

Production de bioénergies à partir de déchets : Exemples du biométhane et du biohydrogène

César Arturo Aceves-Lara, Eric Trably, Juan-Rodrigo Bastidas-Oyenadel, Ivan Ramirez, Eric Latrille et Jean-Philippe Steyer

INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Étangs, 11100 Narbonne, France

Auteur correspondant : Jean-Philippe Steyer, steyer@supagro.inra.fr

Reçu le 19 mai 2008

Résumé – Ce nouveau siècle présente plusieurs défis environnementaux : La distribution d'eau potable, le réchauffement planétaire et l'obtention de nouvelles sources d'énergie en substitution des combustibles fossiles en sont les plus cruciaux. Ces deux derniers sont intimement liés car la majeure partie du dioxyde de carbone (CO₂), considéré comme le principal responsable de l'effet de serre, est issu de l'utilisation de combustibles fossiles. Ainsi, les nouvelles sources d'énergie devront avoir comme caractéristique principale un bilan presque nul en CO₂. Parmi elles, les voies de production de bioénergie à partir de déchets sont tout particulièrement intéressantes : Notamment, une première voie, relativement ancienne, est liée à la production de méthane par digestion anaérobie. Une seconde possibilité, beaucoup plus récente et innovante, repose sur la production d'hydrogène par des écosystèmes microbiens.

Mots clés : Bioénergie / biogaz / méthane / hydrogène / déchets

Abstract – Bioenergy production from waste: Examples of biomethane and biohydrogen.

This new century addresses several environmental challenges among which distribution of drinking water, global warming and availability of novel renewable energy sources to substitute for fossil fuels are of utmost importance. The last two concerns are closely related because the major part of carbon dioxide (CO₂), considered as the main cause of the greenhouse effect, is widely produced from fossil fuel combustion. Renewable energy sources fully balanced in CO₂ are therefore of special interest, especially the issue of biological production from organic wastes. Among the possibilities of bioenergy production from wastes, two approaches are particularly interesting: The first one is relatively old and related to the production of biomethane by anaerobic digestion while the second one, more recent and innovative, relies on biohydrogen production by microbial ecosystems.

Key words: Bioenergy / biogas / methane / hydrogen / waste

La production de biométhane

La découverte du biogaz

Les premières grandes découvertes sur le biogaz datent de 1630, avec Jan Baptist van Helmont, surnommé le « Leonard de Vinci Bruxellois », qui a découvert que

la fermentation de la matière organique produisait un gaz inflammable. En 1776, Alessandro Volta passant ses vacances sur les rives du Lac Majeur, a remarqué que, lorsqu'il remuait le fond du lac avec un bâton au cours d'une promenade en bateau, des bulles de gaz remontaient en surface, qu'il appellera gaz des marais. En collectant une partie de ce gaz, il a montré que ce gaz était un combustible. Il a également observé

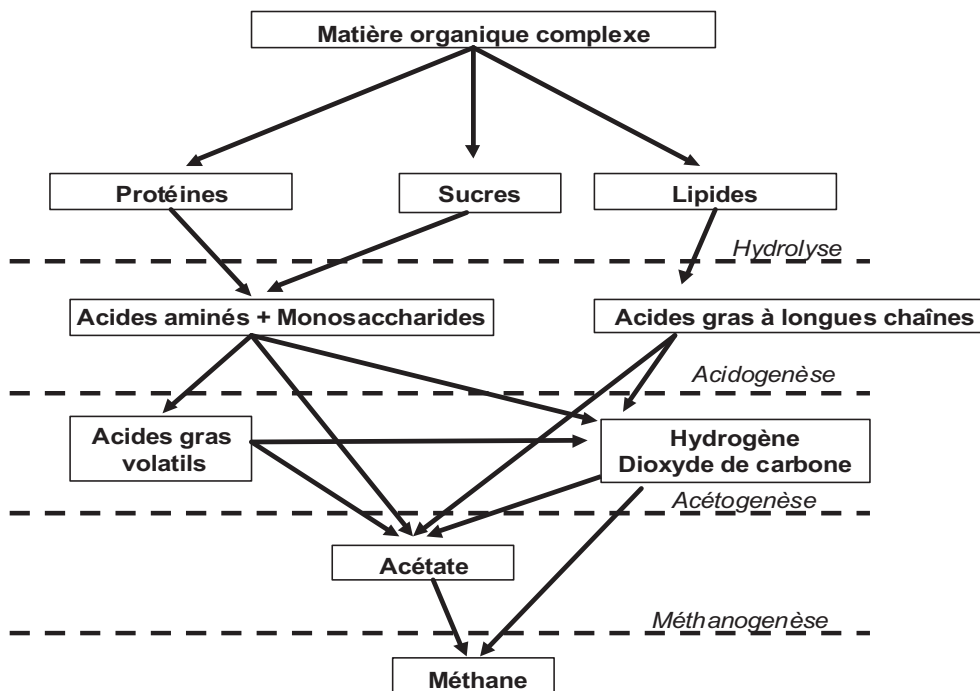


Fig. 1. Schéma réactionnel général de la digestion anaérobie.

que le volume de gaz était proportionnel à la masse de matière en décomposition. Le terme de méthane ne sera proposé qu'en 1865 pour être définitivement accepté en 1892 lors d'un congrès international de nomenclature chimique.

Concernant l'utilisation du biométhane, des preuves historiques suggèrent que dix siècles avant J.C., les Assyriens s'en servaient pour chauffer l'eau de leur bain (Lusk, 1998). De nombreux pays ont très tôt saisi l'intérêt de produire du biogaz pour prévenir une trop forte dépendance aux hydrocarbures. Ainsi l'Inde commença dès le début du 19ème siècle à produire du biogaz (mélange de biométhane et de dioxyde de carbone) et la première unité de traitement de déchets pour produire du biogaz aurait même été construite en 1859 à Bombay (Meynell, 1976). Vers 1890-1895, Donald Cameron construisit une fosse septique pour la ville d'Exeter au Royaume-Uni. Le gaz produit était alors collecté et servait à l'éclairage public.

Au 19ème siècle, Mitscherlich suggéra le rôle des microorganismes dans les réactions de dégradation de la cellulose et la production de méthane (1939). Vers 1930, les travaux en microbiologie conduisirent plusieurs scientifiques, dont Arthur M. Buswell, à la découverte des bactéries anaérobies et au moyen de produire plus efficacement du biogaz. C'est également à cette époque que furent formulées les premières équations macroscopiques de dégradation de la matière organique par fermentation méthanogène.

Biochimie du procédé

La digestion anaérobie n'est autre que l'exploitation par l'homme d'un processus de fermentation méthanogène de la matière organique. Les microorganismes métabolisent la matière organique en absence d'oxygène et produisent du biogaz composé de méthane et de gaz carbonique. Ces transformations se trouvent intimement liées aux transformations énergétiques, représentées par l'énergie libre de Gibbs. Les énergies libérées lors des procédés anaérobies sont faibles, ce qui conduit à de faibles productions de biomasse, car la plus grande partie de l'énergie est libérée sous forme de méthane (CH_4).

