*, qui sont devenues les espèces modèles les plus étudiées en électromicrobiologie en raison de leur capacité à pouvoir former un biofilm sur la surface de l'électrode (Lovley 2011).

Comme pour la chaîne respiratoire de microorganismes aérobies, des protéines membranaires se situant entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire permettent le passage des électrons. Ces protéines ont été montrées chez plusieurs bactéries comme étant des cytochromes. Ces derniers permettent le transfert des électrons au travers de la membrane réduisant des composés du milieu extérieur tels que les métaux. C'est notamment le cas avec *S. oneidensis* qui possède une chaîne de cytochromes dont la gamme de potentiel varie de -350 à 0 mV vs. SHE. Cette chaîne de cytochromes permet le transfert d'électrons vers le milieu extérieur mais

peut également être réversible. Ainsi, ce mécanisme de transfert direct par contact peut être retrouvé dans des bactéries étant sur l'anode et/ou la cathode d'un système électromicrobien.

Comme dit plus haut, il existe également des *nanowires* ou pili représentant une extension de la membrane externe. Ces pili ont la capacité d'être conducteurs, d'avoir une conductivité proche de celle des métaux et semblent être liés à la présence de cytochromes. Les électrons passeraient par la suite au travers de cette chaîne protéique allant jusqu'aux médiateurs présents dans le milieu extérieur. Par ailleurs, dans un biofilm, les bactéries peuvent, par le biais de ces *nanowires*, s'échanger les électrons en faisant une connexion physique entre cellules par contact direct ou via des polymères extracellulaires (Xiao et al. 2017; Lovley 2017).

4.3. Transfert indirect des électrons

Le transfert indirect des électrons fait appel à l'utilisation de navettes d'électrons excrétés par les microorganismes tels que des cytochromes, ou des médiateurs organiques comme les quinones ou des médiateurs minéraux présents dans l'environnement, comme la magnétite (Xu, et al., 2016). Ce phénomène est généralement observé dans des biofilms où les exopolysaccharides EPS servent de matrice aux navettes électrons, c'est notamment le cas pour les bactéries *Geobacter* et *Shewanella* (Marsili et al. 2008) mais également pour *S. oneidensis* et *P. aeuginosa* qui produisent des flavines et la phénazine, respectivement, dans le milieu afin de les utiliser pour les transferts d'électrons extracellulaires (Marsili et al. 2008; Hernandez et al., 2004). A l'image du transfert direct, ces navettes s'oxydent et se réduisent successivement afin de transférer les électrons vers l'accepteur final d'électron extérieur. Outre la production de médiateurs intermédiaires, les microorganismes électroactifs peuvent également utiliser les médiateurs chimiques déjà présents dans le milieu extérieur afin de réaliser le transfert d'électrons, comme cela a été le cas avec le rouge neutre utilisé avec *Actinobacillus succiongenes* qui a permis d'augmenter la production de succinate à partir de fumarate, de CO₂ et d'hydrogène (Lovley 2010).

4.4. Les biofilms microbiens

4.4.1. Généralités sur les biofilms microbiens

Un biofilm est composé d'une communauté microbienne plus ou moins complexe fixée sur un support. Cette communauté est maintenue par une matrice composée de polymères, principalement des EPS (Sutherland 1982) produits par les microorganismes. C'est une forme à la fois protectrice vis-à-vis de l'environnement mais aussi de symbiose permettant aux microorganismes de communiquer et avoir un rôle spécifique dans la communauté du biofilm.

Pour cela, un biofilm se forme suivant un cycle de cinq étapes (figure 2-7) :

- Etape 1 - Dépôt : Le dépôt de microorganismes sur une surface. A cette étape, l'adhérence est assez faible car elle met en jeu des liaisons de types Van der Waals, électrostatiques et des interactions acide-base, selon la surface déposée ;
- Etape 2 - Adhésion : L'adhérence des microorganismes sur la surface et entre-elles. Durant cette étape, l'adhérence du début de la formation du biofilm est irréversible car les bactéries de surfaces ont produit des exopolysaccharides (Makin et Beveridge 1996). Ces produits forment également le glycocalyx, la matrice présente autour des bactéries ;
- Etape 3 – Maturation 1 : La croissance des microorganismes commence à former des microcolonies sur le support colonisé. Ces colonies vont petit-à-petit recouvrir toute la surface du support ;
- Etape 4 – Maturation 2 : La taille du biofilm augmente. Durant cette étape, le biofilm va former une structure tridimensionnelle liée à la multiplication des bactéries présentes jusqu'à stabilisation. Des canaux se forment dans les biofilms afin de permettre aux cellules présentes d'échanger les nutriments ou d'autres molécules utiles dans la vie du biofilm.

- Etape 5 – Dispersion et propagation : Dispersion du biofilm. Lorsque le biofilm devient plus épais, celui-ci peut se détacher en surface dans le milieu par morceaux ou sous forme planctonique afin de se propager et coloniser une autre surface.

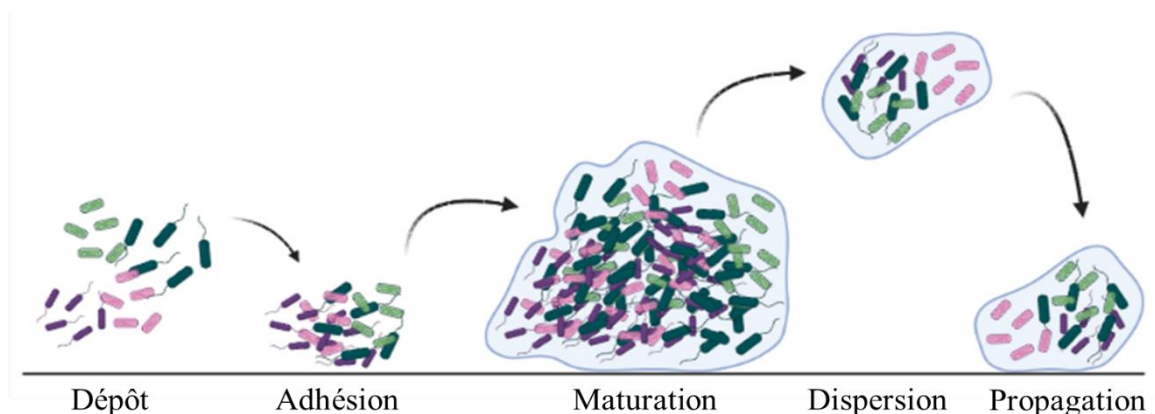


Figure 2-7 : Schéma montrant les étapes de la formation et la colonisation d'un biofilm sur une surface. Les microorganismes en suspension se déposent sur la surface (Dépôt) et s'y adhèrent afin de commencer à coloniser (Adhésion). Les microorganismes vont par la suite excréter des composés permettant de former une structure tridimensionnelle et ainsi créer une structure permettant l'échange de molécules ou de nutriments au sein du biofilm (Maturation). Vient ensuite le décrochage d'une partie du biofilm lié à des évènements environnementaux et à l'épaisseur du biofilm (Dispersion) qui viendra se déposer plus loin sur la même ou sur une autre surface (Propagation).

4.4.2. Les biofilms électroactifs

Dans chaque organisme vivant, des réactions redox jalonnent leur métabolisme afin de fournir de l'énergie et des précurseurs nécessaires à leur croissance. Contrairement à certains microorganismes qui utilisent un accepteur final d'électron inorganique comme l' O_2 , d'autres ont la capacité d'utiliser dans leur environnement des accepteurs finaux d'électrons comme

des composés humiques (Lovley et al. 1996), les sulfates (Muyzer et Stams 2008) ou même des métaux lourds et toxiques comme l'uranium (Wall et Krumholz 2006). Généralement, il est préférable d'utiliser des biofilms mixtes et non purs car l'interaction inter espèces entre microorganismes est importante pour le transfert d'électrons et/ou de co-produits issus du métabolisme microbien. Ainsi certaines bactéries peuvent produire des molécules pouvant être utilisées comme transporteurs d'électrons pour les transferts indirects et d'autres peuvent utiliser les produits issus de la fermentation comme l'acétate pour les oxyder et produire un flux d'électron directement au niveau des électrodes.

Ces biofilms électroactifs sont composés de microorganismes électroactifs pouvant être des archées ou des bactéries. Ils sont séparés en deux catégories qui sont présentées ci-dessous.

4.4.3. Les microorganismes électrotrophes – biocathodes

Précédemment, il a été vu que la présence d'acétate permet d'obtenir les meilleurs rendements de production de bioH₂. Utilisé comme substrat dans une CEM, l'acétate permet également d'augmenter sa production à la cathode (B. H. Kim et al. 2015). Lorsque celui-ci est le co-produit majoritaire au niveau de la cathode, certaines bactéries deviennent majoritaires également. C'est notamment le cas avec les bactéries homoacétogènes telles que *Acetobacterium sp* (Mashall et al. 2012) ou *Desulfovibrio* et *E. limosum* (Pisciotta et al. 2012). Kim et al., 2015 ont émis l'hypothèse qu'en fonction des conditions initiales, la population microbienne change dès le début de la culture car les souches électro-réductrices peuvent devenir électro-oxydantes et ainsi changer leur métabolisme (Kim et al. 2015).

Une étude a montré que *Desulfovibrio* peut utiliser son excès d'électrons pour entrainer une corrosion de l'acier en condition anaérobie (Venzlaff et al. 2013). C'est pour cette raison que les bactéries homoacétogènes sont importantes car l'acétate est utilisé par des bactéries telles que *Desulfovibrio* comme source de carbone. Ainsi, si l'on retrouve la bactérie en présence de populations homoacétogènes, on peut supposer que les bactéries utilisent les électrons issus

de la cathode utilisant l'acétate produit dans le milieu comme source d'énergie (Fu et al., 2013). Cependant, la caractéristique des homoacétogènes pouvant également récupérer les électrons issus de la cathode pour réduire le CO₂ en acétate n'est pas clairement démontrée dans la littérature.

4.4.4. Les microorganismes exoélectrogènes – bioanode

Les bactéries exoélectrogènes sont le plus souvent étudiées face aux bactéries électrotrophes. Ces microorganismes peuvent transférer leur excès d'électrons issus de leur métabolisme au milieu extérieur (matériau ou composé chimique externe, dans notre cas, l'anode). Les phyla les plus souvent retrouvés sont : α , β , γ , δ protéobactéries (Chaudhuri et Lovley 2003; Holmes et al. 2004; Zuo et al. 2008), les firmicutes, les acidobactéries (Bond et al. 2002) et les actinobactéries (Bond et Lovley 2005).

Certaines de ces bactéries sont par ailleurs connues comme étant non électro-actives mais dans certaines conditions, elles peuvent avoir des échanges d'électrons avec le milieu extérieur. C'est notamment le cas avec *E. coli*. En effet, en cas de cultures longues ou en présence d'électrodes traitées chimiquement notamment avec un dépôt de platine, la bactérie montre une densité de courant proche de *Geobacter* ou *Shewanella* qui sont les deux bactéries modèles parmi les bactéries électroactives (Zhang et al. 2006; Logan et al. 2019; Ringeisen et al. 2006).

Avoir un faible potentiel anodique pourrait sélectionner des microorganismes exoélectrogènes pouvant combiner leur métabolisme énergétique avec ce faible gradient de potentiel entre le potentiel redox de leur donneur d'électron et l'anode (ex. : *Geobacter* limité en-dessous de -0,15 V vs. SHE (Jung et Regan 2011)). Cependant, les bactéries peuvent s'adapter à un potentiel donné en régulant les équivalents réducteurs comme le ratio NADH/NAD⁺, selon le potentiel de l'accepteur d'électron (Logan 2009).

Il est toutefois à noter que la bioanode oxyde le substrat organique apporté dans le milieu afin de produire des protons, en plus de transférer leur excès d'électrons. Cependant, il a été vu que la résistance externe a un impact sur la vitesse de consommation du substrat, ce qui affecte la communauté microbienne de ce biofilm et ainsi, par extension, la production de proton et le pH au niveau du biofilm de l'anode (Ren et al. 2007).

4.4. La pile microbienne (PM)

La pile microbienne (PM) est la première technologie électromicrobienne à avoir été décrite expérimentalement utilisant les microorganismes électroactifs. Elle a pour but de produire de l'électricité grâce à l'exploitation du métabolisme microbien (Logan 2008). Pour cela, des microorganismes anaérobies sont implantés dans le compartiment anodique de la pile afin d'oxyder la matière organique. Ces microorganismes sont généralement organisés sous la forme de biofilms microbiens pouvant alors réaliser un transfert d'électron extracellulaire vers l'anode. Les électrons sont alors conduits au travers d'un circuit électrique pour être amenés à la chambre cathodique afin de réduire un accepteur final d'électron, qui est le plus souvent l'oxygène mais peut également être du nitrate ou toute autre molécule dont le potentiel redox est supérieur au potentiel d'oxydation de la matière organique (figure 2-8). En général, le compartiment cathodique et le compartiment anodique sont séparés par une membrane échangeuse de cation afin d'éviter la présence de toute trace d'oxygène dans la chambre anodique qui contient des microorganismes anaérobies stricts (Schaetzle, et al., 2008).

Une des premières PM fonctionnelle a été obtenue en 1911 par l'équipe de Potter qui a observé une tension de 0,3 à 0,5 V à partir des matériaux conducteurs métalliques et en présence de *Saccharomyces cerevisiae*, connue aujourd'hui comme électroactive. Le design de la pile permet de produire des protons obtenus lors de l'oxydation de la matière organique. Ces protons diffusent vers la chambre cathodique à travers par exemple une membrane échangeuse d'ion pour réagir avec les électrons et l'accepteur final d'électron, par exemple O₂ (Logan 2008; Palanisamy et al. 2019). Une pile microbienne peut également être créée en plaçant l'anode

dans un milieu sédimentaire et la cathode dans l'eau superficielle au-dessus de cette zone sédimentaire. Dans ce cas, il n'y a pas de membrane échangeuse d'ions.

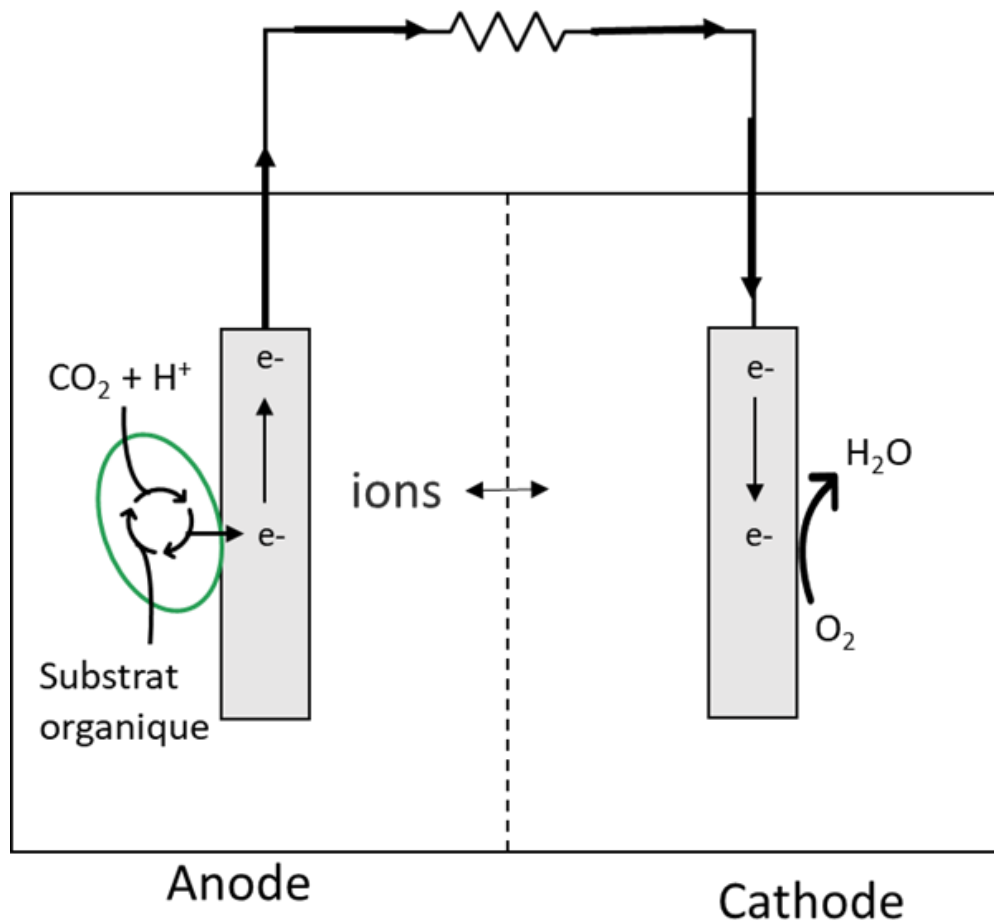


Figure 2-8 : Schéma d'une pile microbienne avec membrane échangeuse d'ion (Schaetzel et al., 2008). La chambre anodique est composée d'une électrode et d'un biofilm microbien fixé dessus permettant l'oxydation de la matière organique (substrat) afin de produire un flux d'électrons pouvant circuler dans un circuit électrique. Des protons sont également produits et, pour cet exemple, des ions passent à travers la membrane échangeuse d'ions entre la chambre anodique et la chambre cathodique. La chambre cathodique contient également une électrode qui peut réduire l'oxygène en eau ou réagir avec un autre accepteur d'électron.

4.5. La cellule d'électrolyse microbienne (CEM)

Le but principal de la cellule d'électrolyse microbienne (CEM) n'est pas la production d'électricité mais la production d'un produit d'intérêt, par exemple le H₂. Pour cela, de même qu'avec la pile microbienne, la matière organique est oxydée à l'anode et les électrons sont transférés à la cathode où, par exemple, la réduction des protons en H₂ se réalise. Ici, la réaction de réduction pourrait éventuellement être catalysée par des microorganismes électroactifs producteurs d'H₂. Certains auteurs ont ainsi décrit la récupération des effluents issus de la fermentation sombre, riches en acides gras volatils pour obtenir une production d'H₂ complémentaire (Lalaurette et al. 2009).

Toutefois, pour cet exemple de production d'hydrogène, il est nécessaire d'apporter une énergie supplémentaire dans le système électromicrobiologique, en imposant un courant ou un potentiel adéquat, car le potentiel généré par l'oxydation électromicrobienne de la matière organique ne suffit pas à lui seul à passer la barrière endergonique de la réaction de production d'H₂. En effet, le potentiel redox de la réduction de protons en H₂ est de -0,414 V vs. SHE (Chandrasekhar, Lee, et Lee 2015). Pour que la réaction puisse se faire, il faudrait théoriquement un potentiel d'au moins 0,11 V en plus de celles générées par les bactéries qui peuvent atteindre un potentiel de -0,3 V vs. SHE (Chandrasekhar, et al., 2015; Mohan et Pandey 2013), dans les conditions anaérobies. Par ailleurs, les surtensions électrochimiques observées, dues aux composés chimiques, aux matériaux utilisés et aux microorganismes augmentent le potentiel à appliquer pour observer la production d'H₂ (Chandrasekhar, Lee, et Lee 2015; Mohan et Pandey 2013). Notons que la tension appliquée à une électrode peut amener à une sélection de différentes bactéries colonisant les électrodes, entre l'anode et la cathode (Mohan et Pandey 2013). D'après Cheng et Logan, 2007, 90 % de l'H₂ peut être récupéré au maximum avec la CEM contre 33 % en fermentation sombre (Cheng et Logan 2007).

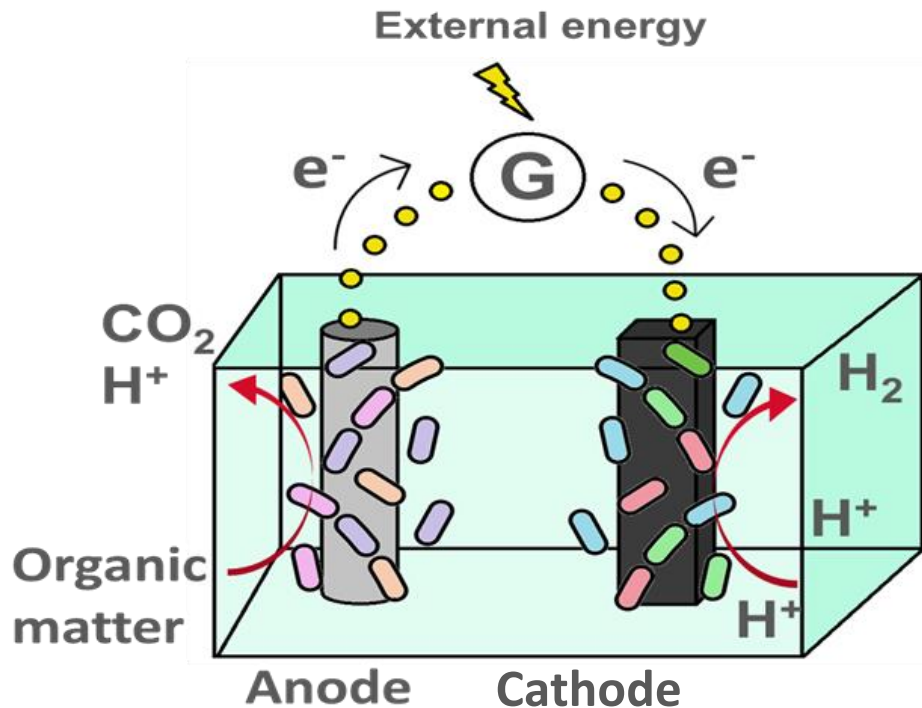


Figure 2-9 : Schéma d'une cellule d'électrolyse microbienne sans membrane échangeuse d'ion. Les électrodes sont dans un seul et même compartiment. L'anode et la cathode sont séparées par l'électrolyte et un biofilm est implanté sur chaque électrode. La matière organique est oxydée à l'anode, libérant des protons et un flux d'électrons issus du métabolisme microbien. Les protons sont ensuite réduits à la cathode à l'aide du flux d'électron arrivant. Cette réaction nécessite un apport d'énergie supplémentaire par courant ou potentiel imposé à l'aide d'un générateur de puissance ou d'un potentiostat

Historiquement, la CEM a été initialement mise en œuvre expérimentalement sur 2 chambres de réactions. Cependant, plusieurs études tendent à rassembler les électrodes dans une seule chambre réactionnelle (figure 2-9), afin de réduire la résistance de la cellule, limiter les gradients de pH liés aux réactions et permettre une mise en œuvre plus simple (Hallenbeck 2011). Généralement les matériaux utilisés à la cathode sont le platine ou le palladium, ce qui, comme pour la pile microbienne, est un facteur limitant pour l'utilisation à une échelle industrielle. Cependant, en 2009, Jeremiasse et al., ont réussi à réduire les coûts en utilisant des électrodes moins coûteuses, avec des feutres de carbone qui ont l'avantage d'utiliser une meilleure surface d'adhésion pour les microorganismes (Jeremiasse, et al., 2010).

4.6. Les procédés de type *Snorkel* ou en court-circuit

Parmi les procédés électromicrobiens, les systèmes en court-circuit (ou *Snorkel*) n'utilisant aucun ajout externe d'énergie ont été proposés récemment, notamment pour le traitement des eaux. Pour cela le procédé consiste à utiliser une électrode pouvant agir comme une anode à une extrémité et une cathode à l'autre. L'anode est utilisée dans le milieu riche ou dans un sol pour oxyder la matière organique présente à l'aide d'un biofilm électroactif. Les électrons produits à la bioanode circulent ensuite vers la cathode où un autre biofilm microbien y est implanté pour la réduction de molécules ou composés accepteurs d'électrons tels que le NO_3^- (Rogińska et al. 2021), de l' O_2 (Hoareau et al. 2023). L'utilisation de deux électrodes distinctes dans deux milieux différents, en court-circuit peut également être mise en place. La bioanode est utilisée pour l'oxydation de la matière organique et le courant produit permet de réduire des métaux tels que le cuivre au niveau de la cathode (Mitov et al. 2021).

4.7. Electrofermentation

Les microorganismes électroactifs sont présents naturellement dans l'environnement. Leur métabolisme particulier de transfert d'électron a été décrit dans la partie 4.1.

D'un point de vue pratique, l'électrofermentation est un processus où, selon les conditions environnementales redox données, l'échange d'électrons entre les bactéries électroactives est favorisé. Contrairement à l'électrolyse microbienne, il n'y a pas avec l'électrofermentation de relation directe entre le courant circulant entre les électrodes et le flux de molécules produites. L'électrofermentation a pour but de créer un environnement propice au voisinage des électrodes pour favoriser les échanges redox, notamment liés aux cofacteurs tels que le $\text{NADH}/\text{NADH}^+$, en générant un milieu favorable à la production microbologique de la molécule d'intérêt, comme par exemple la production de H_2 . L'électro-fermentation est ainsi une technique pouvant influencer sur le métabolisme global des microorganismes en cultures mixtes (Moscoviz 2017).

L'électrofermentation consiste à réaliser une fermentation à l'aide d'électrodes polarisées par la présence de microorganismes électroactifs. Généralement, une faible densité de courant ou un faible courant imposé peut impacter le processus (Choi et al. 2014; Kracke, et al., 2015; Moscoviz et al. 2016; Moscoviz, et al., 2018).

En 2014, Choi et al. ont réalisé des essais avec *Clostridium pasteurianum* DSM 525, et ont étudié l'impact d'un courant cathodique sur le métabolisme du microorganisme, notamment les ratios NADH/NAD⁺ lors de la fermentation en présence de glucose ou de glycérol. Ils ont montré qu'une faible densité de courant pouvait changer le métabolisme et impacter ce ratio au détriment du NADH (Choi et al. 2014). Ce courant n'étant pas suffisant pour une électrolyse microbienne, mais pourrait être utilisé pour réaliser une électrosynthèse microbienne. Changer le ratio NADH/NAD⁺ privilégie ainsi des métabolismes microbiens pour retrouver un équilibre au sein de la cellule mais également favoriser des populations électroactives à la cathode préférant des conditions réductrices (Moscoviz 2017).

4.8. Les potentiels redox possibles à la cathode

D'un point de vue chimique, pour qu'une réaction ait lieu, elle doit être thermodynamiquement favorable. Cela est déterminé par l'enthalpie libre (ΔG) du système. Si la réaction est thermodynamiquement défavorable, de l'énergie doit être apportée pour permettre la réaction. Pour réaliser cela en électrochimie, il est possible d'imposer à l'électrode un potentiel (ou un courant) conduisant à forcer la réaction.

Différentes équations existent pour calculer le potentiel redox d'une réaction. Le lien entre l'enthalpie de Gibb et la tension à apporter pour une réaction se fait à l'aide de cette équation :

$$E_{\text{éq}} = -\frac{\Delta G_r^0}{nF}$$

Où E (V) représente la tension à ajouter, n est le nombre d'électrons échangés lors de la réaction et F est la constante de Faraday (96 485 C.mol⁻¹). Dans le cas de la production d'hydrogène à partir de l'oxydation de l'acétate, il faudra ajouter une énergie de :

$$E = -\frac{130,18 \times 10^3}{8 \times 96485} = -0.169 \text{ V}$$

Dans le cas d'une électrolyse microbienne, cette tension à appliquer peut également être calculée en prenant en compte les réactions globales présentes à l'anode et à la cathode et peut être déterminée par l'équation de Nerst, reprenant les potentiels standards des demi-équations, suivant les équations :

$$E_{a \text{ ou } c} = E^0 - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \right)$$

Où E_a ou E_c (V) est le potentiel d'équilibre à l'anode ou la cathode, E⁰ (V) est le potentiel standard du couple redox mis en jeu, R est la constante des gaz parfaits (8,314 J/mol⁻¹.K⁻¹), T (K) est la température, F est la constante de Faraday (96 485 C.mol⁻¹), a_{ox} et a_{red} sont les activités chimiques des oxydants et réducteurs de la réaction d'oxydo-réduction.

$$E_{\text{éq}} = E_c - E_a$$

Cette tension d'équilibre dépend de plusieurs paramètres dont le pH. Cela dépend également de la pression partielle en H_2 , qui, en fonction de sa valeur peut inhiber la production d' H_2 . Ainsi, une augmentation de la pression partielle de 10 ou 100 bar peut augmenter le potentiel de 0,03 à 0,06 V, demandant ainsi plus d'énergie à la production d' H_2 (Logan et al. 2008).

4.9. Les électrodes

La sélection des électrodes est primordiale dans la construction du système électromicrobiologique et se base sur plusieurs paramètres tels que le coût des matériaux utilisés pour la mise en échelle du procédé, et leur biocompatibilité avec les microorganismes. En effet, certains matériaux comme le cuivre peuvent avoir un impact négatif sur la croissance des biofilms, voire être toxique. Plusieurs études ont utilisé des combinaisons de matériaux afin d'augmenter la réactivité des électrodes. Le tableau 2 présente les électrodes utilisées pour la construction de CEM ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Comme indiqué, les matériaux métalliques permettent une bonne production d' H_2 , cependant, leur coût est important et, dans le cas de l'acier inox, le métal peut également se corroder avec le temps et l'activité des microorganismes. Les matériaux à base de carbone quant à eux sont potentiellement moins chers et sont compatibles avec l'activité microbienne. Combinées avec des particules métalliques telles que la platine, ces électrodes peuvent présenter une très bonne réactivité pour produire l' H_2 mais sont moins stables au cours du temps en raison probablement d'un empoisonnement des catalyseurs. Le platine est par exemple sensible à la présence de produits soufrés, largement présents dans le digestat d'un méthaniseur. Concernant le nickel, celui-ci utilisé en présence ou en absence d'autres métaux tels que le fer ou le molybdène, semble pouvoir maintenir dans le temps une bonne production d' H_2 (Kundu et al. 2013).

Tableau 2: Matériaux principalement retrouvés en CEM à l'anode et la cathode

Cathode	Anode	Tension imposée	Avantages	Inconvénients	Source
Acier inoxydable	Fibre de graphite	0,7 V	Peu cher, une grande surface permettrait de produire un bon taux de H ₂	Surtension électrochimique, corrosion par les microorganismes	(Tenca et al. 2013)
Pt			Bonne production de H ₂ , courant relativement important	Le Pt est couteux, sensible à des composés organiques soufrés	
Papier de carbone avec 0,35 mg/cm ² Pt	Fibre de carbone	0,6V	Faible surtension électrochimique, faible quantité de Pt, un biofilm anodique favorise l'efficacité et la puissance de sortie de la CEM	Pt sensible à des composés organiques soufrés	(A. Wang et al. 2011)
Feutre de graphite	Feutre de graphite	1; 1,5 et 2 V	Peu coûteux, la porosité augmente la surface d'échange	La production de d'H ₂ est plus grande quand une tension est imposée	(Khosravanipour Mostafazadeh et al. 2016)
Ni-Mo (Mo = molybdène)	Tissue de carbone	0,6; 0,4; 0,35 et 0,3 V	Peu coûteux, stable, se rapproche du taux de production d'H ₂ observé avec une électrode contenant du Pt		(Hu, et al. 2009)

5. Combinaison de la CEM et de la AnBRM

Du point de vue pratique, l'utilisation de la fermentation sombre ne permet pas de récupérer tout le bioH₂ disponible dans les matières organiques traitées. En effet, comme montré précédemment, les microorganismes fermentaires ne peuvent oxyder totalement la matière organique, limitant ainsi la quantité de bioH₂ produit à 4 mol_{H₂}/mol_{glucose}.

Il existe toutefois des microorganismes pouvant oxyder davantage les produits issus de la fermentation sombre tels que l'acétate ou le butyrate. Ces microorganismes sont le plus souvent retrouvés en électrolyse microbienne pour la production d'H₂.

Combiner les deux méthodes permettrait alors d'augmenter le rendement de production d'H₂ à partir d'un seul et même substrat. Plusieurs études existent déjà utilisant les deux méthodes séparément en deux étapes :

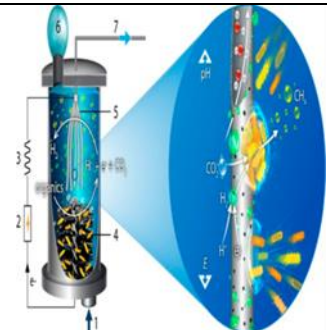
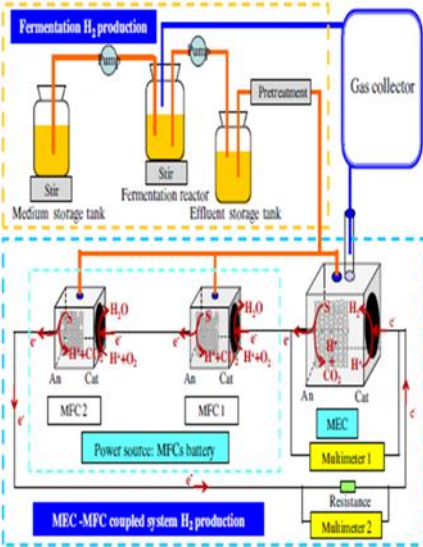
- La première étape est la fermentation, où une première partie de l'H₂ est produite.
- Dans la seconde étape, les effluents issus de la fermentation sont récupérés dans la CEM pour les oxyder et ainsi produire plus de H₂.

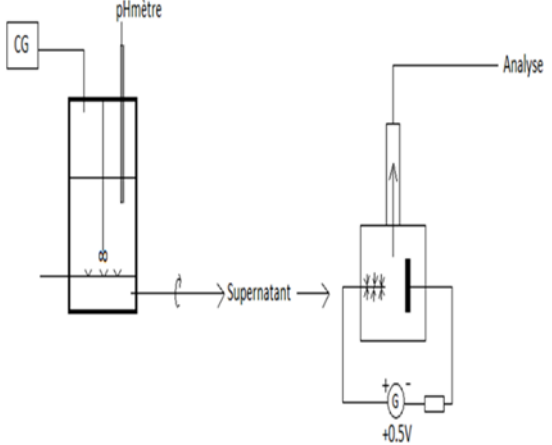
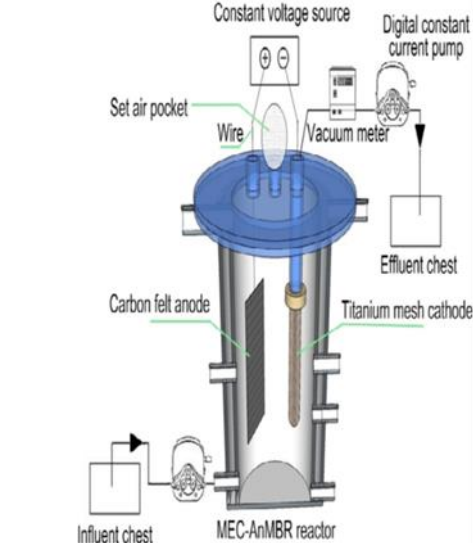
Peu d'études ont toutefois essayé de combiner les deux méthodes dans un seul et même système. Ces dernières sont présentées dans le tableau 3.

Le choix d'utiliser un système à deux étapes comme présenté précédemment permet de séparer les microorganismes électroactifs qui préfèrent croître à pH neutre, voire légèrement basique, les microorganismes fermentaires préfèrent quant à eux les pH acides avec un optimum à 6,5 (Guo et al. 2010; Patil et al. 2011). C'est d'ailleurs la première approche qui a été réalisée par Lalaurette et al., 2009 qui ont pu avoir un flux de production de bioH₂ à 1,17

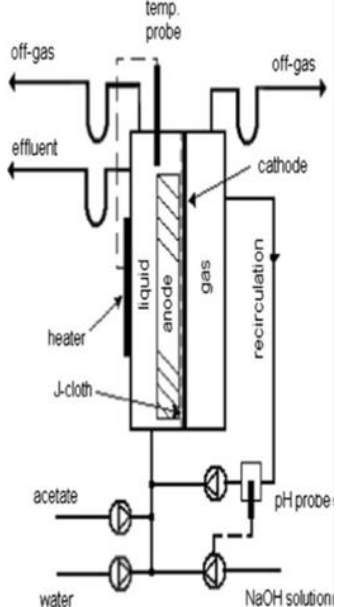
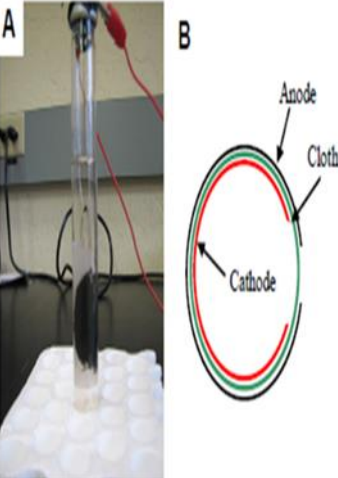
L_{H_2}/L_j . Il existe également des procédés intégrant la fermentation sombre et la CEM ou PM dans un seul et même système en utilisant différentes stratégies (Lalaurette et al. 2009). Tout d'abord, différents matériaux d'électrodes ont été utilisés à l'anode et à la cathode. Ces matériaux sont pour certains coûteux car ils utilisent du platine (Tartakovsky et al. 2009; K. Guo, Prévotéau, et Rabaey 2017), d'autres sont moins coûteux car le matériau utilisé est de l'acier inoxydable ou des matériaux à base de carbone et de nickel (Katuri et al. 2014; Wang et al. 2011; Hu, et al., 2009; Gil-Carrera et al. 2013 ; Borea et al., 2020). Au niveau de la mise en place des procédés, une tension est imposée afin de produire de l' H_2 dans toutes les études présentées dans le tableau 4. Néanmoins, ces études ne permettent pas de savoir si les procédés proposés peuvent être compatibles avec une bioproduction d' H_2 . En effet, l'inox peut être, par exemple, corrodé par l'activité microbienne, dans le temps. Il a également été présenté, dans la partie 3.4.2. sur les facteurs limitant la bioproduction d' H_2 , que la pression partielle de l' H_2 pouvait limiter sa production et qu'une méthode diminuant cette pression partielle permettait de lever cette inhibition. Parmi les systèmes présentés dans le tableau 4, le bioréacteur de Katuri et al. est le plus intéressant. En effet, il utilise une membrane en polyéther sulfone (PES) et polyvinylpyrrolidone (PVP), basé sur le principe d'un bioréacteur à membrane pour la fermentation sombre (extraction des gaz produits), dans lequel une poudre de nickel y est incorporée afin de pouvoir l'utiliser en tant que cathode pour à la fois produire et extraire le bio H_2 , selon les conditions données.

Tableau 3 : Liste exhaustive des différents systèmes étudiés combinant de la fermentation sombre (BRM) et la cellule d'électrolyse microbienne (CEM) ou la pile microbienne (PM).

