



HAL
open science

Ingénierie écologique microbienne pour la production de biohydrogène

Eric Trably, M.T. Giudici-Ortoni, S. Benomar, Eric Latrille, Isabelle Meynial-Salles, Yan Rafrafi, Jérôme J. Hamelin, Jean-Philippe Steyer

► **To cite this version:**

Eric Trably, M.T. Giudici-Ortoni, S. Benomar, Eric Latrille, Isabelle Meynial-Salles, et al.. Ingénierie écologique microbienne pour la production de biohydrogène. Innovations Agronomiques, 2013, 26, pp.67-82. hal-02641895

HAL Id: hal-02641895

<https://hal.inrae.fr/hal-02641895>

Submitted on 28 May 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Ingénierie écologique microbienne pour la production de biohydrogène

Trably E.¹, Giudici-Orticoni M.T.², Benomar S.², Latrille E.¹, Meynial-Salles I.³, Rafrafi Y.¹, Hamelin J.¹, Steyer J.P.¹

¹ INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France.

² Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR 7281, FR3479, CNRS-AMU 31 chemin Joseph Aiguier 13402 Marseille cedex 20, France

³ Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) – UMR INSA CNRS 5504, UMR INSA-INRA 792 – 135 avenue de Rangueil 31077 Toulouse, France

Correspondance : eric.trably@supagro.inra.fr

Résumé

Un grand nombre d'espèces microbiennes, issues d'environnements variés, peuvent produire du biohydrogène par voie fermentaire. Le potentiel des cultures mixtes microbiennes est particulièrement intéressant au regard de leur large flexibilité métabolique permettant d'envisager d'utiliser des ressources organiques complexes issues du traitement de la biomasse. Toutefois, la diversité microbienne des cultures mixtes est également source d'instabilité des procédés *via* l'expression de métabolismes bactériens multiples pouvant conduire notamment à une reconsumption du bioH₂ produit. A ce jour, peu de moyens d'actions, et essentiellement des modifications physico-chimiques, permettent d'assurer l'optimisation des procédés continus de production de biohydrogène. Les recherches menées ont permis d'identifier puis d'utiliser des espèces-clés situées au cœur des réseaux métaboliques en tant que contrôleur biologique des écosystèmes microbiens, et ceci en améliorant la stabilité et les rendements de conversion en biohydrogène.

Mots-clés : biohydrogène, contrôle biotique, fermentation, interaction microbienne.

Abstract : Biotic control of fermentative microbial ecosystems

A wide number of microbial species issued from different environments are able to produce biohydrogen by dark fermentation. More particularly, microbial mixed cultures are interesting since they present a broad metabolic flexibility and allow considering complex organic biomass as potential resources for hydrogen production. However, microbial diversity leads to process instability because of the presence of multiple bacterial metabolisms that can lead to direct H₂ uptake. To date, only few controllers, essentially physicochemical, are available to control bioprocesses producing bioH₂. Biotic control of microbial ecosystems is proposed here as a new controller of fermentative microbial ecosystems. For this, biotic control was investigated through the identification of keystone species within metabolic networks and their use as biological trigger of the whole microbial fermentative metabolism, in order to improve stability and conversion efficiencies of organic substrates to biohydrogen.