D'une façon générale, quatre étapes interviennent (Figure 1). Tout d'abord, la matière organique complexe est fractionnée en unités plus simples de sucres, lipides et protéines. Ceux-ci sont ensuite hydrolysés en acides aminés, monosaccharides et acides gras à longues chaînes à l'aide d'enzymes sécrétées par les microorganismes, pour pouvoir ensuite être transportés au travers de la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule, ces molécules simples peuvent être utilisées comme source d'énergie pour le métabolisme.

Dans une seconde étape, les monomères issus de l'hydrolyse, ainsi que les composés dissous, servent de substrats à des microorganismes fermentaires qui les transforment principalement en acides de faibles poids moléculaires comme les acides gras volatils (AGVs) tels que l'acétate, le propionate, le butyrate,

le valérate, en alcools tels que le méthanol, l'éthanol et en gaz carbonique et hydrogène. Les microorganismes réalisant cette étape peuvent aussi bien être anaérobies facultatifs (du genre *Acetobacter* ou *Streptococcus*) que anaérobies stricts (*Clostridium* sp.). Leur taux de croissance plus rapide que celui des autres microorganismes anaérobies et de l'ordre de 6 h^{-1} est responsable de l'accumulation de composés intermédiaires comme l'acétate ou l'hydrogène, qui peuvent inhiber l'ensemble de la chaîne trophique.

Les produits de l'hydrolyse et de l'acidogénèse (acides, sucres, alcools, ...) sont réduits en acétate, hydrogène et dioxyde de carbone par un groupe hétérogène de deux populations bactériennes : les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène et syntrophes des méthanogènes, les acétogènes non-syntrophes. Les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène produisent de l'acétate et de l'hydrogène à partir des acides qui contiennent trois atomes ou plus de carbone dans leur structure. Les réactions d'acétogénèse à partir du propionate, du butyrate et de l'éthanol sont thermodynamiquement défavorables dans les conditions standards ($\Delta G_o > 0$) et elles ne deviennent possibles que pour de très faibles pressions partielles en H_2 (inférieures à 10^{-4} ppm) (Fukuzaki *et al.*, 1990b; Lee & Zinder, 1988). Ceci nécessite que les bactéries oxydant les acides fonctionnent en syntrophie avec des espèces hydrogénotrophes, comme par exemple les méthanogènes qui, en consommant l'hydrogène, maintiennent une pression partielle faible et permettent à ces réactions de se produire (Ahring & Westermann, 1987).

Les acétogènes non-syntrophes produisent majoritairement de l'acétate et peuvent également utiliser le CO_2 comme accepteur final d'électron (Buschhorn *et al.*, 1989). Ces bactéries sont anaérobies strictes et sont réparties en deux groupes : les fermentatives acétogènes (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Ruminococcus*...) et les acétogènes hydrogénotrophes ou homoacétogènes (*Acetogenium*, *Acetobacterium*, *Clostridium*) qui consomment le CO_2 et l' H_2 .

Finalement, l'acide acétique et le couple gazeux CO_2/H_2 sont convertis en CH_4 par des archaeas respectivement appelées méthanogènes acétoclastes (*Methanosarcina* sp. et *Methanotrix* sp.) et méthanogènes hydrogénéophiles.

Facteurs influençant la digestion anaérobie

pH et alcalinité

On considère habituellement que la gamme optimale de pH pour la digestion anaérobie se situe entre 6,7 et 7,3 (Barker, 1943; Braun, 2007). Un écart du pH de cette gamme est en général le signe d'un mauvais

fonctionnement du digesteur et d'une accumulation d'acides ou de composés alcalins. Un procédé opérant à un pH trop faible (en dessous de pH 4) ou trop élevé (au dessus de pH 9) aura tendance à inhiber l'activité microbienne.

Certains auteurs ont mis en évidence l'adaptation de populations anaérobies à des pH inférieurs à 5 (Goodwin & Zeikus, 1987). Jain & Mattiasson (1998) ont étudié l'adaptation d'une culture de bactéries méthanogènes à des pH extrêmes de l'ordre de 4. Ils ont montré que la production de méthane était fortement ralentie mais pas entièrement stoppée.

Composition du milieu

Hall *et al.* (1992) rapportent que des rapports C/N de 400/7 et 1000/7 sont suffisants pour le traitement de faibles et fortes charges, et que le rapport N/P doit être supérieur à 7. Moletta (2005) et Braun (2007) évoquent quant à eux un rapport C/N/P minimal de 800/5/1. En dehors de ces macro-nutriments, les bactéries anaérobies ont besoin d'un grand nombre de micronutriments tels que des vitamines, des acides aminés et des éléments traces métalliques (cuivre et nickel en particulier) (Cresson *et al.*, 2006). Certains microorganismes méthanogènes comme *Methanobacterium thermoautotrophicum* sont toutefois capables de synthétiser l'ensemble de leurs composants cellulaires uniquement à partir d'un milieu inorganique (Murray & Zinder, 1985).

Composés toxiques ou inhibant la digestion anaérobie

Des composés toxiques et inhibiteurs peuvent être responsables du mauvais déroulement de la méthanisation au sein d'un réacteur. Un excès d'AGVs (acides gras volatiles) sous leur forme non dissociée (-COOH) accélère leur entrée dans les cellules, ce qui provoque une baisse du pH intra-cellulaire (Boe, 2006). Dans ces conditions, une partie de l'ATP servant habituellement à la croissance est hydrolysée pour libérer des protons, contrebalancer cet apport supplémentaire d'anions et assurer le maintien de l'homéostasie. En conséquence, moins d'ATP sera disponible pour la croissance bactérienne (Fukuzaki *et al.*, 1990a). La concentration seuil à partir de laquelle les AGVs sont inhibiteurs dépend alors du pouvoir tampon du milieu.

D'autres composés comme l'acide 2-bromoéthane-sulfonique (BES) ou le chloroforme inhibent également la méthanogénèse (Ahring & Westermann, 1987). Ces mêmes auteurs ont montré que l'ajout d'oxygène (O_2) dans le ciel gazeux d'un digesteur dégradant en coculture du butyrate, stoppe la dégradation du butyrate.

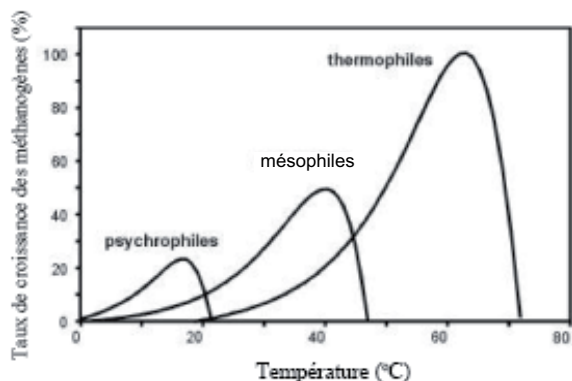


Fig. 2. Effet de la température sur les taux de croissance des méthanogènes (van Lier *et al.*, 1997; Batstone *et al.*, 2002).

