

Effets de la pression partielle en hydrogène sur la production anaérobie de bioH₂ par une bactérie chimiotrophe du genre *Clostridium* dans un nouveau réacteur à cylindre horizontal rotatif.

Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor.

BECKERS Laurent^{a*}, HILIGSMAN Serge^a, MASSET Julien^a, HAMILTON Christopher^a et THONART Philippe^a

^aCWBI – Université de Liège
Bd du Rectorat 29 B.40 – P.70, B-4000 Liège, Belgique

Résumé

La production de biohydrogène par des bactéries anaérobies chimiotrophes est une voie d'avenir permettant la production d'hydrogène « vert » à partir de nombreux substrats. Afin d'augmenter les rendements et taux de production du biohydrogène, un nouveau réacteur à biohydrogène, appelé « bioréacteur à cylindre horizontal rotatif », a été développé. Il permet la production d'hydrogène en continu avec la souche *Clostridium butyricum* sp. à partir de glucose et atteint de bons rendements ($1,9\text{mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$) ainsi que de bonnes productivités ($48,6\text{mmol}_{\text{H}_2}\cdot\text{l}_{\text{milieu}}^{-1}\cdot\text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Le cylindre rotatif sur lequel les bactéries sont fixées permet un transfert efficace du biogaz (essentiellement l'hydrogène) du liquide où il est produit vers la phase gazeuse. Cette technique permet de favoriser les voies métaboliques bactériennes qui mènent à la production d'hydrogène. Cette hypothèse a été vérifiée en modifiant la pression totale au sein du bioréacteur. Une augmentation de pression de 0,18bar diminue les rendements de 19,5% tandis qu'une diminution de 0,11bar les améliore de 7%. Ce travail met en évidence l'importance du transfert liquide-gaz dans les réacteurs producteurs de biohydrogène qui permet d'atteindre des rendements et des taux de production plus élevés.

Mots-clés : biohydrogène, fermentation anaérobie, *Clostridium*, H₂ pression partielle, bioréacteur

Abstract

The fermentative production of hydrogen using chemotrophic anaerobic bacteria offers a new way to produce “green” energy from a large variety of renewable resources and organic wastes. In order to produce hydrogen at high yields and production rates, efficient bioreactors must be designed. A new reactor called “horizontal rotating cylinder bioreactor” allows the production of biohydrogen from glucose with the selected *Clostridium* sp. strain at high yields ($1,9\text{mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$) and production rates ($48,6\text{mmol}_{\text{H}_2}\cdot\text{l}_{\text{milieu}}^{-1}\cdot\text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). The rotative cylinder where the bacteria are fixed enables efficient gas transfer (mainly hydrogen) from the liquid phase where it is produced by the bacteria. This is an important way to allow the bacteria metabolism to shift in a fermentation pathway that produces more hydrogen. This was confirmed by varying the total pressure in the bioreactor. An increase of the total pressure 0,18bar lowered the yields of 19,5% while a decrease of 0,11bar increased the yields of 7%. Our work concludes the importance of providing good liquid to gas transfers in the biohydrogen-producing reactors in order to reach higher yields and production rates.

Key-words : biohydrogen, dark fermentation, *Clostridium*, H₂ partial pressure, bioreactor

1. Introduction

L'hydrogène est aujourd'hui considéré comme un élément jouant un rôle incontournable dans le système énergétique du futur. Les recherches et développements sur la production d'hydrogène « vert » se

* Auteur/s à qui la correspondance devrait être adressée : lbeckers@ulg.ac.be

tourment notamment vers la production d'hydrogène par voie microbiologique (Hallenbeck and Benemann 2002), en vue d'un éventuel couplage avec le traitement des eaux usées provenant de l'industrie alimentaire (Das 2009). Les bactéries chimiotrophes du genre *Clostridium* consomment les molécules organiques hydrocarbonées dans un milieu anaérobie strict afin d'assurer leur croissance ainsi qu'une production d'hydrogène et de divers métabolites retrouvés en solution. Ces bactéries présentent de nombreux avantages quant aux substrats qu'elles peuvent utiliser, aux rendements de production atteints, ... (Lin et al. 2007). La compréhension des phénomènes permettant d'atteindre de bonnes performances est essentielle afin de pouvoir imaginer une application future de réacteurs producteurs d'hydrogène à grande échelle.