Keywords : Biohydrogen, Biotic control, Fermentation, Microbial interaction

1. Contexte socio-économique des recherches sur l'hydrogène

Dans le contexte actuel de crise énergétique mondiale, la recherche de nouvelles sources d'énergie constitue un challenge majeur tant sociétal et politique, que scientifique. En effet, alors même que plus de 85% de l'énergie consommée dans le monde provient de combustibles fossiles, les ressources énergétiques mondiales tendent à s'épuiser de plus en plus rapidement, avec des stocks de seulement 39, 61 et 204 années pour les réserves mondiales de, respectivement, pétrole, gaz et charbon (EIA, 2007). De plus, l'impact sur le changement climatique global impose le développement urgent de ressources en énergie renouvelable. De nos jours, la recherche de nouvelles bioénergies ne répond plus seulement à un enjeu environnemental, à la diversification et la sécurité d'approvisionnement en énergie, mais également à de nombreux enjeux industriels qui s'y rattachent et à la création d'emplois qu'elle implique, ce qui en fait un facteur majeur du développement durable. Dans cette perspective, la recherche sur de nouveaux vecteurs énergétiques se révèle d'une importance stratégique, notamment dans le cadre réaliste mais encore conceptuel de « bioraffineries environnementales » où tout un panel de ressources bioénergétiques serait proposé à partir de substrats organiques complexes et variés. Le principe de ces futures installations serait d'associer des procédés de transformation de la biomasse et des équipements de production d'une grande variété de biocarburants, de bioénergies et de bioproduits à haute valeur ajoutée. Cette approche nécessite la mise en œuvre rationnelle et dans des conditions contrôlées de microorganismes vivants ou de leurs constituants (enzymes). **Actuellement, les bioénergies issues de la biomasse ne représentent qu'un pourcentage infime de la production d'énergie primaire et sont donc vouées à se développer fortement au travers de l'engagement actuel de la France et de l'Europe dans ces filières.** Parmi les ressources envisagées, l'hydrogène, dit biocarburant de troisième génération, possède certains avantages sur les autres vecteurs énergétiques, dont un pouvoir calorifique élevé (122 MJ/kg) soit 2,4 fois plus élevé que le gaz naturel, et une combustion propre qui ne rejette que de la vapeur d'eau. Il peut de plus être utilisé comme réactant dans l'industrie chimique (sa principale utilisation actuelle), ou comme vecteur de stockage pour produire de l'électricité dans des piles à combustible. De nos jours, il n'est que peu utilisé dans le domaine de l'énergie et les 50 millions de tonnes produites par an, ne représenteraient que 1,5% de la demande énergétique mondiale actuelle (EIA, 2007). Utiliser l'hydrogène comme vecteur énergétique suppose donc d'augmenter sa production de manière radicale, tout en s'affranchissant des technologies de production actuelle par reformage, dépendantes des combustibles fossiles et émettrices de grandes quantités de gaz à effet de serre. La production biologique d'hydrogène (ou biohydrogène) à partir de matière organique issue de la biomasse constitue donc une voie d'avenir dans un contexte de développement durable des filières agro-énergétiques et de valorisation de sous-produits organiques. Néanmoins, le développement de la filière biohydrogène dépendra fortement de la mise en œuvre de technologies robustes et fiables permettant une conversion énergétique efficace de cette biomasse.

2. Production de biohydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes

La production de biohydrogène a été observée dans de nombreux écosystèmes aérobies et anaérobies. L'hydrogène est en effet un sous-produit soit de la photosynthèse, soit de la photofermentation, soit des voies fermentaires bactériennes (« dark fermentation »). Dans ce dernier cas, des microorganismes anaérobies utilisent des substrats organiques pour leur croissance tout en générant de l'hydrogène en tant que sous-produit de fermentation. Dans la nature, ces substrats peuvent être utilisés par d'autres microorganismes pour produire des composés organiques sans production d'H₂ (lactate, éthanol, propionate, etc.), ce qui tend à réduire le rendement de conversion vers l'hydrogène. Enfin, l'hydrogène étant une molécule de transfert d'électrons entre espèces microbiennes, l'H₂ produit est facilement utilisé par de nombreux microorganismes pour leur propre métabolisme, comme les bactéries homoacétogènes [4H₂ + 2CO₂ → CH₃COOH (acétate) + H₂O], les

(iii) Une phase d'acétogénèse où les produits de l'acidogénèse (acides, alcools,...) peuvent également être convertis en acétate, dioxyde de carbone et hydrogène par les bactéries acétogènes syntrophes des méthanogènes. Ces réactions étant rapidement thermodynamiquement défavorables ($\Delta G^0 > 0$), elles ne deviennent possibles que pour de très faibles pressions partielles en H_2 (inférieures à 10^{-4} ppm) (Lee et Zinder, 1988 ; Fukuzaki *et al.*, 1990). Le mutualisme retrouvé dans la nature avec des microorganismes méthanogènes ou sulfato-réducteurs permet alors de lever ces inhibitions par la reconsommation de l'hydrogène produit (Ahring et Westermann, 1987; Stolyar *et al.*, 2007). Par ailleurs, il est important de noter qu'il existe également des bactéries acétogènes fermentaires non-syntrophes qui, en déviant leur métabolisme, produisent des acides organiques sans coproduction d'hydrogène (genres *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Ruminococcus*...).