Température

Dans le domaine de la digestion anaérobie, les microorganismes sont répartis en trois grandes catégories selon la plage des températures auxquelles leur croissance est optimale :

- les psychrophiles qui croissent entre 4-20 °C, avec un optimum vers 15 °C,
- les sub-mésophiles et mésophiles qui croissent entre 20-45 °C avec un optimum vers 37 °C,
- les thermophiles qui croissent entre 55-70 °C, avec un optimum vers 60 °C.

La figure 2 montre les plages de températures où la croissance de ces trois populations est possible. La dépendance des taux de croissance à la température peut être décrite par une loi d'Arrhenius (Batstone *et al.*, 2002). Karakashev *et al.* (2005) ont par ailleurs montré que les réacteurs mésophiles présentaient une diversité bactérienne supérieure à celle des réacteurs thermophiles.

Production anaérobie de biohydrogène

L'hydrogène a été découvert en 1766 par Henry Cavendish qui le dénommait « air inflammable ». Il a montré que l'hydrogène combiné avec de l'oxygène produisait de l'eau. Cette caractéristique amena Lavoisier à proposer le nom d'hydrogène (Piera *et al.*, 2006). Le rêve de l'utilisation de l'hydrogène comme source inépuisable d'énergie a en fait commencé avec Jules Verne. Dans son roman *L'Île Mystérieuse* (1874), il imagina en effet l'hydrogène comme un substitut du charbon. Bien plus tard, l'hydrogène a été utilisé comme combustible, entrant à 50 % dans le mélange de gaz de ville fourni aux grandes métropoles jusque dans les années 1950 (Maddy *et al.*, 2003). Ce gaz

est d'ailleurs toujours utilisé en Chine, en Afrique du Sud et dans tous les lieux où le gaz naturel est cher (Bjørnar *et al.*, 2002).

Principes généraux de production de biohydrogène par voie anaérobie

Dans les procédés anaérobies, l'hydrogène est produit essentiellement pendant l'acidogénèse des sucres par des espèces des genres bactériens, entre autres, *Enterobacter*, *Bacillus* et *Clostridium* sp. (Hawkes *et al.*, 2002; Iyer *et al.*, 2004). Les voies biochimiques qui décrivent l'acidogénèse montrent que les réactions qui produisent de l'éthanol, du lactate et du propionate ne peuvent produire de l'hydrogène car elles sont en compétition pour l'élément réducteur NADH (Figure 3). Par contre, celles qui produisent de l'acétate et du butyrate produisent de l'hydrogène (Vavilin *et al.*, 1995; Hawkes *et al.*, 2002). Les limitations énergétiques revêtent beaucoup d'importance dans ce cas. En effet, d'un point de vue stœchiométrique, il est possible de produire jusqu'à 4 moles d'hydrogène via l'acétate mais avec une limitation thermodynamique forte. Cette limite est connue sous le nom de *limite de Thauer* (Hallenbeck, 2005). Elle établit que l'oxydation enzymatique du NADH, réalisée par les hydrogénases et associée à la production d'hydrogène, a besoin d'une pression partielle en hydrogène inférieure à 10^{-3} atm. En pratique, cela signifie que la limite supérieure de la production anaérobie d'hydrogène est de 4 moles par mole de glucose avec de faibles débits de gaz. Toutefois, dans la littérature, les rendements d'hydrogène obtenus en cultures complexes sont proches de 2 moles/mole de glucose dû à une production combinée d'acétate et de butyrate (Hallenbeck, 2005).

Facteurs influençant la production de biohydrogène

Le type d'inoculum

Des inoculum de souches pures ou de cultures mixtes ont été utilisés pour la production d'hydrogène. *Clostridium butyricum* a été l'espèce la plus utilisée en culture pure (Yokoi *et al.*, 1998a; Yokoi *et al.*, 1998b; Yokoi *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006a; Lin *et al.*, 2007), mais d'autres espèces telles qu'*Enterobacter* ont aussi été largement étudiées (Fabiano & Perego, 2002). Les cultures mixtes sont quant à elles issues de plusieurs sources dont le plus fréquemment des boues de stations d'épuration (Chen *et al.*, 2002), des boues de compostage (Ueno *et al.*, 1996), des décanteurs (Fang

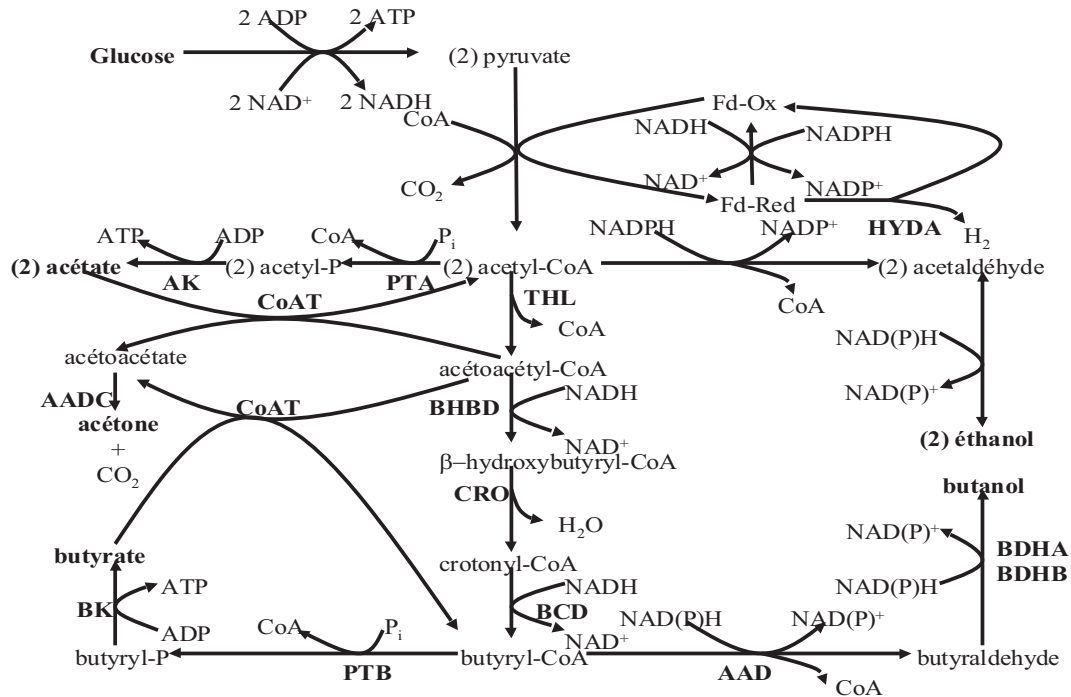


Fig. 3. Principales voies biochimiques de l'acidogénèse (Desai *et al.*, 1999). (HYDA) hydrogénase, (PTA) phosphotransacétylase, (AK) acétate kinase, (THL) thiolase, (CoAT) acétoacétyl-CoA : acétylbutyrate : CoA transférase, (AADC) acétoacétate décarboxylase, (BHBD) b-hydroxybutyryl-CoA déhydrogénase, (CRO) crotonase, (BCD) butyryl-CoA déhydrogénase, (PTB) phosphotransbutyrylase, (BK) butyrate kinase, (AAD) aldehyde :alcool déhydrogénase, (BDHA&B) butanol déhydrogénase A & B.

et al., 2002b) et des boues des digesteurs mésophiles (Lin & Chang, 1999; Zhang *et al.*, 2006b).