Parmi les différents paramètres de culture largement investigués dans la littérature scientifique, l'inhibition que crée l'hydrogène dissout dans le milieu sur sa propre production par les microorganismes est régulièrement cité bien que tous les mécanismes biochimiques n'aient pas encore été éclaircis (Das and Veziroglu 2001). Plusieurs auteurs ont en effet discuté de l'influence de l'hydrogène sur les enzymes qui permettent la succession de réaction chimique aboutissant à la réduction de protons en hydrogène (Angenent et al. 2004; Hawkes et al. 2002). Bien qu'aucune corrélation claire entre la quantité d'hydrogène dissout dans le milieu et les performances atteintes n'ait été, à notre connaissance, publiée, ces recherches ont été complétées par des études montrant l'effet d'un dégazage du milieu entraînant la diminution de la concentration en gaz dissouts (Kraemer and Bagley 2008; Mizuno et al. 2000). Dès lors, la diminution de la concentration en hydrogène dissout, qui peut se réaliser par l'amélioration de son transfert depuis la phase liquide vers la phase gazeuse, est une voie importante permettant d'augmenter les performances de production d'hydrogène par les microorganismes.

La quantité Q de gaz transférée au travers d'une interface liquide-gaz exprimée par unité de temps et de volume de liquide est donnée par l'équation (1) et dépend, d'une part, du coefficient global de transfert $k_L a$ lié aux conditions de mélange du milieu, et, d'autre part, du potentiel moteur du transfert $P_G - P_G^\circ$ lié à la pression partielle et la concentration du gaz dissout, la constante d'Henry (He) étant liée à la nature du gaz envisagé (Treybal 1980).

$$Q = k_L a \cdot He^{-1} \cdot (P_G - P_G^\circ) \quad (1)$$

Dans cette étude, un bioréacteur original, appelé réacteur à cylindre horizontal rotatif, a été investigué. De par son design, il développe une grande surface spécifique d'échange liquide-gaz. Par ailleurs, l'effet du potentiel moteur de transfert de l'équation (1) a été étudié en variant la pression totale au sein du réacteur.

2. Matériel et méthodes

Le bioréacteur à cylindre horizontal rotatif investigué dans cette étude est constitué d'une cuve de 2,3L en forme d'obus placée horizontalement et équipée d'une double paroi en verre dans laquelle un courant d'eau thermostatisée maintient la température à 30°C. La cuve est hermétiquement fermée par un couvercle en métal inoxydable muni de tubulures assurant l'alimentation en milieu de fermentation ainsi que la sortie de produits gazeux et liquides. Dans la cuve, tourne horizontalement et en permanence à la vitesse de 2,1tpm un cylindre servant de support aux microorganismes inoculés dans le fermenteur (figure 1). L'axe mobile d'agitation horizontal est muni d'une armature cylindrique en toile de polypropylène de 20x9cm sur laquelle est enroulée une membrane en fibres de verre sur une épaisseur de 5mm et protégée de la désagrégation par un filet en polypropylène de surface maillée par des motifs carrés de l'ordre de 1mm². Ce cylindre est utilisée comme site de fixation des microorganismes afin d'éviter leur perte par le lessivage du milieu. Un dispositif en hélice fixé sur le cylindre permet l'agitation du milieu liquide stagnant dans le fond du réacteur et sa répartition sur la membrane.

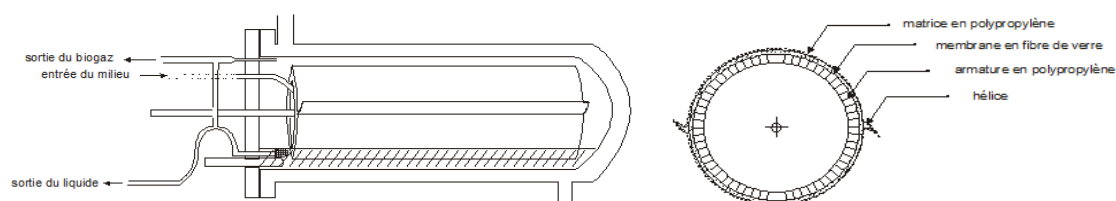


Figure 1 : à gauche : cuve du réacteur à cylindre horizontal rotatif ; à droite : coupe transversale du cylindre