Source	CEM/PM	Substrat	Cathode	Anode	BRM + ou CEM/PM même compartiment?	Tension appliquée	Densité de courant ou de puissance	Production d'H ₂	Schéma
(Katuri et al. 2014)	CEM	Acétate	Fibre creuse à base de Ni	Brosse en fibre graphite sur une tige de titane	Oui	0,9 V; 0,7 V	15 A/m ³ (3,7 A/m ²); 11,1 A/m ³	0,20 L _{H₂} /L/j	
(Wang et al. 2011)	2 PM + 1 CEM	Eaux usées	PMs : cathode air en PTFE et nafion + Pt CEM : sans PTFE	PMs et CEM : brosse en fibre de carbone	Non	-	0,272 V (un PM); 0,435 V pour 2 PM; courant de densité de 150 A/m ³ en 28h	0,07 L _{H₂} /L/j pour 1 PM + 1 CEM); 0,28 L/L/j avec 2 PMs	

(Lalaurette et al. 2009)	CEM	DF : cellulose CEM : eaux usées	Tissu de carbone fin avec 10 % de Pt	Brosse en fibre de carbone	Non	0,5 V	NA	1,17 +/- 0,07 L _{H2} /L/j avec l'acétate à 0,62 +/- 0,20 L _{H2} /L/j pour le formate	
(Du et al. 2019)	CEM	Eaux usées	Maille en titane sur une fibre creuse en PVDF	Feutre de carbone	Oui	0,8 V	NA	NA	

Borea, et al., 2020	CEM	Eaux usées	Maille en acier inoxydable	Aluminium cylindrique perforé	Oui	0,6 V	NA	NA	
(Guo, et al., 2017)	CEM	Acétate	Pt recouvert d'un tube de Ti en maille	Feutre de fibre d'acier inoxydable (plissé et roulé)	La membrane sépare les 2 chambres	1 V	1,09 mA/cm ²	0,0510 L/L/j en autonome ; 7,10 L/L/j de 0,55 V à 1 V	

(Tartakovsky et al. 2009)	CEM	Acétate	Electrode à diffusion de gas E-TEK avec Pt	Feutre de carbone	NA	1V après stabilisation	6A/m ²	6,1-6,5 L/L/d	
(Hu, et al., 2009)	CEM	Acétate	NiMo et NiW sur un tissu de carbone	Feuille en Pt	NA	0,3-0,6V	0,2-0,8 mA/cm ² pour 0,4 V	0,53 L/L/d à 0,6 V avec NiMo	

(Gil-Carrera et al. 2013)	CEM	Eaux usées	Ni électrodéposé sur une feuille de carbone	2 couches de feutre de carbone	Non	1 V	NA	0,045 $L_{H_2}/L/d$	
---------------------------	-----	------------	---	--------------------------------	-----	-----	----	---------------------	--

(Wang et al. 2013)	PM	Eaux usées	Feutre graphite	Feutre graphite	Non	Non	7,6 W/m ³	NA	
(Werner et al. 2016)	CEM	Acétate	graphene HFMs (support en Ni)	Tissu de carbone imperméable et brosse en graphite contenant du Ti	Oui	0,7 V (2 géométrie de réacteurs) ; 0,9 V (rectangulaire)	NA	0,9 V (rectangulaire) : 0,42 m ³ /m ³ /d ; 0,7 V (tubulaire) : 0,01 m ³ /m ³ /d	

5.1. L'avantage des cultures mixtes

Dans une culture mixte utilisée dans des procédés électromicrobiologiques, les microorganismes peuvent entrer en synergie afin de produire une plus grande puissance électrique qu'en culture pure. Par exemple, la présence d'*E. coli* en co-culture avec *G. sulfurreducens* permet de maintenir les conditions anaérobies dans le milieu (Qu et al. 2012; Bourdakos, et al., 2014). Il a été également observé qu'*Acetobacter aceti* et *Gluconobacter roseus*, deux espèces exoélectrogènes, produisent une plus grande densité de courant en co-culture qu'en culture pure en PM avec $1,0544 \text{ A/m}^3$ (Karthikeyan et al. 2009). Enfin *Clostridium cellulolyticum* permettrait de produire des substrats issus de la fermentation de cellulose, utiles au métabolisme exoélectrogène de *G. sulfurreducens* afin de produire du courant, jusqu'à $0,05 \text{ mA/cm}^2$ dans les conditions d'une PM, c'est-à-dire dont le but premier est la production d'énergie (Ren et al. 2007). Les cultures mixtes sont faciles à mettre en place car il est possible de récupérer des inocula issus de l'environnement comme dans les eaux usées ou les déchets agricoles et ne nécessitent pas une attention particulière à la stérilité du milieu, permettant également l'utilisation d'une large gamme de substrats.

Un consortium microbien permettrait d'obtenir des conditions favorables pour obtenir un courant électromicrobien en maintenant les conditions anaérobies. Certaines souches présentes dans le digestat du méthaniseur utilisé pour cette étude sont cellulolytiques pouvant fournir, en plus d'une production d' H_2 , les substrats nécessaires à certains microorganismes électroactifs à l'anode pour augmenter les flux d'électron pouvant être transmis à la cathode et ainsi augmenter la production de bioH_2 .

Cependant, l'utilisation des cultures mixtes peut également avoir un désavantage. En effet, elles proviennent généralement des milieux organiques utilisés, comme les eaux usées ou digestat de méthaniseur. Cette population est riche et comporte également des consommateurs d' H_2 tels que les méthanogènes. Ce sont des archées et des bactéries anaérobies strictes, non sporulantes pouvant diminuer le rendement de production d'hydrogène (Rozendal et al. 2007).

5.2. Conclusion de l'état de l'art

Le contexte actuel dans lequel la thèse s'inscrit et les différents procédés de production de l' H_2 existants mais également en cours de développement ont été présentés. C'est notamment le cas pour les méthodes de bioproduction, dont celles liées à la fermentation sombre et à l'électromicrobiologie.

Les méthodes liées à la fermentation sombre utilisent un métabolisme anaérobie naturel intermédiaire permettant la production d' H_2 . Dans l'environnement, la molécule est ensuite utilisée par des microorganismes hydrogénotrophes pour la production d'autres composés. C'est notamment le cas pour les méthanogènes qui produisent du CH_4 . Le métabolisme de la fermentation sombre oxyde le glucose en acides gras volatils tels que l'acétate ou le butyrate, qui sont des voies métaboliques permettant la formation de cofacteurs réduits tels que la ferredoxine et le NADH. Ces derniers sont par la suite oxydés soit directement par l'hydrogénase, ce qui est le cas de la ferredoxine, pour la production directe de l' H_2 par réduction des protons, soit oxydés d'abord par la NADH-ferredoxine déshydrogénase qui permet de transférer les électrons à la ferredoxine pour la production d'hydrogène par l'hydrogénase par la suite. Ce métabolisme est ainsi intéressant pour la production de bio H_2 mais différents paramètres limitants sont à prendre en compte, notamment la pression partielle en H_2 , qui lorsqu'elle est trop importante inhibe la production du gaz. De ce fait, des bioréacteurs à membranes ont été proposés, utilisant une membrane permettant de séparer le bio H_2 produit du milieu de culture à l'aide d'un gaz vecteur ou l'utilisation d'un vide, diminuant ainsi la pression partielle en hydrogène pour une production en continu. Cependant, les procédés basés sur la fermentation sombre ne permettent pas d'atteindre le rendement théorique de production de bio H_2 .

Les procédés électromicrobiens utilisent des microorganismes électroactifs sous forme de biofilms. Ces microorganismes ont la capacité d'échanger les électrons avec leur environnement. Ils peuvent soit donner les électrons issus de leur métabolisme

(exoélectrogène), soit récupérer des électrons issus du milieu extérieur (électrotrophe). Utiliser des biofilms électroactifs sur des électrodes permet d'oxyder la matière organique et de transférer l'excès d'électrons issu du métabolisme à l'anode pour être conduit vers la cathode pour produire des molécules d'intérêts tels que l' H_2 . Pour cela, plusieurs technologies électromicrobiennes ont été décrites. La pile microbienne a pour but de produire de l'énergie à partir de l'oxydation de la matière organique à l'anode par un biofilm électroactif couplée à la réduction d'espèces comme l'oxygène à la cathode. L'électrolyse microbienne a été proposée par la suite pour non pas produire de l'énergie électrique mais produire des produits d'intérêt comme l' H_2 ou le CH_4 . L'anode et éventuellement la cathode utilisent des biofilms électroactifs spécifiques et les électrodes peuvent être utilisées dans un seul et même compartiment. Un apport d'énergie (par courant ou potentiel imposé) est le plus souvent nécessaire pour permettre ce processus. Les procédés en court-circuit ne nécessitent pas un apport énergétique et ne permettent pas de produire de l'énergie. Ils utilisent une électrode pouvant agir en tant qu'anode à une extrémité permettant par exemple l'oxydation de matière organique et une seconde électrode en tant que cathode à l'autre extrémité permettant la réduction de molécules ou composés comme accepteurs d'électrons tels que l' O_2 ou le NO_3^- . L'intérêt de cette méthode est de maximiser le courant circulant dans le circuit électrique. Enfin l'électrofermentation est une méthode se basant sur le métabolisme microbien. L'électrofermentation met en œuvre un faible courant électrique pour créer un environnement réduit au voisinage des électrodes favorisant alors la production de molécules réduites comme d' H_2 . En électrofermentation, la quantité d'électrons circulant dans le système est largement inférieure au nombre d'électrons nécessaire pour la production de ces molécules réduites.

La combinaison des procédés électromicrobiologiques, notamment des piles microbiennes ou de l'électrolyse microbienne, et de la fermentation sombre peut avoir un intérêt pour la production de $bioH_2$ ou pour le traitement des eaux usées. En effet, les microorganismes électroactifs peuvent utiliser comme substrats les produits issus de la fermentation sombre, notamment les acides tels que l'acétate ou le butyrate, permettant ainsi de produire plus d' H_2 . Parmi les procédés présentés dans le tableau 4, la récupération du $bioH_2$ est importante afin de favoriser une production en continu du gaz. Cependant ces procédés nécessitent un apport d'énergie par courant ou tension imposée pour aider à la production d' H_2 à la biocathode.

Jusqu'à maintenant, aucun procédé n'a été étudié combinant la fermentation sombre avec l'électrofermentation induit par utilisation d'électrodes en court-circuit dans un seul et même système, qui plus est en utilisant une électrode permettant également l'extraction des gaz produits dans le milieu.

6. Objectifs de la thèse

Cette thèse avait pour but de produire du bioH₂ en utilisant des déchets organiques agricoles en combinant deux méthodes biologiques de production (i) la fermentation sombre et (ii) l'électromicrobiologie. Pour cela, différentes études et expérimentations ont été mises en place :

- Etude bibliographique

Ce chapitre a permis de recenser les principales méthodes de production d'H₂ existantes par voie biologique, notamment celles liées à la fermentation sombre et les méthodes électromicrobiologiques. Il montre également les différents matériaux utilisés à l'anode et à la cathode en électromicrobiologie et les populations pouvant être retrouvées en fermentation sombre ou utilisées en électromicrobiologie. La possibilité de combiner les deux méthodes de bioproduction d'H₂ a également été discutée.

- Choix et caractérisation de la membrane conductrice pour la production d'H₂

Ce chapitre présentera le choix de la membrane tubulaire conductrice selon différents paramètres : la réactivité de la membrane tubulaire permettant l'observation des réactions redox à sa surface, mais également sa capacité à extraire les gaz produits, notamment l'H₂. Pour cela deux matériaux pour la membrane tubulaire seront évalués : une membrane en silicone carbone ou une membrane en silicone nickel. Des essais en présence du couple ferricénium/ferrocène seront utilisés pour comparer la réactivité des membranes. Par la suite,

afin de valider la capacité d'extraction de l' H_2 au travers du matériau de la membrane sélectionnée, deux méthodes de mesure de gaz seront mises en œuvre avec (i) un capteur à hydrogène, permettant une détection qualitative et (ii) une micro-chromatographie à phase gazeuse (microGC) pour une mesure quantitative de l' H_2 mais également des autres gaz produits dans la matière organique, notamment le CH_4 .

- Mise en place du système

Ce chapitre présentera les designs expérimentaux des bioréacteurs testés lors du projet de thèse. L'impact de l'utilisation d'un gaz vecteur ou d'un vide dans la membrane sur le potentiel et le courant des différents procédés sera également présenté. Le choix du design du réacteur se portera sur : la mise en place de conditions permettant d'établir un potentiel bas pour le système électromicrobien, proche du potentiel pouvant être atteint par les bactéries à l'anode (environ -300 mV vs SHE) tout en favorisant l'apparition d'un courant cathodique au niveau de la membrane par court-circuit des électrodes. Par la suite, après le choix du design réalisé, un suivi de production de $bioH_2$ et du CH_4 et l'analyse d'écologie microbienne seront également présentés afin de connaître les différences de population entre les deux électrodes et ainsi observer une éventuelle spécialisation des biofilms microbiens au niveau de chaque électrode. Du point de vue électrochimique, les différentes réactions telles que l'oxydation de la matière organique à l'anode et la réduction du $bioH_2$ au niveau de la cathode seront recherchées. Le suivi du potentiel et de la densité de courant du système sur tout le long de la culture va permettre de vérifier la stabilité du système et les conditions anaérobies de la culture.

Ce manuscrit se terminera alors par une conclusion générale et des perspectives.

MATERIELS ET METHODES

Les différents matériels et méthodes utilisés dans cette thèse sont présentés dans ce chapitre.

1. Matériels

1.1. Les membranes

Trois membranes tubulaires en silicone composite dans lesquelles des particules de nickel ou de carbone sont incorporées (Getelec, France) ont été évaluées dans cette thèse. Leurs caractéristiques sont présentées ci-dessous (tableau 4) :

Tableau 4 : Références et épaisseurs des trois membranes tubulaires sélectionnées.

Membrane tubulaire	Diamètre interne (mm)	Diamètre externe (mm)	Référence
Silicone nickel	3,5	5,5	5535 GT3100
Silicone carbone 1	3,5	5,5	5535 BL 10000
Silicone carbone 0,6	2	3,2	3202 BL10000

1.2. Cellule à trois électrodes

Les mesures électrochimiques effectuées tout le long de la thèse ont utilisé une cellule à trois électrodes contenant :

- Une électrode travail : elle permet de réaliser les mesures ou d'appliquer des conditions électrochimiques définies sur l'électrode connectée. L'électrode de travail utilisée au cours des expériences réalisées dans cette thèse est la membrane tubulaire.

- Une contre-électrode : elle permet de fermer le circuit électrique pour pouvoir réaliser les analyses électrochimiques. La contre-électrode utilisée pour les essais préliminaires réalisés pour faire le choix de la membrane est une tige en inox de 0,56 mm de diamètre. Pour le reste des expérimentations, un feutre de graphite de 4 mm d'épaisseur (GFD 4,6 EA, SGL, Allemagne) a été utilisé.
- Une électrode de référence : elle permet de normaliser les potentiels mesurés ou ceux imposés au système. L'électrode de référence utilisée tout le long des expérimentations est une électrode Ag/AgCl plongeant dans KCl 1M. La conversion des potentiels mesurés et imposés par rapport à la référence standard à hydrogène a été corrigée en ajoutant 240 mV aux valeurs mesurées avec la référence Ag/AgCl.

1.3. Les réacteurs

Afin de choisir les membranes, les expériences préliminaires ont été réalisées dans un premier temps avec une cellule électrochimique de 2,5 cm de diamètre dans laquelle un trou de 0,5 cm de diamètre est présent au fond afin de pouvoir avoir accès à l'électrode placée en dessous (figure 3-1A). Afin de limiter la présence d'O₂, au-dessus de la cellule est placé un bouchon de diamètre identique à celui de la cellule, et sur lequel un emplacement pour l'électrode de référence, la contre-électrode et une arrivée d'azote ont été placés (figure 3-1B). La suite des expérimentations a été réalisée dans un bioréacteur de laboratoire de 5 L.

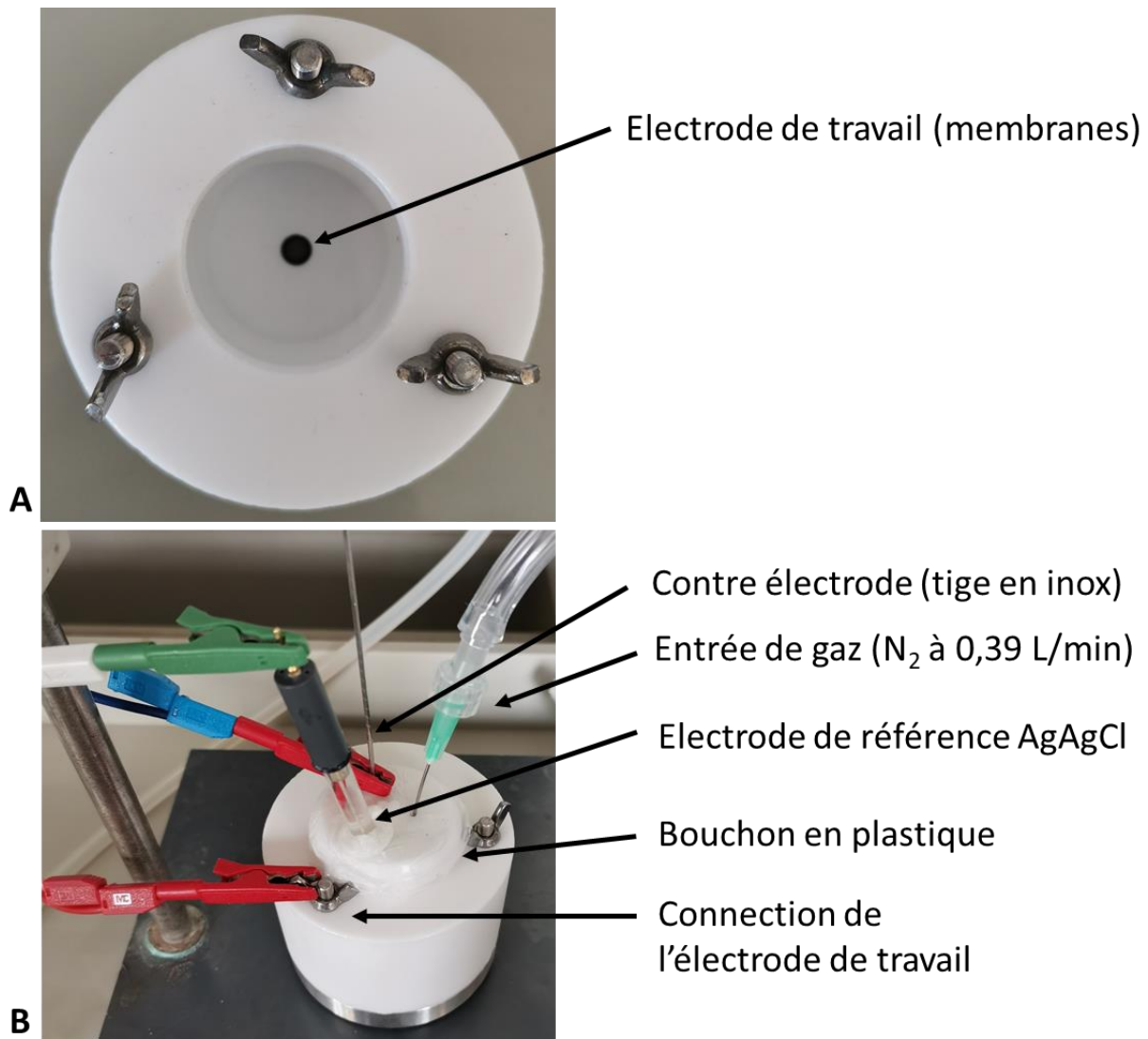


Figure 3-1 : A : Cellule électrochimique en plastique de 2,5 cm de diamètre contenant un trou de 0,5 cm au centre permettant le contact de l'électrode de travail avec les solutions utilisées lors des expérimentations préliminaires. B : Cellule électrochimique en plastique avec un bouchon en plastique par-dessus, limitant l'arrivée de l' O_2 , avec un emplacement pour la contre-électrode, l'électrode de travail et une arrivée de gaz. Un flux d'azote de 0,39 L/min est introduit dans la solution pendant 15 min puis dans le ciel de la cellule pendant les mesures.

1.4. Solutions et milieu utilisés pour la sélection de la membrane tubulaire, les essais d'extraction de l'H₂ et les cultures en bioréacteur

1.4.1 Solutions pour les tests préliminaires

Les produits utilisés dans cette étude sont tous issus de Sigma Aldrich (France). Ils ont permis la réalisation de solutions pour les expérimentations préliminaires présentées dans le chapitre suivant.

Deux solutions ont été utilisées afin de choisir la membrane. La première solution est composée de KCl 0,1 M. La seconde solution est composée de KCl 0,1 M et de ferrocène-méthanol, 97% 1 mM. La solution utilisée pour produire de l'H₂ par voie électrolytique est composée de H₂SO₄ 0,1 M.

1.4.2. Milieu organique - Biomasse

Le milieu organique complet utilisé dans cette étude est issu de méthaniseurs agricoles. Il s'agit de digestats, prélevés à la demande, soit à la ferme expérimentale de l'Université de Lorraine (La Bouzule, Nancy), soit auprès du méthaniseur de Méthanason (Einville-au-Jard). Ces deux installations agricoles sont alimentées de la même façon avec un régime comparable constitué de lisier de ruminants, principalement de bovins, de déchets végétaux agricoles (pailles, rafles, grains déclassés...) et fonctionnent de concert. Elles servent l'une pour l'autre de starter lorsque les installations doivent être redémarrées après maintenance. Nous partons du principe qu'elles possèdent des populations microbiennes initiales équivalentes lors de ce travail. Afin de simplifier le milieu utilisé, le digestat est filtré pour en retirer les grosses particules, le rendant ainsi plus facile à manipuler. Dans cette étude, le substrat, directement issu du digestat des méthaniseurs est aussi utilisé comme inoculum.

2. Méthodes analytiques

2.1. Suivi et analyses électrochimiques

Les analyses électrochimiques ont été effectuées afin d'observer les processus électrochimiques pouvant survenir au niveau des deux électrodes, anode et cathode. Ces analyses utilisent des méthodes précises pour observer les processus redox pouvant créer un flux d'électron dans le système, et donc un courant électrique, ou pour forcer des réactions électrochimiques par contrôle du courant ou du potentiel du système électrochimique. Pour cela, les mesures électrochimiques ont été réalisées au laboratoire à l'aide du potentiostat VSP-3e (Biologic, France) et le suivi a été réalisé à l'aide du logiciel Ec-lab (Biologic, France).

2.1.1. *Electrochemical noise* ou bruit électrochimique – ECN

L'*electrochemical noise* ou bruit électrochimique (ECN) est la méthode de mesure utilisée pour pouvoir déterminer le courant et le potentiel de façon simultanée lorsque les deux électrodes sont mises en court-circuit. C'est une méthode généralement utilisée pour étudier les processus de corrosion à l'interface entre les métaux et la solution. Cette méthode permet de mesurer le courant et le potentiel entre deux électrodes en court-circuit, c'est-à-dire, sans imposer aux électrodes un potentiel et sans imposer au circuit un courant électrique. Généralement, dans les systèmes électrochimiques microbiens, aucun bruit au sens de la corrosion n'est détecté. L'utilisation de l'ECN permet de suivre le sens du flux d'électrons obtenu naturellement, en observant un courant positif ou négatif à l'électrode de travail lorsque le système s'équilibre, ce qui permet d'analyser le sens des réactions issu des systèmes électrochimiques microbiens étudiés.

2.1.2. Analyse par voltamétrie cyclique – CV

La voltamétrie cyclique (CV) est une méthode qui permet d'observer des réactions d'oxydation et de réduction pouvant se réaliser sur l'électrode de travail. Elle permet également d'étudier les transferts d'électrons issus des réactions redox sous différentes conditions comme en présence d'un catalyseur. Pour cela, grâce à un montage à trois électrodes, une gamme de potentiel est appliquée de façon linéaire sur l'électrode de travail. La réponse en courant de l'électrode de travail est mesurée. Des balayages du potentiel en sens inverses sont réalisés, dans le sens croissant des potentiels, et dans le sens décroissant une fois que la limite du potentiel imposé par la gamme est atteinte. La figure 3-2 présente le voltampérogramme obtenu, avec deux courbes présentant chacune un pic d'oxydation ou de réduction. Ces pics sont observés si des espèces redox sont présentes dans la solution. Ils sont obtenus par oxydation ou réduction de ces espèces. Lorsque le potentiel appliqué augmente, l'espèce redox présente au niveau de la surface de l'électrode de travail est oxydée, augmentant sa concentration jusqu'à une valeur maximale correspondant à l'oxydation totale de l'espèce, ce qui se traduit par un pic d'oxydation. Celui-ci permet d'observer un courant maximal (I_{pa}) pouvant être atteint, et qui dépend du transport de charge et de matière au niveau de la surface de l'électrode. A l'inverse, lorsque le potentiel appliqué diminue, une réduction des espèces redox présentes est observée, atteignant un pic de réduction (I_{pc}). Dans une solution simple contenant un couple redox ox/red, la réaction d'oxydo-réduction peut être réversible. Dans un système parfait où les réactions sont réversibles, les courants I_{pa} et I_{pc} sont à l'opposé l'un de l'autre. L'écart de potentiel ΔE_p entre les deux pics, dans les conditions standards de température est de 59 mV, ce qui représente un transfert d'électron rapide entre les espèces. Dans le cadre de ce travail de thèse, les CV ont été réalisés à une vitesse de 5 mV/s pour les essais préliminaires portant sur le choix des membranes afin de les caractériser en présence du couple redox ferricénium/ferrocène. Pour le reste des expériences, la vitesse de 1 mV/s a été retenue afin d'observer les réactions d'oxydo-réduction qui peuvent se réaliser à la surface des électrodes.

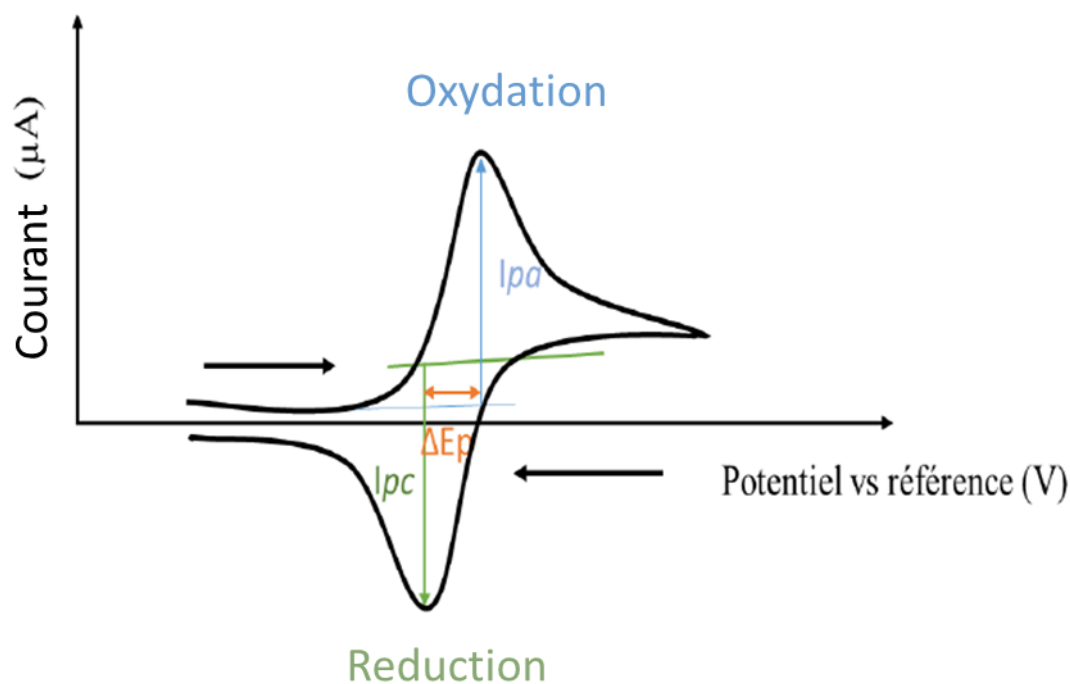


Figure 3-2 : Représentation d'une voltamétrie cyclique réalisée dans une solution contenant un couple redox ox/red avec I_{pa} : le courant maximal mesuré au niveau du pic d'oxydation, I_{pc} : le courant maximal observé au niveau du pic de réduction et ΔE_p : la différence de potentiel entre les deux pics (Smida, 2018, modifié).

2.2. Détection et mesure de H_2 et de CH_4 produit au cours du procédé

2.2.1. Mesure qualitative par utilisation d'un détecteur de H_2

Au cours de cette thèse, des problèmes d'analyse de gaz sont apparus limitant les expériences lorsque ces analyses étaient requises. Un détecteur d'hydrogène avec une électrode de platine a ainsi été fabriqué selon les références de (Vedel et Trémillon 1959; Kuroda et al. 1991).

L'électrode de platine est réalisée à partir d'une grille de platine de 1 cm^2 . Cette dernière est fixée avec un fil en platine de $0,5 \text{ mm}$. Le fil en platine est fixé à l'aide d'une torche sur un fil en cuivre de même diamètre. L'ensemble de l'électrode est protégé par un capillaire en verre fermé à une extrémité, laissant dépasser seulement la grille en platine.

L'électrode de platine est ensuite mise dans une solution composée de 0,1M KCl et 0,1 M HCl. Une tension de 550 mV vs Ag AgCl est imposée. La réponse en courant de l'électrode de platine montre la présence d'H₂. En effet l'électrode de platine agit en tant que catalyseur pour oxyder H₂ en protons.

La calibration du capteur est réalisée par ajout d'un flux d'N₂ (absence de H₂) et en présence d'un mélange d'H₂ à 80% et N₂ à 20%. Si la réponse en courant augmente, cela signifie une augmentation de la concentration de H₂ détectée.

2.2.2. Analyses en micro-chromatographie en phase gazeuse – mesure quantitative

La micro-chromatographie en phase gazeuse (microGC) a été utilisée pour sa sensibilité, précision de détection et de quantification des composés présents dans les gaz produits. Les gaz produits ont été collectés en continu dans un tube de 15 mL placé en série entre le système d'analyse et les bioréacteurs. La microGC (microGC fusion, Shimadzu) est équipée de deux détecteurs TCD A et B. Le gaz vecteur passant dans la colonne A est l'argon, permettant de séparer les gaz légers. Le gaz vecteur passant dans la colonne B est l'hélium, permettant de séparer les gaz plus lourds comme le CH₄. Les températures des colonnes étaient de 80 et 75 °C respectivement. La température du détecteur a été mise à 70 °C. Les analyses ont été réalisées à la sortie de membrane et dans le ciel du réacteur.

2.3. Analyse microbiologique

2.3.1. Extraction des biofilms

A la fin de chaque culture ou avant chaque traitement réalisé pendant une culture, les biofilms présents sur les électrodes ont été prélevés. Pour cela, quatre prélèvements sont réalisés pendant une culture : le milieu à t_0 appelé J0, le milieu en fin de culture appelé M, les biofilms présents sur la membrane appelés Mb et sur le feutre de graphite appelés GF. Les échantillons de cultures sont centrifugés à 5500 G pendant 10 min afin de séparer les cellules de la phase aqueuse. Le surnageant est par la suite retiré et 50 mL de tampon phosphate 1x (Dibelcco D8537) est ajouté au culot avant de réaliser une seconde centrifugation. Le culot est séparé du surnageant pour être conservé à -80 °C jusqu'à analyse. Les électrodes contenant les biofilms sont découpées et placées dans deux béchers de 250 mL contenant 50 mL de tampon phosphate 1x. Les béchers sont par la suite mis dans un bain à ultrason à 45 kHz pendant 10 min afin de réaliser un premier décrochage des biofilms. Les biofilms restants sont ensuite décrochés mécaniquement à l'aide d'un scalpel. Les biofilms ainsi récupérés dans le tampon phosphate sont centrifugés à 1400 rpm pendant 10 min afin de séparer les cellules de la phase aqueuse. Le surnageant est jeté et le culot est conservé dans un congélateur à -80 °C jusqu'à utilisation.

2.3.2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN microbien a été réalisée avec le kit DNeasy PowerBiofilm (Qiagen), à partir d'échantillons décongelés. 0,05 à 0,20 g de chaque échantillon a été utilisé pour chaque extraction. L'extraction d'ADN microbien a suivi le protocole du kit d'extraction.

La pureté de l'ADN a été contrôlée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, USA) grâce à la mesure d'absorbance à 260 et 280 nm. Ce dernier doit avoir un ratio DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,8 et 2. Les échantillons ont ensuite été envoyés à la

plateforme Novogene (prestataire de service, UK) pour une analyse métagénomique à l'aide de la méthode Illumina NovaSeq 6000 de l'ADNr 16 S V3-V4.

3. Designs des bioréacteurs utilisés

3.1. Tests préliminaires pour la production d' H_2 par électrolyse forcée à courant imposé

Le montage expérimental du bioréacteur a été utilisé pour réaliser des tests préliminaires sur la membrane tubulaire 0,6 dans les conditions d'une électrolyse (figure 3-3). La longueur de la membrane utilisée est de 200 cm. Celle-ci entoure une grille en inox de 18,5 x 12 cm. La grille en inox est placée autour de deux tubes en inox isolés reliant les extrémités de la membrane. La membrane et la grille en inox constituent la cathode. Un séparateur poreux est placé autour de l'ensemble membrane/inox pour pouvoir par la suite fixer le feutre de carbone de 4mm x 228 mm x 230 mm par-dessus. Un flux d'azote a été appliqué au niveau de ciel du réacteur afin d'en retirer l'oxygène puis il a été introduit dans la membrane à un débit de 0,11 L/min comme gaz vecteur. Ce montage a également été utilisé en présence d'un capteur à H_2 à la sortie de la membrane. Il a également été utilisé en ligne avec le micro-GC pour mesurer et quantifier les molécules de H_2 et de CH_4 produites et récupérées dans la lumière de la membrane tubulaire.

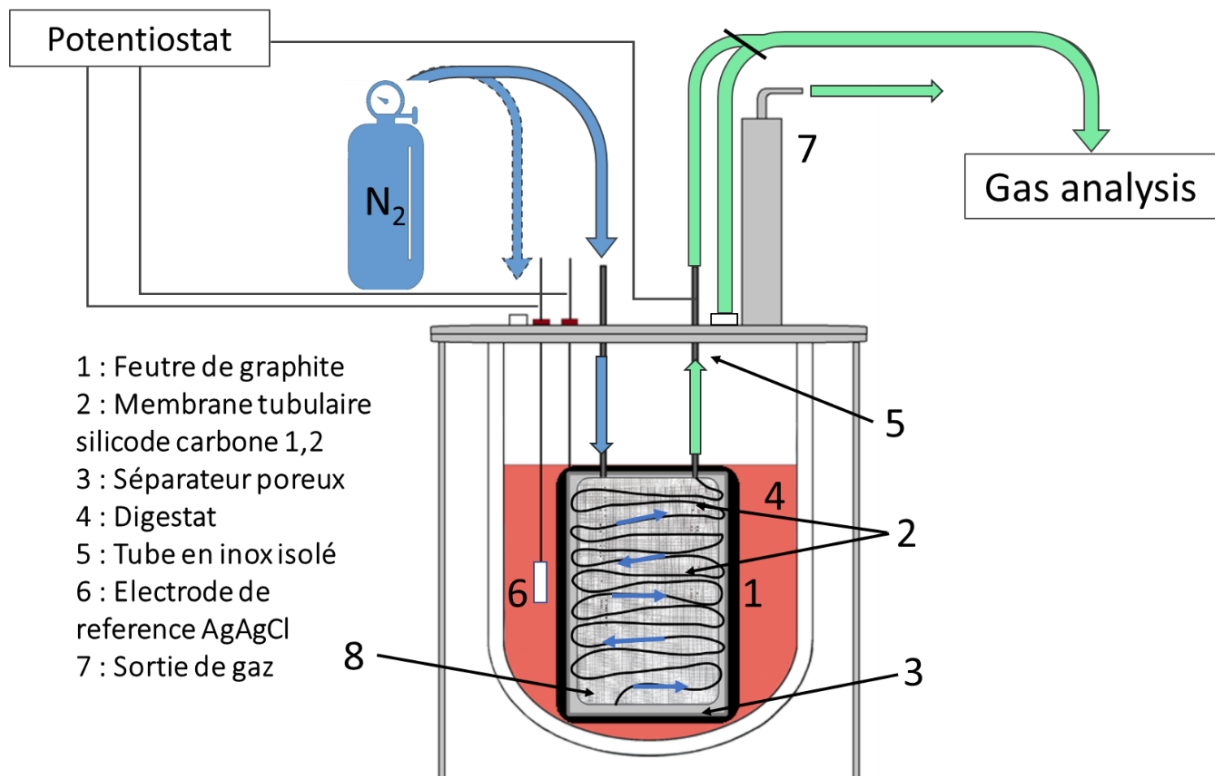


Figure 3-3 : Design de l'expérimentation sur la capacité d'extraction de la membrane. La membrane entoure une grille d'inox. Le feutre de carbone se trouve autour des deux matériaux. Un flux d'azote est utilisé pour maintenir une anaérobiose dans le ciel du réacteur en début d'expérience avant d'être arrêté. Un flux d'azote à 0,11 L/min a par la suite été introduit en continu dans la membrane.

3.2. Choix du design du système

Afin de pouvoir étudier l'utilisation de la fermentation sombre et l'électrolyse microbienne, un choix de système devait être réalisé. Pour cela, plusieurs designs de réacteurs ont été évalués dans un bioréacteur de 5 L. Ces bioréacteurs sont remplis avec environ 3L de digestat.

3.1.1. Premier design du système expérimental

Le premier design expérimental du bioréacteur (figure 3-4) a été mis en place avec une membrane en silicone carbone 1 de 80 mm de long. Cette membrane a été placée au fond de la cuve à l'aide de deux tubes en inox afin de pouvoir faire la connexion électrique entre la seconde électrode et le potentiostat.

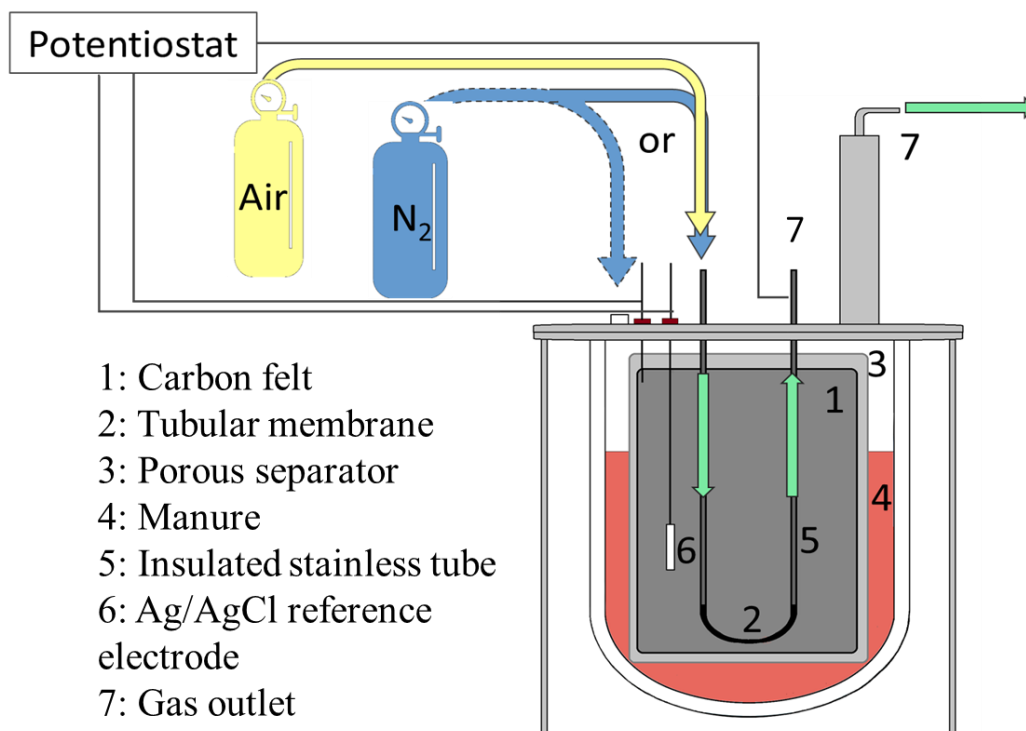


Figure 3-4 : Premier design expérimental du bioréacteur. Le flux d' N_2 est introduit dans le ciel du réacteur pour établir une atmosphère anoxique avant d'être arrêté. Un flux d'air ou d' N_2 à 0,11 L/min est utilisé comme gaz vecteur dans la membrane.