(iv) Finalement, sans action extérieure d'inhibition, l'acide acétique ou le couple gazeux CO_2/H_2 sont convertis directement en méthane par des archées méthanogènes, appelées respectivement, acétotrophes ou hydrogéntrophes.

Produit central de la digestion anaérobie, le biohydrogène est donc essentiellement généré pendant la phase d'acidogénèse par des bactéries des genres, entre autres, *Enterobacter*, *Bacillus* et *Clostridium* (Li et Fang, 2007). Les voies métaboliques qui décrivent l'acidogénèse montrent que les voies métaboliques qui génèrent des sous-produits comme l'éthanol, le lactate ou le propionate ne peuvent produire de l'hydrogène car elles rentrent en compétition pour les éléments réducteurs intracellulaires que sont le NAD et les ferrédoxines (voir Figure 2).

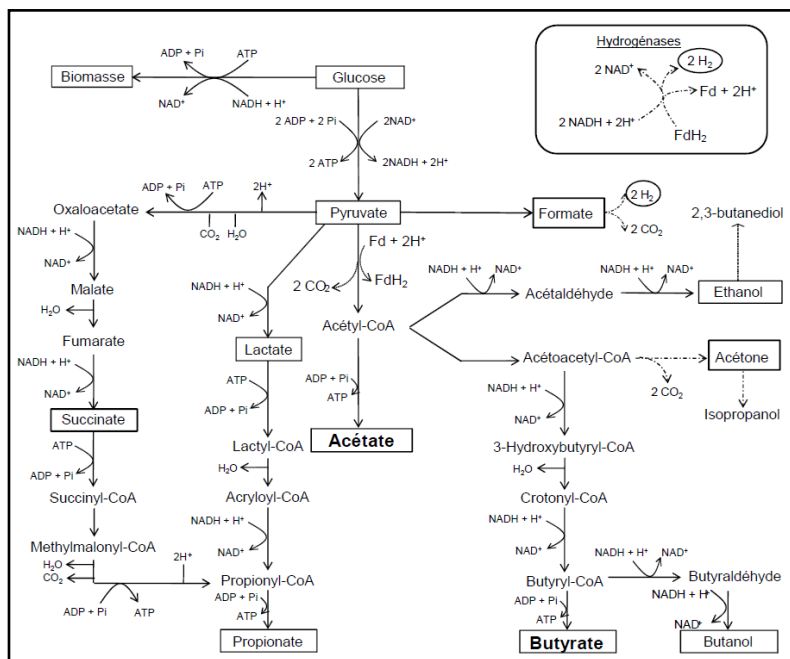
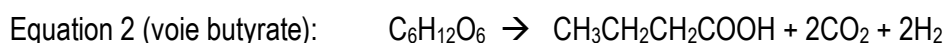
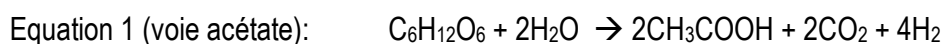


Figure 2 : Principales voies métaboliques de la production de biohydrogène par voie fermentaire (Latrille *et al.*, 2010).

Par contre, celles qui produisent de l'acétate, du butyrate et du formate produisent simultanément de l'hydrogène (voir équations 1 et 2 ci-dessous) (Vavilin *et al.*, 1995). Ainsi, d'un point de vue stœchiométrique, il est possible de produire jusqu'à 4 moles d'hydrogène par mole de glucose *via* la voie de l'acétate. Toutefois, les rendements d'hydrogène obtenus en cultures mixtes sont plus proches d'une moyenne de 1 à 2 moles de H_2 par mole d'hexose en raison d'une production combinée d'acétate et de butyrate, notamment à partir de substrats complexes lignocellulosiques (Guo *et al.*, 2010). De plus, l'accumulation de ces métabolites peut conduire à des limitations métaboliques fortes par suraccumulation d'éléments réducteurs et, *in fine*, à un détournement de ces voies vers la production d'alcools (Acétone, Butanol, Ethanol), ou solvantogénèse (Latrille *et al.*, 2010). En culture pure de type