Le milieu d'alimentation MDT décrit par Hiligsmann et al (2011) ajusté à $12,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose est injecté au sein du cylindre rotatif à un débit de 80mL/h . Le pH de ce milieu est ajusté entre 8,5 et 10,5 avant stérilisation par ajout de NaOH afin de réguler de manière indirecte le pH dans le bioréacteur. Celui-ci est mesuré en continu au moyen d'une sonde WTW pHSenTix 41 introduite par un des orifices du couvercle. Par ailleurs, le pH et le potentiel redox ont été mesurés quotidiennement sur les prélèvements liquides pris en sortie de fermenteur. Des échantillons pour analyse HPLC sont réalisés à partir de ces prélèvements selon la méthode décrite par Beckers et al. (2010) permettant de déterminer les concentrations en solutés organiques dans le milieu (glucose, éthanol, acides gras volatils, ...). Une tubulure en provenance du bioréacteur est connectée à la fiole d'alimentation afin d'équilibrer les pressions sans mettre le milieu en contact avec de l'oxygène atmosphérique.

Une tubulure plongeant dans le bas du réacteur sert d'évacuation aux effluents liquides du milieu qui s'écoulent par gravité jusqu'à une bouteille fermée hermétiquement servant de réceptacle aux effluents liquides. Cette bouteille d'évacuation est acidifiée par ajout de H_3PO_4 afin d'éviter toute activité bactérienne supplémentaire à celle du bioréacteur. Le volume liquide à l'intérieur du bioréacteur peut légèrement varier entre les évacuations naturelles de liquide, mais est globalement considéré comme fixé à 300ml tout au long des expériences réalisées. L'ensemble des périphériques d'alimentation de milieu et d'évacuation des gaz est schématisé sur la figure 2.

Le biogaz produit (H_2 et CO_2) passe par le volume gazeux du récipient d'effluents liquides pour être ensuite évacué par la sortie des gaz via un filtre Sartorius Midisart de $0,2\mu\text{m}$ menant au dispositif permettant de mesurer le volume gazeux produit. Ce dernier est constitué d'une colonne graduée de 1,75m de hauteur (38L) en plexiglas, fermée hermétiquement et remplie d'eau. L'arrivée de gaz se fait par le sommet de la colonne tandis que le bas est connecté à une tubulure afin de récupérer l'eau qui s'écoule. La production de biogaz provoque le déplacement de l'eau récoltée dans un récipient annexe. Afin d'éviter toute erreur de différence de pression, les niveaux d'eau dans la colonne et de la tubulure d'évacuation sont placés à mêmes hauteurs. Pour mettre l'ensemble du dispositif en dépression, la sortie d'eau de la colonne est placée plus bas que celle-ci. Pour mettre le dispositif en surpression, l'arrivée de gaz est connectée au pied de la colonne et, lorsque le système est sous pression suffisante, les bulles de biogaz peuvent vaincre la hauteur d'eau et remonter du pied de la colonne jusqu'à son sommet. Le biogaz récolté est constitué d'un mélange d'hydrogène, de dioxyde de carbone et d'azote (provenant des purges des bouteilles d'effluents liquides du réacteur). La constitution du biogaz a été quantifiée à intervalles réguliers par chromatographie en phase gazeuse tel que décrit par Hamilton et al. (2010).