Un feutre de carbone (4mm x 80 mm x 80 mm) a été utilisé comme anode et a été placé dans la cuve pour avoir un ratio de deux tiers de la surface dans le digestat et un tiers de la surface au niveau du ciel du bioréacteur. Un isolant poreux a été fixé sur le feutre de graphite afin d'éviter tout contact avec la membrane. L'anode est connectée électriquement au potentiostat

à l'aide d'une tige en inox de 0,56 mm de diamètre. Les deux électrodes sont reliées électriquement à un potentiostat soit par la platine en inox, pour la membrane, soit par une tige en inox de diamètre 0,56 mm pour le suivi des mesures électrochimiques. L'électrode de référence Ag/AgCl a été utilisée pour mesurer le potentiel des électrodes dans le système.

Un flux d'air et un flux d' N_2 , tous deux à 0,11 L/min, ont été utilisés comme gaz vecteur dans la membrane durant l'expérimentation.

3.2.1. Second design du système expérimental

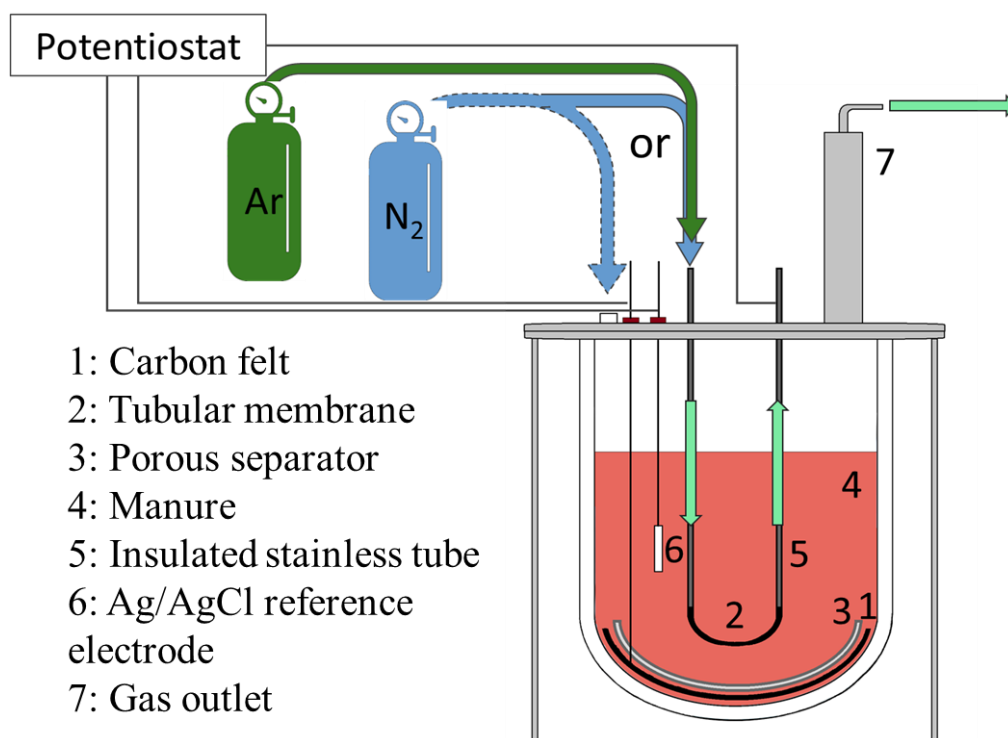


Figure 3-5 : Second design expérimental du bioréacteur. L' N_2 est utilisé en premier lieu pour créer les conditions anoxiques dans le ciel du réacteur. L' N_2 ou l'Ar sont utilisés comme gaz vecteur à 0,11 L/min dans la membrane.

Le second design expérimental du bioréacteur (figure 3-5) est construit à partir de la même surface de la membrane silicone carbone 1 que pour le premier design expérimental, utilisée également comme cathode. Le feutre de carbone est également utilisé en tant qu'anode mais sous forme d'un disque de 16 cm de diamètre. Il a été placé au fond de la cuve, au niveau de la zone où l'anaérobiose est la plus forte. L'anode est connectée par une tige en inox de 0,56 mm préalablement isolée électriquement. Au niveau de la platine du bioréacteur, des tubes Tygon E-3603, VWR, France, avec un diamètre interne de 3,18 mm et un diamètre externe de 6,35 mm ont été utilisés. Un flux d'azote à 0,11 mL/min a été utilisé comme gaz vecteur dans la membrane durant l'expérimentation.

3.2.2. Troisième design du système expérimental

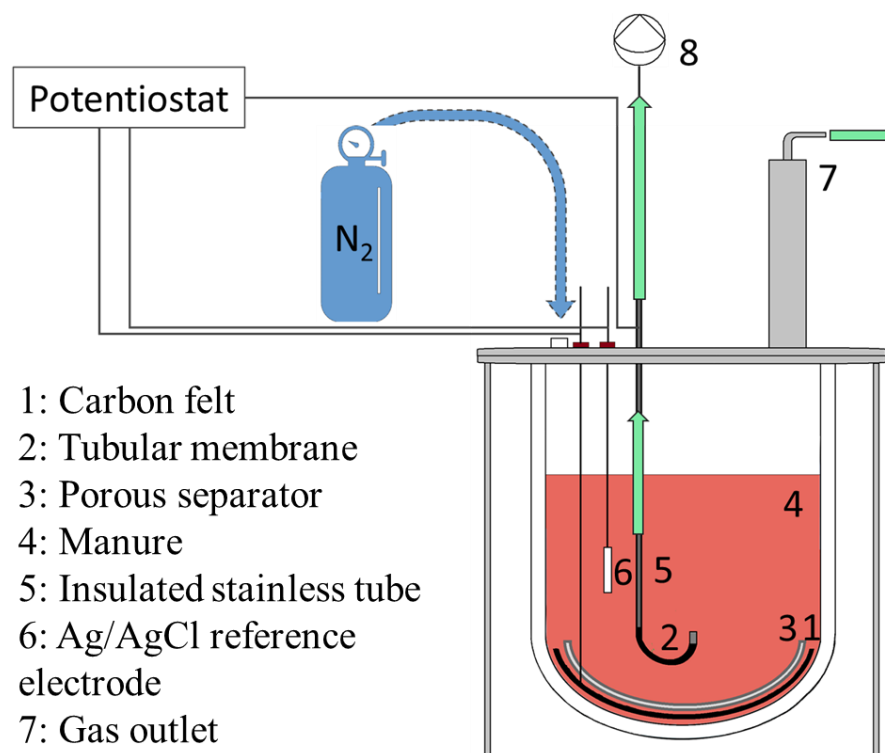


Figure 3-6 : Troisième design expérimental du bioréacteur. L' N_2 est d'abord utilisé dans le ciel du réacteur pour créer un environnement anoxique. Un vide a ensuite été créé dans la membrane afin de récupérer les gaz produits par le système.

Le troisième design expérimental du bioréacteur est présenté en figure 3-6. Les dimensions des électrodes à l'anode et la cathode sont identiques par rapport à celles utilisées dans le second design expérimental du bioréacteur. Cependant, un seul tube en inox relie la membrane (cathode) en silicone carbone. Un bouchon en inox d'une longueur de 2 cm est mis à l'autre extrémité de la membrane afin d'éviter que le milieu n'entre dans la lumière de la membrane.

Dans ce système, aucun gaz vecteur n'a été utilisé, seul un vide de - 84 kPa dans la membrane a été réalisé à l'aide d'une pompe à membrane N86 Labport, KNF, Allemagne.

Choix et caractérisation des matériaux et dispositifs analytiques mis en œuvre pour la production de bioH₂ dans des bioréacteurs combinant l'électromicrobiologie et à la fermentation sombre.

La sélection des matériaux et des dispositifs analytiques et expérimentaux est une étape importante dans la conception et la mise en œuvre d'un procédé efficace de bioproduction d'H₂ combinant l'électromicrobiologie avec la fermentation sombre (DF). Les matériaux des électrodes, doivent permettre de transférer les électrons issus des microorganismes tout en permettant d'extraire les gaz produits rapidement en limitant leur perte ou leur consommation par des microorganismes hydrogénotrophes.

Avant la mise en place du procédé combinant l'électromicrobiologie avec la DF, des essais préliminaires ont été réalisés afin de mieux connaître les matériaux utilisés, et plus particulièrement, afin de choisir celui de la membrane tubulaire. En effet, le choix de la membrane tubulaire est important car elle doit avoir deux propriétés importantes : avoir la capacité d'échanger les électrons avec le milieu et permettre l'extraction des gaz produits au cours de la bioproduction.

Les caractérisations de ces matériaux ont été conduites à l'aide de méthodes électrochimiques et par analyse des gaz. Les analyses de gaz ont été réalisées dans un premier temps avec un capteur d'hydrogène. Ce capteur a permis de réaliser une mesure qualitative de la production de bioH₂ puis un micro-chromatographe en phase gazeuse (microGC) a été mis en place, couplé au bioréacteur, afin de réaliser des mesures quantitatives du bioH₂ produit.

Ce chapitre de la thèse a les objectifs suivants :

- Valider le choix de la membrane tubulaire pour une utilisation dans le procédé
- Valider l'extraction de l' H_2 par la membrane tubulaire sélectionnée
- Quantifier la production de l' H_2 à partir de la microGC de manière à en observer sa limite de détection et de pouvoir réaliser une cinétique de production grâce à un couplage avec le bioréacteur

1. Choix des matériaux pour la constitution des électrodes

1.1. Caractéristiques des électrodes.

1.1.1. Choix de l'anode

Le choix des électrodes dans un système électrochimique microbien est important pour plusieurs raisons :

- L'électrode doit avoir une grande surface pour permettre la croissance des microorganismes sur celle-ci mais également pour permettre les transferts d'électrons issus des réactions métaboliques des microorganismes,
- Le matériau constituant ces électrodes doit être biocompatible et ne doit pas perturber le métabolisme microbien. Par exemple les électrodes en cuivre ne peuvent pas être utilisées en raison de leur effet toxique sur les microorganismes (Grass, Rensing, et Solioz 2011).

- Les électrodes doivent avoir une bonne conductivité électrique et une bonne réactivité électrochimique pour pouvoir permettre le transfert d'électrons dans le circuit
- Le matériau constituant les électrodes, notamment de l'anode doit résister à la corrosion en milieu acide. En effet, l'anode oxyde les espèces moléculaires présentes dans son environnement afin de récupérer et transférer les électrons à la cathode pour la réduction des composés en produits d'intérêt. Dans une matrice organique non agitée, les réactions d'oxydations peuvent également libérer des protons et acidifier l'environnement local de l'électrode (Banerjee, Calay, et Mustafa 2022).

Une liste des matériaux utilisés en tant qu'électrode à l'anode et la cathode est présentée dans le tableau 3 de la partie 4.8 de l'état de l'art.

Selon les données de la littérature, les matériaux les moins coûteux sont ceux à base de carbone (A. Wang et al. 2011; Khosravanipour Mostafazadeh et al. 2016). Les matériaux à base de carbone permettent d'avoir une bonne surface d'adhésion pour les biofilms tout en étant réactifs pour les échanges d'électrons, et ils peuvent être utilisés sous différentes géométries (X. Fan et al. 2021). Le feutre de carbone utilisé (SGL, Germany) a la particularité d'avoir des pores de l'ordre de 50 μm en raison de sa méthode de fabrication qui utilise des fibres de polymères traitées à haute température. Il en résulte une grande surface de contact avec l'environnement. Leur taille compacte par rapport à leur surface permet aux microorganismes de s'implanter. La nature du matériau est connue comme étant conducteur, réactif et biocompatible. Dans le cadre de cette étude, notre choix s'est porté sur le feutre de carbone afin de constituer une anode fonctionnelle.

1.1.2. Choix de la cathode

La production d'hydrogène devant se réaliser à la cathode, il est important de limiter son inhibition par la pression partielle en hydrogène (P_{H_2}) et sa consommation par les microorganismes hydrogénotrophes pour la production de composés tels que le CH_4 ou le H_2S . Les membranes tubulaires en silicone sont des matériaux de choix permettant de séparer les liquides et gaz, et sont simples à mettre en place dans un réacteur non agité (Remigy et Desclaux 2007). Selon le matériau utilisé, ils peuvent avoir l'avantage d'être très perméables tout en étant robustes aux pressions et aux températures pouvant être imposées en cas de traitements thermiques (voir partie I.4.1.).

Parmi les membranes connues, les modules en fibres creuses sont les plus intéressants car leur surface peut être grande. Ils sont constitués d'un ensemble de membranes tubulaires sous forme de capillaires, permettant ainsi les échanges entre le milieu et la phase gazeuse (Katuri et al. 2014). Cependant, dans le cadre de ce travail de thèse, il n'a pas été possible de fabriquer un module de fibres creuses conducteur. De ce fait, la membrane tubulaire est utilisée. Dans les différents essais, la surface disponible peut alors être ajustée en faisant varier sa longueur.

D'après le tableau présenté dans l'état de l'art, partie 4.8., sur les matériaux utilisés pour les électrodes en CEM, il semblerait que le nickel et le graphite soient intéressants principalement pour leur faible coût mais aussi pour leur réactivité. Deux membranes tubulaires conductrices ont ainsi été sélectionnées et ont été fabriquées sur une base en silicone car celle-ci permet une bonne extraction des gaz. La membrane est rendue conductrice par formation d'un composite en mélangeant le silicone à des particules de graphite (figure 4-1 A) ou de nickel (figure 4-1 B).

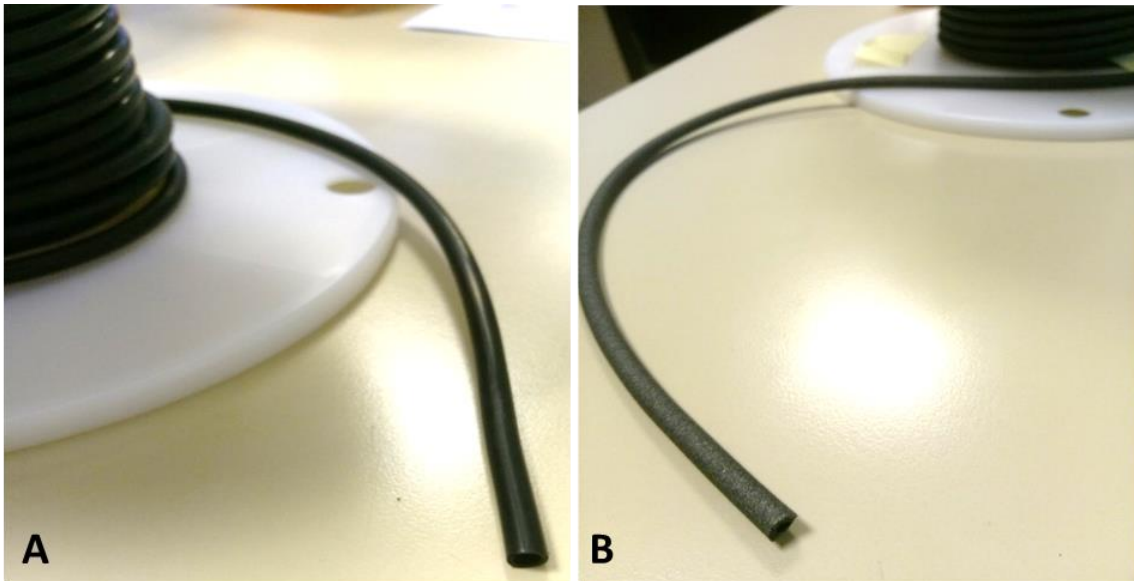


Figure 4-1 : Membranes tubulaire composite sélectionnées pour la mise en place du procédé.
 (A) Silicone carbone (B) Silicone nickel.

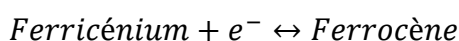
La membrane tubulaire en silicone carbone utilise des inserts de particules fines dans le silicone. Les particules de carbone ont une inertie chimique sauf pour l'oxydation (INRS, 2002) et elles sont inertes pour les microorganismes, tout en étant conductrices. La membrane tubulaire en silicone nickel a été envisagée car le nickel est un matériau stable, avec une bonne conductivité électrique et, est biocompatible avec les microorganismes (Katari et al. 2014). Les membranes sélectionnées ont une épaisseur de 1 mm pour les membranes tubulaires silicone carbone 1 et silicone nickel, et 0,6 mm pour les membranes en silicone carbone 0,6. La résistivité volumique selon le type de matériaux est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5: Résistivité volumique des matériaux utilisés pour la membrane tubulaire selon le fabricant (Getelec).

Matériaux de la membrane tubulaire	Résistivité volumique ($\Omega \cdot \text{cm}$)
Silicone nickel	<0,005
Silicone carbone	2,7

1.2. Réactivité des membranes tubulaires à la cathode

D'après le tableau 5, la membrane tubulaire en silicone nickel semble être un bon choix pour pouvoir conduire le courant sur le long de la membrane car sa résistivité volumique est plus faible que la membrane en silicone carbone. Cependant, ce paramètre ne nous permet pas de savoir si sa réactivité électrochimique est compatible avec notre application. Afin de vérifier cela et déterminer le choix de la membrane tubulaire à utiliser pour les designs expérimentaux du procédé mis en œuvre dans ce travail de thèse, les deux membranes tubulaires sont testées en électrochimie par voltamétrie cyclique dans le même milieu KCl 0,1M et en présence de ferrocène/methanol 1 mM. Cela permet d'observer le courant obtenu afin de réaliser les réactions d'oxydo-réduction selon l'équation suivante :



Les résultats de la CV réalisée sur les deux membranes tubulaires sont présentés sur la figure 4-2. D'après les voltamétries, les réactions d'oxydation et de réduction du couple redox ferricénium/ferrocène, au potentiel redox du couple (403 mV vs SHE (Paul et al. 2019)) ont pu être observées avec les deux membranes tubulaires en carbone (figure 4-2A) mais pas sur la membrane tubulaire en nickel (figure 4-2B). Il semblerait que pour cette dernière, une réaction d'oxydation importante ait lieu à la surface de la membrane, ne permettant pas l'observation des réactions redox du couple ferricénium/ferrocène. L'augmentation importante du courant semble liée à la présence de nickel qui peut être oxydé par électrochimie, pour former de l'oxyde de nickel (NiO).

Concernant les membranes en carbone, les voltampérogrammes cycliques montrent qu'elles sont suffisamment conductrices et permettent de mener des réactions électrochimiques en transférant les électrons d'une forme redox à une autre. Les différences de potentiel entre les pics d'oxydation et de réduction sont de 73 et 78 mV vs SHE, concernant respectivement les membranes tubulaires en silicone carbone 0,6 et en silicone carbone 1, respectivement. Cette

différence de potentiel permet d'évaluer si cette réaction électrochimique est réversible, sachant que, par convention, la valeur de 59 mV est observée quand les réactions sont très rapides. Il semble donc que les membranes tubulaires de carbone permettent les réactions électrochimiques avec une réversibilité non parfaite mais satisfaisante. Dans ces conditions, la membrane tubulaire en carbone pourra être utilisée pour la mise en œuvre du dispositif électrochimique du projet de thèse.

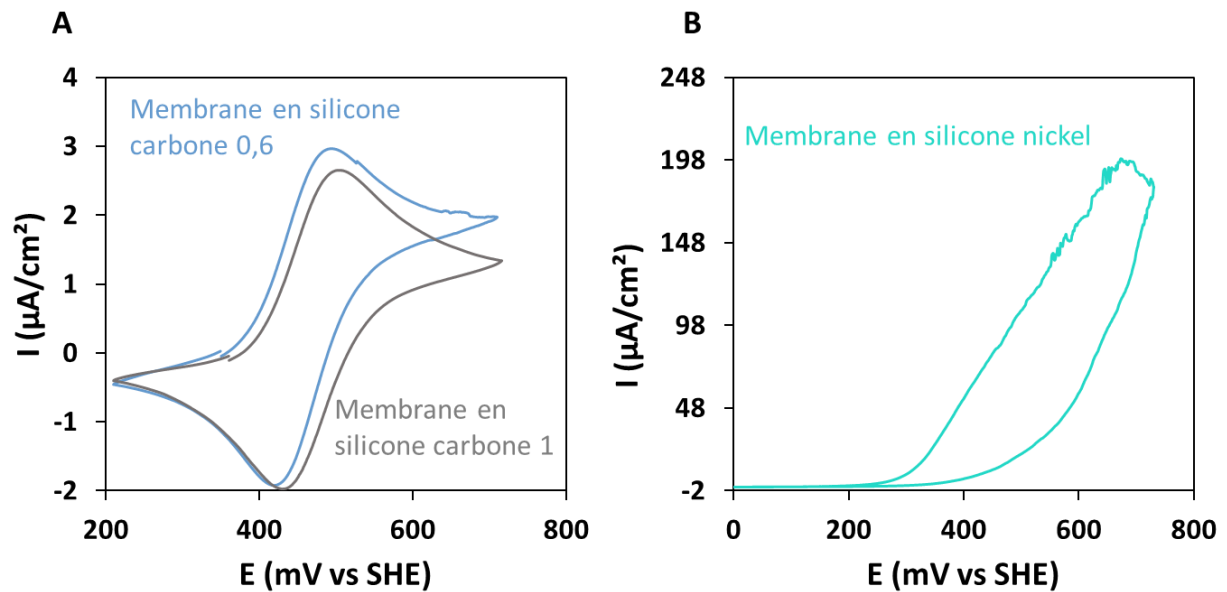


Figure 4-2 : Voltamétrie cyclique des membranes tubulaires en A. silicone carbone et B. silicone nickel dans une solution de 0,1 M KCl et 1 mM de ferrocène-méthanol. Vitesse de balayage : 5 mV/s.

1.3. Courbe de réduction des protons au niveau de la membrane silicone carbone (cathode) pour la production H₂

Les membranes tubulaires en silicone carbone ayant été choisies, et avant de pouvoir les mettre en œuvre dans le procédé, une expérience en milieu modèle est réalisée afin d'observer la courbe de réduction des protons en H₂. Pour cela, deux CV ont été réalisées dans une solution de KCl 0,1 M ayant subi au préalable un bullage à l'azote pendant 15 min afin d'extraire l'O₂ dissout. Puis, un flux de N₂ est introduit dans le ciel de la cellule à un débit de 0,11L/min pour la suite de l'expérience. Les données de voltamétrie cyclique sont présentées dans la figure 4-3.

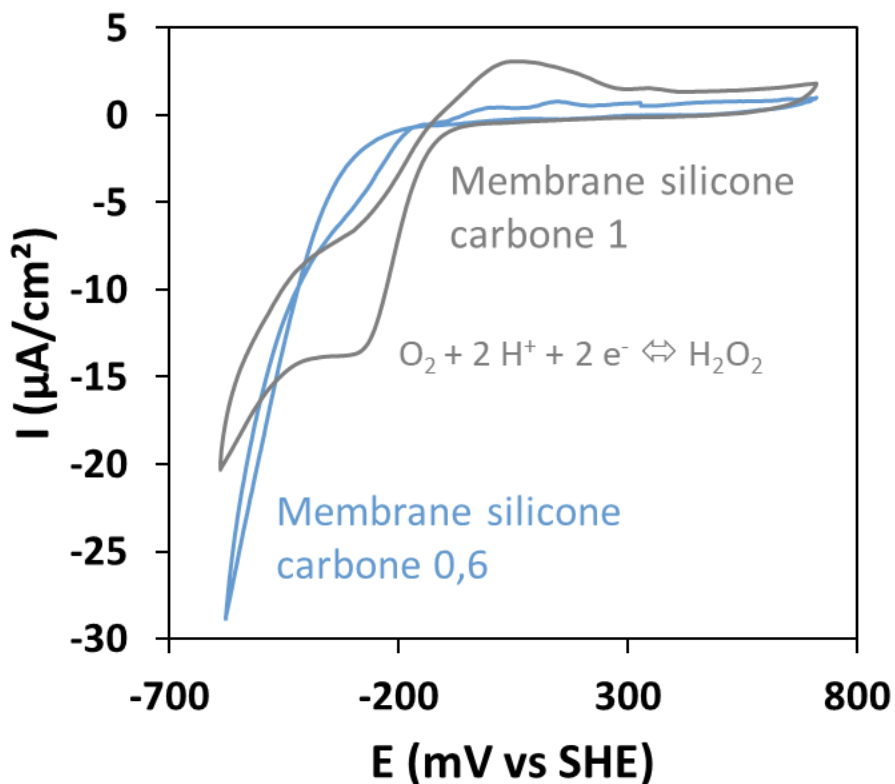


Figure 4-3 : Voltamétrie cyclique de la membrane tubulaire en silicone carbone 1 et 0,6 réalisée dans une solution de KCl 0,1M afin d'observer la courbe de réduction des protons en H₂ en présence d'un flux d'N₂. La vitesse de balayage est de 5 mV/s.

D'après les résultats, la membrane tubulaire en silicone carbone 1 montre une première courbe de réduction qui commence vers -58 mV vs SHE puis une seconde courbe de réduction commençant à -376 mV vs SHE. La première courbe de réduction n'est pas observée sur la membrane 0,6 qui présente seulement une seule courbe de réduction commençant à -123 mV vs SHE. Cette différence de réponse peut être due à l'épaisseur du matériau, différenciant les deux membranes. En effet, la membrane 0,6 a une épaisseur plus fine que la membrane 1 (0,6 mm contre 1 mm respectivement). Il a été vu dans le tableau 2 de la partie 4.1. de l'état de l'art que le silicone était perméable aux gaz aux conditions de l'étude associée. Cependant, plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour la perméabilité d'un matériau : la température, la nature du matériau et son épaisseur et la nature des molécules qui diffusent. Dans la présente étude, les membranes tubulaires de carbone ont la même référence de fabrication et seule l'épaisseur change. Ainsi, l'O₂ présent dans la membrane 1 a pu ne pas être suffisamment retiré lors du balayage à l'azote, contrairement à la membrane 0,6, pour le même temps de bullage de N₂. Il pourrait être plus intéressant d'utiliser la membrane 0,6 pour les montages expérimentaux finaux du projet afin de favoriser les meilleurs échanges avec le milieu, même si la membrane 1 reste intéressante du point de vue électrochimique.

En conclusion, la membrane tubulaire choisie est la membrane tubulaire en silicone carbone car, elle permet d'observer les réactions électrochimiques à sa surface. Il est également préférable d'utiliser la membrane 0,6 car son épaisseur permettrait d'extraire, en principe, plus facilement les gaz qui pourraient être produits dans le milieu.

2. Capacité d'extraction de l'hydrogène par la membrane tubulaire en silicone carbone – Utilisation d'un capteur à hydrogène

Il a été vu précédemment que les membranes tubulaires sélectionnées en silicone carbone permettaient d'observer les réactions électrochimiques qui vont nous intéresser. En effet, ces mesures électrochimiques ont indiqué le potentiel à partir duquel l'H₂ est produit et également, de manière fortuite, le potentiel de réduction de traces de O₂ sur la membrane. Avant de réaliser le montage électrochimique du procédé, il a été nécessaire de valider l'extraction d'H₂

par la membrane en silicone carbone. Pour cela, deux méthodes de détection ont été utilisées, une méthode qualitative, utilisant un capteur d'H₂ et une méthode quantitative, utilisant une micro-chromatographie en phase gazeuse, couplée directement au réacteur. La méthode qualitative a été d'abord utilisée afin de s'assurer du principe de fonctionnement du dispositif.

2.1. Mesure qualitative de l'hydrogène

2.1.1. Montage du capteur

Pour pouvoir réaliser une première mesure qualitative de la production d'H₂, un capteur à hydrogène a été fabriqué à partir d'une grille de platine de 1 cm². Cette dernière se comporte comme une électrode réagissant à un potentiel imposé de 550 mV vs. Ag/AgCl (Kuroda et al., 1990) et une variation du courant dans une solution HCl 0,1 M et KCl 0,1 M, en présence d'un balayage d'azote à 0,11 L/min. La réponse de cette électrode de travail en platine varie alors en fonction de la quantité d'H₂ dans le milieu. En effet, plus la quantité du gaz sera grande, plus le courant à l'électrode sera grand. Pour ce capteur, un feutre de carbone a été utilisé pour la contre électrode et une électrode de référence Ag/AgCl a également été utilisée (figure 4-4).

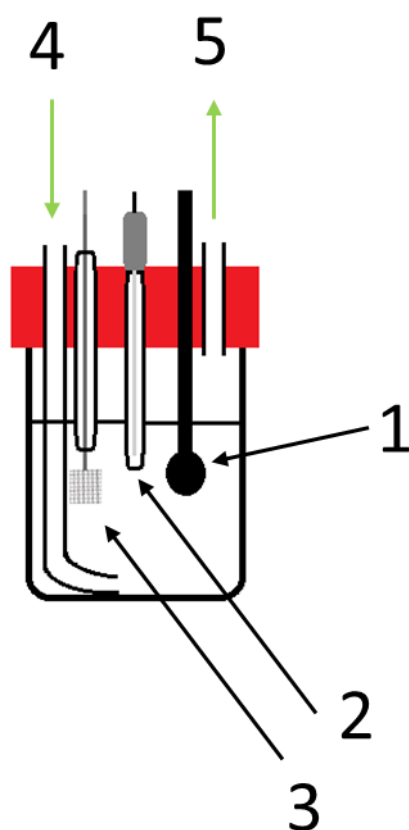


Figure 4-4 : Montage de la cellule expérimentale permettant de détecter qualitativement l' H_2 produit avec 1 : contre-électrode en feutre de carbone, 2 : électrode de référence Ag/AgCl, 3 : électrode de travail en platine, 4 : entrée du gaz et 5 : sortie du gaz..

2.1.2. Réponse du capteur à un apport externe d' H_2

Un premier essai a d'abord été réalisé avec un simple bullage d'un gaz composé de 80% d' H_2 et 20% d' N_2 dans la solution KCl 0,1M et HCl 0,1M contenant le capteur afin d'observer la réponse de celui-ci. La mesure de la réponse du capteur est présentée dans la figure 4-5. Pour cela, la cellule a d'abord été purgée à l'azote afin d'enlever toute trace d' O_2 et d' H_2 résiduel et ainsi obtenir un courant relativement stable, proche de zéro. Par la suite, à t_{15min} , c'est-à-dire après stabilisation, le mélange de gaz est introduit dans la cellule.

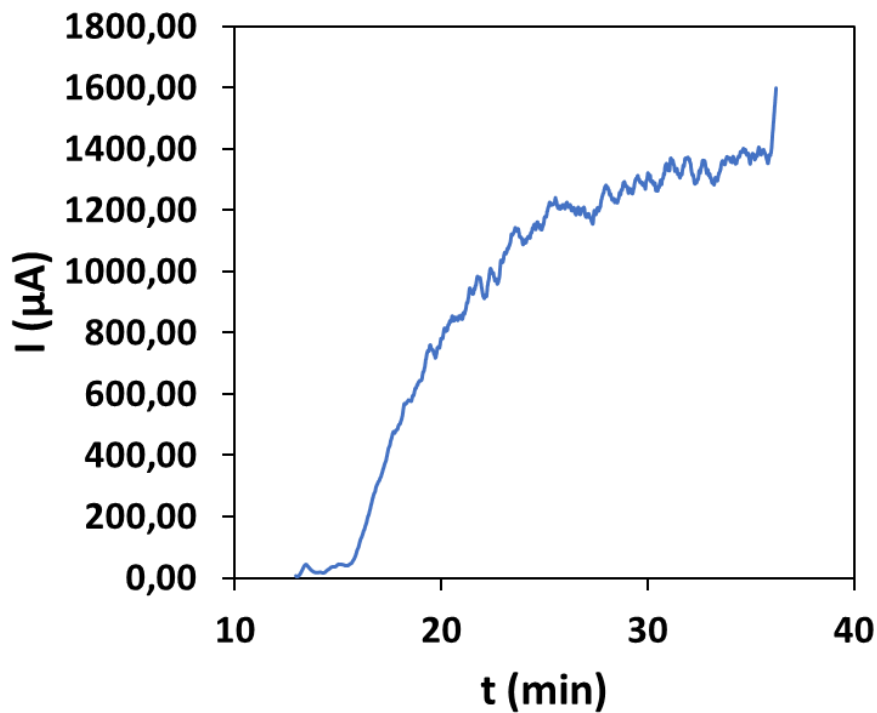


Figure 4-5 : Réponse en courant du capteur à hydrogène en présence d'un flux d'H₂ à 80 % dans une solution de KCl et HCl 0,1 M.

D'après les résultats, la première partie montre un courant faible et proche de zéro correspondant à la réponse en absence d'H₂, lorsque le flux d'azote est utilisé. La réponse de celui-ci est immédiate dès que l'H₂ est introduit et un plateau à environ 1400 μA est atteint en 15 minutes, pouvant indiquer une saturation en hydrogène dans la solution. En effet, selon la loi de Henry, la concentration dissoute d'un gaz à l'équilibre, dépend de la pression partielle apportée, selon l'équation suivante :

$$C_g = kP_g$$

Avec C_g, la concentration du gaz à l'équilibre (ou fraction molaire dans l'eau du gaz), k la constante de Henry de l'H₂ dans l'eau à une température donnée et P la pression partielle de l'H₂ apporté.

Selon cette équation, la concentration en gaz dissout est proportionnelle à la pression partielle du gaz apporté. Ainsi, plus la pression partielle d'H₂ apportée sera grande et plus la concentration dissoute sera grande, c'est-à-dire la concentration saturante pouvant être atteinte à une pression donnée.

Dans notre cas, l'hydrogène est apporté par bullage dans la solution à un débit de 0,11 L/min. La constante de Henry pour l'H₂ à 25 °C dans l'eau est de 0,78 mol.m⁻³.atm (Sander 2015). Soit pour une pression de gaz à 1 atm, la pression d'H₂ présent dans le mélange est de 0,8 atm.

D'après la loi de Henry, le H₂ aurait une solubilité de :

$$C_{H_2} = 0,78 \times 0,8 = 0,62 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} = 0,62 \text{ mmol/L}$$

Ainsi, à l'équilibre entre la phase gaz dans les bulles injectées et le liquide assimilable à l'eau, la concentration dissoute en H₂, dite de saturation, est d'environ 0,62 mmol/L selon la loi de Henry pour un mélange gazeux composé de 80% d'H₂ à une pression de 1 atm. Dans ces conditions, d'après la figure 4-5, la réponse au capteur montre que l'état d'équilibre à saturation du gaz dans le milieu est atteint au bout de 15 minutes.

2.1.3. Réponse du capteur à une électrolyse dans milieu réactionnel témoin

Il a été vu précédemment que le capteur à hydrogène permettait de détecter la présence d'H₂ dans la solution lors d'un apport important de ce gaz. Une solution de H₂SO₄ 0,1M a été utilisée et les courants ont été imposés afin de réaliser une électrolyse de l'eau dans le milieu. Un flux d'azote de 0,11 L/min a balayé le ciel du réacteur afin de pouvoir maintenir des conditions anoxiques et amener le H₂ produit dans la cellule contenant le capteur d'hydrogène (figure 4-6A). La variation de la réponse du capteur est montrée dans la figure 4-6B.

D'après les résultats, pour les courants d'électrolyse appliqués en dessous de -50 mA, l'hydrogène n'a pas été observé par le capteur. Mais lorsqu'un courant d'électrolyse de -100 mA est imposé à la cathode, la réponse du capteur augmente à 2,7 μ A. Pour un courant d'électrolyse de -200 mA, la réponse du capteur augmente encore jusqu'à 9 μ A, et enfin avec -500 mA, la réponse atteint 40 μ A. La figure 4-6B montre ainsi une variation de la réponse du capteur d' H_2 relativement proportionnelle à l'intensité de l'électrolyse.

En conclusion de cette partie, le capteur d'hydrogène permet d'observer qualitativement la production d'hydrogène dans un milieu modèle, lorsqu'un courant électrolytique est imposé aux électrodes et devrait nous aider à visualiser la production d'hydrogène dans un bioréacteur.