Trois méthodes sont généralement utilisées afin de sélectionner les espèces productrices d'hydrogène à partir de cultures mixtes. Ces méthodes mettent à profit la capacité de sporulation présente chez des espèces telles que *Clostridium sp.* Le traitement thermique des boues est la méthode la plus couramment utilisée (Li & Fang, 2007). Elle consiste en un chauffage de l'inoculum, typiquement une centaine de degrés Celsius pendant quelques dizaines de minutes (Lay, 2000; Van Ginkel & Sung, 2001; Iyer *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006b; Mu *et al.*, 2007). La deuxième méthode consiste à appliquer, lors du fonctionnement en continu des réacteurs, des temps de séjour hydrauliques courts afin de lessiver les bactéries les plus lentes et consommatrices d'hydrogène, comme les méthanogènes (Lee *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006b). Cette méthode est basée sur le fait que les micro-organismes producteurs d'hydrogène présentent des taux de croissances supérieurs à ceux des archaea. Des chocs de pH, inférieurs à 4 ou supérieurs à 10, sont la dernière méthode possible pour enrichir en producteurs d'hydrogène une culture mixte (Chen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006b). Certains auteurs utilisent une combinaison de ces diverses méthodes afin d'obte-

nir une bonne sélection des micro-organismes. Ainsi, Zhang *et al.* (2006b) proposent d'utiliser un choc thermique associé à un choc de pH. D'autres auteurs ont préféré travailler avec de faibles temps de séjour associés à un pH bas (Fang & Liu, 2002; Lee *et al.*, 2002) ou avec un prétraitement thermique (Iyer *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006b).

Composition du milieu en minéraux et en métaux

De nombreuses références montrent l'importance de la composition du milieu pour les bactéries productrices d'hydrogène (Lin & Lay, 2005; Zhang & Shen, 2006). La concentration en ions Fe^{2+} dans le milieu est très importante car il s'agit d'un constituant essentiel du site actif des hydrogénases (Das & Veziroglu, 2001). La quantité nécessaire d'ions Fe^{2+} varie en fonction de la température, toute augmentation de température conduisant à une meilleure activité des enzymes (Zhang & Shen, 2006). Zhang & Shen (2006) ont trouvé que la concentration optimale en ions Fe^{2+} était de l'ordre de 200 mg/L à une température proche de 35 °C.

Les concentrations en carbone et en azote sont également intimement liées. Lin et Lay (2004) ont

montré que le ratio C/N optimal était de 47 en utilisant le saccharose comme substrat carboné. De plus, ils ont souligné une dérive métabolique de la production d'acétate vers celle de l'éthanol quand le ratio C/N diminue. Ils ont démontré qu'il était possible de limiter la concentration en carbone en utilisant des phosphates. Enfin, une étude générale des minéraux utilisés pour la production d'hydrogène a été faite par Lin and Lay (2005) en utilisant le saccharose comme substrat. Ils ont trouvé que les minéraux les plus importants étaient le magnésium, le sodium, le zinc et le fer.

Température

Comme pour tous les procédés biologiques, la température est un facteur à contrôler car elle réduit l'énergie d'activation des enzymes. Bien que pour les hydrogénases, la température optimale soit de l'ordre de 50 °C (Adams & Mortenson, 1984), des températures mésophiles comprises entre 35 et 37 °C ont été utilisées (Kraemer, 2004; Li & Fang, 2007). La principale raison est liée à une instabilité plus grande des procédés thermophiles par rapport aux procédés mésophiles (Hawkes *et al.*, 2002). Lin & Chang (2004) ont également montré qu'une température inférieure à 35 °C nécessitait des temps de séjour plus longs afin d'avoir une bonne production d'hydrogène. Mu *et al.*, (2006) ont, quant à eux, étudié les variations du rendement de conversion du substrat en hydrogène pour une gamme de températures allant de 33 à 41 °C. Ils ont observé que l'augmentation de la température orientait le métabolisme de l'éthanol vers le butyrate et augmentait aussi le rendement de conversion. Ils ont également estimé l'énergie d'activation pour la production d'hydrogène à environ 107,66 kJ/mol. Finalement, Li & Fang (2007) ont montré, au travers d'une étude bibliographique, que les rendements et les taux de production d'hydrogène étaient similaires pour les températures mésophiles et thermophiles mais que les rendements étaient plus faibles pour des températures ambiantes (Lin & Chang, 2004; Li & Fang, 2007).

Nature du substrat

Les espèces de type *Clostridium* sp. ont une prédilection pour les sucres et particulièrement pour le glucose (Mitchell *et al.*, 1995). Ainsi, les substrats synthétiques les plus utilisés pour produire de l'hydrogène sont le glucose (Lin & Chang, 2004; Van Ginkel & Logan, 2005; Mu *et al.*, 2006; Li & Fang, 2007) et le saccharose (Hussy *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006a; Lin & Chen, 2006;

Mu *et al.*, 2007). Des sucres plus complexes ont toutefois été utilisés comme la cellulose (Ueno *et al.*, 1995; Lay, 2001), les effluents de levureries (Guwy *et al.*, 1997), les effluents d'une distillerie de riz (Yu *et al.*, 2002), les déchets alimentaires (Han & Shin, 2004; Shin *et al.*, 2004), les déchets de la production du biodiesel (Nishio & Nakashimada, 2007), les déchets ménagers (Lay *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2001) et les mélasses (Tanisho & Ishiwata, 1995; Ueno *et al.*, 1996).

pH

Li et Fang (2007) ont répertorié plusieurs pH optimaux dans la littérature; pour les études comportant une régulation du pH, les pH optimaux sont compris entre 5,2 et 7,0 sur substrats synthétiques en utilisant de cultures mixtes. Par contre, lorsque le substrat est un effluent ou un déchet, la gamme de pH optimal est plus réduite et est comprise entre 5,2 et 5,6.

Le pH modifie en effet le métabolisme de la production d'hydrogène. Fang et Liu (2002) ont par exemple montré que l'acétate était favorisé à un pH de 6,5 alors que le butyrate est favorisé à un pH inférieur à 6,0. Plus précisément, des pH optimaux ont été déterminés pour la production d'autres produits de fermentation, comme un pH de 4,3 pour le butanol (Kim *et al.*, 2004), un pH compris entre 4,5 et 6,0 pour l'éthanol et entre 5,0 et 6,0 pour le propionate (Hwang *et al.*, 2004).