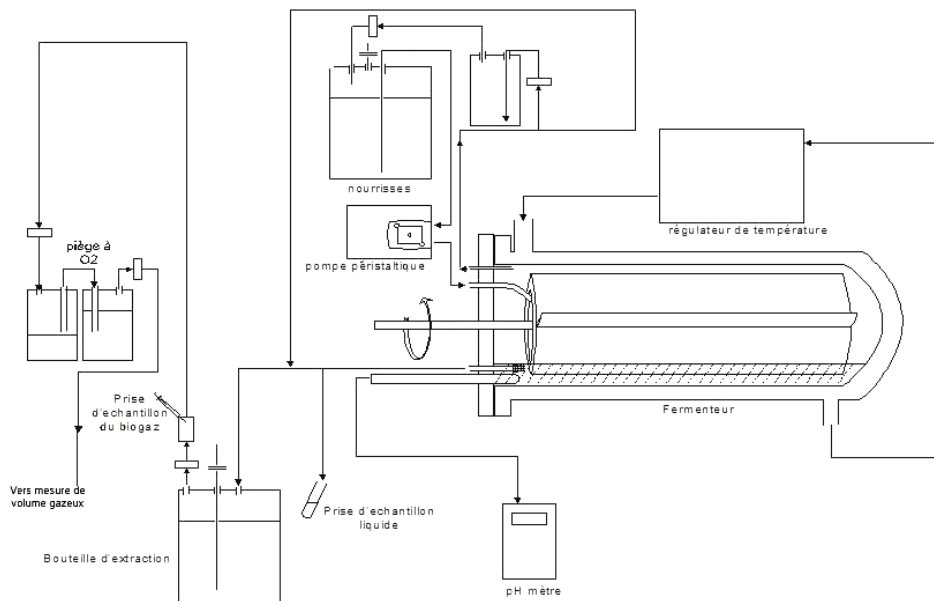


Figure 2 : schéma du réacteur à cylindre horizontal rotatif, du système d'alimentation en milieu frais, d'évacuation du milieu usagé et des tubulures de connexion entre ces éléments.

Le réacteur a été inoculé stérilement par la souche *Clostridium butyricum* CWBI sp1009 (Masset et al. 2010). Lors des manipulations précédant cette étude, le réacteur a été contaminé par une souche aérobie facultative observée par test de pureté PCA (Beckers et al. 2010). C'est en l'état que le bioréacteur a été utilisé et que les expériences ont été réalisées.

3. Résultats et discussion

Le maintien du bioréacteur en mode quasi-stationnaire a été assuré tout au long des 57 jours de manipulations. Un volume total de 260L de biogaz contenant 65% de H₂ pour 35% de CO₂ a été produit et aucune trace de méthane n'a pu être détectée. La biomasse présente sur le biodisque et dans le milieu liquide stagnant au fond de la cuve est restée à un niveau stable (mesure de matière sèche sur les effluents liquide : $1,25 \pm 0,16 \text{ g}_{\text{MS}} \pm \text{L}^{-1}$), le potentiel rédox était inférieur à -150mV assurant l'anaérobiose du milieu et le pH a été stabilisé entre 4,9 et 5,3.

Les rendements de production d'hydrogène, exprimés en moles d'hydrogène par moles de glucose consommé et calculés sur base des volumes de biogaz mesurés et des dosages de glucose dans le milieu sortant (glucose non consommé) montrent une courbe en dents de scie suivant l'allure des variations de pH dans le réacteur (figure 3). En effet, Masset et al. (2010) ont montré que le pH a une grande influence sur la production d'hydrogène, le pH optimal de production se situant entre 5,2 et 5,3, et atteignent des rendements et taux de production comparables à ceux obtenus dans cette étude, soit $1,27 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ en conditions défavorables (pH trop faible) et $1,9 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ au pH optimal. Les débits d'hydrogène suivent les mêmes tendances et atteignent respectivement 9,5 et $14,6 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Les volumes liquides mis en jeu dans l'étude de Masset et al. (2010) (2,5L de milieu liquide) sont toutefois nettement plus importants que ceux présentés ici (0,3L) de telle manière que les taux de production spécifique atteints dans le bioréacteur horizontal leur sont plus de 50 fois supérieurs ($48,6 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{l}_{\text{milieu}}^{-1} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

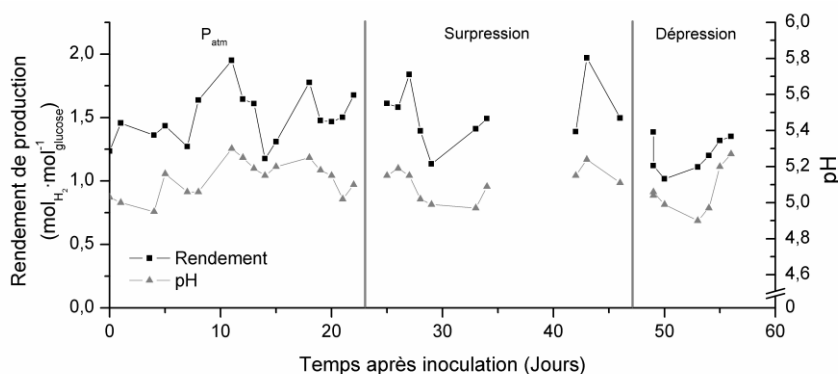


Figure 3 : évolution des rendements de production et du pH au cours de la fermentation du bioréacteur.

Les rendements et taux de production sont inférieurs de 15% à ceux obtenus avant la contamination du réacteur par une souche aérobie facultative (jusqu'à $2,6 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$), dans la mesure où cette dernière consomme une partie du glucose alimenté sans produire d'hydrogène. L'influence de cette activité métabolique parasite au sein du réacteur sera constatée en observant les métabolites en solution. Il est toutefois utile de noter que la présence de ce contaminant n'empêche pas la production d'hydrogène.