Clostridium, la solvantogénèse apparaît lors de l'accumulation des sous-produits de fermentation, *i.e.* acétate et/ou butyrate autour de 60 mM. La solvantogénèse est étroitement associée au phénomène de stress cellulaire et de sporulation chez *Clostridium* et la production d'hydrogène peut donc être perturbée par divers facteurs comme un choc température, une baisse du pH (<4.5), la présence d'oxygène dans le milieu, un excès ou une carence en source de carbone, azote, phosphore ou fer (Latrille *et al.*, 2010).



Alors que, depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont porté sur l'utilisation de cultures pures en vue de produire du biohydrogène à partir de sucres simples ou peu complexes (amidon, saccharose), **la flexibilité métabolique des écosystèmes**, malgré leur instabilité, constituent un avantage majeur lorsqu'il s'agit de transformer des substrats plus complexes, et notamment les biomasses dites de deuxième ou troisième génération.

3. Production de biohydrogène à partir de résidus lignocellulosiques et spécificités des interactions microbiennes dans les écosystèmes fermentaires

La possibilité de produire du biohydrogène à partir de cultures mixtes en utilisant diverses sources organiques complexes (produits et résidus agricoles, boues,...) a été bien documentée ces dernières années (Li et Fang, 2007; Guo *et al.*, 2010 ; Latrille *et al.*, 2010 ; Pessiot *et al.*, 2012 ; Monlau *et al.*, 2013). Les rendements rapportés dans la littérature à partir de résidus agricoles vont de 1 mL_{H₂}.g_{MV}⁻¹ pour des substrats complexes lignocellulosiques, à plus de 200 mL_{H₂}.g_{MV}⁻¹ pour des substrats riches en sucres simples comme les déchets alimentaires (Guo *et al.*, 2010). Les rendements de production en hydrogène dépendent fortement de la teneur du substrat en hydrates de carbone, c'est à dire de la composition en sucres solubles, celluloses, hémicelluloses et lignine (Monlau *et al.*, 2012). D'ailleurs, comme dans le cas des digesteurs anaérobies produisant du méthane à partir de résidus agricoles, l'espèce étudiée, la période et le moment de la récolte doivent obligatoirement être considérés en tant que facteurs pouvant avoir des effets significatifs sur la fermentation. Des techniques prédictives d'évaluation du contenu en hydrates de carbone permettant une première évaluation de production de biohydrogène sont déjà disponibles au sein du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement et font l'objet de recherches intensives par ailleurs. Elles permettent d'envisager l'utilisation de différents lots de substrats sans biais technique (Monlau *et al.*, 2012). En général, la production d'hydrogène à partir de résidus agricoles est limitée par l'activité hydrolytique des micro-organismes. Lors de la digestion anaérobie de résidus agricoles, l'attaque biologique (par des enzymes) de la structure microcristalline et hétérogène des composés lignocellulosiques pour libérer des composés monomériques plus simples est particulièrement longue à réaliser. Ces réactions dépendent très fortement du prétraitement appliqué à la biomasse ainsi que des microorganismes présents dans le milieu (Latrille *et al.*, 2010).

Une gamme étendue de sources en microorganismes fermentaires peut être utilisée afin d'obtenir des inocula pour la production de biohydrogène. Les sources en cultures mixtes les plus fréquemment utilisées sont issues de boues de stations d'épuration (Chen *et al.*, 2002), de composts (Ueno *et al.*, 1996), de résidus de décanteurs (Fang *et al.*, 2002) et de boues des digesteurs mésophiles (Zhang *et al.*, 2006). A partir de ces sources, trois méthodes d'enrichissement en bactéries productrices et d'inhibition des consommatrices d'hydrogène sont généralement utilisées : le traitement thermique est la méthode la plus couramment mise en œuvre et utilise les propriétés de sporulation des clostridies. La deuxième méthode consiste à appliquer des temps de séjour hydrauliques courts dans des systèmes continus afin de lessiver les bactéries les plus lentes et consommatrices d'hydrogène, notamment les méthanogènes (Zhang *et al.*, 2006). L'utilisation de pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 10 consiste en la