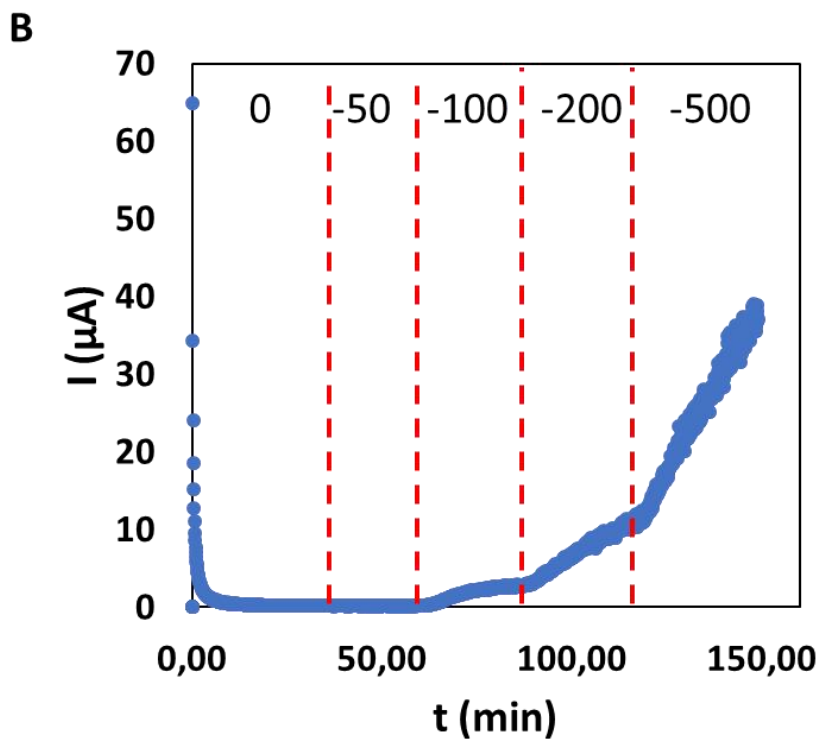
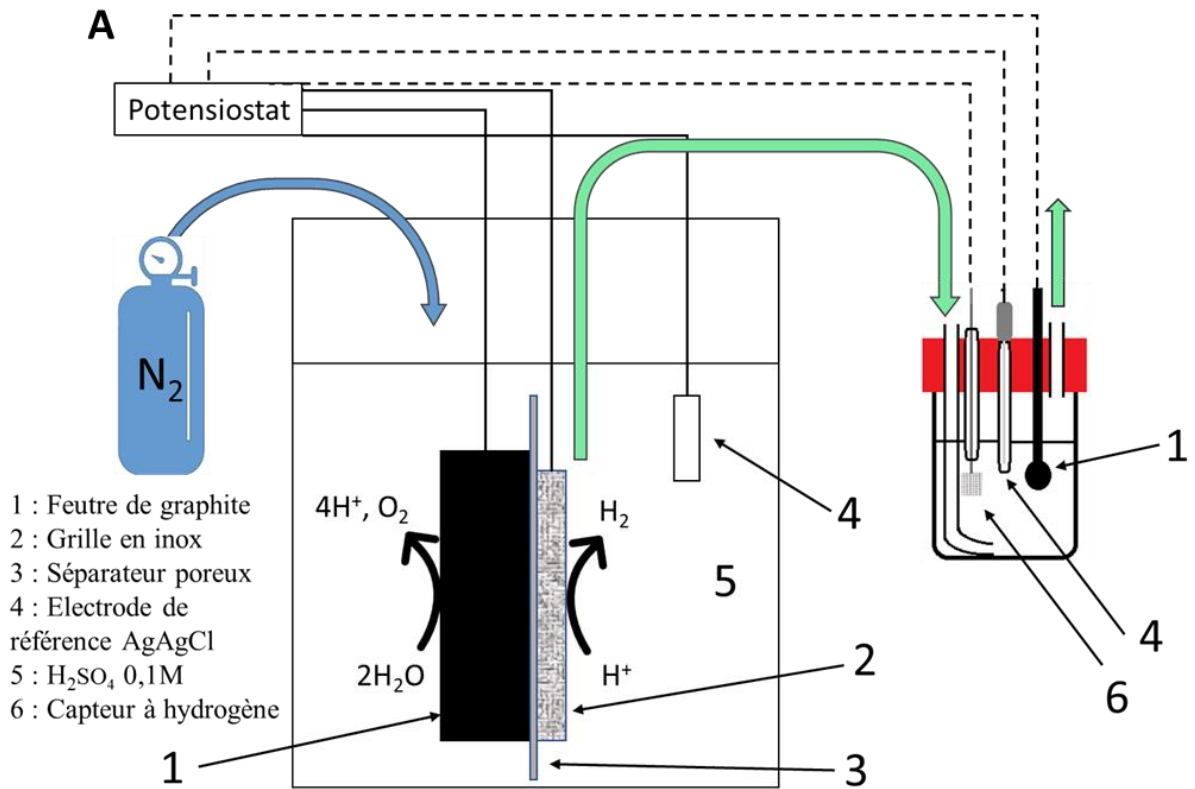


Figure 4-6 : Réponse en courant du capteur à hydrogène en fonction de la présence ou de l'absence des courants de -50 et -100 mA, -200 mA et -500 mA imposés à une grille en inox dans une solution de H_2SO_4 0,1 M.

2.2. Capacité d'extraction de la membrane tubulaire pour des courants faibles

La partie précédente a permis de valider l'utilisation d'un capteur à hydrogène en condition saturante et lors d'une électrolyse dans une solution de H_2SO_4 , permettant des mesures qualitatives du gaz produit. Les essais sur l'extraction du gaz par la membrane ont ensuite été réalisés et les résultats observés sont présentés dans cette partie.

2.2.1. Mise en œuvre de la cellule électrochimique avec la membrane dans un bioréacteur

Un montage simple du bioréacteur intégrant la membrane a été réalisé et est présenté en figure 4-7A. Une membrane 0,6 tubulaire en silicone carbone, longue de 2 m a été utilisée. Celle-ci est disposée en contact avec une grille en inox qui sera le siège de la production d' H_2 . L'ensemble grille en inox et membrane (Kundu et al. 2013) est entouré par une fibre de polymère poreux et isolant afin de les séparer du feutre de graphite, entourant lui-même l'ensemble du dispositif. Du digestat filtré a ensuite été ajouté dans le bioréacteur jusqu'à recouvrir l'ensemble des électrodes, soit environ 2L. Un faible flux d'azote de 20 mL/min a été imposé à l'aide d'un débitmètre massique, directement dans la lumière de la membrane, permettant l'extraction de l' H_2 produit. L'ensemble des gaz est ensuite canalisé jusqu'au détecteur d' H_2 (figure 4-7A).

2.2.2. Réponse du capteur à H_2 en fonction de différents courants imposés aux électrodes dans un bioréacteur contenant du digestat

Les essais d'extraction de gaz à partir de la membrane ont été réalisés dans du digestat de méthaniseur filtré. Les courants imposés à l'anode sont 0, 10 et 25 mA. La réponse du capteur à hydrogène est présentée dans la figure 4-7B.

D'après les résultats, la première mesure n'ayant pas de courant d'électrolyse imposée a montré une réponse de base de 0,004 μA . Celle-ci augmente légèrement lorsqu'un courant d'électrolyse de 10 mA est appliqué atteignant 0,005 μA . Avec un courant d'électrolyse imposé de 25 mA, le courant augmente encore, atteignant une valeur de 0,008 μA . La réponse du capteur à hydrogène diminue lorsque les courants électrolytiques imposés dans le bioréacteur sont arrêtés, montrant un arrêt de production d' H_2 , avant de remonter dès lors qu'un courant d'électrolyse imposé de 25 mA est utilisé. Le capteur semble pouvoir retourner à sa valeur initiale, lorsqu'aucun courant n'est imposé. La variation de la réponse du capteur a été obtenue après extraction de l' H_2 produit dans le bioréacteur et extrait au travers la membrane montrant ainsi que la taille de la membrane, associée à son épaisseur ont permis une extraction d' H_2 produits aux faibles courants d'électrolyse imposés.

En conclusion de cette partie, le capteur d'hydrogène a permis de montrer que la membrane 0,6 tubulaire en silicone carbone est capable d'extraire l' H_2 produit dans les milieux organiques servant de base à cette étude.

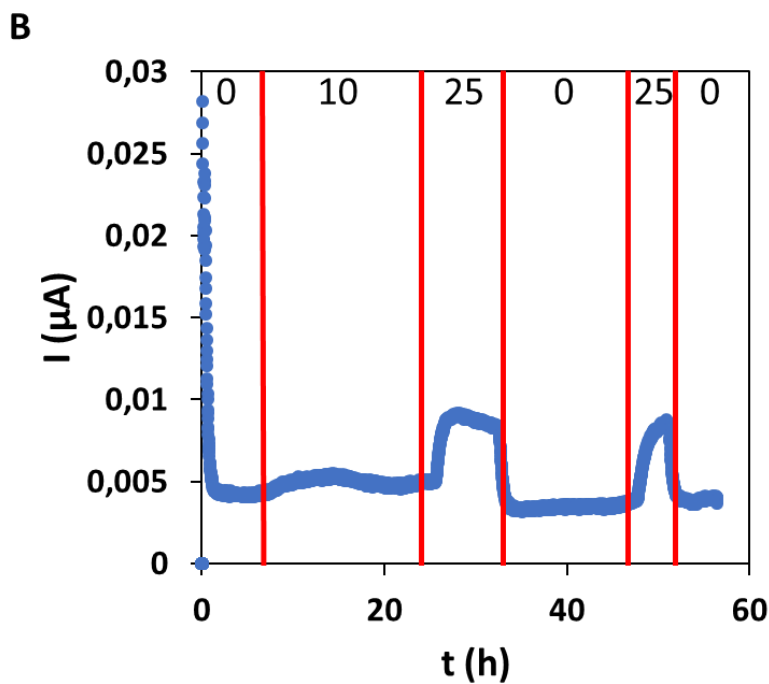
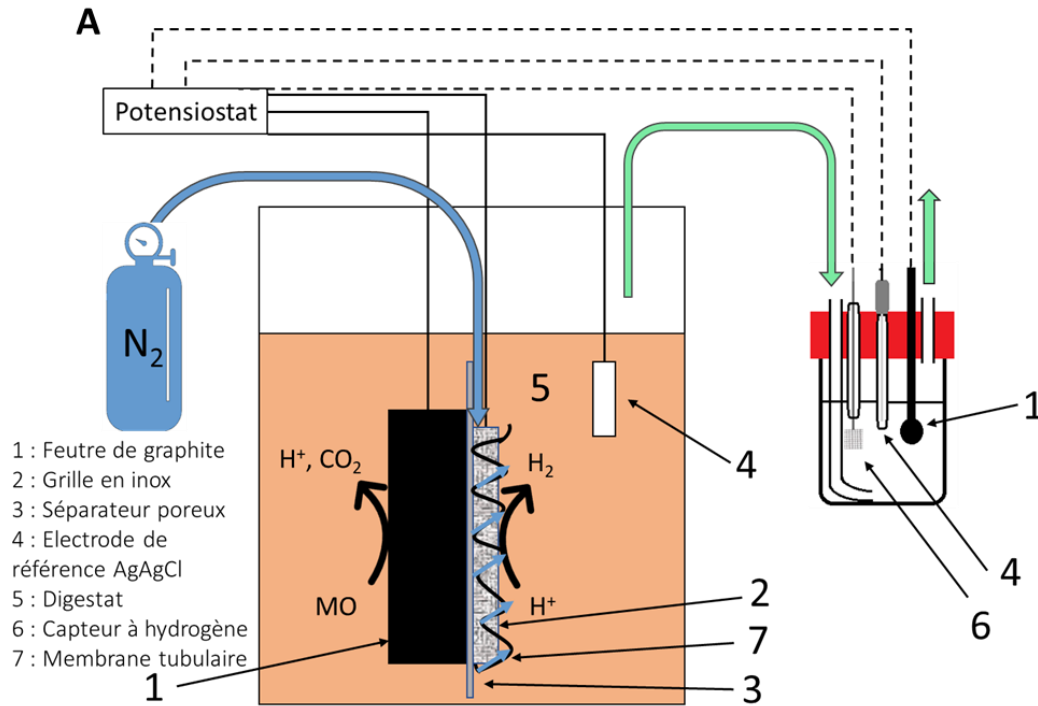


Figure 4-7 : (A) Montage de la cellule électrolytique composée de 1 : un feutre de graphite, 2 : une grille en inox, 3 : un séparateur poreux, 4 : une électrode de référence Ag/AgCl, 5 : digestat filtré, 6 : le capteur à hydrogène et 7 : la membrane tubulaire en silicone carbone fine 0,6 d'une longueur de 2m. (B) réponse en courant du capteur d'hydrogène lorsqu'aucun courant n'est imposé et lorsque les courants de 10 et 25 mA sont imposés.

2.2.3. Couplage de la micro chromatographie en phase gazeuse au bioréacteur en présence de digestat de méthaniseur

Les résultats précédents ont permis de montrer une production d' H_2 à partir de courants d'électrolyse imposés au montage du bioréacteur pour obtenir une électrolyse impliquant la membrane du côté cathodique. Cependant, la présence d'autres gaz n'est pas détectée, notamment ceux montrant une consommation de l' H_2 tels que le CH_4 et le H_2S . La microGC a été utilisée afin de quantifier l'hydrogène produit et d'observer les autres gaz pouvant résulter d'un métabolisme hydrogénotrophe. La matière organique étant prélevée dans le digestat d'un méthaniseur, une des voies consommant l' H_2 est la méthanisation. Ainsi, il sera possible de suivre la production d' H_2 et sa consommation. Le schéma du procédé couplé à la micro chromatographie en phase gazeuse est présenté dans la figure 4-8. Un vide a été créé au niveau du ciel du réacteur pendant 30 min afin de retirer le maximum d' O_2 présent dans le milieu. L'atmosphère est par la suite remplacée par de l'azote. Enfin, un flux d'azote de 0,11 L/min est constamment introduit dans la membrane.

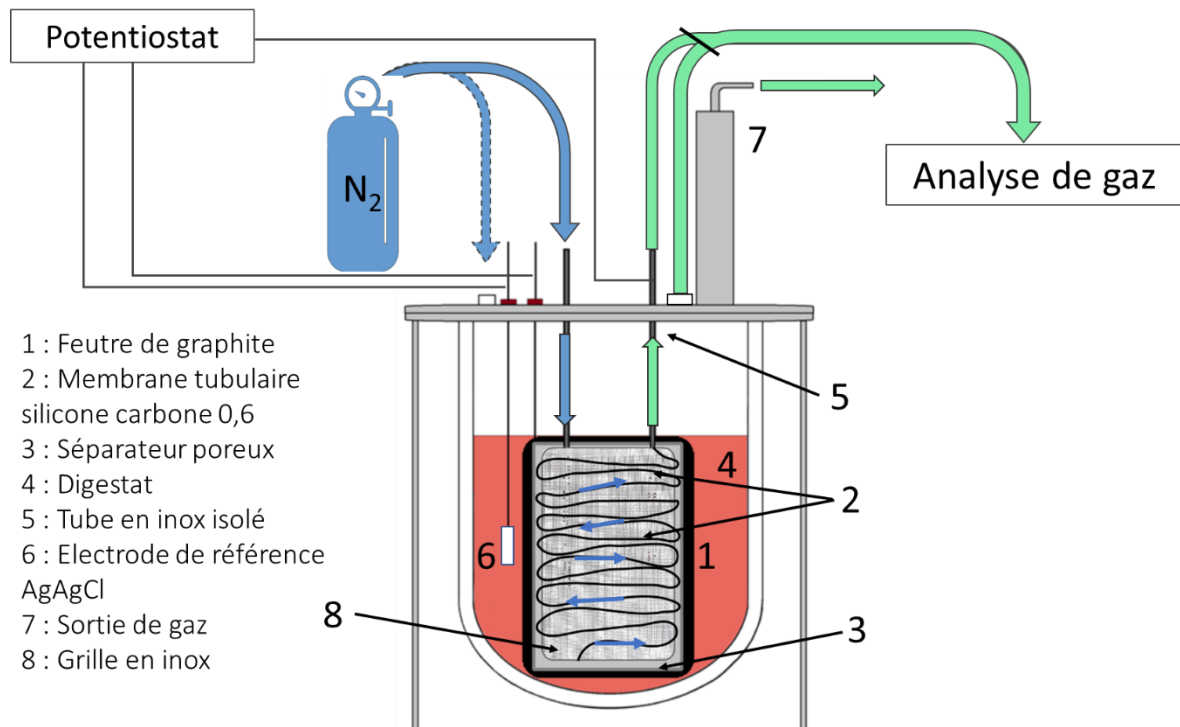


Figure 4-8 : Schéma du procédé utilisé en ligne avec la microGC. 1 : feutre de graphite ; 2 : membrane tubulaire en silicone carbone fine ; 3 : polymère isolant les deux électrodes ; 4 : digestat filtré ; 5 : tube en inox isolé ; 6 : électrode de référence AgAgCl ; 7 : sortie de gaz de sécurité ; 8 : grille en inox.

2.2.4. Analyse de la quantité de CH₄ et H₂ produit en fonction des courants successifs imposés entre les électrodes dans le bioréacteur en présence de digestat

Les figures 4-9 A et B montrent l'évolution du potentiel de la membrane tubulaire silicone carbone 0,6 en fonction des courants imposés. Le CH₄ et l'H₂ sont quantifiés par la microGC. Les gaz sont mesurés avant et après avoir imposé les courants d'électrolyse et après équilibration du potentiel mesuré à la membrane.

D'après les résultats, l'évolution du potentiel montre la réduction d'un composé commençant vers -60 mV vs. SHE à un courant imposé de -100 µA et semble s'équilibrer à un potentiel de -

870 mV vs. SHE pour un courant de $-2000 \mu\text{A}$. Afin de savoir si une production d' H_2 est tout de même observée entre les courants imposés jusqu'à -100 mA , la quantification de CH_4 et de H_2 est présentée sur la figure 4-9 B. La production d'hydrogène, très faible, est observée à $0,02 \text{ mol}\%$ lorsque $-1000 \mu\text{A}$ est imposé. Durant le temps de rééquilibrage à un courant imposé de $-2000 \mu\text{A}$, $0,019 \text{ mol}\%$ a été mesuré à la membrane, après avoir arrêté l'électrolyse. Cette observation se répète avec $-3000 \mu\text{A}$ pour une quantité toujours faible de $0,079 \text{ mol}\%$. Ce n'est qu'à partir de $-4000 \mu\text{A}$ que la production de H_2 a été observée pendant et après que les courants ont été imposés, avec, pour $-4000 \mu\text{A}$ une quantité de $0,033 \text{ mol}\%$. Le maximum de H_2 mesuré a atteint $0,70 \text{ mol}\%$ pour un courant d'électrolyse de -100 mA .

En parallèle, il semble que la production de méthane reste constante et ne semble pas diminuer ou augmenter en fonction des différents courants imposés suggérant que la production en CH_4 est déjà à son maximum possible. Toutefois, il apparaît que le H_2 produit par électrolyse n'est potentiellement pas ou peu consommé par les méthanogènes puisque les valeurs de CH_4 sont stables par rapport à ce qui est observé en absence de courant. Les gaz présents dans le ciel du réacteur n'ont pas été mesurés lors de cette expérience.

En conclusion, il semblerait que la production d' H_2 aux courants imposés est observée à partir d'un courant d'électrolyse de $1000 \mu\text{A}$. Cependant, cette production de H_2 ne semble pas avoir un impact sur la production du méthane mesurée dans la lumière de la membrane tubulaire, qui est restée constante tout le long de l'expérimentation.

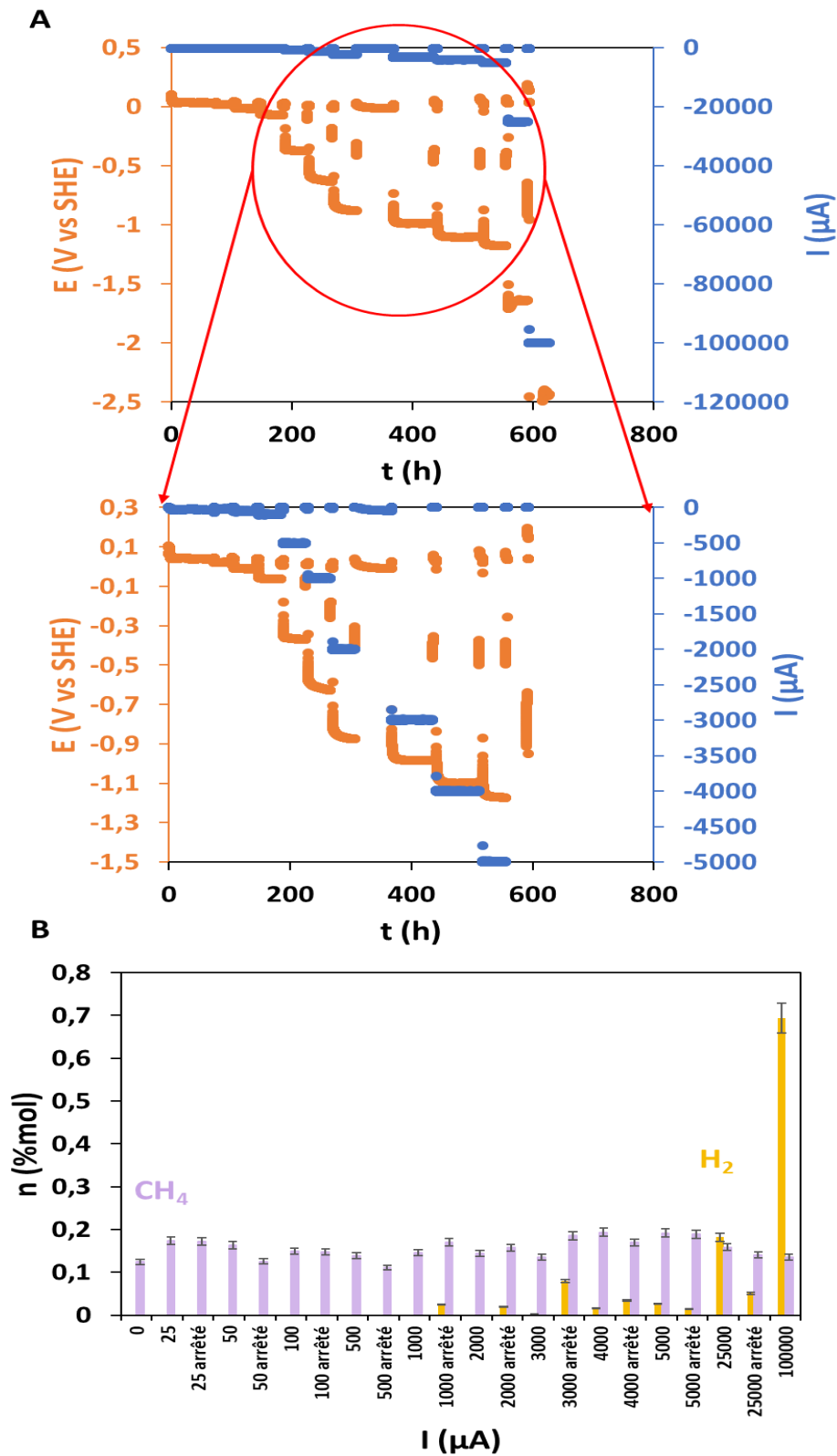


Figure 4-9 : Suivi de l'évolution du (A) potentiel de la membrane et de (B) la production de CH_4 et de H_2 en fonction des courants d'électrolyse imposés (-25 , -50 , -100 , -500 , -1000 , -2000 , -3000 , -4000 , -5000 , -25000 et $-100000 \mu\text{A}$), pendant et après l'électrolyse.

2.2.5. Oxydation de la matière organique au niveau de l'anode dans le bioréacteur

La partie précédente a montré une courbe de croissance du potentiel correspondant à la réduction des protons en H_2 à la membrane en lien avec la production d' H_2 . Une seconde expérience a été réalisée où les potentiels de la membrane tubulaire et du feutre de graphite ont été mesurés en fonction des courants d'électrolyse imposés (figure 4-10). Pour cela un disque de feutre de 16 cm de diamètre a été installé au fond du bioréacteur et la membrane 1 tubulaire en silicone carbone de 8 cm de longueur a été utilisée. Le rapport de surface entre le feutre de carbone (poids de 6,3g ; $1m^2/g$ de feutre) et la membrane tubulaire était de ~ 5000 . Ces conditions expérimentales sont proches de celles utilisées dans le prochain chapitre.

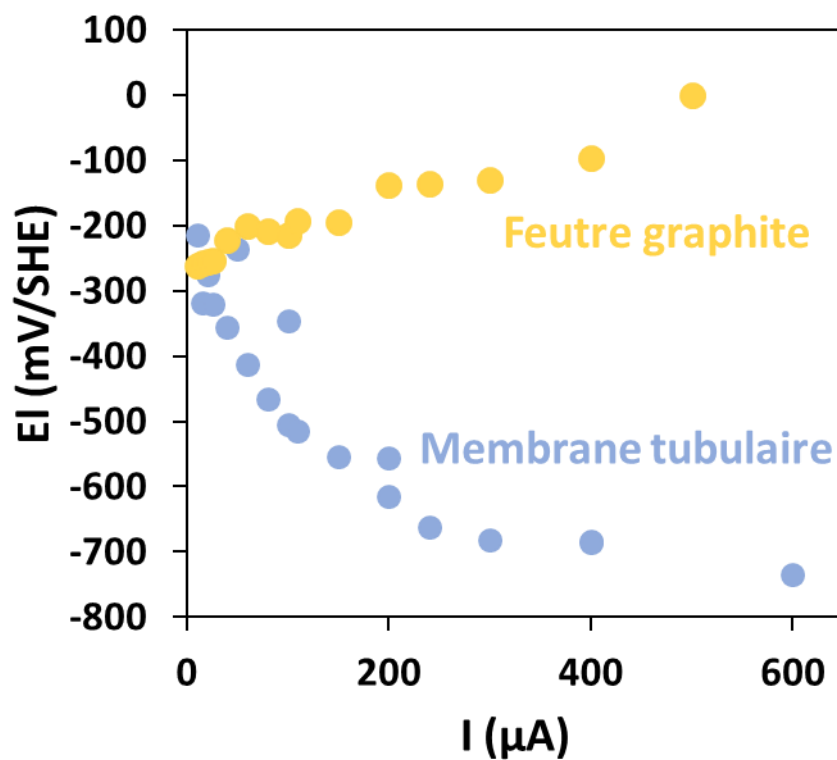


Figure 4-10 : Suivi du potentiel de la membrane tubulaire en silicone carbone 1 et du feutre en fonction des courants imposés.

D'après les résultats, le potentiel de la membrane tend vers une valeur de -700 mV lorsque les courants deviennent plus importants, ce qui correspond assez bien à la courbe de réduction du solvant, et donc d'évolution d'hydrogène, observée à la Figure 4-10 lors des tests préliminaires sur la réactivité de ces membranes. L'évolution du potentiel du feutre de graphite quant à lui suit une évolution moins importante. Plus le courant imposé augmente, plus le potentiel mesuré du feutre augmente, mais ce potentiel reste proche de 0 V vs SHE, ce qui montre que l'oxydation de l'eau n'est pas impliquée dans cette réaction d'oxydation, et que la source d'électron est très certainement la matière organique présente dans le digestat.

3. Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis de réaliser des essais préliminaires, notamment sur la membrane tubulaire afin de pouvoir la valider pour son utilisation pour l'électrochimie dans le digestat et pour l'extraction d'hydrogène. Pour cela, deux matériaux de membrane tubulaire ont été testés : un silicone chargé en particules de carbone et un silicone chargé en particules de nickel. La membrane en silicone carbone a été sélectionnée car elle permet d'observer les réactions électrochimiques avec le couple redox ferricénium/ferrocène et devrait ainsi se comporter de manière intéressante en présence de biofilms électrochimiques.

Les premiers essais en présence d'un capteur à hydrogène ont permis d'observer la capacité d'extraction de l' H_2 par la membrane tubulaire en silicone carbone, dans une solution modèle de H_2SO_4 et dans le digestat, lorsque des courants sont imposés pour forcer les réactions électrolytiques. Les essais réalisés dans le digestat et couplés avec une analyse en microGC ont permis également d'extraire l' H_2 et le CH_4 produit dans le milieu et/ou par électrolyse forcée. Enfin, des mesures de potentiel ont montré que l'apport d'électron par oxydation de la matière organique ne devrait pas être une réaction limitante si la surface de feutre de carbone utilisée en anode est suffisamment grande par rapport à la taille de la membrane silicone carbone qui serait utilisée comme cathode.

L'enjeu de notre étude est maintenant d'évaluer si la production d'hydrogène peut être favorisée sans utiliser d'électrolyse forcée (par imposition de courant ou de potentiel), en se servant d'un système autonome dans lequel les deux électrodes seraient court-circuitées dans le digestat de fermentation sombre, en favorisant alors un processus d'électrofermentation.

Mise en œuvre du procédé de production de bio-hydrogène dans un bioréacteur combinant la fermentation sombre et l'électrofermentation

Les résultats du précédent chapitre ont permis de caractériser et d'établir le choix du matériau nécessaire à l'extraction du bioH₂. En particulier, le choix s'est porté sur une membrane tubulaire en silicone carbone car elle permet l'extraction des gaz, elle présente également une conductivité suffisante pour le transport des électrons et elle permet d'observer des réactions redox avec des espèces chimiques en solution à son voisinage. Par ailleurs, ces travaux ont montré qu'une membrane chargée en nickel avait une réactivité importante liée à cette charge métallique, pouvant avoir une influence négative sur son comportement dans le milieu de fermentation sombre, alors que la membrane chargée en particules de carbone se comportait de façon plus neutre dans le milieu électrolyte et ne réagissait qu'avec les espèces en solution (espèces redox, solvant).

Ce second chapitre va se concentrer sur la mise en place du procédé en proposant différentes configurations de bioréacteurs expérimentaux, en prenant en compte les paramètres clés présentés lors l'état de l'art et explorés dans le premier chapitre des résultats. En particulier, il s'agissait de :

- Proposer un montage permettant d'avoir les conditions anaérobies pour la production de bioH₂, en ayant un milieu réducteur, avec un potentiel redox bas et tout en limitant la présence d'O₂.
- Favoriser la production de H₂ à la cathode tout en limitant la production de gaz CH₄, ce dernier étant un indicateur d'activités hydrogénotrophes.
- Promouvoir une spécialisation de biofilms microbiens sur chaque électrode, et plus spécifiquement une électrode pouvant se spécialiser pour l'oxydation de la matière

organique (devenant ainsi l'anode du système) et la seconde électrode pouvant se spécialiser pour favoriser la production de bioH₂ (cette électrode devenant alors à la cathode).

1. Choix du design du bioréacteur

1.1. Introduction de l'article

A la suite des tests préliminaires permettant la sélection de la membrane tubulaire en silicone carbone et montrant également la capacité de celle-ci à extraire les gaz produits, différents design expérimentaux de bioréacteur ont été réalisés afin d'identifier celui permettant d'atteindre les meilleures conditions pour la production d'H₂ par voie biologique. Comme présenté dans le chapitre de l'état de l'art, plusieurs études ont déjà été réalisées essayant de combiner le principe de la fermentation sombre par l'utilisation de membrane liquide/gaz et l'électromicrobiologie pour augmenter le rendement de production de bioH₂. Pour cela, les procédés mis en œuvre étaient en une ou en deux étapes. Le procédé en deux étapes consiste à faire une première fermentation sombre, suivi d'une récupération des effluents tels que les acides gras volatils (AGV comme l'acétate ou le butyrate), pour les introduire ensuite dans le compartiment anodique d'une CEM dans lequel un biofilm microbien est présent sur l'anode. Dans ces conditions, une oxydation de ces effluents est possible, ce qui se traduit par la formation d'un courant et une production d'H₂ au niveau de la cathode. Cette méthode permet d'obtenir un niveau d'oxydation plus élevé des substrats initiaux présents dans le milieu de fermentation. Le procédé en une seule étape consiste à utiliser la DF et l'électromicrobiologie dans un seul compartiment dans lequel les électrodes se retrouvent dans le même milieu, utilisant des microorganismes électroactifs à l'anode et à la cathode. Il existe des procédés utilisant des membranes principalement retrouvées dans les bioréacteurs anaérobies à membrane, utilisant une membrane dans laquelle des particules de nickel ont été introduites afin d'augmenter la conductivité du matériau membranaire en utilisant cette propriété pour accroître la production et l'extraction de bioH₂ (Katari et al. 2014; Hu, Fan, et Liu 2009). Cela permet également de développer des biofilms microbiens mixtes, contenant des microorganismes électroactifs et non électroactifs permettant une symbiose bénéfique au

procédé. Enfin, une spécialisation des microorganismes dans ces biofilms est attendue si les environnements à l'anode et à la cathode sont suffisamment différenciés. Cependant, les études impliquant ces membranes chargées en nickel utilisaient tout de même une tension additionnelle d'environ 0,6 V ou 0,7 V appliquée aux électrodes afin de surmonter la barrière thermodynamique liée à la production d'H₂ (Katuri et al. 2014; Hu, Fan, et Liu 2009). Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à combiner la DF et une technologie électromicrobiologique dans un seul et même système, afin de créer des conditions favorables à un processus d'électro-fermentation au voisinage de la cathode. Ce procédé combinant deux électrodes mises en court-circuit (SCE) pourrait permettre, par oxydation de la matière au niveau de l'anode et le transfert des électrons vers la cathode de créer un environnement réducteur au voisinage de cette cathode pour favoriser une production indirecte de bioH₂. Cette approche est différente de la production directe de bioH₂ au niveau de la cathode qui ne peut avoir lieu que lorsqu'une tension est imposée entre les deux électrodes du procédé. C'est l'établissement de ce processus d'électrofermentation dans un milieu de fermentation sombre qui a été exploré et décrit dans l'article ci-dessous. **Il est à noter que l'article est en cours de révision au moment où le manuscrit de thèse est écrit.**

1.2. Choix du design expérimental du système, suivi de production d'H₂ et première approche de la population microbienne

Evaluation of short-circuited electrodes in combination with dark fermentation for promoting biohydrogen production process

Delphine Truong^{1,2}, Frédérique Changey², Emmanuel Rondags¹, Xavier Framboisier¹,
Mathieu Etienne² *, Emmanuel Guedon¹ *

¹ Université de Lorraine, CNRS, LRGP, 54500 Nancy, France

² Université de Lorraine, CNRS, LCPME, 54000 Nancy, France

Abstract

Short-circuited electrodes, in combination with dark fermentation, was evaluated in a biohydrogen production process. On the basis of an innovative design of a non-compartmented bioreactor, electrodes made with a conductive tubular membrane and a graphite felt resulted in a functional cathode and anode respectively. In particular, the electrode specialization occurred when the bioreactor was inoculated with manure as the whole medium and when a vacuum was applied. In this experimental condition, the potential of the electrochemical system reached values as low as -320 mV vs. SHE with the used of vacuum only, whereas significant bioH₂ production was characterized. When additional heat treatments of the whole manure were applied in order to remove methanogens without perturbing electrochemical properties, a higher bioH₂ production occurred and a potential of the electrochemical system as low as -429 mV vs SHE was obtained. The electrode specialization, i.e anode and cathode, was confirmed by microbial ecology analysis of biofilms and by cyclic voltammetry measurements.

Keywords

Biohydrogen, short-circuited electrodes, electrochemical snorkel, dark fermentation

*Corresponding author. Université de Lorraine, CNRS, LRGP, 54500 Nancy, France. Email address: emmanuel.guedon@univ-lorraine.fr (E. Guedon)

Université de Lorraine, CNRS, LCPME, 54500 Nancy, France. Email address; mathieu.etienne@cnrs.fr (M. Etienne)

Introduction

In the context of global warming, energetic transition is both a societal and an environmental challenge. With the reduction of fossil energy consumption, development of renewable sources is one of the main solutions to make this transition possible. In recent years, renewable hydrogen has been seen as a credible carbon-free energy resource, used either for direct combustion or in a fuel cell. However, hydrogen production over decades, has been traditionally led by oil industry, through cheap but nonrenewable and polluting methods producing a large quantity of CO₂ (Mosca et al. 2020). Therefore, efforts are carried out toward cost reduction and low CO₂ emission by developing alternatives using electrolyser or, in a lesser extent through biological methods, especially using microbial based technologies (Ghimire et al. 2015). One of the most studied microbial methods is based on dark fermentation (DF), more specifically on the capability of specific microorganisms to produce bioH₂ (Ghimire et al. 2015; Renaudie et al. 2021; Oh et al. 2004; Y.-Q. Wang et al. 2018). In such microorganisms, like *Clostridium* sp., mainly anaerobic species, carbon substrates are oxidized to provide energy and electrons sources that are used by hydrogenase to produce bioH₂ (Saint-Amans et al. 2001). In fact, with the use of specific co-factors, this enzyme can catalyze both the production and/or the consumption of H₂, depending on different parameters such as H₂ partial pressure (P_{H₂}) (Mizuno et al. 2000) and the redox environment such as pH (X. M. Guo et al. 2010). This enzyme is mainly found in a large range of microorganisms such as *Clostridium* species, present in mixed culture dedicated to dark fermentation for bioH₂ production (Barca et al. 2016; Morsy 2017; Zagrodnik et Łaniecki 2017). During this process, H₂ pressure (i.e. P_{H₂}), can be reduced in order to favor H₂ production by using a gas flow as a carrier or using vacuum directly in the headspace of the bioreactor or through a liquid/gas membrane (Renaudie et al. 2021; Lee et al. 2012).

As an alternative to DF, Microbial Electrolysis Cell (CEM) have been evaluated for hydrogen production (Lalauette et al. 2009; Mohan et Pandey 2013; Jeremiasse, Hamelers, et Buisman 2010). This approach is based on microorganisms that can exchange electrons with the extracellular environment, and more specifically with electrodes. In fact, electroactive microorganisms from the environment, can be either exoelectrogenic or electro-trophic, according to their capacity of giving/receiving electrons to/from the environment respectively, creating an electron flow and thus a current (Logan et al. 2019). CEM consists usually in using this electron flow from a bioanode (electrode covered by an electroactive biofilm for catalyzing organic substrate oxidation) to a cathode. The production of bioH₂ is however thermodynamically unfavorable in CEM that combines electrochemical oxidation of organic matter at ~ -300 mV vs. SHE and H₂ evolution (Cheng et Logan 2007; Zaybak et al. 2013; Reeve et al. 2017). In such system, it is therefore necessary to add at least an external potential of 0.13 V between the microbial anode and the cathode (biotic or abiotic) to overcome this thermodynamic barrier for H₂ production. This potential is much lower than the one usually used for water electrolysis at 1.4 V which is one of the advantages of CEM for bioH₂ production. However, such system still consumes energy for H₂ production while microbial bioH₂ producers from the environment can produce this gas despite the unfavorable potential difference between NADH/NAD⁺, H⁺ and H⁺/H₂ redox potentials (-320 and -414 mv vs. SHE respectively).

According to the literature, bioH₂ recovery can reach 33% using DF and 50 to 90 % using 0.6 V applied for CEM, the highest recovery being observed with acetate and lactate as the substrate (Cheng et Logan 2007). This value can be difficult to reach in complex media such as in organic waste because of the complex microbial population present inside. To reach the highest bioH₂ production from organic wastes, combining DF and CEM has to be considered (Lalauette et al. 2009; K. Guo, PrévotEAU, et Rabaey 2017; Katuri et al. 2014; Werner et al. 2016; Y.-K. Wang et al. 2013). In fact, bioH₂ production on its highest rate on CEM is done using substrates that are found in fermentation such as volatile fatty acid (VFA, i.e. acetate, butyrate...) instead of glucose substrate for which bioH₂ recovery could only reach 71% in CEM operated at 0.6 V (Cheng et Logan 2007). In initial experiments that involved the integration of DF and CEM technologies, the production of bioH₂ was achieved through a sequential two-step process. In the initial

phase of DF, the oxidative breakdown of organic substrates within the medium resulted in the generation of hydrogen, concurrently with the production of VFA. In a subsequent stage, these VFA generated in the DF process were transported to an electrochemical cell and subjected to oxidation by an electroactive bacteria biofilm within the anodic chamber (Lalaurette et al. 2009). It has been demonstrated that the combination of these two methods led to an increase in bioH₂ production (Lalaurette et al. 2009; Liu et al. 2012; Moreno et al. 2015). For example, Lalaurette et al., demonstrated that employing effluents from cellobiose fermentation to supply a CEM resulted in achieving a hydrogen yield of 9.95 molH₂/molglucose while DF alone yielded only 1.64 molH₂/mol_{glucose} (Lalaurette et al. 2009). This difference can be attributed to the various oxidation degrees of organic components of the medium.