Inhibitions

La production d'hydrogène au sein d'un réacteur anaérobie peut être perturbée par divers facteurs avec, entre autres, la sporulation des producteurs d'hydrogène et les problèmes de transfert de matière entre la phase liquide et la phase gazeuse.

En effet, Zheng et Yu (2005) ont décrit l'inhibition de la production de l'hydrogène par le butyrate par un mécanisme non-compétitif. La sporulation est également un phénomène qui peut se produire avec les micro-organismes producteurs d'hydrogène, essentiellement chez *Clostridium* sp. Elle est le résultat de la mise en place d'un système de protection lorsque les conditions ne sont pas favorables, comme un excès ou une carence en nutriments, la présence d'oxygène, ou une baisse du pH (Sauer *et al.*, 1995). L'accumulation toxique de substrats au démarrage du réacteur (Yu *et al.*, 2002; Hussy *et al.*, 2005) ou des acides à un pH inférieur à 5 (Sauer *et al.*, 1995; Hawkes *et al.*, 2002) conduit à la production des sous-produits tels que, entre autres, l'éthanol, le propanol, ou le butanol.

Les réacteurs anaérobies présentent également une sursaturation des gaz dans la phase liquide (Pauss *et al.*, 1990; Kraemer, 2004) qui favorise la formation de bulles (Pauss *et al.*, 1990; Merkel & Krauth, 1999). Cette sursaturation peut thermodynamiquement empêcher les réactions productrices d'hydrogène et la conversion du NADH en hydrogène par les hydrogénases (Tanisho *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 2000; Hallenbeck, 2005), voire en faciliter la consommation (Kim *et al.*, 2006). C'est pourquoi, il est important d'avoir un bon contrôle de la concentration en gaz dissous. Actuellement, seulement deux méthodes ont été proposées pour extraire l'hydrogène sous forme de gaz dissous : l'utilisation d'un gaz inerte, comme l'azote ou le dioxyde de carbone, et l'augmentation de la vitesse d'agitation (Aceves-Lara *et al.*, 2008). Le balayage avec un gaz inerte comme l'azote (Tanisho *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 2000; Hussy *et al.*, 2005) a parfois conduit à des résultats spectaculaires, comme une augmentation de 80 % du rendement de la production d'hydrogène (Hussy *et al.*, 2005). Ceci étant, dans cette étude, le rendement était relativement faible puisque inférieur à 0,85 moles-H₂/mol-hexose sur du saccharose. Kim *et al.* (2006) ont également démontré que l'usage du dioxyde de carbone permettait d'avoir de meilleurs rendements que celui de l'azote car ce dernier inhibe les micro-organismes qui consomment l'hydrogène. Finalement, l'augmentation de la vitesse d'agitation de 100 à 500 tr/min a permis à Lay (2000) de doubler les rendements en hydrogène.

Rendements de production

Le tableau 1 présente un résumé de la littérature des différents rendements obtenus en utilisant des réacteurs continus. Ce tableau prend en compte le type de réacteur, le pH, la température, le temps de séjour hydraulique (TSH), la charge volumique appliquée (CVA) et le type d'inoculum. En général, à de bons rendements correspondent de faibles débits en hydrogène. Cette relation n'empêche pas d'obtenir des débits d'hydrogène élevés en augmentant la charge volumique appliquée. Les meilleurs rendements ont, par ailleurs, été obtenus en utilisant des réacteurs infiniment mélangés avec comme substrat du saccharose (2,26 mol d'H₂/mol-hexose – (Chen & Lin, 2003) et du glucose (2,8 mol d'H₂/mol-hexose –) (Van Ginkel & Logan, 2005). Ces résultats sont très intéressants puisque le rendement théorique maximal estimé en conditions anaérobies à partir du glucose est de 3,26 mol-H₂/mol-hexose (Chen *et al.*, 2006b). Ce rendement a pris en compte la formation de la biomasse par *Clostridium butyricum*. De plus, dans le cas du glucose, les rendements élevés sont aussi liés à la sélection de l'inoculum. Finalement, il est important

de souligner que des espèces telles que *Klebsiella pneumoniae* (anaérobie facultative) permettent d'atteindre des rendements théoriques plus élevés allant jusqu'à 6,68 mol-H₂/mol-hexose en conditions microaérobies qui restent toutefois des conditions très difficiles à maintenir en pratique (Chen *et al.*, 2006b).

La valorisation du biogaz

Valorisation du méthane

La digestion anaérobie est intéressante car le biogaz produit peut être valorisé. Le choix d'un mode de valorisation du biogaz découle principalement d'un calcul de rentabilité. De nombreux critères comme la proximité d'utilisateurs finaux pour l'électricité et/ou la chaleur produite(s), ou encore de la composition du biogaz brut, entrent en ligne de compte. Le biogaz doit être purifié avant son utilisation pour en retirer les composés toxiques et corrosifs comme H₂S. Il peut également être nécessaire d'enrichir le biogaz en méthane pour accroître son pouvoir calorifique.

Les caractéristiques physico-chimiques du biogaz sont proches de celles du gaz naturel, ce qui permet sa valorisation sous diverses formes :

- énergie thermique (chaudière ou groupe frigorifique),
- énergie mécanique (moteur à gaz, turbine à vapeur, turbine à gaz),
- production simultanée d'énergie thermique (chaleur ou froid) et de travail par cogénération,
- production simultanée de chaleur, de travail et de froid par trigénération,
- carburant automobile (après purification poussée, compression et stockage),
- injection dans le réseau de gaz de ville.

Le méthane est le seul composé du biogaz énergétiquement intéressant et le pouvoir calorifique du mélange dépend uniquement de la pression partielle en méthane. Pour du méthane pur, le pouvoir calorifique est de 12,67 kWh.m⁻³ et pour un biogaz contenant 70 % de CH₄, il sera donc de 8,87 kWh.m⁻³, soit 32 MJ.m⁻³.

Valorisation de l'hydrogène

Ces dernières années, l'hydrogène a reçu une attention particulière car il présente un grand pouvoir calorifique (*i.e.*, 122 kJ/g) et est utilisé en combustion propre en produisant uniquement de l'eau. Il est ainsi considéré comme étant le vecteur énergétique idéal car

Tableau 1. Meilleurs rendements obtenus dans la littérature pour des réacteurs continus.