D'autres données issues de la littérature scientifique montrent des rendements de conversion à partir de glucose qui sont généralement inférieurs à $2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ dans des réacteurs de production classiques (AnSBR, UASB). Mizuno et al. (2000) rapportent un rendement de $1,43 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$, Zhang et al. (2006) de 2 et Van Ginkel et Logan (2005) de 1,7. Les productivités, quant à elles, varient en fonction de la méthode de concentration de la biomasse. Les réacteurs à biomasse fixée atteignent par exemple $58,9 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{l}_{\text{milieu}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Chang et al. 2002), $105,3 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{l}_{\text{milieu}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Zhang et al. 2007). Cependant, ce gain en productivité se fait souvent au détriment du rendement, pour des temps de rétentions hydrauliques faibles et une alimentation importante en substrat carboné.

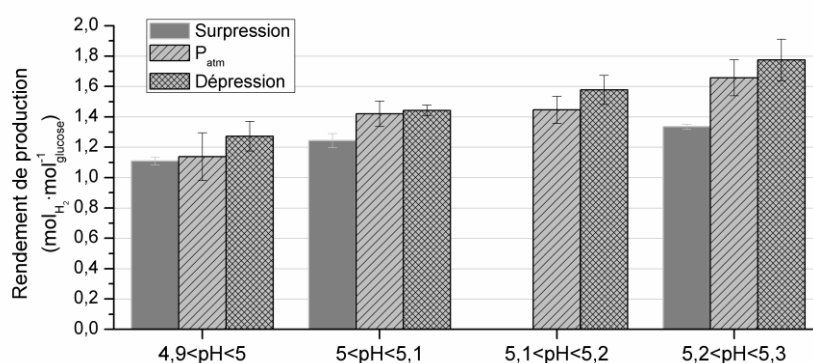


Figure 4 : rendement de productions en fonctionnement en surpression de 0,18bar, à pression atmosphérique et en dépression de 0,11bar regroupés par gamme de pH de 0,1 unité.

Les trois conditions de pression totales testées (pression atmosphérique, dépression de 0,11bar et surpression de 0,18bar) appliquées successivement au bioréacteur sont donc largement dépendantes du pH du milieu dans lequel les bactéries produisent le biohydrogène. Dès lors, afin de distinguer l'influence des différentes conditions de fermentation appliquées, les données ont été regroupées par tranche de 0,1 unité de pH afin de comparer les rendements et débits obtenus dans des gammes restreintes de conditions de fonctionnement (figure 4). Les valeurs moyennes obtenues aux différentes gammes de pH et selon la pression totale mettent en évidence l'influence de ces deux facteurs. Non seulement un pH bien régulé permet une production accrue d'hydrogène (valeurs maximales au pH optimal), mais aussi la pression de fonctionnement du réacteur, donc la pression partielle en hydrogène dans la phase gazeuse et la vitesse de transfert de l'hydrogène (équation 1), influence également la production d'hydrogène en la favorisant si elle est diminuée. En effet, la diminution de pression engendre, dans les conditions de pH optimales, une augmentation de rendement de 24% en diminuant la pression de 1,18 à 1bar absolu, de 9% supplémentaire en abaissant la pression à 0,89bar, et une augmentation de taux de production de respectivement 55 ml_{H₂}·h⁻¹ et de 15ml_{H₂}·h⁻¹ correspondant à un gain de 12% par rapport aux conditions normales de fonctionnement. Cette augmentation significative est par ailleurs observée pour toutes les tranches de 0,1 unités de pH. Elle peut être expliquée par le meilleur transfert gazeux suite à la diminution de pression, ayant pour effet une diminution de l'hydrogène dissout perçu par la bactérie et facilitant l'emprunt de voies métaboliques favorisant sa production.