The combination of the two methods into a single step process was later considered. In order to reduce internal resistance present in CEM, the two electrodes chamber could be combined by implementing electrodes closer to each other without separation. In addition, the global system could be additionally simplified by using conductive membranes, such as nickel based hollow fiber, making them able to work either as a cathode and for gas extraction (Katuri et al. 2014; Werner et al. 2016). However, some important experimental conditions are not always easy to set up, depending mostly on microorganism optimal cultures. As an example, the optimal pH of fermentative microorganisms in DF usually ranges between 5 to 6 (X. M. Guo et al. 2010) while it is around 7 for electroactive bacteria in CEM (Patil et al. 2011) and some compromise values had to be established. Another difficulty is related to microorganisms that are naturally present in the complex environment such as manure or waste-based media. Such microorganisms can consume hydrogen, resulting in an increase in pH of the medium and the decrease of the performance of bioH₂ production, explaining why processes combining both CEM and DF in a one-step method are hardly investigated. Apart from CEM, DF and any combination of these two processes, another concept, the microbial electrochemical snorkel involving short-circuited electrodes (SCE; anode and cathode) emerged recently in the area of microbial electrochemistry. SCE do not produce nor consume electricity but permits to connect efficiently separated electromicrobial processes and was shown to be efficient for the passive water treatment by promoting organic matter oxidation (Hoareau et al. 2023), nitrate removal (Rogińska et al. 2021) or metal recovery (Mitov et al. 2021). The main interest of SCE lies in its simplicity, not requiring external power sources to run the process.

The purpose of this study was to evaluate the possibilities offered by short-circuited electrodes in combination with DF for bioH₂ production, considering the CEMhanism of electrofermentation. To do this, experiments were carried out in a non-compartmentalized bioreactor inoculated with manure as the whole medium and inside which a graphite felt was used as a bioanode and a conductive tubular membrane used as biocathode for both electrochemical reactions and gas extraction. First, the design of the experiment was improved in order to reach the lowest potential range in the complex medium. Then, the electrochemical specialization of the electrodes with biofilms was monitored electrochemically, for bioH₂ production and in a microbial ecology point of view on each electrode biofilms.

2. Material and methods

2.1. *Experimental design*

A 5 liters bioreactor was used for all experiments. The electrochemical device was composed of three electrodes, the working electrode was a carbon-based silicone tubular membrane (Getelec, France), the counter electrode was made with a piece of graphite felt (GFD 4.6EA, SGL, Germany) and the reference electrode was an Ag/AgCl/KCl 1M. A porous separator was implemented at the surface of the graphite felt, between the two electrodes to prevent direct contact. Electrochemical analysis was done with a VSP-3e potentiostat (Biologic, France). Following a previous report (Rogińska et al. 2021), the electrochemical noise mode of the EC Lab software (Biologic, France) was used to short-circuit the graphite felt and the conductive tubular membrane while the current as well as the potential of the whole system were measured between the two electrodes. All potentials were then recorded versus standard hydrogen electrode (SHE) by adding 240 mV to the measured values. The current density was calculated according to the geometric surface area of the electrodes. Potential and current values were collected every minute. Open circuit voltage (OCV) and cyclic voltammetry (CV) at 1mV/s were measured on individual electrodes.

Three experimental designs of the bioreactor were tested during this study (Figures 1 to 3). For all experiments, the tubular membrane was connected to an insulated stainless-steel tube. The graphite felt was connected to a stainless-steel rod and through a butyl septum in the headplate of the bioreactor in order to avoid any oxygen entry.

In the first design of the bioreactor, a tubular membrane (inner diameter x outside diameter x length of 3.5 mm x 5.5 mm x 80 mm) was connected to two stainless steel tubes inside which 0.11 mL/min of air or N₂ were used as gas carrier for gas extraction. The graphite felt piece (80mm x 85 mm x 4 mm) was placed at two-thirds in the organic medium and one-third in the headspace of the reactor. In the second design of the bioreactor, the graphite felt piece (a 160 mm disc in diameter with 5 mm in thickness) was placed at the bottom of the reactor whereas the tubular membrane did not change compare to the first design. A flow of N₂ at 0.11 mL/min inside the tubular membrane was used as gas carrier for gas extraction in the third design of the bioreactor, the graphite felt piece (a 160 mm disc in diameter with 5 mm in thickness) was placed at the bottom of the reactor and an 80 mm tubular membrane was closed in one extremity with a 20 mm stainless steel stem. Instead of a gas carrier, a vacuum of 80 kPa was applied inside the tubular membrane, using membrane pump (N86 Labort, KNF, Germany).

In this final experimental design of the bioreactor, a vacuum of 80 kPa was applied continuously for long term electrochemical and gas analyses.

2.2. Culture conditions

Cultures were inoculated using manure from either the methanizers of Methanason (Einvilleau-Jard, France) or La Bouzule farm (Nancy, France) as the whole medium. The two methanizers were feed with the same organic wastes, were associated and were actives for dark fermentation. The manure collected at t_0 was directly introduced into the bioreactor. A first vacuum was made through the membrane, in the medium and in the headspace to remove all O₂ present in the bioreactor. Then, N₂ was, used to fill the membrane and the headspace in

order to limit O₂ entry when the vacuum was stopped. Electrochemical and daily gas analyses started when vacuum was applied to the membrane. After the system reached potential and current equilibrium values, two successive heat treatment at 121 °C were done to the medium for electrochemical and gas analysis.

2.3. Gases analysis

H₂ and CH₄ from the membrane and headspace of the reactor were analyzed online with a micro Gas chromatography (microGC fusion, Chemlys) equipped with two Thermal Conductivity Detector (TCD, columns A and B) were used for gas composition analysis with argon as carrier gas on the detector A and helium as carrier gas for the detector B. The A and B column were set at 80 °C and 75°C respectively. The detector was set 70 °C.

2.4. Electrofermentation coefficient

Electrofermentation coefficient (η_{EF}) was calculated following the equation proposed by Moscoviz et al., 2016, using the transfer charged (Q_{e-}) and the total charged product (Q_p):

$$Q_{e-} = \int I dt \quad (1)$$

Where I is the electric current recorded over a time.

$$Q_p = n_p \times N_p \times F \quad (2)$$

With n_p the number of moles of the product, N_p the number of moles of electrons available per mole of product which can be calculate using this formula: $N(C_a N_b O_c H_d) = 4a - 3b - 2c + d$, and F the Faraday constant (96 485 C/mol).

$$\eta_{EF} = Q_{e-}/Q_p \quad (3)$$

The value of the coefficient is always positive. If the value is >1, the system may be close to a microbial fuel cell that a significant current density and the system is able to drive a bioH₂ electrosynthesis. If the coefficient is comprised between 0 and 1, the electron presents in the electric circuit could not contribute directly to H₂ production and the electrosynthesis may not be the main reaction in the electrochemical system (Moscoviz et al. 2016).

2.5. *Microbial community analysis*

At the beginning and the end of each experiment, manure was sampled for global microorganism community analysis. Biofilm samples, from both the felt (anode) and tubular membrane (cathode) surfaces were collected at the end of the experiment. Total DNA extraction from biofilm and manure were made in 50 mL of phosphate buffer following two steps. First of all, an ultrasound treatment was made at 45 kHz for 10 min, using an Ultrasonic Cleaner (VWR, France). Then, each electrode was scratched using a scalpel in order to remove biofilm from their surface. All biofilm and manure samples were then centrifuged at 12 G for 10 min and supernatants were collected before storing them at -80 °C.

DNA was extracted from all supernatants using DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen, Germany) for 16S rDNA V3-V4 metagenomic analysis. DNA samples were analysed by NovaSeq 6000 metagenomic using the Novogene facility (Novogene, United Kingdom).

3. Results and discussion

3.1. Reactor designs

Preliminary experiments were carried out in order to design a reactor that could be favorable to bioH₂ production by simply short-circuiting an anode to a relatively smaller cathode, in a liquid manure coming from methanizers as a biological component. In such conditions, low potentials and current flow from the larger anode to the smaller cathode were expected. In this study, the large anode was made with a piece of graphite felt whereas the smaller cathode was designed with a conductive tubular membrane that allows extraction of the produced gases, either by flowing N₂ or by applying a limited vacuum to the membrane in order to specialize electrodes.

The main criteria in this first series of experiments were the measurement of the current, the characterization of the direction of this electron flow (current must be negative at the tubular membrane side, the cathode), and the potential reached by the system with manure while the current was flowing between anode and cathode. In this configuration of the process, the potentiostat was only used to monitor the resulting potential and was never used for applying any external potential and forced current flow.

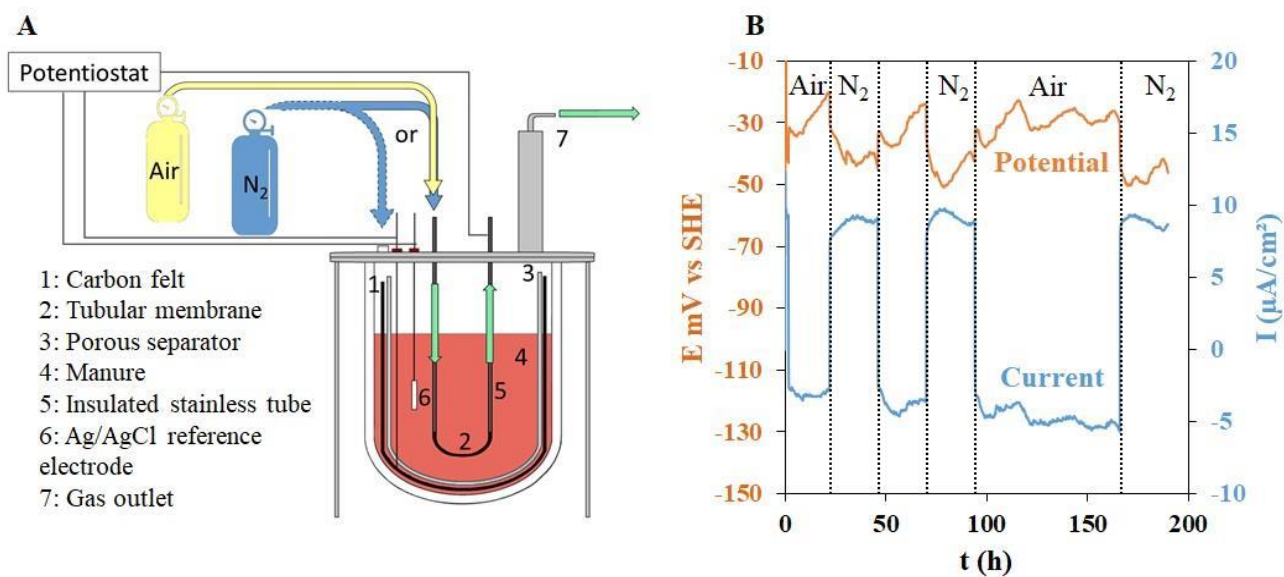


Figure 1. (A) First design of the bioreactor and (B) Electrochemical evaluation of this reactor with utilization of air or N₂ as gas carriers in the tubular membrane. N₂ was flushed into the headspace at the experiment's outset to establish anaerobic conditions. The orange curve represents the potential, and the blue curve represents the current, recorded throughout the experiment.

A first process configuration is reported in Figure 1. In this experiment, a carrier gas (N₂) was used through the internal tube of the conductive membrane located inside the manure. A graphite felt piece was introduced as represented in Figure 1A, a larger part being in the organic matter, and a smaller emerged in the headspace of the reactor where electrical connections were established. The experiment was initiated by flowing air inside the membrane, while N₂ was injected in the headspace of the bioreactor. The two electrodes, i.e. the conductive tubular membrane and the graphite felt, were short-circuited using a special measurement mode offered by the potentiostat that allowed implementing a zero-resistance between them. As a result, an electrical current between these electrodes and the potential of the whole system were measured (Figure 1B).

In these experimental conditions, the potential was close to -30 mV vs SHE and the current reached $-5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ at the tubular membrane that behaved thus as a cathode when air was flowing through it (Figure 1B). Air contains 20 % oxygen that was readily reduced at the membrane, and at this potential, it could result from either abiotic reduction, or reduction through biofilm catalysis. Flowing N_2 inside of the tubular membrane drastically changed the experiment and the current became positive, reaching $8-9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Then, the membrane switched from a cathode to an anode and the origin of this positive current could result from the oxidation of organic matter at the membrane surface, due to microorganism activities. Microbial electrodes that can rapidly switch from bioanodic to biocathodic behavior have been already reported in the literature (Rozendal et al. 2008; Jeremiasse, Hamelers, et Buisman 2010). However, the potential of the system did not change dramatically during the experiment and only oscillated between -20 to -50 mV in the presence of air to -30 and -50 mV in the presence of N_2 . In this experiment, the lowest potential was observed when the membrane was behaving as an anode, when purged with N_2 , but potential measurements were very far from what was expected, i.e. a low equilibrium potential close to -300 mV vs SHE. Higher potentials were obtained if one of the electrode is contaminated by oxygen, as already reported (Reeve et al. 2017). In this study, the hypothesis that the headspace of the reactor was not completely free of oxygen was privileged. Therefore, the first design of the reactor that involved a wetted graphite felt, largely exposed to the headspace, probably switched from an anodic to a cathodic behavior since this structure can canalize organic matter components by capillarity, that can consequently be in contact and react with oxygen traces and thus limiting the bioH_2 production (Hoareau et al. 2023).

To prevent such exposure to oxygen traces, the graphite felt electrode was more deeply immersed at the bottom of the reactor (see Figure 2A), and covered with an insulating porous separator to prevent any uncontrolled short-circuit with the tubular membrane. In addition, N_2 was flowed in the tubular membrane in order to extract gases produced at the vicinity of the surface membrane where dark fermentation occurred.

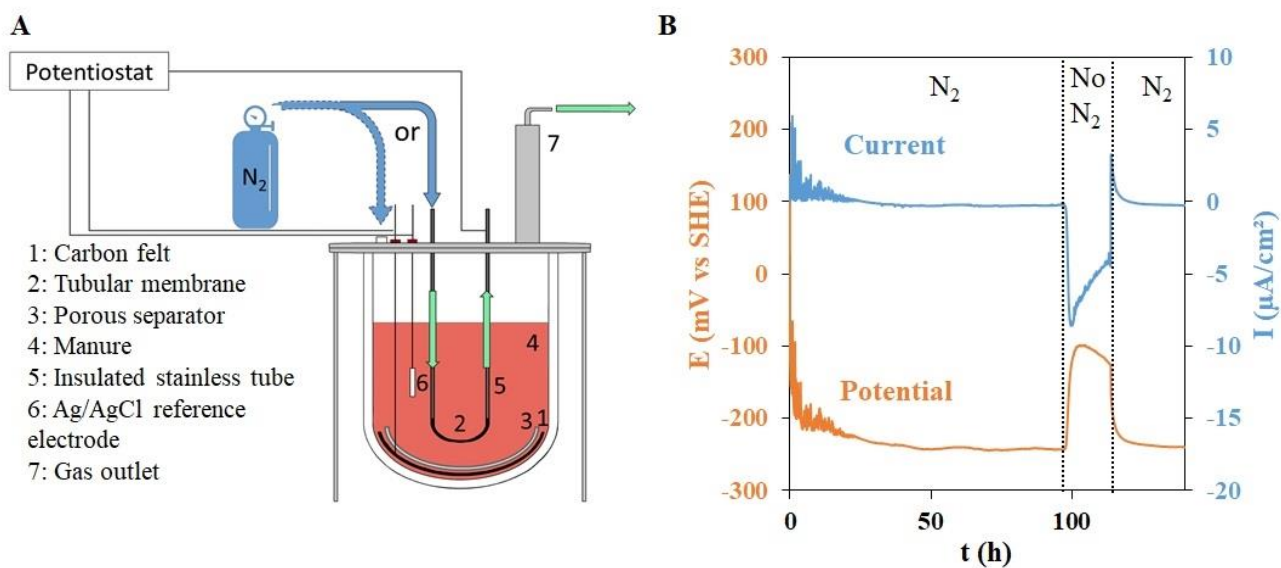


Figure 2. (A) Second design of the bioreactor and (B) Electrochemical evaluation of this reactor with and without the utilization of N₂ as the tubular membrane's gas carrier. N₂ is introduced into the headspace at the experiment's outset to establish anaerobic conditions in the headspace. The orange curve represents the potential, and the blue curve represents the current recorded throughout the experiment.

Figure 2B reports the behavior of the new configuration of the system as described above, when the two electrodes were short-circuited. The initial potential was relatively high, around -50 mV vs SHE before to gradually decrease to -250 mV within 25 hours, which was close to the maximum potential that bacteria can reach in anaerobic conditions, -300 mV (Cheng et Logan 2007). In the same time, an unstable positive current, starting from 5 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, decreased to a negative and stable value of $-0.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. The large current observed during the first hours was probably due to the presence of oxygen traces in the manure due to the inoculation from methanizer into the bioreactor, that were gradually consumed until exhaustion. Whereas the final measured current was relatively low but stable, the electron flow was consistent with the membrane behaving as a cathode. After 100h, when the N₂ flow was stopped, some oxygen traces probably entered again into the tubular membrane. The current remained negative but a rapid switch in current was observed, from $-0.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ to $-9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, associated to a rapid switch of the potential from -250 mV to -100 mV. In such experimental system equipped with short-circuited electrodes, a higher current is usually associated with a higher potential of

equilibrium (Rogińska et al. 2021). Moreover, it was assumed that the presence of oxygen necessarily pushed the redox potential of the whole system to higher values. Flowing N_2 again through the membrane allowed a rapid recovery of the low potential and the current diminished back to about $-3\mu A$, and the tubular membrane behaved continuously as a cathode.

In this second design of the bioreactor, the conductive tubular membrane could behave as a robust cathode when short-circuited with a larger piece of graphite felt that behaved as a stable anode. However, the potential that was reached could be not low enough to promote $bioH_2$ production at the cathode tubular membrane. In order to reach lower potentials, N_2 flow was replaced by a small vacuum through the membrane, of about 80 kPa (Figure 3A). Figure 3B reports the kinetic of the potential and current measured between the two electrodes when the vacuum was applied and stopped. Results indicated that a potential as low as -323 mV was reached and a negative current was continuously measured, varying from $-0.53 \mu A/cm^2$ (at the beginning of the experiment) to $-1.1 \mu A/cm^2$ (at the end of the experiment). In these conditions, a functional cathode was thus established, offering, among the series of experiments, the most compatible redox environment for hydrogen producers. When the vacuum was stopped, some oxygen probably entered into the membrane, resulting in a current that gradually increased (from 3h to 18h of the kinetic). The potential of the system was then gradually increasing up to -300 mV, which still remains more negative than during the previous experiment when N_2 was stopped (-100 mV) in the second design of the bioreactor design. One can assume that the risk of oxygen contamination is lower with the use of vacuum than with N_2 as the carrier gas. At the final stage of the experiment, the lowest potential was finally recovered when the vacuum was applied again (Figure 3B).

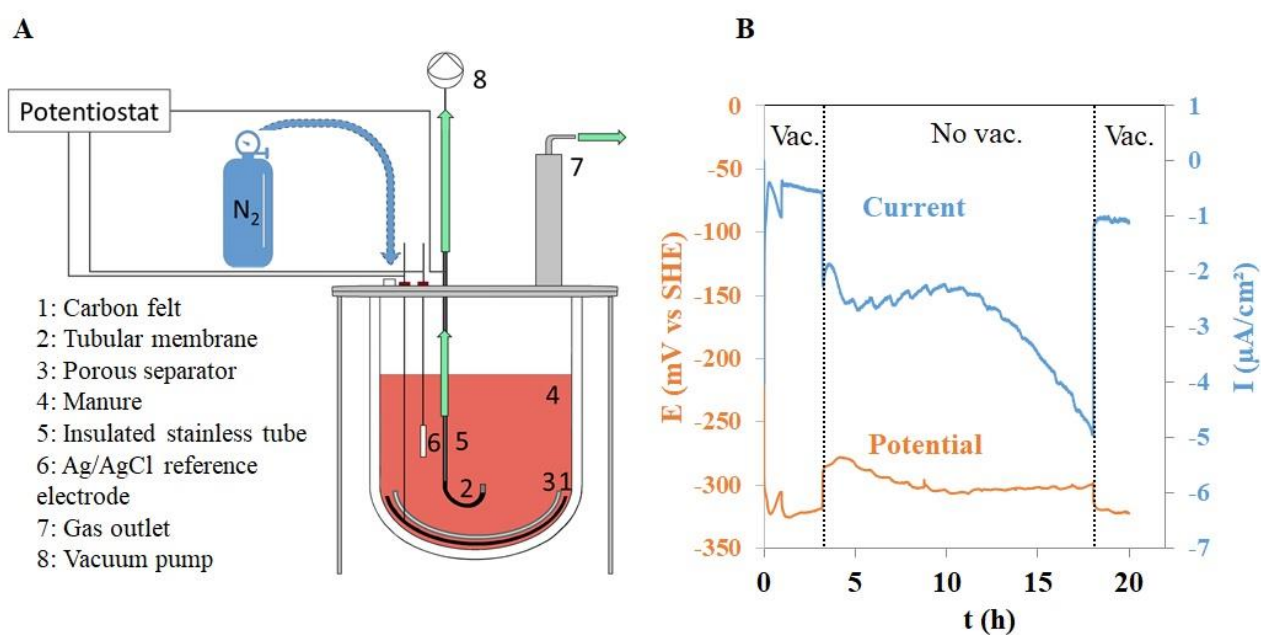


Figure 3. (A) Third design of the bioreactor and (B) Electrochemical evaluation of this reactor under vacuum and without vacuum conditions. N₂ was introduced into the headspace at the experiment's outset to establish anaerobic conditions in the headspace. The orange curve represents the potential, and the blue curve represents the current recorded throughout the experiment.

In conclusion, applying a vacuum in the conductive tubular membrane allowed reaching the lowest possible equilibrium potential of -323 mV vs SHE in the manure when this electrode was connected to a larger graphite felt while the two first designs did not show a low potential that can be maintained. Different cyclic voltammetry measurements were performed on the tubular membrane, allowing to observe oxygen contamination when vacuum, air or N₂ were used, when vacuum was stopped or when no gas flow was used in the membrane (figure 4B). Results indicated that the reduction curve tended to higher potentials in presence of air or in absence of any gas flow in the tubular membrane that did not passed below -200 mV vs SHE. However, lowest reduction curve potentials were observed with a N₂ flow, in the presence of a vacuum and even when the vacuum was stopped. In fact, the presence of oxygen might inhibit H₂ production and increase the whole potential of the system. However, when present in small quantity, oxygen traces were removed by aero-anaerobic microorganism consumption and/or

through oxydo-reduction reactions, resulting in anaerobic conditions, favorable for bioH₂ production.

In the third design of the bioreactor, the tubular membrane became systematically the cathode, and the graphite felt the anode, which should correspond to different electrochemical reactions on these electrodes. To verify this electrode differentiation, cyclic voltammetry measurements were done with the graphite felt and the tubular membrane working as electrodes. Results indicated dramatic differences between these electrodes. With the graphite felt, an anodic wave was observed (Figure 4A, curve a), starting from a potential slightly more negative than -300 mV while such anodic wave was not observed at the tubular membrane (Figure 4A, curve b). The current at the tubular membrane was negative with a potential below -300 mV, which is consistent with the low cathodic current measured in short-circuit (Figure 3B). Such low current flow should not affect dramatically the bioH₂ production by direct reduction of proton with this electron flow, in particular an appropriate electrofermentation, in order to produce bioH₂. This hypothesis was evaluated by combining electrochemical measurements and gas analyses (see next section).

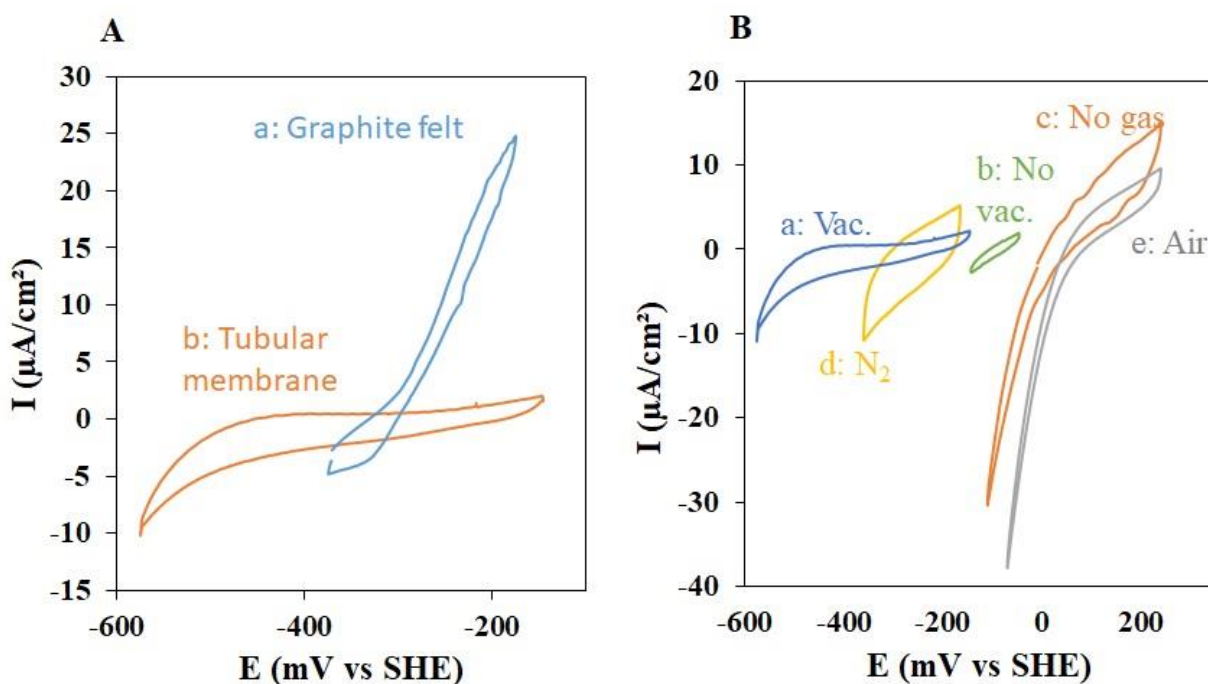


Figure 4. Cyclic voltammetric measurements (A) on (a) the graphite felt and (b) the tubular membrane at the end of the experiment presented in Figure 3, with the third design of the bioreactor; and (B) carried out on the membrane in the first and third designs of the bioreactor (a) with vacuum, (b) after the vacuum was stopped, (c) without any gas carrier, (d) with N_2 as a gas carrier and (e) in presence of air as a gas carrier. All cyclic voltammetric measurements were done with a scan rate set at $1\text{mV}/\text{s}$.

3.2. Online monitoring of gas production during the DF-SCE experiment

In order to evaluate the environment generated in the third design of the bioreactor, i.e. with the optimal setup and electrode implementation, and to verify its capability to promote bioH_2 production, the bioreactor was connected to an inline Micro Gas chromatography analyzer, both at the headspace and at the tubular cathode. The bioreactor was also connected to a potentiostat in order to evaluate the potential and current state that the system could naturally reach for bioH_2 production. Since the reactor was inoculated with manure coming from a methanizer, it was assumed that the whole system was able to naturally produced CH_4 , whereas bioH_2 is usually not detected in the atmosphere of such environment (Lebranchu et al. 2019). However, effective methods to promote bioH_2 (from dark fermentation) to the detriment of

CH₄ (anaerobic digestion) exist and one of the most efficient consists in applying heat treatment to the bioreactor (Castelló et al. 2020).

Figure 5 shows electrochemical analyses at the beginning of the process with the whole medium, i.e. manure collected from the methanizer (Figure 5A) and with the same medium heat treated twice at 121 °C for 20 min (Figure 5B). When the medium was not heat treated, the potential of the whole system was stable and reached -277 mV with a stable current density established at -0.086 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Figure 5A). Such low potential was not observed when the inoculation of the bioreactor occurred medium after a heat treatment of the manure. In these experimental conditions the potential of the system reached -42 mV with a stable current at -0.098 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Figure 5B). Results indicated that the heat treatment was not favorable to establish the bioelectrochemical system and did not allow to reach the low potential that was targeted (-300 mV). Moreover, gas analyses indicated that no bioH₂ was produced in the reactor with heattreated manure (A). In addition, current measurements indicated that the electrochemical system was slightly disturbed once gas analyses are performed, resulting in cathodic current value increasing briefly (this is observed for both reactors).

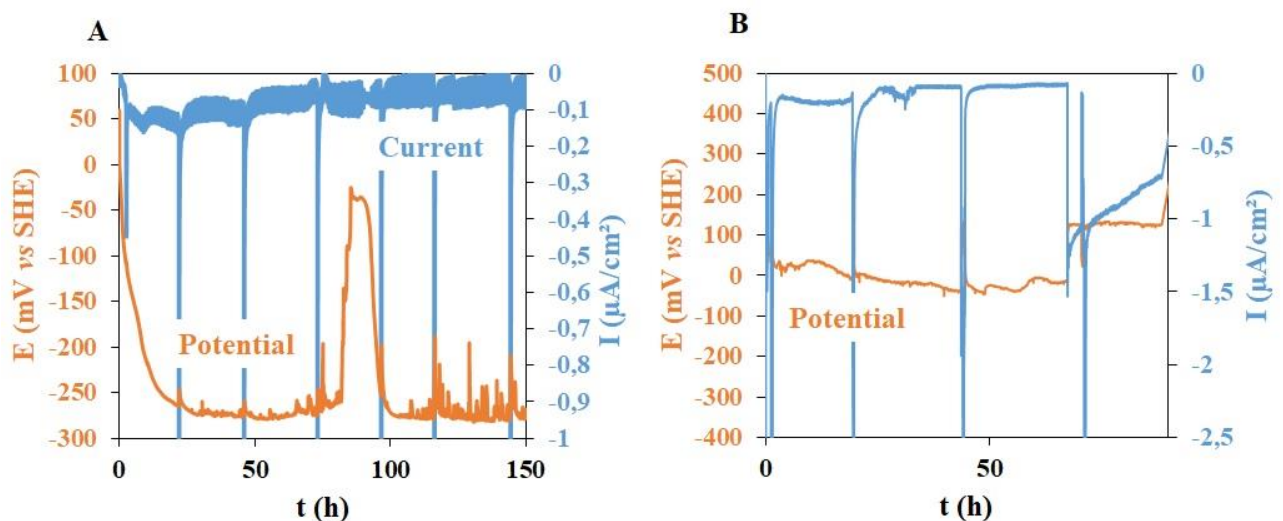


Figure 5. Potential (in orange curves) and current (in blue curves) measurements obtained from the setup comprising a tubular membrane short-circuited with a piece of graphite felt within the reactor. This was inoculated with (A) manure and (B) with manure after double heat treatment of 121 °C for 20 minutes.

Electrochemical data measurements and the gas analyses, either in the tubular membrane and in the headspace of the reactor were carried out using this configuration of the process (Figure 6). During this experiment, 4 different stages were investigated in order to investigate the resilience and the stability of the bioreactor. In particular, the two first stages described the beginning of the experiment and its stabilization before and after heat treatment respectively. The two last stages were carried out to illustrate the stability and resilience of the microbial based electrochemistry phenomenon after disconnection and connection of electrodes respectively, as shown by gas analyses and electrochemical measurements. In addition, to avoid the negative influence of gas analysis on electrochemical data, current and potential values were always collected just before gas samplings and analyses.

At the beginning of the experiment, CH₄ was detected in the tubular membrane in low amount, around 0.028%mol, then in higher quantity after 110 hours of culture with a maximum at 0.20 %mol (Figure 6B). BioH₂ was also detected through the membrane, and started to increase after 110 hours of culture and remained stable at 0.20%mol during this experiment. In the headspace of the bioreactor (Figure 6C), CH₄ production was also measured, from 0.15%mol at the beginning of the experiment, up to 0.22%mol after 100 hours of culture, while bioH₂ production reached a maximum value of 0.22%mol after 44 hours of culture before to remain stable at 0.18%mol. Before heat treatment, CH₄ production in the headspace of the bioreactor was always higher than bioH₂ production compared to the tubular membrane, showing that biomethanation was very active in these conditions.

After heat treatment, CH₄ decreased in the headspace of reactor, starting from 0.39 % mol to 0.07 %mol after 230 hours of the culture (Figure 6C). Production of this gas also decreased in the tubular membrane, going from 0.14 %mol, down to 0.05 %mol (Figure 6B). For both the headspace and the membrane, CH₄ was completely abolished after 338 hours of culture for the membrane and 374 hours in the headspace of reactor. Conversely, bioH₂ production increased in both compartments, with a higher amount detected through the membrane than in the headspace. In fact, the maximum amount of H₂ detected in the membrane was 0.37 %mol after 284 h instead of 0.26 %mol at the same time in the headspace of the reactor. Then, the gas

production decreased and stabilized at 0.34 %mol through the tubular membrane and at 0.24 %mol in the headspace of the bioreactor respectively. In parallel, electrochemical measurements showed a stable potential of the system that reached -429 mV, at the lowest and a maximum of current density at $-0.81 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, which was highly unexpected, but suggesting that the medium evolved to a very reductive environment, probably due to the excess of hydrogen produced in the media. The electrode potential stabilized at -370 mV with a current density at $-0.11 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ until 344 h. An increase in current density to $-0.66 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, was then observed at 360 hours at the same potential. In fact, due to the vacuum created in the membrane, bioH₂ was directly collected when produced. The P_{H₂} is one of the critical parameters in DF for bioH₂ production and high values of H₂ pressure could inhibit its own production during DF (Chung 1976; D. Kim et al. 2006; K.-W. Jung et al. 2011; Zhou et al. 2017).

On the basis of these results, the hypothesis that the current generated by the bioreactor could be responsible for the direct bioH₂ production or was the consequence of the implementation of a favorable environment at the vicinity of the membrane that promoted DF microorganism species, has to be investigated. Moscoviz and al., proposed a coefficient based on Faradic yield, called electro-fermentation efficiency η_{EF} (Moscoviz et al. 2016). In this study, the index value of our system was 0.0018 at the tubular membrane, indicating that electron flow measured in the electrochemical system could not be directly linked to the H₂ production. Therefore, the hypothesis that the microenvironment created next to the electrodes could promote bioH₂ production by microorganisms was privileged. In fact, bioH₂ can be naturally produced by electro-active microorganisms that are able to give or receive electrons to or from the environment, and particularly these capabilities can help fermentative microorganisms by oxidizing products from fermentation into CO₂ and protons (Bhagchandani et al. 2020; Schievano et al. 2016). Thus, specific environmental conditions created by anode and cathode may impact the Oxidation-Reduction Potential (ORP), near to both electrodes, that could promote bioH₂ production by microorganisms (Moscoviz et al. 2016).

In order to observe if the SCE implementation on the bioreactor could have a direct influence on gas production, electrodes were disconnected from 366 h to 471h. CH₄ was not detected and H₂ slightly decrease from 0.33 and 0.23 %mol to 0.29 and 0.19 %mol through the membrane and in the headspace, respectively. After electrodes reconnection at 471h, the electrochemical properties were restored, gas analyses indicated that bioH₂ production did not increase through the membrane and stays around 0.31 %mol whereas CH₄ remained undetectable. In the headspace of the bioreactor, the H₂ production increased slightly, reaching 0.21 %mol, suggesting a minor contribution of SCE on bioH₂ production. Concerning electrochemical measurements, the potential stabilized at -264 mV with a current density of -0.78 A/m². These values were consistent with the data measured at the beginning of the experiment. A direct link between electron flow and hydrogen production was not observed, supporting the idea that the bioH₂ production was mainly due to DF microorganisms, and electro fermentation in a lesser extent.

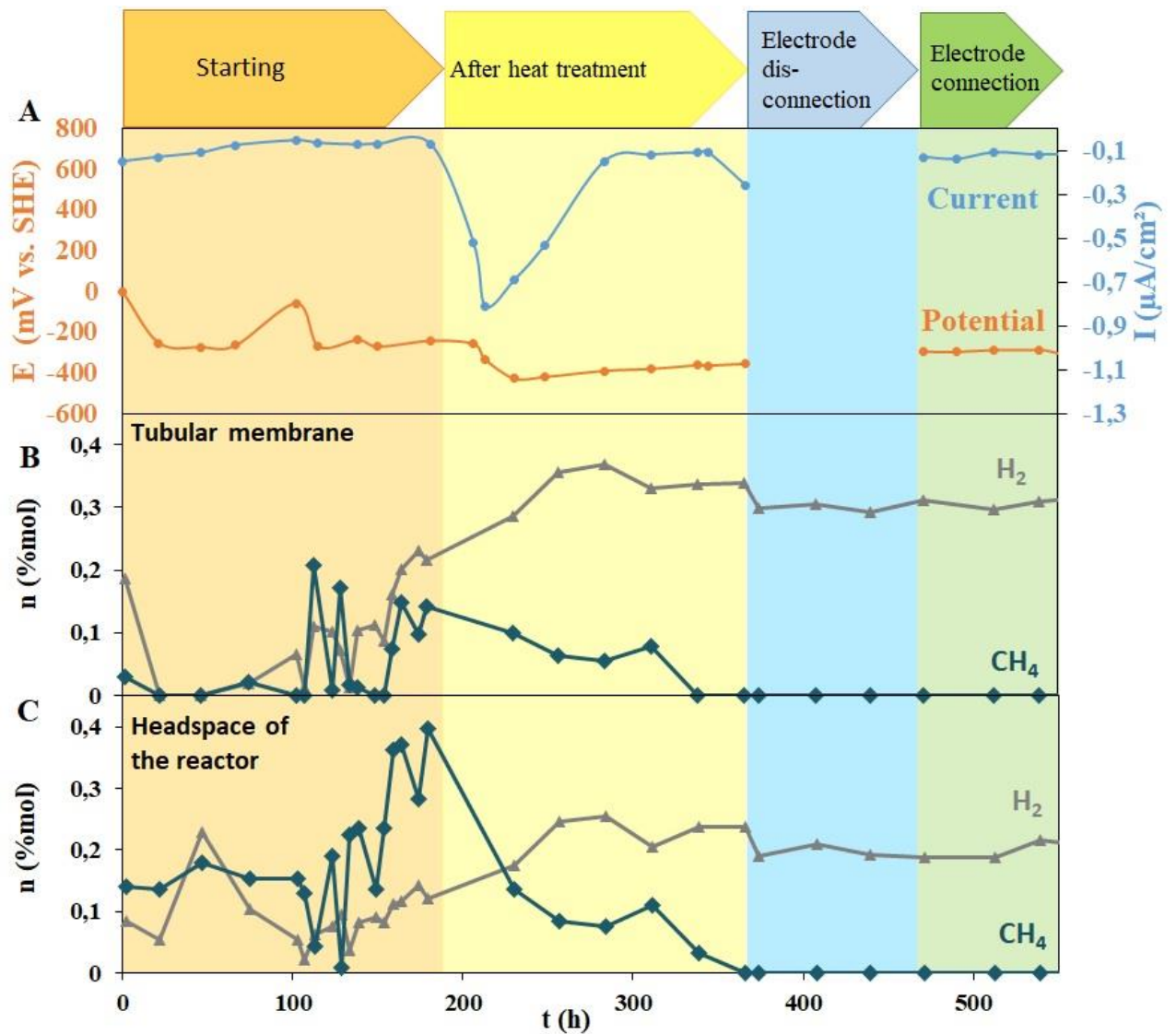


Figure 6. Kinetic of electrochemical responses and gas analyses in the third design of the experiment. The experiment consisted in four consecutive phases: the "Starting" phase with untreated manure, the "After Heat Treatment" in which the bioreactor was heat treated twice at 121 °C for 20 min in order to inactivate methanogen species, the "Electrode disconnection" and "Electrode connection" in order to evaluate short-circuited electrodes on gas production. (A) electrochemical equilibrium potential and current analysis between the short-circuited tubular membrane and graphite felt throughout the entire experiment, (B) analysis of CH_4 and H_2 gas from the tubular membrane, (C) analysis of CH_4 and H_2 gas from the head of the reactor.