dernière méthode possible pour enrichir le consortium en producteurs d'hydrogène (Chen *et al.*, 2002). Certains auteurs utilisent une combinaison de ces méthodes pour obtenir une meilleure sélection en micro-organismes producteurs d'H₂ à partir de nombreux types de substrats organiques (Li et Fang, 2007). Toutefois, l'origine de ces inocula influe fortement sur les performances de conversion. En effet, il a été récemment montré que cette origine, et donc l'historique de l'inoculum pouvait affecter les rendements globaux de conversion en fermenteurs, en influant sur la structure finale des communautés microbiennes (Rafrafi *et al.*, 2013). Rafrafi *et al.* (2013) ont par ailleurs montré que « l'environnement » microbien, *via* la structure des communautés influait fortement sur les performances globales de production en hydrogène. Le contrôle de ces communautés, et notamment en co-cultures, constitue actuellement un sujet d'un fort intérêt à l'échelle internationale (Tanouchi *et al.*, 2012).

Récemment, de nombreux auteurs se sont intéressés à étudier l'association de plusieurs souches en co-cultures, avec un bénéfice certain pour la production d'hydrogène (Masset *et al.*, 2012). En général, le choix des partenaires de *Clostridium* repose sur : (i) l'amélioration des rendements de la production d'hydrogène, mais aussi sur (ii) le potentiel de conversion de substrats complexes, (iii) l'orientation du flux métabolique vers les voies productrices d'hydrogène, (iv) l'élimination des métabolites produits par *Clostridium* et (v) le maintien des conditions strictes d'anaérobiose. Quelques exemples des associations des cocultures avec *Clostridium* sont résumés dans le Tableau 1, ci-dessous.

Cocultures	Avantages	Références
<i>C. butyricum</i> + <i>C. pasteurianum</i> + <i>C. beijerinckii</i>	- Meilleure production d'hydrogène. - Stabilité de la coculture. - Dégradation de substrats complexes (amidon).	Masset et al., 2012
<i>C. thermocellum</i> + <i>C. thermopalmarum</i>	- Augmentation de la production d'H ₂ (X2). - Changement de métabolisme de acétate + éthanol vers butyrate.	Geng et al., 2010
<i>C. thermocellum</i> JN4 + <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	- Augmentation de la production d'H ₂ (x 2,25). - Changement de métabolisme de acétate + lactate + éthanol vers butyrate.	Liu et al., 2008
<i>C. beijerinckii</i> + <i>Geobacter metallireducens</i>	- Augmentation de la production d'H ₂ (35 %). - Élimination du stress pH par consommation des acides produits par <i>Clostridium</i> .	Zhang et al., 2012
<i>C. butyricum</i> + <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	- Production d' H ₂ sans phase de latence. - Élimination du stress pH par consommation des acides produits par <i>Clostridium</i> .	Lee et al., 2012 Fang et al., 2006
<i>Clostridium</i> sp. + <i>Enterobacter</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.	- Augmentation de la production d'H ₂ . - Élimination d'O ₂ résiduel. - Hydrolyse de substrats complexes.	Yokoi et al., 2002 Chang et al., 2008

Tableau 1 : Synthèse des différentes associations et stratégies de l'utilisation de *Clostridium* sp. en coculture décrites dans la littérature.

La mise en œuvre des procédés de production de biohydrogène en cultures mixtes rencontre donc des verrous scientifiques dus à un manque de compréhension et de contrôle (i) des interactions microbiennes régissant le métabolisme global de ces communautés microbiennes, (ii) de l'installation de métabolismes indésirables non producteurs voire consommateurs d'hydrogène, et (iii) des bioprocédés à mettre en œuvre pour lever les inhibitions métaboliques et contrôler au mieux ces écosystèmes, avec pour objectif une production robuste et stable dans le temps à partir de substrats complexes. Toutes les associations décrites visent à améliorer le rendement de la production d'hydrogène. Toutefois, les mécanismes de coopération et/ou compétition entre les différentes souches ou encore les changements des flux métaboliques ne sont pas encore élucidés.