Alimentation	Type de réacteur	pH	Température (°C)	TSH (h)	CVA (g _{DCO} .L ⁻¹ .j ⁻¹)	Rendement (molH ₂ .mol- hexose ⁻¹)	Débit H ₂ (mLH ₂ .h ⁻¹)	Inoculum	Référence
Glucose	Infiniment mélangé	5,7	35	6	80	1,7	209	Boues de digesteur	(Lin & Chang, 1999)
Glucose	Infiniment mélangé	5,5	36	6	30	2,1	97	Boues de réacteur d'hydrogène (choc pH)	(Fang & Liu, 2002)
Glucose	Semi-continu	5,0	35	72	5	1,4	43	Boues de digesteur	(Hwang <i>et al.</i> , 2004)
Glucose	Infiniment mélangé	5,5	37	10	24	1,8	436	Sol (choc thermique)	(Iyer <i>et al.</i> , 2004)
Glucose	Lit fixe	6,7	35	1	480	0,5	1210	Boues de digesteur (choc thermique)	(Chang <i>et al.</i> , 2002)
Glucose	Bioréacteur à membrane	5,5	-	3,3	77	1,0	640	Boues de digesteur (choc thermique)	(Oh <i>et al.</i> , 2004)
Glucose	Infiniment mélangé	-	30	10	6	2,8	65	Sol (choc thermique)	(Van Ginkel & Logan, 2005)
Glucose	Infiniment mélangé	-	30	1	240	2,8	65	Sol (choc thermique)	(Van Ginkel & Logan, 2005)
Saccharose	Infiniment mélangé	6,7	35	13,3	40	2,23	2500	Boues de décanteurs aérobies	(Chen & Lin, 2001)
Saccharose	Infiniment mélangé	7,0	35	8	67	2,26	662	Boues de décanteurs aérobies	(Chen & Lin, 2003)
Saccharose	Infiniment mélangé	7,0	35	179	67	1,44	1121	Boues de décanteurs aérobies	(Chen & Lin, 2003)
Saccharose	Infiniment mélangé avec des flocs	5,5	26	6	52	1,95	541	Boues de décanteurs aérobies	(Fang <i>et al.</i> , 2002a)
Saccharose	Infiniment mélangé avec des flocs	6,0	35	6	80	1	1810	Boues de décanteurs aérobies (choc thermique)	(Wu & Chang, 2007)
Saccharose	Infiniment mélangé (balayage au CO ₂)	5,3	35	12	40	1,68	660	Boues anaérobies (choc thermique)	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
Distillerie de riz	Flux ascendant	5,5	55	2	408	2,14	159	Boues de décanteurs aérobies	(Yu <i>et al.</i> , 2002)
Amidon	Infiniment mélangé (balayage à N ₂)	5,2	35	12	21	1,87	123	Boues anaérobies (choc thermique)	(Hussy <i>et al.</i> 2003)

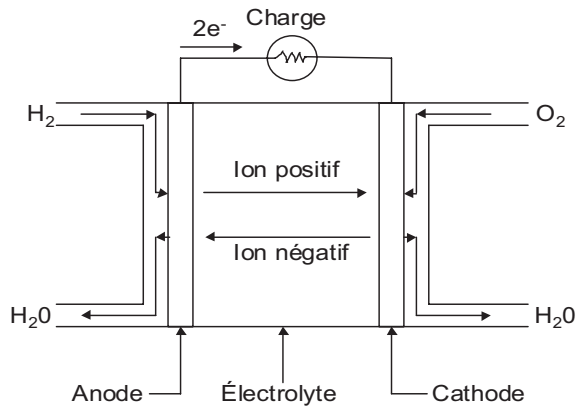


Fig. 4. Principe de fonctionnement d'une pile à combustible à H_2 .

il permet le stockage et le transport d'énergie sur de courtes, moyennes et longues durées (Berry & Aceves, 2005; Orecchini, 2006). De plus, toutes les énergies renouvelables sont transitoirement transformables en hydrogène en tant que forme de stockage, ce qui renforce d'autant plus son attrait.

Entre autres, la pile à combustible permet de convertir l'hydrogène stocké en électricité. Il est à noter que le principe de la pile à combustible a été inventé dans les années 1800 et ce, bien avant le moteur à combustion interne. Son développement s'est ensuite accéléré à partir des années 1960, principalement sous l'impulsion des programmes spatiaux de la NASA (Bjørnar *et al.*, 2002; Maddy *et al.*, 2003; Berry & Aceves, 2005). Aujourd'hui, les piles à combustibles sont utilisables pour des voitures particulières mais avec des rendements encore faibles, proches de 40 % (Hetland & Mulder, 2007). La pile à combustible fonctionne comme une batterie, dans laquelle une membrane anodique et une membrane cathodique sont séparées par un électrolyte (Fuel Cell Handbook, 2000). L'anode et la cathode sont alimentées en continu par de l'hydrogène et de l'oxygène, respectivement, et produisent du courant électrique et de l'eau (Figure 4). La principale différence entre une batterie et une pile à combustible est que cette dernière ne consomme pas d'électrolyte mais ne fonctionne qu'en présence de débits continus en hydrogène et en oxygène. L'inconvénient majeur des piles à combustible réside dans la nécessité de l'utilisation d'un catalyseur en platine qui est relativement coûteux et sensible à l'empoisonnement par des impuretés.

Outre le fait que l'hydrogène est un excellent vecteur énergétique, le principal inconvénient de son utilisation est que, d'un point de vue volumique, il n'est pas très attractif puisque son pouvoir calorifique est quasiment divisé par un facteur 10 (*i.e.*, 1 L de H_2 est équivalent à 0,27 L d'essence). Il est

donc nécessaire de le comprimer fortement ou de le liquéfier, la liquéfaction nécessitant des températures très basses consommant de 30 à 40 % de l'énergie contenue dans l'hydrogène (Berry & Aceves, 2005). La compression implique également que, pour son transport, il faille utiliser des conteneurs résistants à des hautes pressions qui ne sont pas actuellement disponibles dans le commerce. L'autre inconvénient majeur est lié à sa détonabilité avec une limite de détonation dans l'air de 18,3 à 59 % (vol/vol) et à son inflammabilité à l'état gazeux ou liquide avec une limite d'inflammabilité dans l'air (4,1 à 75 % (vol/vol) (Piera *et al.*, 2006).

Couplage des procédés

Le couplage de différents procédés biologiques a été imaginé afin d'augmenter les rendements de conversion en hydrogène et en méthane. Ainsi, plusieurs configurations ont été imaginées et testées expérimentalement.

Un exemple est le couplage d'un réacteur de production d'hydrogène avec un réacteur de méthanisation (Figure 5). Le méthane ayant un apport énergétique égal à 800 kJ/mole, la production d'hydrogène dans une première étape et de méthane dans une deuxième permet d'obtenir une distribution des productions d'énergie de 37,5 % et 62,5 % pour chacun des gaz respectifs. Liu *et al.* (2006) ont par ailleurs montré qu'une telle configuration était capable d'améliorer les rendements de production du méthane. Cette configuration peut toutefois présenter des problèmes de contamination si la sortie du deuxième réacteur est recyclé dans le premier (Kraemer & Bagley, 2005).