3.3. Microbial analysis

To verify that hydrogen production was the result of a microbial activity and especially a microbial specialization in the bioreactor during the process kinetic, either in the whole medium or in the vicinity of electrodes, analysis of the microbial ecology was carried out (Figure 7). In details, microbial analyses were performed on the media; i.e. manure, at the beginning of the experiment (t_0), before heat treatment (M -181h) and at the end of the process, after heat treatment (MT, at the end of the experiment). Biofilm presents on the surface of tubular membrane and graphite felt before heat treatment (Mb – 181h, GF – 181h respectively) and at the end of the culture, after heat-treatment (MbT and GFT respectively, at the end of the experiment) were also analyzed in order to see the impact of the bioreactor configuration on the implementation of microbial population before and after heat treatment.

Before heat treatment, no significant microbial community abundance variation between the membrane (Mb), graphite felt (GF) and media before heat treatment (M) was observed, and mostly hydrogen producers were observed as the main microorganism phylum: *Firmicutes*, *Cloacimonadota*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Halobacterota*, *Spirochaetota*, *Caldatibacteriota* and *Synergistota*. Only two phyla belonged to methanogens: *Synergistota* (Jumas-Bilak et Marchandin 2014) and *Halobacterota* (L. Bräuer et al. 2020). Those microbes were present in low abundance but were observed on the membrane and the graphite felt but not in the medium before the heat treatment. *Halobacterota* are electroactives and, so, could perturbate the electron transfer with electroactives bioH₂ producing bacteria by using those electrons to produce other product instead of bioH₂ (Logan et al. 2019). Because of the presence of these methanogen microorganisms, the growth of bioH₂ producers in symbiosis with them may be favored to limit the bioH₂ accumulation.

After heat treatment, *Firmicutes* relative abundance on carbon felt was 0.62 and around 0.25 for the membrane and the media. *Proteobacteria* relative abundance were at 0.25, 0.12 and 0.25 for the membrane, carbon felt and media respectively. *Bacteroidota* was found on the membrane at 0.3, 0.25 on the carbon felt and 0.3 in the media. No *Synergistota* and

Halobacterota were found for each sample after heat treatment, suggesting that they were inactivated, explaining the decrease in CH₄ production as shown in Figure 6B and C. When the manure was heat treated after 181h, differences in microbial population on each electrode were observed and compared to the same experiment carried out but without heat treatment, as shown in figure 7. Microbial analyses revealed that the microbial phyla on the tubular membrane surface were close to that of the whole manure at the end of the experiment, but a higher abundance of *Proteobacteria* and *Bacteroidota* were found on the tubular membrane. These higher abundances may explain the H₂ production observed both in the bioreactor headspace and in the tubular membrane after heat treatment. *Bacteroidota* are known to be cellulosic fermentative bacteria, producing acids such as acetate in association with bioH₂ and CO₂, and also are described as electroactive microorganisms, (Q. Fan et al. 2022; Logan et al. 2019). *Proteobacteria* species are also reported to be bioH₂ producers, capable of sporulation and electroactivity by oxidizing acids such as propionate as energy and electron sources (kumar, Sarathi, et Nahm 2013; Logan et al. 2019). Their higher abundance on the surface of the membrane may result in a favorable environment established near to the tubular membrane, especially when vacuum is applied, resulting in a better growth and a better bioH₂ removal. Moreover, because of their electroactive capabilities, species from those two phyla may be electrotrophic, resulting in additional bioH₂ production. Those microorganisms were less present on the graphite felt that was composed in majority with *Firmicutes*, and in particular sporulating species involved in the degradation of lignocellulosic materials, and in the production of acetate and bioH₂. The relative high abundance of *Firmicutes* on the graphite felt may suggest that those species, mainly exoelectrogenic, and could be involved in the electrons transfer from the anode to the cathode (Ottoni et al. 2021; Wirth et al. 2012; Logan et al. 2019). Moreover, it was supposed that combining activities of specialized microorganisms on both electrodes in such SCE-DF bioprocess may favor substrate oxidation, enhancing bioH₂ production. Some other electroactive microorganisms belonging to *Geobacter*, or *Clostridium* species, that are part of the *Proteobacteria* or *Firmicutes* phyla respectively, are usually found in those systems using agricultural wastes, have the capacity to oxidize acids such as VFAs or more complex substrate such as cellulose (Ndayisenga et al. 2021; Logan et al. 2019). It has to be noticed that some species from those phyla may not be electroactives too. Besides, it was expected that electroactives and non-electroactives microbes are present in the biofilms, interacting together in symbiosis, as revealed by metagenomic analyses. However, the role of

the latter remained unknown or at least could not be revealed in this study, and further experimentations are needed to characterize them and to confirm the importance of electroactive bacteria in this dual SCE-DF bioprocess for bioH₂ production.

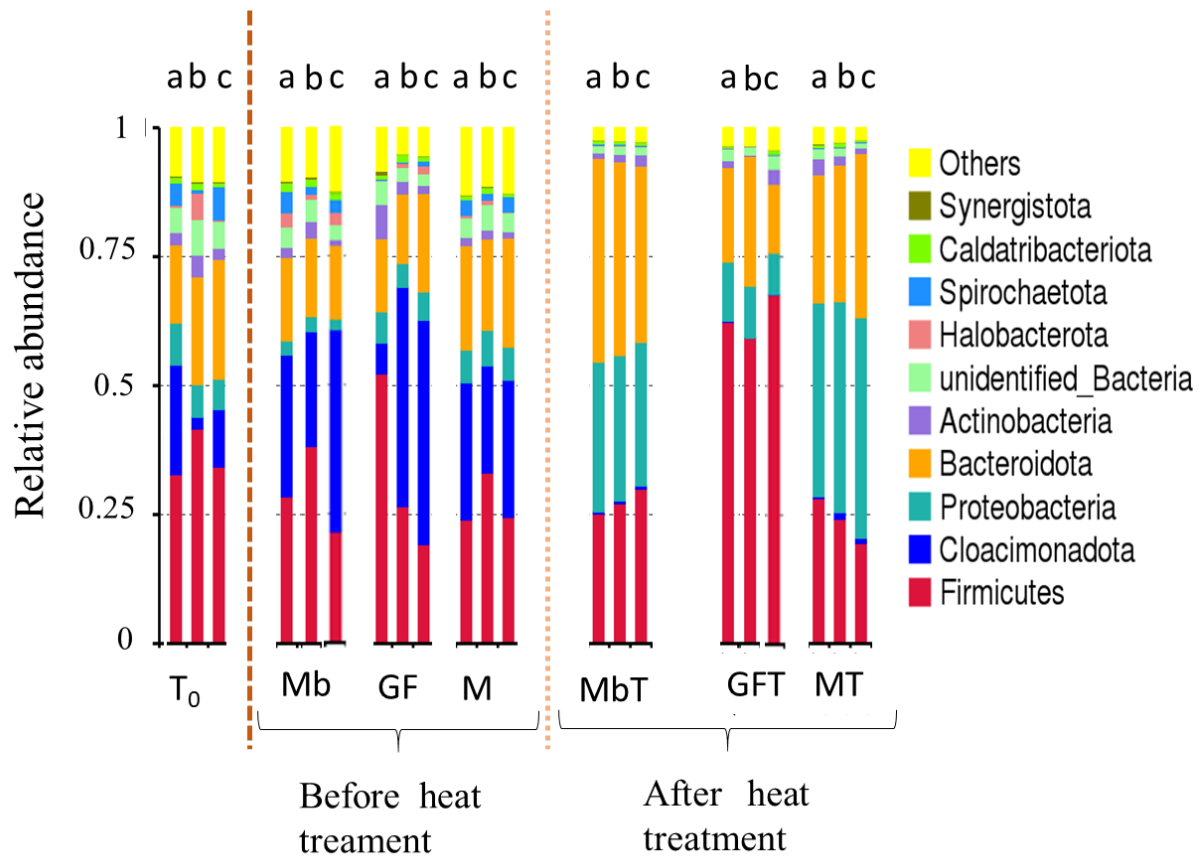


Figure 7. Major microbial composition characterized at different stages of the process (see figure 6): Initial media composition (T₀), composition of membrane (Mb), graphite felt (GF), and media (M) before heat treatment, and composition after heat treatment (MbT, GFT, MT). DNA from triplicate samples (a, b, and c) were extracted and analyzed. T₀ was sampled before starting the experiment, Mb, GF and M were sampled at 181h, before heat treatment and MbT, GFT and MT were sampled at the end of the experiment.

4. Conclusion

In this study, a bioH₂ production process combining short-circuited electrodes with dark fermentation was evaluated. Results indicated that potential as low as -320 mV vs SHE could be reached with manure when electrodes made with a graphite felt and a tubular membrane were short-circuited resulting in a specialization in a functional anode and cathode respectively. In these experimental conditions and after heat treatment, a negative current was observed at the tubular membrane surface, resulting in bioH₂ production higher in the membrane than in the headspace of the bioreactor. Such electrode specialization was confirmed by microbial ecology analyses and cyclic voltammetry measurements. Based on this work, additional studies are needed for further characterization of the process in order to improve bioH₂ production.

Aknowledgements

The research was supported by the LUE program UHLYS of the university of Lorraine. The authors wish to thank Benjamin Rivard and Adrienne Mangin of the experimental farm “La Bouzule” of University of Lorraine, Nancy, France, and Vincent Bourot of “Methanason, Einville-au-Jard, France.

References

- Barca, Cristian, David Ranava, Marielle Bauzan, Jean-Henry Ferrasse, Marie-Thérèse Giudici-Ortoni, et Audrey Soric. 2016. « Fermentative Hydrogen Production in an Up-Flow Anaerobic Biofilm Reactor Inoculated with a Co-Culture of *Clostridium Acetobutylicum* and *Desulfovibrio Vulgaris* ». *Bioresource Technology* 221: 526- 33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.072>.
- Bhagchandani, Drishti Dinesh, Rishi Pramod Babu, Jayesh M. Sonawane, Namita Khanna, Soumya Pandit, Dipak A. Jadhav, Santimoy Khilari, et Ram Prasad. 2020. « A

- Comprehensive Understanding of Electro ». *Fermentation* 6 (3): 92.
<https://doi.org/10.3390/fermentation6030092>.
- Castelló, Elena, Antonio Djalma Nunes Ferraz-Junior, Cristiane Andreani, Melida Del Pilar Anzola-Rojas, Liliana Borzacconi, Germán Buitrón, Julián Carrillo-Reyes, et al. 2020. « Stability Problems in the Hydrogen Production by Dark Fermentation: Possible Causes and Solutions ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 119: 109602.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- Cheng, S., et B. E. Logan. 2007. « Sustainable and Efficient Biohydrogen Production via Electrohydrogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (47): 18871-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>.
- Chung, K T. 1976. « Inhibitory Effects of H₂ on Growth of *Clostridium Cellobioparum*. » *Applied and Environmental Microbiology* 31 (3): 342- 48. <https://doi.org/10.1128/AEM.31.3.342-348.1976>.
- Fan, Qingwen, Xiaojing Fan, Peng Fu, Yongmei Sun, Yan Li, Siling Long, Tianyang Guo, Liang Zheng, Kai Yang, et Dongliang Hua. 2022. « Microbial Community Evolution, Interaction, and Functional Genes Prediction during Anaerobic Digestion in the Presence of Refractory Organics ». *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10 (3): 107789.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107789>.
- Ghimire, Anish, Luigi Frunzo, Francesco Pirozzi, Eric Trably, Renaud Escudie, Piet N.L. Lens, et Giovanni Esposito. 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>.
- Guo, Kun, Antonin PrévotEAU, et Korneel Rabaey. 2017. « A Novel Tubular Microbial Electrolysis Cell for High Rate Hydrogen Production ». *Journal of Power Sources* 356: 484- 90.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.029>.
- Guo, Xin Mei, Eric Trably, Eric Latrille, Hélène Carrère, et Jean-Philippe Steyer. 2010. « Hydrogen Production from Agricultural Waste by Dark Fermentation: A Review ». *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (19): 10660- 73.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>.

- Hoareau, Morgane, Luc Etcheverry, Olivier Chapleur, Chrystelle Bureau, Cédric Midoux, Benjamin Erable, et Alain Bergel. 2023. « The Electrochemical Microbial Tree: A New Concept for Wastewater Treatment ». *Chemical Engineering Journal* 454: 140295. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140295>.
- Jeremiasse, Adriaan W., Hubertus V.M. Hamelers, Michel Saakes, et Cees J.N. Buisman. 2010. « Ni Foam Cathode Enables High Volumetric H₂ Production in a Microbial Electrolysis Cell ». *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (23): 12716- 23. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.131>.
- Jumas-Bilak, Estelle, et Hélène Marchandin. 2014. « The Phylum *Synergistetes* ». In *The Prokaryotes*, edited by Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, and Fabiano Thompson, 931- 54. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_384.
- Jung, Kyung-Won, Dong-Hoon Kim, Sang-Hyoun Kim, et Hang-Sik Shin. 2011. « Bioreactor Design for Continuous Dark Fermentative Hydrogen Production ». *Bioresource Technology* 102 (18): 8612- 20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.056>.
- Katuri, Krishna P., Craig M. Werner, Rodrigo J. Jimenez-Sandoval, Wei Chen, Sungil Jeon, Bruce E. Logan, Zhiping Lai, Gary L. Amy, et Pascal E. Saikaly. 2014. « A Novel Anaerobic Electrochemical Membrane Bioreactor (AnEMBR) with Conductive Hollow-Fiber Membrane for Treatment of Low-Organic Strength Solutions ». *Environmental Science & Technology* 48 (21): 12833- 41. <https://doi.org/10.1021/es504392n>.
- Kim, D, S Han, S Kim, et H Shin. 2006. « Effect of Gas Sparging on Continuous Fermentative Hydrogen Production ». *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (15): 2158- 69. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.012>.
- Kumar, G. Gnana, V.G. Sathiya Sarathi, et Kee Suk Nahm. 2013. « Recent Advances and Challenges in the Anode Architecture and Their Modifications for the Applications of Microbial Fuel Cells ». *Biosensors and Bioelectronics* 43: 461- 75. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>.
- Lalaurette, Elodie, Shivegowda Thammannagowda, Ali Mohagheghi, Pin-Ching Maness, et Bruce E. Logan. 2009. « Hydrogen Production from Cellulose in a Two-Stage Process

- Combining Fermentation and Electrohydrogenesis ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (15): 6201- 10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.112>.
- L. Bräuer, Suzanna, Nathan Basiliko, Henri M. P. Siljanen, et Stephen H. Zinder. 2020. « Methanogenic Archaea in Peatlands ». *FEMS Microbiology Letters* 367 (20): fnaa172. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa172>.
- Lebranchu, Aline, Fabrice Blanchard, Michel Fick, Stéphane Pacaud, Eric Olmos, et Stéphane Delaunay. 2019. « Pilot-Scale Biomethanation of Cattle Manure Using Dense Membranes ». *Bioresource Technology* 284: 430- 36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.140>.
- Lee, Kuo-Shing, Tzu-Shan Tseng, Yen-Wen Liu, et Yi-Dai Hsiao. 2012. « Enhancing the Performance of Dark Fermentative Hydrogen Production Using a Reduced Pressure Fermentation Strategy ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (20): 15556- 62. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.039>.
- Liu, Wenzong, Shihching Huang, Aijuan Zhou, Guangyu Zhou, Nanqi Ren, Aijie Wang, et Guoqiang Zhuang. 2012. « Hydrogen Generation in Microbial Electrolysis Cell Feeding with Fermentation Liquid of Waste Activated Sludge ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (18): 13859- 64. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.090>.
- Logan, Bruce E., Ruggero Rossi, Ala'a Ragab, et Pascal E. Saikaly. 2019. « Electroactive Microorganisms in Bioelectrochemical Systems ». *Nature Reviews Microbiology* 17 (5): 307- 19. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>.
- Mitov, Mario, Ivo Bardarov, Elitsa Chorbadzhiyska, Krassimir L. Kostov, et Yolina Hubenova. 2021. « First evidence for applicability of the microbial electrochemical snorkel for metal recovery ». *Electrochemistry Communications* 122: 106889. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106889>.
- Mizuno, Osamu, Richard Dinsdale, Freda R Hawkes, Dennis L Hawkes, et Tatsuya Noike. 2000. « Enhancement of Hydrogen Production from Glucose by Nitrogen Gas Sparging». *Bioresource Technology*, 7.
- Moreno, R., A. Escapa, J. Cara, B. Carracedo, et X. Gómez. 2015. « A Two-Stage Process for Hydrogen Production from Cheese Whey: Integration of Dark Fermentation and

- Biocatalyzed Electrolysis ». *International Journal of Hydrogen Energy* 40 (1): 168- 75. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.120>.
- Morsy, Fatty Mohamed. 2017. « Synergistic Dark and Photo-Fermentation Continuous System for Hydrogen Production from Molasses by *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824 and *Rhodobacter Capsulatus* DSM 1710 ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 169: 1- 6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.02.011>.
- Mosca, Lorena, Jose Antonio Medrano Jimenez, Solomon Assefa Wassie, Fausto Gallucci, Emma Palo, Michele Colozzi, Stefania Taraschi, et Giulio Galdieri. 2020. « Process Design for Green Hydrogen Production ». *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (12): 7266- 77. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.206>.
- Moscoviz, Roman, Javiera Toledo-Alarcón, Eric Trably, et Nicolas Bernet. 2016. « Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems ». *Trends in Biotechnology* 34 (11): 856- 65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>.
- Ndayisenga, Fabrice, Zhisheng Yu, Jianzhong Zheng, Bobo Wang, Hongxia Liang, Irfan Ali Phulpoto, Telesphore Habiyakare, et Dandan Zhou. 2021. « Microbial Electrohydrogenesis Cell and Dark Fermentation Integrated System Enhances Biohydrogen Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes: Substrate Pretreatment towards Optimization ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 145: 111078. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111078>.
- Oh, Sang-Eun, Prabha Iyer, Mary Ann Bruns, et Bruce E. Logan. 2004. « Biological Hydrogen Production Using a Membrane Bioreactor ». *Biotechnology and Bioengineering* 87 (1): 119- 27. <https://doi.org/10.1002/bit.20127>.
- Otoni, Júlia Ronzella, Suzan Prado Fernandes Bernal, Tiago Joelzer Marteres, Franciele Natividade Luiz, Viviane Piccin dos Santos, Ângelo Gabriel Mari, Juliana Gaio Somer, Valéria Maia de Oliveira, et Michel Rodrigo Zambrano Passarini. 2021. « Cultured and Uncultured Microbial Community Associated With Biogas Production ». Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1107386/v1>.
- Patil, Sunil A., Falk Harnisch, Christin Koch, Thomas Hübschmann, Ingo Fetzer, Alessandro A. Carmona-Martínez, Susann Müller, et Uwe Schröder. 2011. « Electroactive Mixed Culture

- Derived Biofilms in Microbial Bioelectrochemical Systems: The Role of PH on Biofilm Formation, Performance and Composition ». *Bioresource Technology* 102 (20): 9683- 90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.087>.
- Reeve, Holly A., Philip A. Ash, HyunSeo Park, Ailun Huang, Michalis Posidias, Chloe Tomlinson, Oliver Lenz, et Kylie A. Vincent. 2017. « Enzymes as Modular Catalysts for Redox Half-Reactions in H₂-Powered Chemical Synthesis: From Biology to Technology ». *Biochemical Journal* 474 (2): 215- 30. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160513>.
- Renaudie, Marie, Christine Dumas, Stéphane Vuilleumier, et Barbara Ernst. 2021. « Biohydrogen Production in a Continuous Liquid/Gas Hollow Fiber Membrane Bioreactor: Efficient Retention of Hydrogen Producing Bacteria via Granule and Biofilm Formation ». *Bioresource Technology* 319: 124203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124203>.
- Rogińska, Joanna, Michel Perdicakis, Cédric Midoux, Théodore Bouchez, Christelle Despas, Liang Liu, Jiang-Hao Tian, et al. 2021. « Electrochemical Analysis of a Microbial Electrochemical Snorkel in Laboratory and Constructed Wetlands ». *Bioelectrochemistry* 142: 107895. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107895>.
- Rogińska, Joanna, Timothé Philippon, Morgane Hoareau, Frédéric P.A. Jorand, Frédéric Barrière, et Mathieu Etienne. 2023. « Challenges and Applications of Nitrate-Reducing Microbial Biocathodes ». *Bioelectrochemistry* 152: 108436. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108436>.
- Rozendal, René A, Adriaan W Jeremiasse, Hubertus V M Hamelers, et Cees J N Buisman. 2008. « Hydrogen Production with a Microbial Biocathode », 6.
- Saint-Amans, Sylvie, Laurence Girbal, Jose Andrade, Kerstin Ahrens, et Philippe Soucaille. 2001. « Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium Butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures ». *Journal of Bacteriology* 183 (5): 1748- 54. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1748-1754.2001>.
- Schievano, Andrea, Tommy Pepé Sciarria, Karolien Vanbroekhoven, Heleen De Wever, Sebastia Puig, Stephen J. Andersen, Korneel Rabaey, et Deepak Pant. 2016. « Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications ». *Trends in Biotechnology* 34 (11): 866- 78. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>.

- Wang, Yun-Kun, Guo-Ping Sheng, Bing-Jing Shi, Wen-Wei Li, et Han-Qing Yu. 2013. « A Novel Electrochemical Membrane Bioreactor as a Potential Net Energy Producer for Sustainable Wastewater Treatment ». *Scientific Reports* 3 (1): 1864. <https://doi.org/10.1038/srep01864>.
- Wang, Yun-Qi, Fang Zhang, Wei Zhang, Kun Dai, Hua-Jie Wang, Xue Li, et Raymond Jianxiong Zeng. 2018. « Hydrogen and Carbon Dioxide Mixed Culture Fermentation in a Hollow-Fiber Membrane Biofilm Reactor at 25 °C ». *Bioresource Technology* 249: 659- 65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.054>.
- Werner, Craig M., Krishna P. Katuri, Ananda Rao Hari, Wei Chen, Zhiping Lai, Bruce E. Logan, Gary L. Amy, et Pascal E. Saikaly. 2016. « Graphene-Coated Hollow Fiber Membrane as the Cathode in Anaerobic Electrochemical Membrane Bioreactors – Effect of Configuration and Applied Voltage on Performance and Membrane Fouling ». *Environmental Science & Technology* 50 (8): 4439- 47. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02833>.
- Wirth, Roland, Etelka Kovács, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, et Kornél L Kovács. 2012. « Characterization of a Biogas-Producing Microbial Community by Short-Read next Generation DNA Sequencing ». *Biotechnology for Biofuels* 5 (1): 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>.
- Zagrodnik, R., et M. Łaniecki. 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>.
- Zaybak, Zehra, John M. Pisciotta, Justin C. Tokash, et Bruce E. Logan. 2013. « Enhanced Startup of Anaerobic Facultatively Autotrophic Biocathodes in Bioelectrochemical Systems ». *Journal of Biotechnology* 168 (4): 478- 85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.001>.
- Zhou, Miaomiao, Jun Zhou, Ming Tan, Juan Du, Binghua Yan, Jonathan W.C. Wong, et Yang Zhang. 2017. « Enhanced Carboxylic Acids Production by Decreasing Hydrogen Partial Pressure during Acidogenic Fermentation of Glucose ». *Bioresource Technology* 245 (december): 44- 51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.152>.

1.3. Principaux résultats de l'article

Les résultats présentés dans cette étude ont permis de mettre en lumière plusieurs conclusions lors de la mise en œuvre du procédé, portant sur l'efficacité des matériaux constituant les électrodes pour la production de bioH₂, sur l'utilisation d'un gaz porteur ou du vide ainsi que sur l'impact d'un traitement thermique et ses conséquences sur la spécialisation des biofilms microbiens sur les électrodes.

Pour cela, trois designs expérimentaux du procédé combinant la DF et la SCE au sein du même bioréacteur ont été proposés puis testés afin de pouvoir créer les meilleures conditions permettant d'obtenir le potentiel le plus bas possible dans les conditions d'anaérobiose du milieu.

Le premier design expérimental a été réalisé en présence d'un flux de N₂ ou d'air dans la membrane tubulaire. Il a permis d'atteindre un potentiel à -50 mV vs SHE, en présence de N₂ conduisant à des réactions d'oxydation au niveau de la membrane et non au niveau du feutre de carbone dû à la grande surface de celui-ci, ayant un tiers de sa surface au niveau du ciel du bioréacteur pouvant contenir de l'O₂.

Le second design expérimental a été mis en place avec seulement du N₂ dans la membrane tubulaire et une taille de feutre de carbone plus faible, le feutre étant placé au fond du bioréacteur. Ce montage a permis d'obtenir un potentiel de -250 mV vs SHE et d'observer l'oxydation de la matière organique au niveau du feutre graphite. Cependant le potentiel augmente lorsque le flux de N₂ est arrêté suggérant que du O₂ entre de nouveau dans la membrane.

Le troisième design expérimental a été réalisé en présence d'un vide appliqué au niveau de la membrane à la place d'un gaz vecteur. Il a permis d'obtenir un potentiel d'équilibre assez bas -320 mV vs SHE permettant la production de bioH₂, le potentiel est maintenu bas à -300 mV vs SHE lorsque le vide est coupé, maintenant de bonnes conditions anaérobies dans la membrane.

Il a également été montré que le traitement thermique du milieu a permis d'inactiver en grande partie les consommateurs d'hydrogène, dont les méthanogènes. Toutefois lorsque le traitement thermique est réalisé avant la mise en culture, il n'a pas été possible d'obtenir les conditions électrochimiques identiques à celles obtenues au début de la mise en œuvre du procédé basé sur le troisième design expérimental avant traitement thermique. Ainsi, il s'est avéré plus intéressant de laisser le bioréacteur s'équilibrer pendant une semaine pour que la production de gaz (CO_2 , H_2 , CH_4) permette la création d'un environnement anaérobie pour les microorganismes, puis de réaliser le traitement thermique.

Après traitement thermique, la production de CH_4 a drastiquement diminué, jusqu'à devenir inexistante et la production de bioH_2 a quant à elle, augmenté jusqu'à 0,37 mol% au travers la membrane et 0,26 mol% dans le ciel du bioréacteur.

Au cours du procédé, le courant mesuré entre les électrodes n'est pas directement responsable de la production d' H_2 mais est probablement représentatif d'un microenvironnement créé au voisinage de ces électrodes. C'est cette hypothèse qui a été privilégiée, car les microorganismes électroactifs peuvent participer aux métabolismes des microorganismes fermentaires (qui sont parfois les mêmes). En particulier, cela se traduit par une production de bioH_2 mais également des différences de composition des populations microbiennes sur chaque électrode.

L'analyse de l'écologie microbienne dans le bioréacteur a montré que le traitement thermique a eu un effet très significatif. Il a été observé une spécialisation de certains phyla sur les électrodes, notamment les phyla contenant des microorganismes électroactifs et/ou cellulolytiques. Certaines espèces présentes dans les biofilms ont également la propriété d'oxyder les acides gras volatiles. Cette observation permet de montrer que les actions sur le procédé ont un effet direct ou indirect sur les espèces microbiennes présentes à la surface des électrodes, dans le lisier environnant et que les résultats observés au niveau macroscopique (production de gaz, tension et courant...) pouvaient être le reflet d'une interaction entre les espèces microbiennes.

Cette étude a permis d'avoir une première vision sur la production d' H_2 associée à un design simple du procédé. Ce montage est facile à mettre en place et les électrodes sont accessibles pour l'étude de la population microbienne. Cependant, des travaux complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'impact du courant produit sur les différentes populations microbiennes.

2. Analyse bio-électrochimique et suivi de la production des gaz dans du digestat traité thermiquement avant culture

2.1. Effet du traitement thermique sur le digestat avant mise en culture dans le bioréacteur

Les résultats précédents présentés dans l'article ont permis de montrer qu'un traitement thermique effectué après avoir laissé le système s'équilibrer une première fois, avait pour conséquence une plus grande quantité de bio H_2 produite.

Il a été également indiqué qu'un traitement thermique du digestat avant culture dans le bioréacteur ne permettait pas d'atteindre un potentiel très bas et ce, même en présence d'un vide appliqué à la membrane (cité comme en figure A dans l'article mais présenté ici en figure 5-1A). La figure 5-1A montre les mesures de potentiel et de densité de courant du digestat ayant subi plusieurs traitements thermiques avant culture. Celui-ci, en présence de vide appliqué à la membrane, a atteint un potentiel minimum de -48 mV vs SHE après les deux traitements thermiques à 80 °C pendant 45 minutes (figure 5-1A traitement a), contre -320 mV vs SHE présenté dans l'article pour le bioréacteur traité thermiquement après pré-culture (partie 1.2, section 3.1 de l'article). De T_0 jusqu'à t_{67h} , même avec plusieurs traitements thermiques, les mesures ont montré une densité de courant assez stable autour de $-1 \mu A/cm^2$ mais le potentiel varie et augmente jusqu'à 155 mV vs SHE avant le traitement b (deux fois 80 °C pendant 45 min) puis jusqu'à 255 mV vs SHE au moment où le traitement thermique c a été réalisé (un traitement à 80 °C pendant 2h30). C'est après le traitement d (deux traitements

thermiques à 121 °C pendant 20 minutes) que la densité de courant augmente un peu et atteint un maximum de $-1,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ pour un potentiel de 209 mV vs SHE. La densité de courant ne varie pas beaucoup lorsque le traitement f (trois traitements thermiques à 121 °C) a été réalisé mais le potentiel a augmenté légèrement avant de s'équilibrer de nouveau à 209 mV vs SHE. Cette différence dans les mesures électrochimiques entre un milieu qui a été traité avant la mise en culture et un milieu qui a été traité après avoir laissé le système se stabiliser (article) peut être due à la différence d'abondance microbienne viable. En effet, lors du prélèvement du digestat, celui-ci a déjà subi un brassage introduisant de l' O_2 dans le milieu et inhibant ainsi une partie de la population microbienne qui est composée principalement de microorganismes anaérobies. La réalisation d'un traitement thermique directement sur le milieu après le prélèvement diminuerait encore plus la population de microorganismes viables. Cependant il a été vu précédemment que lorsque le digestat est introduit immédiatement dans le bioréacteur, et qu'un vide dans le ciel du bioréacteur est effectué afin d'en retirer le maximum d' O_2 , de meilleures performances électrochimiques ont été observées. En effet, le procédé sans traitement thermique avant culture, a pu atteindre un potentiel aussi bas que -270 mV vs SHE après 27 heures de culture, ce qui n'a pas été le cas avec l'expérience pour laquelle plusieurs traitements thermiques ont été réalisés (figure 5-1A). L'absence de traitement thermique initial associé à un vide poussé du bioréacteur lors de son inoculation a permis probablement de limiter l'inactivation des microorganismes anaérobies et de favoriser de nouveau leur croissance. La densité de la population microbienne ainsi plus élevée, restera plus élevée dans le milieu après un traitement thermique.

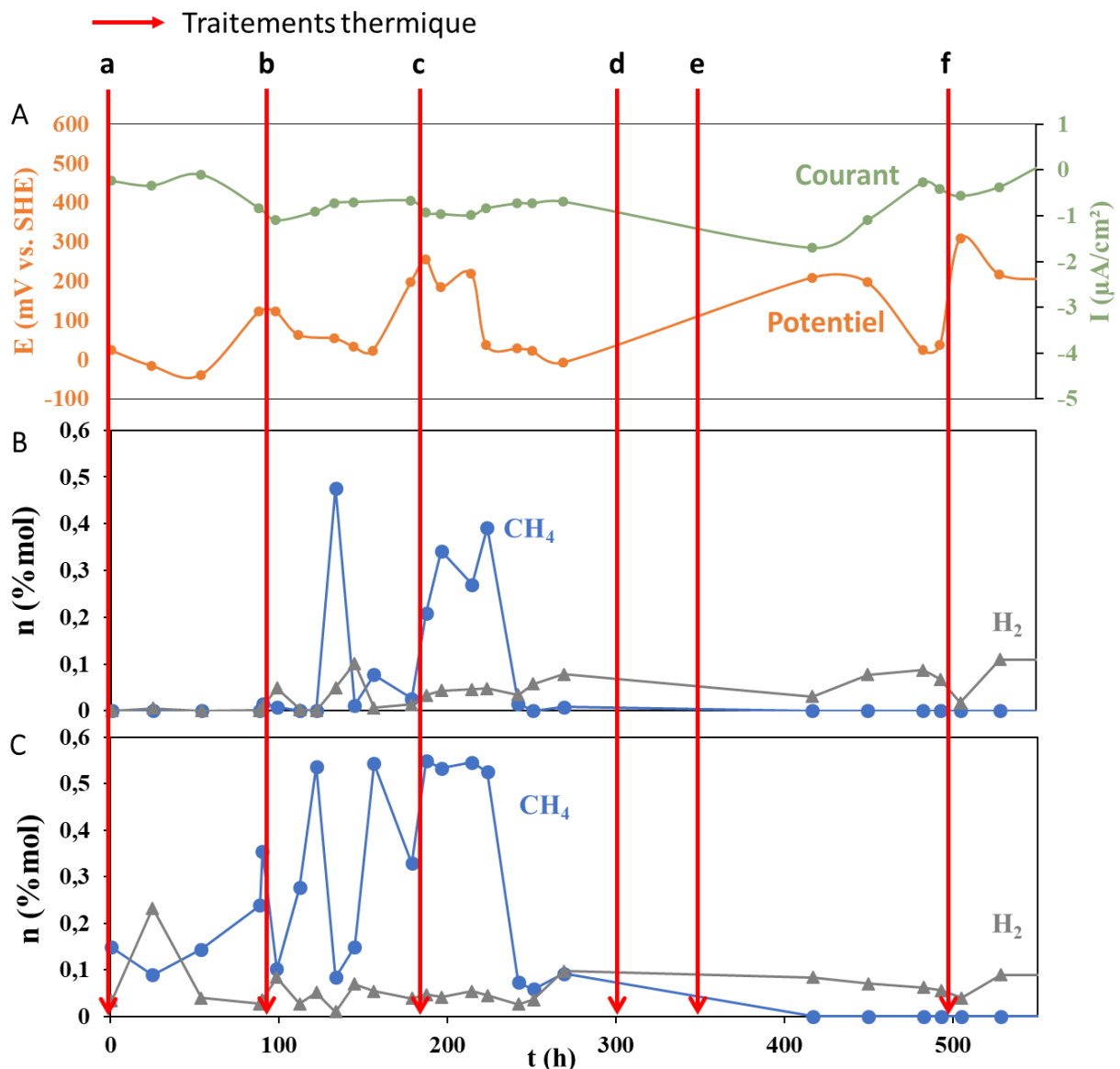


Figure 5-1 : Evolution temporelle de la réponse électrochimique et analyses des gaz du procédé en fonction des multiples traitements thermiques réalisés sur le digestat après a : deux traitements thermiques à 80 °C pendant 45 min ; b : deux traitements thermiques à 80 °C pendant 45 min ; c : un traitement thermique à 80°C pendant 2h30 ; d : deux traitements thermiques à 121 °C pendant 20 min ; e : deux traitements thermiques à 121 °C pendant 20 min ; et f : 3 traitements thermiques à 121 °C pendant 1h. (A) Suivi de l'analyse du potentiel et du courant du bioréacteur en court-circuit, en présence de vide (courbe simplifiée) (B) Suivi de la production des gaz CH₄ et H₂ au niveau de la membrane tubulaire et (C) au niveau du ciel du bioréacteur.

2.2. Effet des conditions expérimentales sur les cinétiques de production de H₂ et de CH₄ dans le bioréacteur.

Nous avons montré que les traitements thermiques appliqués au procédé ont perturbé de manière très significative les valeurs de potentiels et de densité de courant d'équilibre. En parallèle de ces mesures, une quantification des gaz a été réalisée, notamment de CH₄ et bioH₂ afin de suivre l'activité microbienne présente dans le bioréacteur. Les figures 5-1B et 5-1C montrent l'évolution des mesures de gaz au cours du temps en fonction des différents traitements réalisés.

L'analyse des gaz indique une production de méthane en grande quantité au niveau du ciel du bioréacteur et au travers de la membrane tubulaire. Ce n'est qu'à T_{250h} que la quantité de méthane détectée diminue drastiquement passant de 0,39 et 0,52 à 0,015 et 0,73 mol% respectivement pour la membrane et au niveau du ciel du bioréacteur. Le méthane n'est toutefois plus détectable pour les deux endroits de mesure, après le traitement du milieu à T_{300h}. En parallèle, le bioH₂ est également observé dans le ciel du bioréacteur et dans la membrane. Cependant le bioH₂ est mesuré en quantité stable de 0,06 %mol dans les deux environnements même après un traitement thermique à 121°C pendant 20 min, suggérant le maintien d'une population productrice dans le bioréacteur pouvant être liée à des bactéries sporulantes. Les spores sont connues comme étant une forme de résistance, capable de survivre à des traitements thermiques élevés. Ainsi, les formes sporulées des espèces productrices de bioH₂ sont certainement présentes en grande quantité. Néanmoins les traitements thermiques successifs doivent inactiver la plupart d'entre-elles ce qui explique la faible production de bioH₂ mesurée.

Les microorganismes présents dans le milieu du digestat sont des mésophiles anaérobies en plus d'être sporulants pour certains. Ainsi, un traitement thermique au-delà de 60 °C devrait être suffisant pour pouvoir inactiver thermiquement les formes végétatives de ces microorganismes. Cependant, l'efficacité du traitement thermique dépend également de la température au cœur du milieu qui doit être homogène mais également de la charge microbienne initiale de celui-ci (ANSES 2019).

En conclusion, la charge microbienne initiale du digestat est grande, avec probablement une grande quantité de bactéries sporulantes présente. Les différents traitements thermiques ont permis la diminution de la charge microbienne de l'ensemble, avec une très grande efficacité concernant les hydrogénotrophes producteurs de CH₄. Toutefois, il serait nécessaire de pouvoir réaliser une étude plus détaillée afin de proposer un traitement thermique suffisamment efficace pour inactiver les producteurs de CH₄, tout en préservant au maximum les producteurs de bioH₂.

3. Effet du traitement thermique sur la dynamique des populations microbiennes au cours du procédé

Dans l'étude présentée précédemment, il a été vu qu'un traitement thermique devait être réalisé après une première pré-culture du digestat, permettant probablement une bonne installation des populations microbiennes. Les premières analyses microbiologiques ont permis d'observer une première différence de population entre les biofilms de chaque électrode, suggérant ainsi une spécialisation des populations au cours du procédé, et ceci en fonction des différents traitements appliqués. Des analyses métagénomiques complémentaires liées à l'efficacité des traitements thermiques sur ces populations microbiennes ont été réalisées lors de l'étude, et ont été comparées à une culture n'ayant subi aucun traitement tout le long de sa culture, soit 600 h.