4. Approche innovante d'ingénierie écologique d'écosystèmes microbiens ou contrôle biotique

4.1 Origine et Concept

Largement développée dans le domaine des biotechnologies, l'utilisation de souches pures a permis d'acquérir de nombreuses connaissances sur les métabolismes fermentaires bactériens et la modélisation des flux métaboliques en milieu simple. Dans le domaine de l'environnement et au regard de la complexité des substrats potentiellement mobilisables, l'utilisation de communautés microbiennes complexes est privilégiée, et ce, en dépit du manque de connaissances sur les acteurs fonctionnels individuels et leurs interactions. Les études microbiologiques se résument essentiellement à décrire les communautés en présence, en validation de principes d'écologie microbienne, notamment sur la biodiversité de ces milieux. Alors que de nombreuses études portent sur l'influence des paramètres opératoires sur ces mêmes communautés microbiennes, le contrôle de tels bioprocédés au moyen de facteurs biotiques (voir Figure 3) – autrement dénommés « ingénierie des écosystèmes » – est une approche innovante, de rupture, qui permettrait de surcroît d'apporter des connaissances sur les interactions existantes entre microorganismes au sein d'un même consortium. Dans les systèmes macroscopiques, l'approche d'ingénierie écologique désigne la gestion de milieux et la conception d'aménagements durables, adaptatifs, multifonctionnels, inspirés par les mécanismes qui gouvernent les systèmes écologiques (Hastings *et al.*, 2007).

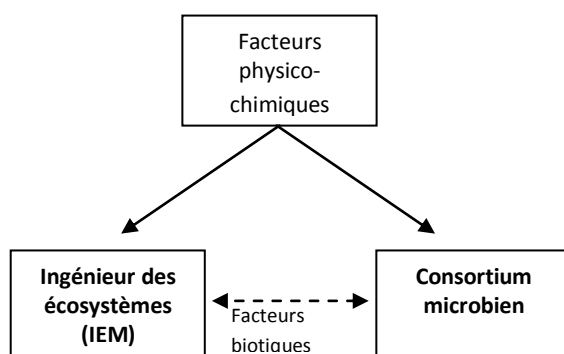


Figure 3. Intégration du concept d'ingénierie écologique dans le fonctionnement des écosystèmes (d'après Hastings *et al.*, 2007).

Dans le cas des études présentées dans les paragraphes suivants, il s'agissait d'appliquer ces approches à des écosystèmes dont l'environnement est parfaitement contrôlé. L'approche proposée d'ingénierie écologique microbienne consiste donc à concevoir, **construire et maintenir des écosystèmes microbiens semi-synthétiques** présentant une fonction d'intérêt donnée. Il s'agit d'une approche dirigiste et mécanistique d'étude d'un écosystème et d'utilisation des interactions existantes entre acteurs fonctionnels, sur la base de la phylogénie, du métagénome et du transcriptome associés. Un tel contrôle métabolique par des facteurs biotiques a pour objectif une production optimale, stable et contrôlée d'hydrogène. De récentes recherches, initiées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA-Narbonne) et uniques en leur genre, ont permis d'identifier des microorganismes pouvant potentiellement servir d'ingénieur des écosystèmes (Rafrafi *et al.*, 2013), et de démontrer le potentiel de contrôle biotique d'un procédé de production de biohydrogène *via* certains microorganismes « clés » (cf. paragraphe suivant). L'originalité de cette approche consiste donc à se situer à l'intersection des domaines scientifiques du génie microbiologique en cultures pures, de l'écologie microbienne en cultures mixtes et du génie des procédés en vue de répondre à une problématique commune de production de biohydrogène.