À partir d'une analyse technico-économique des filières de production du biogaz et du biohydrogène, Elias *et al.* (2007) ont comparé plusieurs configurations de procédés à une ou deux étapes. Ils ont envisagé des configurations qui prendraient en compte la valorisation à des degrés variables du biogaz et du biohydrogène en co-génération. Suivant les hypothèses faites en termes de coûts d'investissement et de fonctionnement, ces configurations présentent finalement des temps d'amortissement assez proches compris entre 5 et 6 ans. La réduction de ce temps est fortement liée au prix de rachat de l'électricité, qui est essentiellement fixé par les politiques publiques. En France, dans ce contexte – et afin d'encourager cette technologie de production d'énergies renouvelables et d'assurer un seuil de rentabilité suffisant – de nouvelles conditions tarifaires de rachat de l'électricité produite à partir du biogaz issu d'une unité de méthanisation

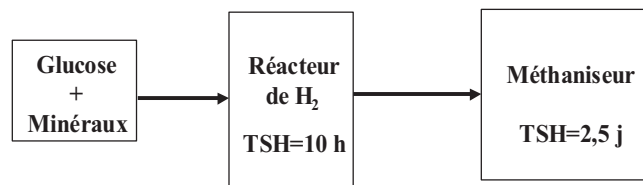


Fig. 5. Couplage d'un réacteur produisant de l'hydrogène avec un méthaniseur (TSH : temps de séjour hydraulique).

ont été fixées et publiées dans l'arrêté de 10 juillet 2006.

Références

- Aceves-Lara C.A., Latrille E., Buffiere P., Bernet N. & Steyer J.P., Experimental determination by Principal Component Analysis of pseudo-stoichiometric for anaerobic biohydrogen production. *Chem. Eng. Process.*, 2008, sous presse. doi : 10.1016/j.cep.2007.12.007.
- Adams M. & Mortenson L., The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 7045–7055.
- Ahring, B.K. & Westermann P., Kinetics of butyrate, acetate, and hydrogen metabolism in a thermophilic, anaerobic butyrate-degrading triculture. *Appl. Environ. Microb.*, 1987, 53, 434–439.
- Arrêté du 10 Juillet 2006, Arrêté fixant les conditions d'achat d'électricité produite par les installations qui valorisent le biogaz. *Journal officiel de la république Française*, 2006.
- Barker H.A., Studies on the methane fermentation. VI. The influence of carbon dioxide concentration on the rate of carbon dioxide reduction by molecular hydrogen. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 1943, 29, 184–190.
- Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S., Pavlostathis S., Rozzi A., Sanders W., Siegrist H. & Vavilin V., The IWA anaerobic digestion model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.*, 2002, 45, 65–73.
- Berry G.D. & Aceves S.M., The case for hydrogen in a carbon constrained world. *J. Energ. Resour. Technol.*, 2005, 127, 189–194.
- Bjørnar K., Sondre G. & Cato B., Bellona report No 6 - Hydrogen status of Muligheter. *The Bellona Foundation*, 2002, 52 pages.
- Boe K., On-line monitoring and control of the biogas process, *PhD. thesis*, Lyngby, Denmark, Technical University of Denmark, 2006.
- Braun R., Anaerobic digestion: A multi-faceted process for energy, environmental, management and rural development. *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, Springer Eds., 2007, 335–416.
- Buschhorn H., Durre P. & Gottschalk G., Production and utilization of ethanol by homoacetogen *Acetobacterium woodii*, *Appl. Environ. Microb.*, 1989, 55, 1835–1840.
- Chang J.S., Lee K.S. & Lin P.J., Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, 1167–1174.
- Chen C.C. & Lin C.Y., Start-up of anaerobic hydrogen producing reactors seeded with sewage sludge. *Acta Biotechnol.*, 2001, 21, 371–379.
- Chen C.C. & Lin C.Y., Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Adv. Environ. Res.*, 2003, 7, 695–699.
- Chen C.C., Lin C.Y. & Lin M.C., Acid–base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 58, 224–228.
- Chen W.M., Tseng Z.J., Lee K.S. & Chang J.S., Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2005, 30, 1063–1070.
- Chen W.H., Chen S.Y., Kumar Khanal S. & Sung S., Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006a, 31, 2170–2178.
- Chen X., Sun Y., Xiu Z., Li X. & Zhang D., Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006b, 31, 539–549.
- Cresson R., Carrère H., Delgenès J.P. & Bernet N., Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor - Impact of nutrient complementation. *Biochem. Eng. J.*, 2006, 30, 55–62.
- Das D. & Veziroglu T.N., Hydrogen production by biological processes : a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2001, 26, 13–28.
- Desai R.P., Nielsen L.K. & Papoutsakis E.T., Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *J. Biotechnol.*, 1999, 71, 191–205.
- Illinois State Water Survey Division, *Anaerobic Fermentations*, State of Illinois, USA, 1939
- Elias A., Frederic S., Aceves-Lara C.A., Latrille E., Buffiere P., Bernet N., Delgenès J.P. & Steyer J.P., Analyse technico-économique comparative des filières biogaz et biohydrogène produits à partir de déchets. *11ème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés*, Saint-Etienne, 2007, 6 pages sur CDROM.
- Fabiano B. & Perego P., Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, 149–156.
- Fang H.H. & Liu H., Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.*, 2002, 82, 87–93.