3.1. Abondance des populations retrouvées et homogénéité de ces dernières en fonction du digestat non traité ou traité thermiquement

La figure 5-2 présente une analyse de l'écologie microbienne observée dans les échantillons issus des bioréacteurs sans traitement, ou avant et après traitement thermique. L'indice de Pielou a été calculé. Il permet notamment d'indiquer si les espèces sont distribuées équitablement dans les échantillons. Plus la valeur se rapproche de 1, plus cela montre une homogénéité dans l'échantillon. A l'inverse, si celui-ci se rapproche de 0, cela montre une

hétérogénéité dans la population. La *Richness* représente le nombre total d'espèces retrouvées dans les échantillons. Pour chaque calcul réalisé, une ANOVA a été réalisée afin d'identifier les échantillons significativement différents.

D'après les résultats, la *richness* montre un plus grand nombre d'espèces retrouvées pour le t_0 du bioréacteur 2 correspondant au bioréacteur dont le milieu a été traité thermiquement durant la culture ($T_0MST R2$), contrairement au t_0 du bioréacteur où le milieu n'a pas subi de traitement thermique au préalable ($T_0MST R1$) avec respectivement une moyenne de 1000 et 800 communautés retrouvées. Il semble également que les communautés retrouvées dans les échantillons prélevés après que le digestat ait subi un traitement thermique ($T_{600h} R2$), soient significativement différentes de celles du milieu initial avant traitement, avec une baisse d'environ 50% de la population retrouvée après traitement.

Il est également à noter que d'après l'indice de Pielou, les populations retrouvées dans les échantillons issus d'un milieu non traité thermiquement et ceux traités thermiquement ont une différence significative sur la répartition des communautés contrairement aux échantillons issus d'un milieu traité qui sont plus hétérogènes. Cela peut être dû à la population au niveau des électrodes. En effet, comme vu dans la partie précédente, la population microbienne des électrodes, notamment à l'anode, a montré une population différente par rapport à la population retrouvée sur la cathode, comme l'abondance de certains des *Firmicutes*, contrairement aux populations issues des échantillons du milieu non traité dont l'abondance semblait être plus homogène entre eux.

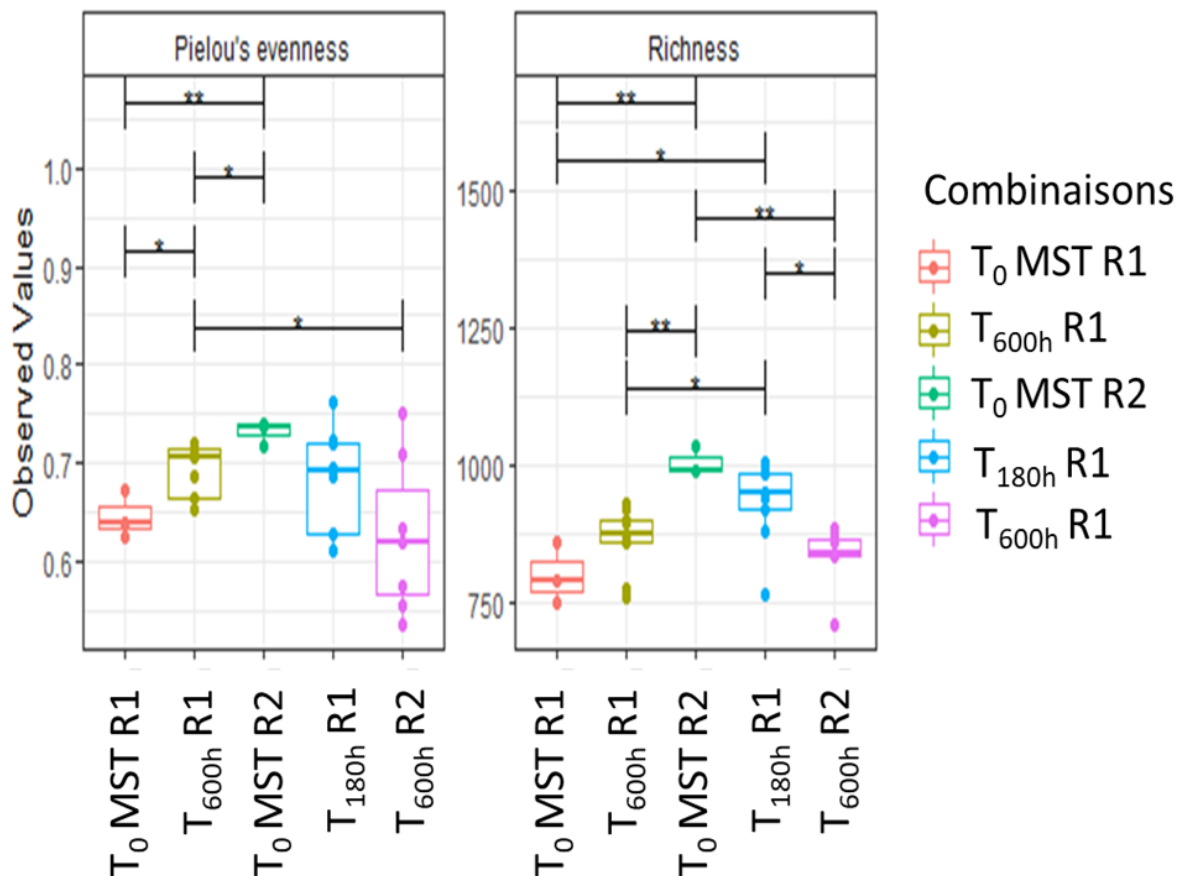


Figure 5-2 : Détermination de l'index de Pielou et observation de l'abondance des populations retrouvées dans les échantillons provenant d'un milieu traité ou non traité thermiquement avec MST : milieu sans traitement thermique, T₀ : prélèvement avant culture, T_{180h} : prélèvement après 180h de culture, T_{600h} : prélèvement après 600h de culture pour les bioréacteurs R1 et R2. * et ** montre si la différence est significative entre les échantillons.

Il semble ainsi que réaliser un traitement thermique sur le lisier (milieu) augmente l'hétérogénéité des populations retrouvées dans les échantillons prélevés après traitement, tout en diminuant le nombre de communautés retrouvées. Cela n'est toutefois pas observé pour la culture n'ayant subi aucun traitement qui a montré une homogénéité de la population plus importante en fin de culture qu'en début de culture avec une plus grande abondance retrouvée dans les échantillons, ce qui semble correspondre à l'hypothèse émise dans la partie précédente.

3.2. Similarité entre les populations de chaque échantillon issu du bioréacteur en fonction des conditions expérimentales.

L'effet du traitement thermique sur la population microbienne du digestat est par ailleurs illustré dans la figure 5-3 qui montre une analyse statistique de PCoA (Analyse de coordonnées principales). Cette méthode convertit les données de dissimilarité en distance pouvant être visualisée sur une carte, permettant ainsi d'observer si les échantillons issus d'un digestat qui a été traité thermiquement (bleu) ou non (rouge) ainsi que les échantillons issus du milieu avant culture (vert) pour les bioréacteurs R1 (en rond) et R2 (en triangle) sont proches ou non.

D'après les résultats, il semblerait que les populations retrouvées dans les échantillons issus d'un digestat non traité ne sont pas différentes de celles présentes initialement au démarrage (t_0) de la culture pour le réacteur 1 (points en cercle vert et rouge). Cependant, les populations retrouvées entre le t_0 et les échantillons prélevés après traitement (R2) sont très différents, confirmant ainsi que le traitement thermique a bien eu un impact sur la population microbienne. Il est toutefois à noter que les trois échantillons du t_0 réalisés sur le réacteur R2 présentent des différences pour un échantillon. Cela peut être dû à une non-homogénéité du milieu lors du prélèvement des échantillons. Le milieu contient des microparticules qui passent au travers d'un tamis utilisé pour filtrer le digestat et pourrait limiter l'homogénéité des populations dans celui-ci. Cela peut être également dû à la qualité de l'extraction de l'ADN qui aurait pu être moins efficace.

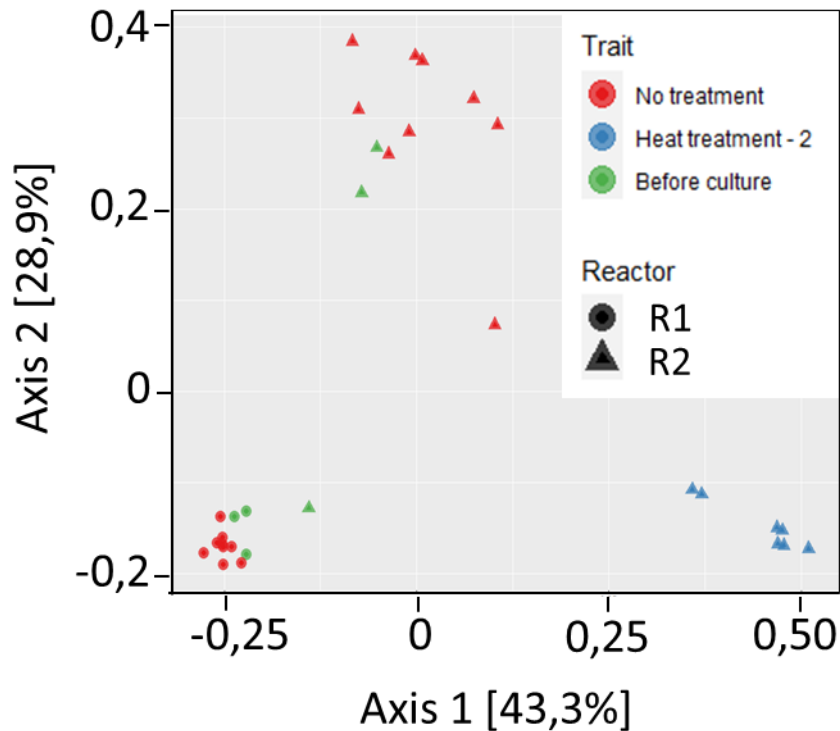


Figure 5-3 : Carte de similarité des populations dans les échantillons issus d'un digestat traité (bleu) ou non (rouge) traité thermiquement et les milieux avant culture (vert) pour le bioréacteur R1 et R2 – test PCoA. L'ordonnée et l'abscisse montrent la distance de dissimilarité entre les échantillons.

3.3. Principales classes de microorganismes retrouvées dans les échantillons prélevés dans le milieu traité et non traité au cours du procédé

La figure 5-4 montre les principales classes de microorganismes retrouvées dans les différents échantillons : avant culture (T_0), sur la membrane, le feutre graphite et le milieu après culture, tous les trois issus d'un milieu non traité thermiquement (Mb, GF, M) et traité thermiquement (MbT, GFT, MT), pour le bioréacteur R1 (figure 5-4A) ou R2 (figure 5-4B). Le digestat bioréacteur R1 n'a pas subi de traitement thermique durant la culture et le bioréacteur R2 a subi un traitement thermique à 180h, après prélèvement des échantillons.

D'après les résultats, comme dit dans la partie 1.2., 6.1. et 6.2., le traitement thermique montre une différence de population entre les échantillons dont le milieu a été traité thermiquement et les échantillons dont le milieu n'a pas été traité thermiquement. En particulier, en détails, les résultats sur la figure 5-4A montrent que les classes majoritaires sont différentes entre les populations retrouvées dans le bioréacteur R1 pour le digestat avant culture (T₀R1), le feutre graphite (GFR1) et le milieu après culture (MR1) qui sont identiques et la membrane (MBR1) où les *Gammaproteobacteria* deviennent la troisième classe majoritaire avec une abondance relative de 0,20, classes retrouvées sur des biocathodes issues d'eaux de mer (Erdle et al. 2010; Vandecastelaere et al. 2010). Ces microorganismes sont également connus comme étant électroactifs, pouvant être également retrouvés à l'anode (Logan et al. 2019; Amanze et al. 2022). Il semble également y avoir une variation de *Bacteroidia* dont l'abondance devient plus grande au niveau du feutre graphite GFR1 (anode) avec une abondance relative de 0,4. Ces bactéries généralement exoélectrogènes, permettraient potentiellement un échange d'électrons de la cellule vers le milieu extérieur (ici l'anode) (Park et al. 2019; Tang et al. 2017).

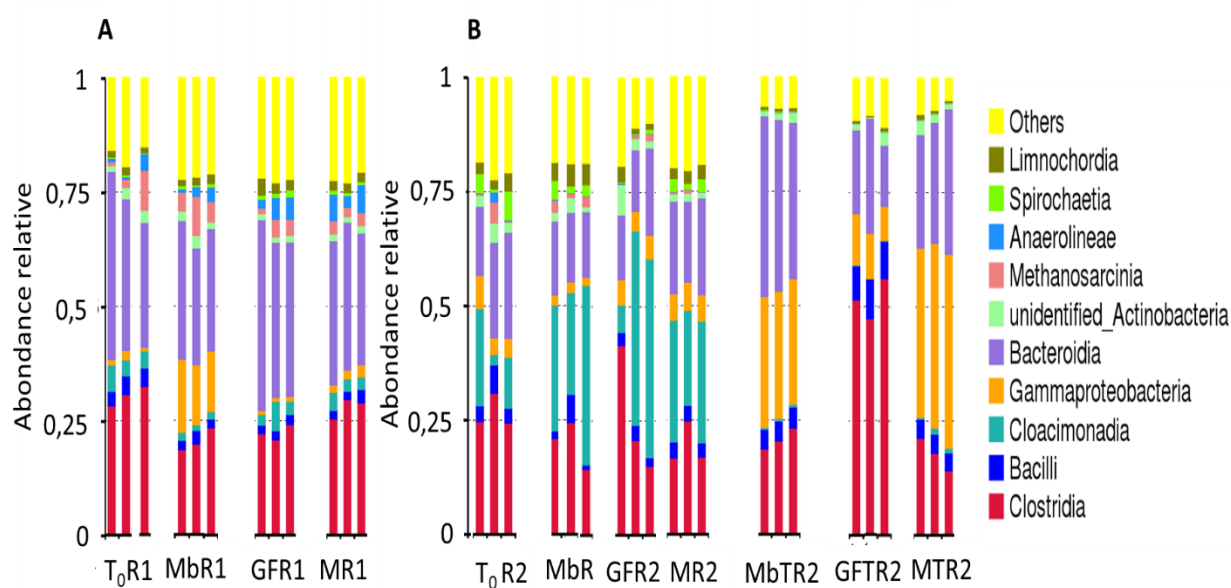


Figure 5-4 : Distributions des principales classes de population microbiennes présentes dans les échantillons A: issus d'un bioréacteur dont le milieu n'a subi aucun traitement avec T₀R1, le milieu initial ; MbR1, les biofilms de la membrane ; GFR1, les biofilms du feutre de graphite et MR1, le milieu en fin de culture et B : issu du bioréacteur dont le milieu a été traité thermique à 200h après avoir eu un pré-culture (bioréacteur discuté dans l'article) avec T₀R2, le milieu initial ; MbR2, le biofilm issu de la membrane avant traitement ; GFR2, le biofilm issus du feutre de graphite avant traitement, MR2, le milieu avant traitement, MBTR2, le biofilm de la membrane en fin de culture, après traitement thermique du milieu, GFTR2, le biofilm du feutre de graphite en fin de culture, après traitement thermique du milieu et MTR2, le milieu en fin de culture, après traitement thermique du milieu.

La figure 5-4 B montre des populations différentes entre les échantillons avant traitement et les échantillons issus du milieu traité thermiquement. En effet, lorsque celui-ci n'est pas traité, il semblerait que l'abondance relative de *Cloacimonadia* augmente pour le feutre graphite (GFR2), la membrane (MbR2) et le milieu après culture (MR2) avec 0,27 en moyenne, contre une abondance de 0,15 en moyenne pour l'échantillon du digestat du bioréacteur 2 avant culture (T₀R2). Dans la littérature, *Cloacimonadia* sont des bactéries pouvant participer à l'acétogénèse en utilisant des substrats tels que les alcools ou encore des sucres (Theuerl et al. 2018), ce qui pourrait être des bactéries intéressantes dont les produits tels que l'acétate ou le butyrate pourraient être utilisés par certaines souches microbiennes électroactives pour la

production de bioH₂. Cette classe disparaît totalement de la liste des classes majoritaires après que le milieu a été traité thermiquement. À la place, les *Gammaproteobacteria* deviennent majoritaires sur la membrane MbTR2 et dans le milieu en fin de culture MTR2 avec respectivement 0,25 et 0,5 d'abondance relative. La présence de ces bactéries a déjà été observée sur la figure 5-4 A, montrant leur implantation préférentielle sur la membrane tubulaire, participant ainsi à une biocathode fonctionnelle. Il semblerait que le traitement thermique du milieu ait favorisé une meilleure implantation de ces bactéries sur la membrane. Il est également à noter que les *Clostridia* sont majoritaires avec 0,5 d'abondance relative sur le biofilm du feutre de graphite GFTR2 (anode). Ces bactéries sont également présentes dans tous les échantillons représentant au minimum un quart des populations majoritaires retrouvées. Certaines bactéries sont des bactéries sporulantes participant à la production de bioH₂. Par ailleurs, parmi les souches de *Clostridia*, plusieurs sont connues comme étant électroactives et pouvant participer à la fois à la fourniture des électrons à l'anode ou à la récupération de ces électrons via la cathode (Logan et al. 2019). Leur interaction avec certaines bactéries telles que *Geobacter* a été démontrée dans les biofilms électroactifs car les *Clostridia*, par leur métabolisme peuvent produire des composés tels que l'acétate ou l'éthanol, pouvant être utilisés par d'autres microorganismes au sein du même biofilm, participant ainsi une interaction avec celles-ci (Rivalland et al. 2022; Ren et al. 2007). La présence en grande quantité des *Clostridia* sur le feutre de graphite pourrait être due à l'accumulation au fond du réacteur de substrat tel que la biomasse lignocellulosique très abondante dans un digestat agricole. En effet, le bioréacteur n'est pas agité afin de favoriser une anaérobiose et l'établissement des communautés microbiennes, on peut facilement imaginer une sédimentation des matériaux et autres substrats insolubles sur l'anode constitué par le feutre. Il est à noter également que l'abondance relative des *Bacteroidia* varie également, et fait également partie des classes majoritaires présentes sur les biofilms issus de la membrane MbTR2, représentant presque la moitié des principales classes retrouvées, contrairement à ce qui est indiqué sur la figure 5-4A où ces bactéries sont retrouvées plutôt au niveau de l'anode.

En conclusion, au niveau des classes microbiennes, une légère spécialisation microbienne sur les électrodes apparaît dans l'expérience dont le milieu n'a pas été traité thermiquement (figure 5-4 A) avec notamment une variation des *Gammaproteobacteria* et *Bacteroidia*. Lorsque le bioréacteur subit un traitement thermique (figure 5-4B), d'autres espèces microbiennes semblent s'implanter préférentiellement sur les électrodes. C'est notamment le cas pour les *Clostridia* ou les *Gammaproteobacteria* qui présentent une abondance plus élevée respectivement sur le feutre de graphite (anode) et la membrane tubulaire (cathode) après traitement thermique.

4. Conclusions du chapitre :

Trois designs de bioréacteurs ont été étudiés quant à leur capacité à générer des bonnes conditions d'anaérobiose et ainsi atteindre de bas potentiels pour la production de bioH₂. La production de CH₄ et de bioH₂ a également été suivie. Il semblerait que le système ne permette pas d'extraire le bioH₂ rapidement avant qu'il soit consommé par les méthanogènes, notamment lorsqu'aucun traitement thermique n'est appliqué au bioréacteur. Un traitement thermique a été réalisé après une phase de stabilisation du digestat dans le bioréacteur. Ce traitement thermique s'est avéré être efficace pour obtenir une meilleure production d'H₂ tout en supprimant la production de CH₄.

L'efficacité du traitement thermique a été validée par les analyses microbiennes qui ont montré que ce traitement permettait de favoriser des populations différentes sur chaque électrode. Au niveau des phyla, la différence entre les populations est difficilement observable, notamment pour les échantillons provenant d'un digestat non traité thermiquement. Néanmoins, une analyse plus fine, au niveau des classes, a permis d'observer plus en détails les variations de populations dans chaque échantillon. Cependant, d'autres expériences et analyses seront nécessaires afin de mieux comprendre l'interaction entre les microorganismes et également de valider notamment la présence de souches microbiennes électroactives.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse avait pour objectif principal d'évaluer le couplage des processus liés à la fermentation sombre (DF) et à l'électrolyse microbienne (CEM) ou l'électrofermentation dans un seul et même système, idéalement autonome, afin de favoriser la production d' H_2 en utilisant des déchets organiques agricoles. Ces méthodes biologiques, la fermentation sombre, associée à des bioréacteurs membranaires, et l'électrolyse microbienne ou l'électrofermentation ont été particulièrement investiguées quant à leur propension à favoriser l'implémentation de biofilms électroactifs, favorisée par le procédé dans son ensemble. Ce travail de thèse avait également pour but de répondre à certaines questions scientifiques telles que la spécialisation microbienne des biofilms développés au niveau des électrodes mais également la capacité de ces procédés couplés à être orientés vers la production d' H_2 . Pour cela, une démarche rationnelle et des expériences ont été mises en place, au travers de :

- La réalisation d'une étude bibliographique recensant les principales méthodes de production existantes, notamment biologiques, et permettant d'obtenir des informations plus détaillées sur les procédés utilisant la fermentation sombre, l'électrolyse microbienne et l'électrofermentation ;
- La mise en place des expériences permettant de sélectionner la membrane tubulaire parmi deux matériaux composites sélectionnés : le silicone carbone et le silicone nickel, selon leur réactivité électrochimique mais également leur capacité à extraire les gaz produits ;
- La mise en place des expériences permettant le choix d'un design du procédé afin d'obtenir les conditions favorables à la production de $bioH_2$. Parmi ces conditions, un potentiel bas minimal, proche de -300 mV vs SHE, a été recherché avec un courant de cathode permettant des processus de réduction au niveau de la membrane tubulaire sélectionnée.

- La caractérisation de l'effet du traitement thermique sur la population microbienne, notamment des biofilms afin d'observer s'il était possible de favoriser la croissance de biofilms mixtes électroactifs spécialisés sur les électrodes, avec à l'anode, un biofilm exoélectrogène oxydant la matière organique, et à la cathode, potentiellement un biofilm électrotrophe pouvant produire du H_2 ou favoriser un environnement pour cette production.

L'état de l'art a permis de présenter les différentes méthodes de production de H_2 , notamment de bioproduction, qui peuvent dépendre de la présence de lumière ou non. Parmi ces méthodes, la fermentation sombre et l'électrolyse microbienne ont été les plus détaillées. La fermentation sombre est un métabolisme intermédiaire vis-à-vis de processus permettant la production de composés tels que le CH_4 ou le H_2S , présents dans les environnements naturels anaérobies. L'utilisation de ce métabolisme dans un procédé nécessite l'utilisation de membranes permettant la séparation des biogaz produits du milieu de culture. Les matériaux utilisés doivent ainsi avoir la capacité d'extraire le H_2 produit. Notre choix s'est porté sur le silicone. L'utilisation d'un gaz vecteur ou d'un vide favorise la production de bio H_2 car elle diminue la P_{H_2} , facteur limitant à la production du gaz.

L'électrolyse microbienne, quant à elle, utilise des microorganismes électroactifs pouvant transférer/récupérer des électrons vers ou provenant de milieux extérieurs. Leur utilisation dans un procédé électrochimique peut être réalisée sous la forme d'un biofilm électroactif à l'anode permettant de catalyser les réactions d'oxydation de la matière organique présente dans le milieu de culture. Un biofilm électroactif peut aussi être éventuellement impliqué à la cathode pour la production de H_2 . Les électrodes utilisées doivent cependant être compatibles avec les microorganismes, permettant leur implantation et elles doivent également avoir une bonne résistance vis-à-vis de la corrosion pouvant se réaliser au cours du temps, en raison de l'activité microbienne.

Il existe toutefois un autre procédé électromicrobiologique utilisant des microorganismes électroactifs, c'est l'électrofermentation. La différence entre l'électrolyse microbienne et

l'électrofermentation est que le premier procédé a pour finalité une production quantitative de H_2 à la cathode à partir du courant apporté par les réactions bioanodiques. L'électrofermentation utilise quant à elle un plus faible courant pour créer un environnement au voisinage des électrodes favorisant la production de H_2 .

Nous savons que la combinaison entre la DF et la CEM est intéressante car les microorganismes électroactifs peuvent oxyder des acides gras volatils (AGV) tels que l'acétate ou le butyrate qui sont des produits issus de la DF. Cependant, des études combinant les deux méthodes dans un seul et même procédé montrent qu'il est nécessaire d'apporter au système une énergie complémentaire, ce qui est réalisé par l'imposition d'un courant ou d'un potentiel à l'électrode de travail responsable de la production de H_2 . Par ailleurs, les populations de la DF et la CEM peuvent être différentes, avec un pH optimal différent, de 6,5 pour les microorganismes fermentaires et un pH de 7, voire légèrement basique pour les microorganismes électroactifs, pouvant perturber la production de H_2 . Cependant l'utilisation de ces microorganismes dans le même procédé permettrait de favoriser un biofilm mixte conduisant à une interaction entre les microorganismes fermentaires et électroactifs, favorisant ainsi la production de $bioH_2$.

Le premier chapitre des résultats a permis de montrer que la membrane tubulaire en silicone carbone avait une réactivité électrochimique vis-à-vis du couple redox ferricénium/ferrocène plus adaptée à notre étude que la membrane tubulaire en silicone nickel. Du point de vue qualitatif, la membrane en silicone carbone a également permis une extraction de H_2 du milieu étudié.

Par la suite, des mesures quantitatives ont été réalisées, et ont permis d'observer que la production de H_2 pouvait être découplée à la production de CH_4 . Les résultats ont montré que la détection de H_2 est apparue après à un courant d'électrolyse imposé de $-1000 \mu A$. En parallèle, la production de CH_4 semble ne pas augmenter ni diminuer en fonction des courants imposés dans la cellule d'électrolyse. De ce fait, il est apparu qu'en conditions d'électrolyse, la production d' H_2 n'avait pas d'impact sur la production de CH_4 . Cependant, il nous a tout de

même semblé nécessaire de prendre en compte l'activité des méthanogènes dans la mise en place du procédé avec un environnement adapté pour favoriser la production de BioH₂.

Le second chapitre des résultats a permis de proposer plusieurs architectures du procédé, en particulier au niveau de la disposition des électrodes et de l'extraction des gaz. Ces études ont conduit à l'obtention de conditions environnementales propices au couplage entre la DF et un processus électromicrobiologique, dans de bonnes conditions d'anaérobiose du procédé. Ainsi, trois designs du bioréacteur ont été évalués. Le premier s'est stabilisé à un potentiel de -50 mV vs SHE en présence de N₂ comme gaz porteur dans la membrane. Le potentiel n'a pas pu descendre plus bas, probablement à cause de la taille du feutre de graphite dont un tiers se trouvait au niveau du ciel du bioréacteur, contenant peut-être des traces de O₂. Le second design expérimental du bioréacteur a été réalisé en disposant le feutre graphite au fond du bioréacteur. Il a permis d'obtenir un potentiel plus bas à -250 mV vs SHE en présence d'un flux de N₂ dans la membrane. Cependant ce potentiel n'a pas pu être maintenu et celui-ci a drastiquement augmenté lorsque le flux de N₂ a été arrêté, probablement en raison d'une arrivée de traces de O₂ dans le réacteur. Enfin, un troisième design du bioréacteur a été réalisé en remplaçant le flux de N₂ par un vide à 80 kPa au niveau de la lumière de la membrane tubulaire. Ce vide a permis d'obtenir un potentiel beaucoup plus bas allant jusqu'à -323 mV vs SHE pour une densité de courant cathodique au niveau de la membrane en silicone carbone de 1,1 μA/cm².

Suite à cela, des expériences ont été réalisées afin d'observer la production de bioH₂ et la population de biofilms retrouvée sur les électrodes. Il est apparu qu'il était important de réaliser une stabilisation du digestat dans le bioréacteur, d'une à deux semaines, avant de réaliser deux traitements thermiques à 121 °C pendant 20 min. De cette façon, des conditions expérimentales favorables ont été obtenues. Cela a permis également d'inhiber la production de CH₄ dans le milieu, augmentant ainsi la production de H₂ qui est passée de 0,1 %mol dans la membrane et le ciel du réacteur à respectivement 0,33 et 0,29 %mol. Ainsi, cette production obtenue après traitement thermique suggère la présence de bactéries sporulantes productrices de H₂ dans le digestat utilisé. A l'opposé de l'expérience précédente, lorsque le

digestat est traité avant la stabilisation, les conditions électrochimiques les plus favorables ne sont pas observées. En effet, par rapport aux conditions précédentes pour lesquelles le digestat a été stabilisé dans le réacteur, la production de CH₄ est instable et la production de bioH₂ reste faible avec 0,06 mol% dans le ciel du réacteur et 0,08 mol% au travers de la membrane.

En parallèle, une étude de l'écologie microbienne du digestat dans le procédé a également été réalisée, notamment sur le bioréacteur ayant subi un traitement thermique après stabilisation. Les premiers résultats ont montré que certaines populations ont été privilégiées avant et après traitement thermique. Parmi les phyla majoritaires, aucune réelle différence n'a pu être observée avant le traitement thermique. Toutefois, du point de vue de la classe, une différence chez les *Gammaproteobacteria*, qui sont des bactéries pouvant être électroactives, a été observée dans les échantillons avec une plus grande abondance relative sur la membrane tubulaire par rapport à la population du feutre en graphite mais également au niveau des échantillons issus du milieu. Après traitement thermique, une différence au niveau des phyla a été observée notamment sur les populations des *Proteobacteria* et *Bacteroidota* qui se sont implantées préférentiellement sur la membrane plutôt que sur le feutre. Au contraire, les *Firmicutes* dont certaines espèces peuvent être électroactives ont préféré s'implanter au niveau du feutre.

Au niveau des classes, des différences sont observées montrant que les *Clostridia* sont favorisées au niveau de l'anode (feutre de graphite). Ces bactéries sont sporulantes et pour certaines cellulolytiques et électroactives. Les *Bacteroidia* deviennent également majoritaires mais sur la membrane. Elles peuvent être électroactives. Les *Gammaproteobacteria* deviennent quant à elles majoritaires sur les deux électrodes. Le traitement thermique semble ainsi avoir un impact sur la population microbienne, et associé aux environnements spécifiques générés à leur voisinage, certaines populations sont favorisées sur les électrodes et participent à leur fonctionnalité dans le procédé.

Au titre des perspectives de ce travail, l'architecture du procédé, bien que simple, le rend avantageux parce qu'il devient autonome du point de vue électrochimique. Toutefois, même si sa simplicité est un avantage, l'utilisation du vide est un frein pour une extrapolation à plus

grande échelle. Il serait ainsi intéressant de faire évoluer le design du procédé en utilisant la membrane tubulaire en silicone carbone de plus grandes tailles mais également une anode plus proche de la membrane afin d'optimiser au mieux les échanges entre les deux électrodes. Il a été vu dans le présent document qu'une partie significative du H₂ produit n'est pas récupéré par la membrane. Le placement des électrodes proches l'une de l'autre permettrait d'augmenter l'extraction des gaz par la membrane tubulaire.

Dans nos expériences, le digestat n'a pas été homogénéisé afin de favoriser un gradient de potentiel dans le milieu permettant de conserver les conditions anaérobies du milieu au voisinage des électrodes, créant des conditions favorables à la production de bioH₂. Ajouter une agitation dans le procédé, notamment lorsque celui-ci sera à plus grande échelle pourrait permettre d'augmenter la production de bioH₂. C'est notamment ce qui a été observé dans une précédente étude réalisée par Lebranchu, 2017 qui a observé qu'une agitation à 5 rpm après une agitation à 20 rpm dans du digestat de méthaniseur de la Bouzule a permis d'augmenter la production de biogaz dont la production de H₂ (Lebranchu 2017).

Par ailleurs, il serait également intéressant de compléter les expérimentations afin de pouvoir d'observer la répétabilité du procédé mis en place, notamment en fonction de la saisonnalité lors du prélèvement du digestat. En effet, bien que les conditions expérimentales concernant notamment la production de bioH₂, avec une stabilisation du digestat au préalable avant traitement thermique aient été établies, cette saisonnalité, au niveau du digestat n'a pas été prise en compte. Il serait ainsi intéressant de pouvoir observer si le procédé permet d'obtenir des résultats similaires pour des digestats prélevés sur toute l'année.

Du point de vu de la production, le système permet de produire un faible courant cathodique dans un bioréacteur de 5L. Il serait intéressant d'étudier plus en détails l'impact de ce faible courant sur la population microbienne au voisinage des électrodes. En effet, il a été vu dans la littérature qu'un faible courant pouvait favoriser un microenvironnement pouvant impacter les potentiels redox proches des électrodes, favorisant la production d'H₂. Ainsi, il serait également intéressant de réaliser d'autres expérimentations pour observer plus en détails l'impact du

faible courant sur la population microbienne mais également afin de mieux comprendre les interactions entre les microorganismes dans les biofilms. En effet, les populations retrouvées sur les électrodes sont mixtes. Ces microorganismes sont issus de ceux déjà présents dans le digestat et qui ont préférentiellement pu s'installer sur la cathode ou l'anode. Cependant, ces populations peuvent ne pas être simplement composées de bactéries électroactives.

Confirmer la présence de microorganismes électroactifs serait intéressant car, dans les phyla et classes, différentes souches de microorganismes existent pouvant soit être exoélectrogènes ou électotrophes. Par ailleurs, d'autres souches dans ces même phyla et classes n'ont pas la capacité de transférer les électrons vers le milieu extérieur. D'autre part, parmi ces phyla et classes, certaines espèces ne sont pas électroactives, ce qui nécessite une étude plus approfondie de la population microbienne au voisinage des électrodes.

Références bibliographiques

- Abo-Hashesh, Mona, et Patrick C. Hallenbeck. 2012. « Microaerobic dark fermentative hydrogen production by the photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus* JP91 ». *International Journal of Low-Carbon Technologies* 7 (2): 97-103. <https://doi.org/10.1093/ijlct/cts011>.
- Adams, Michael W.W. 1990. « The Structure and Mechanism of Iron-Hydrogenases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1020 (2): 115-45. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90044-5).
- AFHYPAC. 2016. « Production et consommation d'hydrogène aujourd'hui ».
- . 2021. « Enjeux et perspectives ». France Hydrogène. 2021. <https://www.francehydrogene.org/comprendre-lhydrogene/enjeux-et-perspectives/>.
- Aimar, Pierre, et Georges Daufin. 2004. « Séparations par membrane dans l'industrie alimentaire », 26.
- Amanze, Charles, Xiaoya Zheng, Richmond Anaman, Xiaoyan Wu, Bridget Ataa Fosua, Shanshan Xiao, Mingchen Xia, et al. 2022. « Effect of nickel (II) on the performance of anodic electroactive biofilms in bioelectrochemical systems ». *Water Research* 222 (118889). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118889>.
- Andel, J. G. van, G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, et A. M. Breure. 1985. « Glucose Fermentation By *Clostridium Butyricum* Grown under a Self Generated Gas Atmosphere in Chemostat Culture ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 23 (1): 21-26. <https://doi.org/10.1007/BF02660113>.
- ANSES. 2019. « Full article: Microbial paths to renewable hydrogen production ». Fiche outil d'aide à la rédaction d'un guide de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH). [https://www-tandfonline-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.4155/bfs.11.6](https://www.tandfonline-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.4155/bfs.11.6).
- Antonopoulou, Georgia, Katerina Stamatelatos, Nikolaos Venetsaneas, Michael Kornaros, et Gerasimos Lyberatos. 2008. « Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47 (15): 5227-33. <https://doi.org/10.1021/ie071622x>.
- Azwar, M. Y., M. A. Hussain, et A. K. Abdul-Wahab. 2014. « Development of Biohydrogen Production by Photobiological, Fermentation and Electrochemical Processes: A

- Review ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 31 (mars): 158-73.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>.
- Banerjee, Aritro, Rajnish Kaur Calay, et Mohamad Mustafa. 2022. « Review on Material and Design of Anode for Microbial Fuel Cell ». *Energies* 15 (6): 2283.
<https://doi.org/10.3390/en15062283>.
- Barca, Cristian, David Ranava, Marielle Bauzan, Jean-Henry Ferrasse, Marie-Thérèse Giudici-Ortoni, et Audrey Soric. 2016. « Fermentative Hydrogen Production in an Up-Flow Anaerobic Biofilm Reactor Inoculated with a Co-Culture of *Clostridium Acetobutylicum* and *Desulfovibrio Vulgaris* ». *Bioresource Technology* 221 (décembre): 526-33.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.072>.
- Basak, Nitai, et Debabrata Das. 2007. « The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (1): 31-42. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>.
- Bhagchandani, Drishti Dinesh, Rishi Pramod Babu, Jayesh M. Sonawane, Namita Khanna, Soumya Pandit, Dipak A. Jadhav, Santimoy Khilari, et Ram Prasad. 2020. « A Comprehensive Understanding of Electro ». *Fermentation* 6 (3): 92.
<https://doi.org/10.3390/fermentation6030092>.
- Bond, Daniel R., Dawn E. Holmes, Leonard M. Tender, et Derek R. Lovley. 2002. « Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments ». *Science* 295 (5554): 483-85. <https://doi.org/10.1126/science.1066771>.
- Bond, Daniel R., et Derek R. Lovley. 2005. « Evidence for Involvement of an Electron Shuttle in Electricity Generation by *Geothrix fermentans* ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4): 2186-89. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2186-2189.2005>.
- Bourdakos, Nicholas, Enrico Marsili, et Radhakrishnan Mahadevan. 2014. « A Defined Co-Culture of *Geobacter Sulfurreducens* and *Escherichia Coli* in a Membrane-Less Microbial Fuel Cell ». *Biotechnology and Bioengineering* 111 (4): 709-18.
<https://doi.org/10.1002/bit.25137>.
- Brentner, Laura B., Jordan Peccia, et Julie B. Zimmerman. 2010. « Challenges in Developing Biohydrogen as a Sustainable Energy Source: Implications for a Research Agenda ». *Environmental Science & Technology* 44 (7): 2243-54.
<https://doi.org/10.1021/es9030613>.