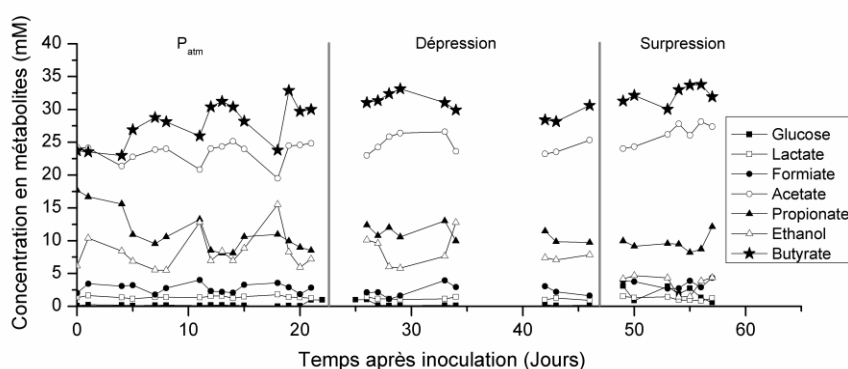


Figure 5 : concentration en métabolites en solution au cours de la fermentation dans le bioréacteur.

Les concentrations en métabolites liquides (figure 5) ne permettent pas de distinguer de différences entre les conditions de pression appliquées du réacteur. Le propionate et l'éthanol présents dans le réacteur témoignent de la présence du contaminant dans la mesure où ces métabolites ne sont pas produits par *Clostridium butyricum* CWBI sp1009 dans les conditions de pH et de renouvellement du milieu tels que rencontrés dans ce travail (Masset et al. 2010). Néanmoins, la concentration stable au cours du temps en propionate montre que le contaminant se maintient sans supplanter ni être supplanté par la souche CWBI sp1009. Enfin, le glucose est totalement consommé, exception faite de la période en surpression. Cela

peut témoigner à nouveau de l'inhibition causée par l'hydrogène empêchant par ailleurs la consommation de la totalité du glucose.

3. Conclusions

Le bioréacteur original présenté dans cette étude a permis la production stable d'hydrogène sur une période de 60 jours. Il a atteint des performances comparables aux réacteurs cités dans la littérature en terme de rendements de production, ce malgré la présence d'un contaminant dans le milieu. Il a par ailleurs montré de grands avantages quant aux productivités atteintes, grâce à son système de fixation bactérienne. Enfin, son fonctionnement dans différentes conditions de pression totale a permis de mettre en évidence des variations de performances soulignant l'influence que joue l'hydrogène dissout dans le milieu sur sa propre production par la souche bactérienne.

Références

- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., and Domiguez-Espinosa, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.*, **22**(9), 477-485.
- Beckers, L., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Masset, J., and Thonart, P., 2010. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* cwbi1009 and *Citrobacter freundii* cwbi952 in pure and mixed cultures. *Biotechnol Agron Soc Environ*, **14**, 541-548.
- Chang, J. S., Lee, K. S., and Lin, P. J., 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1167-1174.
- Das, D., 2009. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *Int. J. Hydrogen Energy*, **34**(17), 7349-7357.
- Das, D., and Veziroglu, T. N., 2001. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*, **26**(1), 13-28.
- Hallenbeck, P. C., and Benemann, J. R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1185-1193.
- Hamilton, C., Hiligsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., and Thonart, P., 2010. Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* cwbi952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode. *Int. J. Hydrogen Energy*, **35**(3), 1089-1098.
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., and Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1339-1347.
- Hiligsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., Beckers, L., and Thonart, P., 2011. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresour. Technol.*, **102**(4), 3810-3818.
- Kraemer, J. T., and Bagley, D. M., 2008. Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**(22), 6558-6565.
- Lin, P. Y., Whang, L. M., Wu, Y. R., Ren, W. J., Hsiao, C. J., Li, S. L., and Chang, J. S., 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**, 1728-1735.
- Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., and Thonart, P., 2010. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* cwbi1009. *Int. J. Hydrogen Energy*, **35**(8), 3371-3378.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., and Noike, T., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.*, **73**(1), 59-65.
- Treybal, R. E., 1980. *Mass-transfer operations*. McGraw-Hill.
- Van Ginkel, S. W., and Logan, B., 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Res.*, **39**(16), 3819-3826.
- Zhang, H. S., Bruns, M. A., and Logan, B. E., 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res.*, **40**(4), 728-734.
- Zhang, Z. P., Tay, J. H., Show, K. Y., Yan, R., Liang, D. T., Lee, D. J., and Jiang, W. J., 2007. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(2), 185-191.

Remerciements

L. Beckers remercie le FRS-FNRS (Fonds de la Communauté française de Belgique pour la Recherche Scientifique) pour le soutien accordé à son travail et à ses recherches. Ce travail est également le résultat d'une Action de Recherche Concertée (ARC-07/12-04) financée par la Communauté française de Belgique.