- Fang H.H.P., Liu H. & Zhang T., Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002a, 78, 44–52.
- Fang H.H.P., Zhang T. & Liu H., Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002b, 58, 112–118.
- Fukuzaki S., Nishio N., Shobayashi M. & Nagai S., Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Appl. Environ. Microb.*, 1990a, 56, 719–723.
- Fukuzaki S., Nishio N., Shobayashi M. & Nagai S., Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Appl. Environ. Microb.*, 1990b, 56, 719–723.
- Goodwin S. & Zeikus J., Physiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH : Metabolic control of proton motive force in *Sarcina ventriculi*. *J. Bacteriol.*, 1987, 169, 2150–2157.
- Guwy A.J., Hawkes F.R., Hawkes D.L. & Rozzi A.G., Hydrogen production in a high rate fluidised bed anaerobic digester. *Water Res.*, 1997, 31, 1291–1298.
- Hall E.R., Hulshoff L.W., Lettinga G., Malina J.F. & Pohland J.F.G., *Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes*, Technomic Publishing Company, 1992.
- Hallenbeck P.C., Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.*, 2005, 52, 21–29.
- Han S.K. & Shin H.S., Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004, 29, 569–577.
- Fuel Cell Handbook, fifth ed., EG&G Services Parsons, Inc., 2000.
- Hawkes F., Dinsdale R., Hawkes D. & Hussy I., Sustainable fermentative hydrogen production : challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, 1339–1347.
- Hetland J. & Mulder G., In search of a sustainable hydrogen economy : How a large-scale transition to hydrogen may affect the primary energy demand and greenhouse gas emissions. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007, 32, 736–747.
- Hussy I., Hawkes F.R., Dinsdale R. & Hawkes D.L., Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 84, 619–626.
- Hussy I., Hawkes F.R., Dinsdale R. & Hawkes D.L., Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2005, 30, 471–483.
- Hwang M.H., Jang N.J., Hyun S.H. & Kim I.S., Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *J. Biotechnol.*, 2004, 111, 297–309.
- Iyer P., Bruns M.A., Zhang H., Van Ginkel S. & Logan B.E., H₂-Producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2004, 66, 166–173.
- Jain S. & Mattiasson B., Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. *Biotechnol. Lett.*, 1998, 20, 771–775.
- Karakashev D., Batstone D.J. & Angelidaki I., Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl Environ Microbiol.*, 2005, 71, 331–338.
- Kim D.H., Han S.K., Kim S.H. & Shin H.S., Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006, 31, 2158–2169.
- Kim I.S., Hwang M.H., Jang N., Hyun S.H. & Lee S.T., Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004, 29, 1133–1140.
- Kraemer J.T., Effects of methanogenic effluent recycle on fermentative hydrogen production, *Ph.D. thesis*, University of Toronto, 2004.
- Kraemer J.T. & Bagley D.M., Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle. *Environ. Sci. Biotech.*, 2005, 39, 3819–3825.
- Lay J.J., Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 68, 269–278.
- Lay J.J., Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74, 280–287.
- Lay J.J., Lee Y.J. & Noike T., Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.*, 1999, 33, 2579–2586.
- Lee M.J. & Zinder S.H., Hydrogen partial pressure in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Appl. Environ. Microb.*, 1988, 54, 1457–1461.
- Lee Y.J., Miyahara T. & Noike T., Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J. Chem. Technol. Biot.*, 2002, 77, 694–698.
- Li C. & Fang H.H.P., Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, 2007, 37, 1–39.
- Lin C.Y. & Chang R.C., Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J. Chem. Technol. Biot.*, 1999, 74, 498–500.
- Lin C.Y. & Chang R.C., Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004, 29, 715–720.
- Lin C.Y. & Chen H.P., Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006, 31, 253–260.
- Lin C.Y. & Lay C.H., Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004, 29, 41–45.
- Lin C.Y. & Lay C.H., A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2005, 30, 285–292.
- Lin P.Y., Whang L.M., Wu Y.R., Ren W.J., Hsiao C.J., Li S.L. & Chang J.S., Biological hydrogen production of the genus *Clostridium* : Metabolic study and mathematical model simulation. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007, 32, 1728–1735.
- Liu D.W., Liu D.P., Zeng R.J. & Angelidaki I., Hydrogen and methane production from household solid waste in

- the two-stage fermentation process. *Water Res.*, 2006, 40, 2230–2236.
- Lusk P.D., Methane recovery from animal manures. the current opportunities casebook, National Renewable Energy Laboratory, 1998.
- Maddy, J., Cherryman S., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Dinsdale R.M., Guwy A.J., Premier G.C. & Cole S., HYDROGEN 2003 Report No 1 ERDF part-funded project entitled: *A sustainable energy supply for Wales: Towards the hydrogen economy*. University of Glamorgan, 2003.
- Merkel W. & Krauth K., Mass transfer of carbon dioxide in anaerobic reactors under dynamic substrate loading conditions. *Water Res.*, 1999, 33, 2011–2020.
- Meynell P., *Methane: Planning a digester*, Prism Press, 1976.
- Mitchell W.J., Albasheri K.A. & Yazdanian M., Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1995, 17, 317–329.
- Mizuno O., Dinsdale R., Hawkes F.R., Hawkes D.L. & Noike T., Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.*, 2000, 73, 59–65.
- Moletta R., Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, 2005, 51, 137–144.
- Mu Y., Yu H.Q. & Wang G., A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Res.*, 2007, 41, 1152–1160.
- Mu Y., Zheng X.J., Yu H.Q. & Zhu R.F., Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006, 31, 780–785.
- Murray, P.A. & Zinder S., Nutritional requirements of *Methanosarcina* sp. strain TM-1. *Appl. Environ. Microb.*, 1985, 50, 49–55.
- Nielsen A.T., Amandusson H., Bjorklund R., Danneun H., Ejlertsson J., Ekedahl L.G., Lundström I. & Svensson B.H., Hydrogen production from organic waste. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2001, 26, 547–550.
- Nishio N. & Nakashimada Y., Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes. *J. Biosci. Bioeng.*, 2007, 103, 105–112.
- Oh S.E., Lyer P., Bruns M.A. & Logan B.E., Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 87, 119–127.
- Orecchini F., The era of energy vectors. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2001, 31, 1951–1954.
- Pauss A., Andre G., Perrier M. & Guiot S.R., Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Appl. Environ. Microb.*, 1990, 56, 1636–1644.
- Piera M., Martinez-Vaj J.M. & Montes M.J., Safety issues of nuclear production of hydrogen. *Energ. Convers. Manage.*, 2006, 47, 2732–2739.
- Sauer U., Santangelo J.D., Treuner A., Buchholz M. & Durre P., Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1995, 17, 331–340.
- Shin H.S., Younb J.H. & Kim S.H., Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004, 29, 1355–1363.
- Tanisho S. & Ishiwata Y., Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *Int. J. Hydrogen Energy*, 1995, 20, 541–545.
- Tanisho S., Kuromoto M. & Kadokura N., Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*, 1998, 23, 559–563.
- Ueno Y., Kawai T., Sato S., Otsuka S. & Morimoto M., Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, 79, 395–397.
- Ueno Y., Otsuka S. & Morimoto M., Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J. Ferment. Bioeng.*, 1996, 82, 194–197.
- Van Ginkel S. & Sung S., Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Env. Sci. Tech.*, 2001, 35, 4726–4730.
- Van Ginkel S.W. & Logan B., Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Res.*, 2005, 39, 3819–3826.
- Van Lier J.B., Rebac S. & Lettinga G., High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. *Water Sci. Technol.*, 1997, 35, 199–206.
- Vavilin V.A., Rytow S.V. & Lokshina L.Y., Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. *Bioresour. Technol.*, 1995, 54, 171–177.
- Wu K.J. & Chang J.S., Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix. *Process Biochem.*, 2007, 42, 279–284.
- Yokoi H., Maki R., Hirose J. & Hayash S., Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass and Bioenerg.*, 2002, 22, 389–395.
- Yokoi H., Mori S., Hirose J., Hayashi S. & Takasaki Y., H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M-19. *Biotechnol. Lett.*, 1998a, 20, 895–899.
- Yokoi H., Tokushige T., Hirose J., Hayashi S. & Takasaki Y., H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol. Lett.*, 1998b, 20, 143–147.
- Yokoi H., Saitsu A., Uchida H., Hirose J., Hayashi S. & Takasaki Y., Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 91, 58–63.
- Yu H., Zhu Z., Hu W. & Zhang H., Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, 1359–1365.
- Zhang Y., Liu G. & Shen J., Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2005, 30, 855–860.

- Zhang Y. & Shen J., Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006, 31, 441–446.
- Zhang H., Bruns M.A. & Logan B.E., Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res.*, 2006a, 40, 728–734.
- Zhang Z.P., Show K.Y., Tay J.H., Liang D.T., Lee D.J. & Jiang W.J., Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem.*, 2006b, 41, 2118–2123.
- Zheng X.J. & Yu H.Q., Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *J. Environ. Manag.*, 2005, 74, 65–70.