- Cabrol, Lea, Antonella Marone, Estela Tapia-Venegas, Jean-Philippe Steyer, Gonzalo Ruiz-Filippi, et Eric Trably. 2017. « Microbial Ecology of Fermentative Hydrogen Producing Bioprocesses: Useful Insights for Driving the Ecosystem Function ». *FEMS Microbiology Reviews* 41 (2): 158-81. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>.
- Castelló, Elena, Antonio Djalma Nunes Ferraz-Junior, Cristiane Andreani, Melida Del Pilar Anzola-Rojas, Liliana Borzacconi, Germán Buitrón, Julián Carrillo-Reyes, et al. 2020. « Stability Problems in the Hydrogen Production by Dark Fermentation: Possible Causes and Solutions ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 119 (mars): 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- Chandrasekhar, Kuppam, Yong-Jik Lee, et Dong-Woo Lee. 2015. « Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (12): 8266-93. <https://doi.org/10.3390/ijms16048266>.
- Chaudhuri, Swades K., et Derek R. Lovley. 2003. « Electricity Generation by Direct Oxidation of Glucose in Mediatorless Microbial Fuel Cells ». *Nature Biotechnology* 21 (10): 1229-32. <https://doi.org/10.1038/nbt867>.
- Chen, Wen-Hsing, Shihwu Sung, et Shen-Yi Chen. 2009. « Biological Hydrogen Production in an Anaerobic Sequencing Batch Reactor: PH and Cyclic Duration Effects ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (1): 227-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.061>.
- Cheng, S., et B. E. Logan. 2007. « Sustainable and Efficient Biohydrogen Production via Electrohydrogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (47): 18871-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>.
- Choi, Okkyoung, Taeyeon Kim, Han Min Woo, et Youngsoon Um. 2014. « Electricity-Driven Metabolic Shift through Direct Electron Uptake by Electroactive Heterotroph *Clostridium pasteurianum* ». *Scientific Reports* 4 (1): 6961. <https://doi.org/10.1038/srep06961>.
- Chung, K T. 1976. « Inhibitory Effects of H₂ on Growth of *Clostridium Cellobioparum*. » *Applied and Environmental Microbiology* 31 (3): 342-48. <https://doi.org/10.1128/AEM.31.3.342-348.1976>.
- Darnajoux, Romain, Linta Reji, Xin Rei Zhang, Katja E. Luxem, et Xinning Zhang. 2022. « Ammonium Sensitivity of Biological Nitrogen Fixation by Anaerobic Diazotrophs in

- Cultures and Benthic Marine Sediments ». *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 127 (7): e2021JG006596. <https://doi.org/10.1029/2021JG006596>.
- Demuez, Marie. 2009. « Etude des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer de *Clostridium acetobutylicum* et de ses partenaires d'oxydo-réduction ». Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Dixon, Ray, et Daniel Kahn. 2004. « Genetic regulation of biological nitrogen fixation ». *Nature Reviews Microbiology* 2: 621-31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>.
- Du, Shu-wen, Chao Sun, A-qiang Ding, Wei-wang Chen, Ming-jie Zhang, Ran Cheng, et Dong-lei Wu. 2019. « Microbial Dynamics and Performance in a Microbial Electrolysis Cell-Anaerobic Membrane Bioreactor ». *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A* 20 (7): 533-45. <https://doi.org/10.1631/jzus.A1900009>.
- Erable, Benjamin, Ilse Vandecandelaere, Marco Faimali, Marie-Line Delia, Luc Etcheverry, Peter Vendamme, et Alain Bergel. 2010. « Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst ». *Bioelectrochemistry* 78: 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.06.006>.
- Fan, Qingwen, Xiaojing Fan, Peng Fu, Yongmei Sun, Yan Li, Siling Long, Tianyang Guo, Liang Zheng, Kai Yang, et Dongliang Hua. 2022. « Microbial Community Evolution, Interaction, and Functional Genes Prediction during Anaerobic Digestion in the Presence of Refractory Organics ». *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10 (3): 107789. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107789>.
- Fan, Xiaoqi, Yun Zhou, Xueke Jin, Rong-Bin Song, Zhaohui Li, et Qichun Zhang. 2021. « Carbon Material-Based Anodes in the Microbial Fuel Cells ». *Carbon Energy* 3 (3): 449-72. <https://doi.org/10.1002/cey2.113>.
- Fan, Y. 2004. « Optimization of Initial Substrate and PH Levels for Germination of Spring Hydrogen-Producing Anaerobes in Cow Dung Compost ». *Bioresource Technology* 91 (2): 189-93. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00175-5).
- Fisher, Harvey F., Alvin I. Krasna, et D. Rittenberg. 1954. « The interaction of hydrogenase with oxygen » 209: 569-78.
- Ghimire, Anish, Luigi Frunzo, Francesco Pirozzi, Eric Trably, Renaud Escudie, Piet N.L. Lens, et Giovanni Esposito. 2015. « A Review on Dark Fermentative Biohydrogen Production from Organic Biomass: Process Parameters and Use of by-Products ». *Applied Energy* 144 (avril): 73-95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>.

- Gil-Carrera, L., A. Escapa, R. Moreno, et A. Morán. 2013. « Reduced Energy Consumption during Low Strength Domestic Wastewater Treatment in a Semi-Pilot Tubular Microbial Electrolysis Cell ». *Journal of Environmental Management* 122 (juin): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.001>.
- Ginkel, Steven Van, Shihwu Sung, et Jiunn-Jyi Lay. 2001. « Biohydrogen Production as a Function of PH and Substrate Concentration ». *Environmental Science & Technology* 35 (24): 4726-30. <https://doi.org/10.1021/es001979r>.
- Grass, Gregor, Christopher Rensing, et Marc Solioz. 2011. « Metallic copper as an antimicrobial surface ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (5): 1541-47. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>.
- Guo, Kun, Antonin Prévot, et Korneel Rabaey. 2017. « A Novel Tubular Microbial Electrolysis Cell for High Rate Hydrogen Production ». *Journal of Power Sources* 356 (juillet): 484-90. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.029>.
- Guo, Xin Mei, Eric Trably, Eric Latrille, Hélène Carrère, et Jean-Philippe Steyer. 2010. « Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation : A review ». *International Journal of Hydrogen Energy* 35: 10660-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>.
- Hallenbeck, P C, et J R Benemann. 2002 « Biohydrogen - The Microbiological Production of Hydrogen Fuel ». *Biotechnomogy* 7: 24.
- Hallenbeck, Patrick C. 2011. « Microbial paths to renewable hydrogen production ». *Biofuels* 2 (3): 285-302. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.6>.
- Hassan, Gamal Kamel, Bahaa Ahmed Hemdan, et Fatma A. El-Gohary. 2020. « Utilization of Food Waste for Bio-Hydrogen and Bio-Methane Production: Influences of Temperature, OLR, and in Situ Aeration ». *Journal of Material Cycles and Waste Management* 22 (4): 1218-26. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01014-5>.
- He, Zhen, et Largus T. Angenent. 2006. « Application of Bacterial Biocathodes in Microbial Fuel Cells ». *Electroanalysis* 18 (19-20): 2009-15. <https://doi.org/10.1002/elan.200603628>.
- Hernandez, Maria E., Andreas Kappler, et Dianne K. Newman. 2004. « Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction ». *Applied Microbiology* 70 (2): 921-28. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.921-928.2004>.
- Hoareau, Morgane, Luc Etcheverry, Olivier Chapleur, Chrystelle Bureau, Cédric Midoux, Benjamin Erable, et Alain Bergel. 2023. « The Electrochemical Microbial Tree: A New

- Concept for Wastewater Treatment ». *Chemical Engineering Journal* 454 (février): 140295. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140295>.
- Holmes, D.E., D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, et D.R. Lovley. 2004. « Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments ». *Microbial Ecology* 48 (2): 178-90. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0004-4>.
- Hu, Hongqiang, Yanzhen Fan, et Hong Liu. 2009. « Hydrogen Production in Single-Chamber Tubular Microbial Electrolysis Cells Using Non-Precious-Metal Catalysts ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (20): 8535-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.011>.
- INSEE. 2023. « Provenances du pétrole brut importé en France - données annuelles de 2011 à 2022 ». 2023. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2119697>.
- Jami, Elie, Adi Israel, Assaf Kotser, et Itzhak Mizrahi. 2013. « Exploring the Bovine Rumen Bacterial Community from Birth to Adulthood ». *The ISME Journal* 7 (6): 1069-79. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>.
- Jeremiasse, Adriaan W., Hubertus V.M. Hamelers, et Cees J.N. Buisman. 2010. « Microbial Electrolysis Cell with a Microbial Biocathode ». *Bioelectrochemistry* 78 (1): 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.05.005>.
- Jumas-Bilak, Estelle, et Hélène Marchandin. 2014. « The Phylum Synergistetes ». In *The Prokaryotes*, édité par Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, et Fabiano Thompson, 931-54. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_384.
- Jung, Kyung-Won, Dong-Hoon Kim, Sang-Hyoun Kim, et Hang-Sik Shin. 2011. « Bioreactor Design for Continuous Dark Fermentative Hydrogen Production ». *Bioresour Technol* 102 (18): 8612-20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.056>.
- Jung, Sokhee, et John M. Regan. 2011. « Influence of External Resistance on Electrogenesis, Methanogenesis, and Anode Prokaryotic Communities in Microbial Fuel Cells ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2): 564-71. <https://doi.org/10.1128/AEM.01392-10>.
- Kakuk, Balázs, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, Gergely Maróti, Dénes Dudits, et Kornél L. Kovács. 2021. « Methane Production from Green and Woody Biomass Using Short Rotation

- Willow Genotypes for Bioenergy Generation ». *Bioresource Technology* 333 (août): 125223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125223>.
- Karthikeyan, R., K. Sathish kumar, M. Murugesan, Sheela Berchmans, et V. Yegnaraman. 2009. « Bioelectrocatalysis of *Acetobacter acetii* and *Gluconobacter roseus* for Current Generation ». *Environmental Science & Technology* 43 (22): 8684-89. <https://doi.org/10.1021/es901993y>.
- Katuri, Krishna P., Craig M. Werner, Rodrigo J. Jimenez-Sandoval, Wei Chen, Sungil Jeon, Bruce E. Logan, Zhiping Lai, Gary L. Amy, et Pascal E. Saikaly. 2014. « A Novel Anaerobic Electrochemical Membrane Bioreactor (AnEMBR) with Conductive Hollow-Fiber Membrane for Treatment of Low-Organic Strength Solutions ». *Environmental Science & Technology* 48 (21): 12833-41. <https://doi.org/10.1021/es504392n>.
- Khosravanipour Mostafazadeh, Ali, Patrick Drogui, Satinder Kaur Brar, Rajeshwar Dayal Tyagi, Yann Le Bihan, Gerardo Buelna, et Santatriniaina-Denise Rasolomanana. 2016. « Enhancement of Biobutanol Production by Electromicrobial Glucose Conversion in a Dual Chamber Fermentation Cell Using *C. Pasteurianum* ». *Energy Conversion and Management* 130 (décembre): 165-75. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.050>.
- Kim, Byung Hong, Swee Su Lim, Wan Ramli Wan Daud, Geoffrey Michael Gadd, et In Seop Chang. 2015. « The Biocathode of Microbial Electrochemical Systems and Microbially-Influenced Corrosion ». *Bioresource Technology* 190 (août): 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.084>.
- Kim, D, S Han, S Kim, et H Shin. 2006. « Effect of Gas Sparging on Continuous Fermentative Hydrogen Production ». *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (15): 2158-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.012>.
- Koku, Harun, İnci Eroğlu, Ufuk Gündüz, Meral Yücel, et Lemi Türker. 2002. « Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter Sphaeroides* ». *International Journal of Hydrogen Energy*, BIOHYDROGEN 2002, 27 (11): 1315-29. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1).
- Kracke, Frauke, Igor Vassilev, et Jens O. Krömer. 2015. « Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems ». *Frontiers in Microbiology* 6 (575): 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00575>.

- Krasna, Alvin I. 1979. « Hydrogenase: Properties and Applications ». *Enzyme and Microbial Technology* 1 (3): 165-72. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90023-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90023-1).
- Kubas, Adam, Christophe Orain, David De Sancho, Laure Saujet, Matteo Sensi, Charles Gauquelin, Isabelle Meynial-Salles, et al. 2017. « Mechanism of O₂ Diffusion and Reduction in FeFe Hydrogenases ». *Nature Chemistry* 9 (1): 88-95. <https://doi.org/10.1038/nchem.2592>.
- kumar, G. Gnana, V.G. Sathiya Sarathi, et Kee Suk Nahm. 2013. « Recent Advances and Challenges in the Anode Architecture and Their Modifications for the Applications of Microbial Fuel Cells ». *Biosensors and Bioelectronics* 43 (mai): 461-75. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>.
- Kundu, Anirban, Jaya Narayan Sahu, Ghufra Redzwan, et M.A. Hashim. 2013. « An Overview of Cathode Material and Catalysts Suitable for Generating Hydrogen in Microbial Electrolysis Cell ». *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (4): 1745-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.031>.
- Kuroda, Kenji, Roberto Gaifer Silveira, Naomichi Nishio, Hiroshi Sunahara, et Shiro Nagai. 1991. « Measurement of dissolved hydrogen in an anaerobic digestion process by a membrane-covered electrode ». *Journal of fermentation and bioengineering* 71 (6): 417-23.
- Lalurette, Elodie, Shivegowda Thammannagowda, Ali Mohagheghi, Pin-Ching Maness, et Bruce E. Logan. 2009. « Hydrogen Production from Cellulose in a Two-Stage Process Combining Fermentation and Electrohydrogenesis ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (15): 6201-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.112>.
- Latrille, Éric, Éric Trably, et Christian Larroche. 2011. « Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre », 27.
- L. Bräuer, Suzanna, Nathan Basiliko, Henri M. P. Siljanen, et Stephen H. Zinder. 2020. « Methanogenic Archaea in Peatlands ». *FEMS Microbiology Letters* 367 (20): fnaa172. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa172>.
- Lebranchu, Aline. 2017. « Étude du procédé de méthanation en digesteur anaérobie à l'échelle pilote: impact du mélange et du transfert gaz-liquide sur les performances de production de biogaz ».
- Lebranchu, Aline, Fabrice Blanchard, Michel Fick, Stéphane Pacaud, Eric Olmos, et Stéphane Delaunay. 2019. « Pilot-Scale Biomethanation of Cattle Manure Using Dense

- Membranes ». *Bioresource Technology* 284 (juillet): 430-36.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.140>.
- Lee, Kuo-Shing, Tzu-Shan Tseng, Yen-Wen Liu, et Yi-Dai Hsiao. 2012. « Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37: 15556-62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.039>.
- Légifrance. 2015. *Code de l'énergie. Article L100-4*. Vol. Loi n°2023-491.
https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000047717642.
- Li, Chenlin, et Herbert H. P. Fang. 2007. « 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>.
- Lim, Swee Su, Byung Hong Kim, Da Li, Yujie Feng, Wan Ramli Wan Daud, Keith Scott, et Eileen Hao Yu. 2018. « Effects of Applied Potential and Reactants to Hydrogen-Producing Biocathode in a Microbial Electrolysis Cell ». *Frontiers in Chemistry* 6.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00318>.
- Liu, Wenzong, Shihching Huang, Aijuan Zhou, Guangyu Zhou, Nanqi Ren, Aijie Wang, et Guoqiang Zhuang. 2012. « Hydrogen Generation in Microbial Electrolysis Cell Feeding with Fermentation Liquid of Waste Activated Sludge ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (18): 13859-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.090>.
- Logan, Bruce E. 2008. *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons.
- . 2009. « Exoelectrogenic Bacteria That Power Microbial Fuel Cells ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (5): 375-81. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2113>.
- Logan, Bruce E., Douglas Call, Shaoan Cheng, Hubertus V. M. Hamelers, Tom H. J. A. Sleutels, Adriaan W. Jeremiasse, et René A. Rozendal. 2008. « Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter ». *Environmental Science & Technology* 42 (23): 8630-40. <https://doi.org/10.1021/es801553z>.
- Logan, Bruce E., Ruggero Rossi, Ala'a Ragab, et Pascal E. Saikaly. 2019. « Electroactive Microorganisms in Bioelectrochemical Systems ». *Nature Reviews Microbiology* 17 (5): 307-19. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>.
- Lovley, Derek R. 2010. « Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes ». *Environmental microbiology reports* 3 (Issue1): 27-35.
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.0021.x>.

- . 2011. « Powering Microbes with Electricity: Direct Electron Transfer from Electrodes to Microbes ». *Environmental Microbiology Reports* 3 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00211.x>.
- . 2017. « Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer ». *Annual Review of Microbiology* 71 (1): 643-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020420>.
- Lovley, Derek R., John D. Coates, Elizabeth L. Blunt-Harris, Elizabeth J. P. Phillips, et Joan C. Woodward. 1996. « Humic Substances as Electron Acceptors for Microbial Respiration ». *Nature* 382 (6590): 445-48. <https://doi.org/10.1038/382445a0>.
- Makin, Stephen A., et Terrance J. Beveridge. 1996. « The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces ». *Microbiology* 142 (2): 299-307. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-2-299>.
- Mandal, Biswajit, Kaushik Nath, et Debabrata Das. 2006. « Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter Cloacae* ». *Biotechnology Letters* 28 (11): 831-35. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9008-8>.
- Marquez-Reyes, Luis A., M. del Pilar Sanchez-Saavedra, et Idania Valdez-Vazquez. 2015. « Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus* ». *International of hydrogen energy* 40: 7291-7300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.060>.
- Marsili, Enrico, Daniel B. Baron, Indraneel D. Shikhare, et Daniel R. Bond. 2008. « *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (10): 3968-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105>.
- Mashall, Christopher W., Daniel E. Ross, Erin B. Fichot, R. Sean Norman, et Harold D. May. 2012. « Electrosynthesis of Commodity Chemicals by an Autotrophic Microbial Community ». *Applied and Environmental Microbiology*, n° 78: 23. <https://doi.org/10.1128/AEM.02401-12>.
- Melitos, George, Xenofon Voulkopoulos, et Anastasia Zabaniotou. 2021. « Waste of sustainable biohydrogen production via photo-fermentation and biophotolysis - A systematic

- review ». *Renewable energy and environmental sustainability* 6: 45. <https://doi.org/10.1051/rees/2021047>.
- Menia, Sabah, Ilyés Nouicer, Yasmina Bakouri, Abdelhamid M'raoui, Hammou Tebibel, et Abdallah Khellaf. 2019. « Production d'hydrogène par procédés biologiques ». *Oil & Gas science and technology - Rev. IFP Energies nouvelles*, 2019, IFP Energies nouvelles édition, sect. 74, 34.
- Ministère de la transition écologique. 2018. « Plan de déploiement de l'hydrogène pour la transition énergétique ».
- Mitov, Mario, Ivo Bardarov, Elitsa Chorbadzhiyska, Krassimir L. Kostov, et Yolina Hubenova. 2021. « First evidence for applicability of the microbial electrochemical snorkel for metal recovery ». *Electrochemistry Communications* 122 (janvier): 106889. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106889>.
- Mizuno, Osamu, Richard Dinsdale, Freda R Hawkes, Dennis L Hawkes, et Tatsuya Noike. 2000. « Enhancement of Hydrogen Production from Glucose by Nitrogen Gas Sparging ». *Bioresource Technology*, 7.
- Mohan, S. Venkata, K. Chandrasekhar, P. Chiranjeevi, et P. Suresh Babu. 2013. « Biohydrogen Production from Wastewater ». In *Biohydrogen*, 223-57. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00010-6>.
- Mohan, S. Venkata, et Ashok Pandey. 2013. « Biohydrogen Production ». In *Biohydrogen*, 1-24. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00001-5>.
- Monlau, Florian, Abdellatif Barakat, Eric Trably, Claire Dumas, Jean-Philippe Steyer, et Hélène Carrère. 2013. « Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment ». *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43 (Issue 3): 260-322.
- Moreno, R., A. Escapa, J. Cara, B. Carracedo, et X. Gómez. 2015. « A Two-Stage Process for Hydrogen Production from Cheese Whey: Integration of Dark Fermentation and Biocatalyzed Electrolysis ». *International Journal of Hydrogen Energy* 40 (1): 168-75. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.120>.
- Morsy, Fathy Mohamed. 2017. « Synergistic Dark and Photo-Fermentation Continuous System for Hydrogen Production from Molasses by *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824 and *Rhodobacter Capsulatus* DSM 1710 ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 169 (avril): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.02.011>.

- Mosca, Lorena, Jose Antonio Medrano Jimenez, Solomon Assefa Wassie, Fausto Gallucci, Emma Palo, Michele Colozzi, Stefania Taraschi, et Giulio Galdieri. 2020. « Process Design for Green Hydrogen Production ». *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (12): 7266-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.206>.
- Moscoviz, Roman. 2017. « Electrochemical control of a biological process: glycerol electro-fermentation ». Montpellier SupAgro.
- Moscoviz, Roman, Javiera Toledo-Alarcón, Eric Trably, et Nicolas Bernet. 2016. « Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems ». *Trends in Biotechnology* 34 (11): 856-65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>.
- Moscoviz, Roman, Eric Trably, et Nicolas Bernet. 2018. « Electro-Fermentation Triggering Population Selection in Mixed-Culture Glycerol Fermentation ». *Microbial Biotechnology* 11 (1): 74-83. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12747>.
- Muyzer, Gerard, et Alfons J. M. Stams. 2008. « The Ecology and Biotechnology of Sulphate-Reducing Bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (6): 441-54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>.
- Nath, Kaushik, et Debabrata Das. 2004. « Improvement of Fermentative Hydrogen Production: Various Approaches ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (5). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1644-0>.
- . 2011. « Modeling and Optimization of Fermentative Hydrogen Production ». *Bioresource Technology* 102 (18): 8569-81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.108>.
- Ndayisenga, Fabrice, Zhisheng Yu, Jianzhong Zheng, Bobo Wang, Hongxia Liang, Irfan Ali Phulpoto, Telesphore Habiyakare, et Dandan Zhou. 2021. « Microbial Electrohydrogenesis Cell and Dark Fermentation Integrated System Enhances Biohydrogen Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes: Substrate Pretreatment towards Optimization ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 145 (juillet): 111078. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111078>.
- Ntaikou, I., G. Antonopoulou, et G. Lyberatos. 2010. « Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review ». *Waste and Biomass Valorization* 1 (1): 21-39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>.
- Nualsri, Chatchawin, Prawit Kongjan, Alissara Reungsang, et Tsuyoshi Imai. 2017. « Effect of Biogas Sparging on the Performance of Bio-Hydrogen Reactor over a Long-Term

- Operation ». Édité par Shihui Yang. *PLOS ONE* 12 (2): e0171248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171248>.
- Oey, Melanie, Anne Linda Sawyer, Ian Lawrence Ross, et Ben Hankamer. 2016. « Challenges and Opportunities for Hydrogen Production from Microalgae ». *Plant Biotechnology Journal* 14 (7): 1487-99. <https://doi.org/10.1111/pbi.12516>.
- Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. 2021. « Les modes de production de l'hydrogène ». *Les notes scientifiques de l'office*, n° 25 (avril).
- Oh, Sang-Eun, Prabha Iyer, Mary Ann Bruns, et Bruce E. Logan. 2004. « Biological Hydrogen Production Using a Membrane Bioreactor ». *Biotechnology and Bioengineering* 87 (1): 119-27. <https://doi.org/10.1002/bit.20127>.
- Otoni, Júlia Ronzella, Suzan Prado Fernandes Bernal, Tiago Joelzer Marteres, Franciele Natividade Luiz, Viviane Piccin dos Santos, Ângelo Gabriel Mari, Juliana Gaio Somer, Valéria Maia de Oliveira, et Michel Rodrigo Zambrano Passarini. 2021. « Cultured and Uncultured Microbial Community Associated With Biogas Production ». Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1107386/v1>.
- Özgür, Ebru, Nilüfer Afsar, Truus de Vrije, Meral Yücel, Ufuk Gündüz, Pieternel A.M. Claassen, et Inci Eroglu. 2010. « Potential Use of Thermophilic Dark Fermentation Effluents in Photofermentative Hydrogen Production by *Rhodobacter Capsulatus* ». *Journal of Cleaner Production* 18 (décembre): S23-28. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2010.02.020>.
- Palanisamy, Gowthami, Ho-Young Jung, T. Sadhasivam, Mahaveer D. Kurkuri, Sang Chai Kim, et Sung-Hee Roh. 2019. « A Comprehensive Review on Microbial Fuel Cell Technologies: Processes, Utilization, and Advanced Developments in Electrodes and Membranes ». *Journal of Cleaner Production* 221 (juin): 598-621. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.172>.
- Park, Jun-Gyu, Beom Lee, Hye-Rin Park, et Hang-Bae Jun. 2019. « Long-term evaluation of methane production in a bio-electrochemical anaerobic digestion reactor according to the organic loading rate ». *Bioresource Technology* 273: 478-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.021>.
- Patil, Sunil A., Falk Harnisch, Christin Koch, Thomas Hübschmann, Ingo Fetzer, Alessandro A. Carmona-Martínez, Susann Müller, et Uwe Schröder. 2011. « Electroactive Mixed Culture Derived Biofilms in Microbial Bioelectrochemical Systems: The Role of PH on

- Biofilm Formation, Performance and Composition ». *Bioresource Technology* 102 (20): 9683-90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.087>.
- Patriarca, Chiara, Elena De Luca, Claudio Felici, Luigia Lona, Valentina Mazzurco Miritana, et Giulia Massini. 2016. « Bio-production of Hydrogen and Methane Through Anaerobic Digestion Stages ». In *Enriched Methane*, édité par Marcello De Falco et Angelo Basile, 91-109. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22192-2_6.
- Paul, Avishek, Raffaele Borrelli, Houssny Bouyanfif, Sébastien Gottis, et Frédéric Sauvage. 2019. « Tunable Redox Potential, Optical Properties, and Enhanced Stability of Modified Ferrocene-Based Complexes ». *ACS OMEGA* 4: 1470-14789. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01341>.
- Pisciotta, John M., Zehra Zaybak, Douglas F. Call, Joo-Youn Nam, et Bruce E. Logan. 2012. « Enrichment of Microbial Electrolysis Cell Biocathodes from Sediment Microbial Fuel Cell Bioanodes ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (Issue 15). <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-12>.
- Qu, Youpeng, Yujie Feng, Xin Wang, et Bruce E. Logan. 2012. « Use of a Coculture To Enable Current Production by *Geobacter sulfurreducens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (9): 3484-87. <https://doi.org/10.1128/AEM.00073-12>.
- Rajhi, Haifa, Daniel Puyol, Mirna C. Martínez, Emiliano E. Díaz, et José L. Sanz. 2016. « Vacuum Promotes Metabolic Shifts and Increases Biogenic Hydrogen Production in Dark Fermentation Systems ». *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 10 (3): 513-21. <https://doi.org/10.1007/s11783-015-0777-y>.
- Reeve, Holly A., Philip A. Ash, HyunSeo Park, Ailun Huang, Michalis Posidias, Chloe Tomlinson, Oliver Lenz, et Kylie A. Vincent. 2017. « Enzymes as Modular Catalysts for Redox Half-Reactions in H₂-Powered Chemical Synthesis: From Biology to Technology ». *Biochemical Journal* 474 (2): 215-30. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160513>.
- Remigy, Jean-Christophe, et Sandrine Desclaux. 2007. « Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules », 27.
- Ren, Nanqi, Defeng Xing, Bruce E. Rittmann, Lihua Zhao, Tianhui Xie, et Xin Zhao. 2007. « Microbial Community Structure of Ethanol Type Fermentation in Bio-Hydrogen Production ». *Environmental Microbiology* 9 (5): 1112-25. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01234.x>.

- Renaudie, Marie, Christine Dumas, Stéphane Vuilleumier, et Barbara Ernst. 2021. « Biohydrogen Production in a Continuous Liquid/Gas Hollow Fiber Membrane Bioreactor: Efficient Retention of Hydrogen Producing Bacteria via Granule and Biofilm Formation ». *Bioresource Technology* 319 (janvier): 124203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124203>.
- Ringeisen, Bradley R., Emily Henderson, Peter K. Wu, Jeremy Pietron, Ricky Ray, Brenda Little, Justin C. Biffinger, et Joanne M. Jones-Meehan. 2006. « High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10 ». *Environmental Science & Technology* 40 (8): 2629-34. <https://doi.org/10.1021/es052254w>.
- Rivalland, Caroline, Fatima Radouani, Silvina Gonzalez-Rizzo, Florent Robert, et Paule Salvin. 2022. « Enrichment of Clostridia enhances Geobacter population and electron harvesting in a complex electroactive biofilm ». *Bioelectrochemistry* 143 (107954). <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107954>.
- Rogińska, Joanna, Michel Perdicakis, Cédric Midoux, Théodore Bouchez, Christelle Despas, Liang Liu, Jiang-Hao Tian, et al. 2021. « Electrochemical Analysis of a Microbial Electrochemical Snorkel in Laboratory and Constructed Wetlands ». *Bioelectrochemistry* 142 (décembre): 107895. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107895>.
- Rozendal, René A., Hubertus V.M. Hamelers, Redmar J. Molenkamp, et Cees J.N. Buisman. 2007. « Performance of Single Chamber Biocatalyzed Electrolysis with Different Types of Ion Exchange Membranes ». *Water Research* 41 (9): 1984-94. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.019>.
- Rozendal, René A, Adriaan W Jeremiasse, Hubertus V M Hamelers, et Cees J N Buisman. 2008. « Hydrogen Production with a Microbial Biocathode », 6.
- Rte. 2020. « La transition vers un hydrogène bas carbone : Atouts et enjeux pour le système électrique à l'horizon 2030-2035 ». <https://assets.rte-france.com/prod/public/2020-07/rapport%20hydrogene.pdf>.
- Saint-Amans, Sylvie, Laurence Girbal, Jose Andrade, Kerstin Ahrens, et Philippe Soucaille. 2001. « Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium Butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures ». *Journal of Bacteriology* 183 (5): 1748-54. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1748-1754.2001>.

- Sander, R. 2015. « Compilation of Henry(s law constants (version 4.0) for water as solvent ». *Atmospheric chemistry and physics* 15: 4399-4987. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>.
- Schaetzle, Olivier, Frédéric Barrière, et Keith Baronian. 2008. « Bacteria and Yeasts as Catalysts in Microbial Fuel Cells: Electron Transfer from Micro-Organisms to Electrodes for Green Electricity ». *Energy & Environmental Science* 1 (6): 607. <https://doi.org/10.1039/b810642h>.
- Schievano, Andrea, Tommy Pepé Sciarria, Karolien Vanbroekhoven, Heleen De Wever, Sebastiaà Puig, Stephen J. Andersen, Korneel Rabaey, et Deepak Pant. 2016. « Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications ». *Trends in Biotechnology* 34 (11): 866-78. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>.
- Smida, Hassiba. 2018 « Modulation de l'interface entre biofilms microbiens électroactifs et surface d'électrode: modifications de surface et effets de milieu ».
- Stephenson, Marjory, et Leonard Hubert Stickland. 1930. « XXVII. HYDROGENASE: A BACTERIAL ENZYME ACTIVATING MOLECULAR HYDROGEN. I. THE PROPERTIES OF THE ENZYME. », 10.
- Sutherland, I.W. 1982. « Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides ». *Advances in Microbial physiology* 23: 79-150. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60336-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60336-7).
- Tang, Yue, Dandan Deng, Lei Zhou, Yujing Jiang, Yamei Ma, Guangwen Tian, et Ying Liu. 2017. « Analysis of electricity generation and community of electroactive biofilms enriched from various wastewater treatment stages ». *Journal of electroanalytical chemistry* 803: 72-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.09.004>.
- Tartakovsky, B, M Manuel, H Wang, et S Guiot. 2009. « High Rate Membrane-Less Microbial Electrolysis Cell for Continuous Hydrogen Production ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (2): 672-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.003>.
- Tenca, Alberto, Roland D. Cusick, Andrea Schievano, Roberto Oberti, et Bruce E. Logan. 2013. « Evaluation of Low Cost Cathode Materials for Treatment of Industrial and Food Processing Wastewater Using Microbial Electrolysis Cells ». *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (4): 1859-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.103>.
- Thapa, Bhim Sen, Taeyoung Kim, Soumya Pandit, Young Eun Song, Yasamin Pesaran Afsharian, Mostafa Rahimnejad, Jung Rae Kim, et Sang-Eun Oh. 2021. « Overview of electroactive

- microorganisms and electron transfer mechanisms in microbial electrochemistry ». *Bioresource Technology* 347 (126579). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126579>.
- Thauer, Rudolf K., Kurt Jungermann, et Karl Decker. 1977. « Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria ». *Bacteriological reviews* 41 (1): 100-180.
- Theuerl, Susanne, Johanna Klang, Monika Heiermann, et Jo De Vrieze. 2018. « Marker microbiome clusters are determined by operational parameters and specific key taxa combinations in anaerobic digestion ». *Bioresource Technology* 263: 128-35. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.111>.
- Tillmann Stiebritz, Martin, et Markus Reiher. 2012. « Hydrogenases and oxygen ». *Chemical Science* 3: 1739-51. <https://doi.org/10.1039/c2sc01112c>.
- Trably, Eric, Gwendoline Christophe, Eric Latrille, et Christian Larroche. 2018. « Production de biohydrogène - Voie fermentaire sombre », 35.
- Vandecandelaere, Ilse, Olivier Narcessian, Marco Faimali, Eveline Segart, Alfonso Mollica, Wafa Achouak, Paul De vos, et Peter Vandamme. 2010. « Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm ». *Bioelectrochemistry* 78: 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.07.004>.
- Vedel, Jacques, et Bernard Trémillon. 1959. « Voltamétrie du système hydrogène-acide perchlorique dans l'acétonitrile, à une électrode de platine platiné : Préparation coulométrique d'une solution anhydre d'acide perchlorique dans l'acétonitrile ». *Journal of electroanalytical chemistry* 1: 247.
- Venzlaff, Hendrik, Dennis Enning, Jayendran Srinivasan, Karl J. J. Mayrhofer, Achim Walter Hassel, Friedrich Widdel, et Martin Stratmann. 2013. « Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria ». *Corrosion Science* 66 (janvier): 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2012.09.006>.
- Wall, Judy D., et Lee R. Krumholz. 2006. « Uranium Reduction ». *Annual Review of Microbiology* 60 (1): 149-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121357>.
- Wang, Aijie, Dan Sun, Guangli Cao, Haoyu Wang, Nanqi Ren, Wei-Min Wu, et Bruce E. Logan. 2011. « Integrated Hydrogen Production Process from Cellulose by Combining Dark Fermentation, Microbial Fuel Cells, and a Microbial Electrolysis Cell ». *Bioresource Technology* 102 (5): 4137-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.137>.

- Wang, J, et W Wan. 2008. « Effect of Temperature on Fermentative Hydrogen Production by Mixed Cultures ». *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (20): 5392-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.010>.
- Wang, Qiyan, Xiaomei Gao, Yunyan Yang, Caixia Zou, Yingbai Yang, et Bo Lin. 2020. « A Comparative Study on Rumen Ecology of Water Buffalo and Cattle Calves under Similar Feeding Regime ». *Veterinary Medicine and Science* 6 (4): 746-54. <https://doi.org/10.1002/vms3.302>.
- Wang, Yun-Kun, Guo-Ping Sheng, Bing-Jing Shi, Wen-Wei Li, et Han-Qing Yu. 2013. « A Novel Electrochemical Membrane Bioreactor as a Potential Net Energy Producer for Sustainable Wastewater Treatment ». *Scientific Reports* 3 (1): 1864. <https://doi.org/10.1038/srep01864>.
- Wang, Yun-Qi, Fang Zhang, Wei Zhang, Kun Dai, Hua-Jie Wang, Xue Li, et Raymond Jianxiong Zeng. 2018. « Hydrogen and Carbon Dioxide Mixed Culture Fermentation in a Hollow-Fiber Membrane Biofilm Reactor at 25 °C ». *Bioresource Technology* 249 (février): 659-65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.054>.
- Werner, Craig M., Krishna P. Katuri, Ananda Rao Hari, Wei Chen, Zhiping Lai, Bruce E. Logan, Gary L. Amy, et Pascal E. Saikaly. 2016. « Graphene-Coated Hollow Fiber Membrane as the Cathode in Anaerobic Electrochemical Membrane Bioreactors – Effect of Configuration and Applied Voltage on Performance and Membrane Fouling ». *Environmental Science & Technology* 50 (8): 4439-47. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02833>.
- Wirth, Roland, Etelka Kovács, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, et Kornél L Kovács. 2012. « Characterization of a Biogas-Producing Microbial Community by Short-Read next Generation DNA Sequencing ». *Biotechnology for Biofuels* 5 (1): 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>.
- Xiao, Yong, Enhua Zhang, Jingdong Zhang, Youfen Dai, Zhaohui Yang, Hans E.M. Christensen, Jens Ulstrup, et Feng Zhao. 2017. « Extracellular Polymeric Substances Are Transient Media for Microbial Extracellular Electron Transfer ». *Science Advances* 3: 1-8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700623>.
- Xu, Shuai, Yamini Jangir, et Mohamed Y. El-Naggar. 2016. « Disentangling the Roles of Free and Cytochrome-Bound Flavins in Extracellular Electron Transport from *Shewanella*

- Oneidensis MR-1 ». *Electrochimica Acta* 198 (avril): 49-55.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.074>.
- Yakunin, Alexander F., et Patrick C. Hallenbeck. 1998. « Short-term regulation of nitrogenase activity by NH₄⁺ in *Rhodobacter capsulatus*: Multiple in vivo nitrogenase responses to NH₄⁺ addition ». *Journal of bacteriology* 180 (23): 6392-95.
- . 2002. « AmtB is necessary for NH₄⁺ - induced nitrogenase switch-off and ADP-Ribosylation in *Rhodobacter capsulatus* ». *Journal of Bacteriology* 184 (15): 4081-88.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4081-4088.2002>.
- Yokoyama, Hiroshi, Hideyuki Ohmori, Miyoko Waki, Akifumi Ogino, et Yasuo Tanaka. 2009. « Continuous Hydrogen Production from Glucose by Using Extreme Thermophilic Anaerobic Microflora ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (1): 64-66.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.09.010>.
- Zagrodnik, R., et M. Łaniecki. 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 (janvier): 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.060>.
- Zaybak, Zehra, John M. Pisciotta, Justin C. Tokash, et Bruce E. Logan. 2013. « Enhanced Start-up of Anaerobic Facultatively Autotrophic Biocathodes in Bioelectrochemical Systems ». *Journal of Biotechnology* 168 (4): 478-85.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.001>.
- Zhang, Tian, ChangZheng Cui, Xinping Ai, Hanxi Yang, Ping Shen, et Zhenrong Peng. 2006. « A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of *Escherichia coli* ». *The royal society of chemistry, Chem commun.*, 2257-59.
<https://doi.org/10.1039/b600876c>.
- Zhou, Miaomiao, Jun Zhou, Ming Tan, Juan Du, Binghua Yan, Jonathan W.C. Wong, et Yang Zhang. 2017. « Enhanced Carboxylic Acids Production by Decreasing Hydrogen Partial Pressure during Acidogenic Fermentation of Glucose ». *Bioresource Technology* 245 (décembre): 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.152>.
- Zhu, Huguang, et Michel Béland. 2006. « Evaluation of Alternative Methods of Preparing Hydrogen Producing Seeds from Digested Wastewater Sludge ». *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (14): 1980-88. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.01.019>.

Zuo, Yi, Defeng Xing, John M. Regan, et Bruce E. Logan. 2008. « Isolation of the Exoelectrogenic Bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by Using a U-Tube Microbial Fuel Cell ». *Applied and Environmental Microbiology* 74 (10): 3130-37. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-07>.