Alors que cette approche était difficile à mettre en œuvre quelques années auparavant, les progrès réalisés dans les domaines de la physiologie microbienne et du contrôle métabolique sur des bactéries « isolées » ou en cocultures synthétiques permettent désormais d'envisager d'obtenir des réponses sur le fonctionnement d'un consortium bactérien plus complexe. De plus, les technologies moléculaires de suivi des communautés microbiennes complexes ayant également grandement évolué ces dernières années, la combinaison de l'ensemble de ces techniques nous permet aujourd'hui de pouvoir nous confronter à des cultures toujours plus complexes. Cette stratégie d'ingénierie des écosystèmes microbiens a donc pour principal objectif de parvenir à une conduite raisonnée et optimisée des processus microbiens ancrée sur la connaissance des métabolismes liés aux interactions entre populations microbiennes, en lien avec un développement de procédés adaptés permettant de lever certains freins métaboliques. L'élaboration de préconisations techniques de gestion de tels écosystèmes nécessite donc d'améliorer grandement l'état des connaissances dans le domaine de ces réseaux d'interactions métaboliques complexes et, plus particulièrement, dans le cadre spécifique d'une production optimale et durable de biohydrogène pour pérenniser cette filière.

4.2 Cas du contrôle biotique d'écosystèmes microbiens fermentaires producteurs de biohydrogène

Les études présentées ci-dessous ont eu pour objectif principal d'étudier les réseaux d'interactions existants entre microorganismes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire, afin de mieux en contrôler leur stabilité fonctionnelle au sein de procédés en cultures mixtes sur substrats complexes et d'en optimiser au final la production bioénergétique. Il s'agissait pour cela de déterminer l'interdépendance des voies métaboliques produisant de l'hydrogène de plusieurs microorganismes en présence d'autres acteurs microbiens (majoritaires ou minoritaires). Pour cela, une approche d'ingénierie écologique a été mise en œuvre *via* la conception, la construction et le maintien d'écosystèmes microbiens semi-synthétiques (où contrôle biotique des écosystèmes microbiens).

La méthodologie de recherche mise en œuvre a été : (1) d'identifier les microorganismes notamment minoritaires, dit espèces clés, pouvant être utilisés comme ingénieur des écosystèmes microbiens, (2) d'utiliser ces microorganismes en contrôle biotique (ou ingénieur des écosystèmes) et (3) d'étudier par assemblage purement synthétique la nature des interactions existant entre microorganismes fermentaires.

4.2.1 Identification des espèces clés issus d'écosystèmes naturels

Afin d'identifier certaines espèces-clés pouvant être ultérieurement réintroduite comme ingénieur des écosystèmes (IEM), une approche de simplification d'écosystèmes naturels a été mise en œuvre notamment pour mettre en évidence l'influence de microorganismes minoritaires au sein de ces écosystèmes. En effet, alors que ces microorganismes minoritaires (de faible abondance mais actifs) sont omniprésents en procédés, leur rôle exact n'était pas connu. La méthodologie utilisée a été de simplifier des écosystèmes de départ de diversité et structures microbiennes différentes en chémostat.

La simplification d'une diversité large d'écosystèmes producteurs d'hydrogène a donc été réalisée. Pour cela, sept inocula (boues anaérobies, caecotrophes, manioc fermenté, traités thermiquement + un mixte des trois) ont été cultivés en chémostats strictement identiques (pH 5.5, temps de séjour hydraulique de 6 heures, température de 37°C, substrat glucose à 10 g/L, milieu Starkey modifié – Raftai, 2012). Il a été montré que malgré des conditions opératoires strictement identiques, les performances de production d'hydrogène variaient fortement tant en termes de rendements que de productivités (respectivement de 1.21 à 2.32 moles_{H₂}/mole_{Glucose} et 5.4 à 9.1 mmol_{H₂}/L/h) (voir Tableau 2).

	BDA ^{pth}	BDA	Man ^{pth}	Man	Cæ ^{pth}	Cæ	Mix
P (mmol H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	5,47 ^a	9,07 ^e	8,04 ^d	6,42 ^b	7,45 ^c	6,56 ^b	8,06 ^d
Y (mol H ₂ . mol ⁻¹ Glc _{consommé})	1,21 ^A	1,92 ^C	1,79 ^{B,C}	1,41 ^A	1,72 ^B	2,32 ^D	1,87 ^C

Tableau 2 : Performances de production d'hydrogène des sept réacteurs à l'équilibre : les boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement (BDA^{pth}), les boues de digesteur anaérobie (BDA), le manioc fermenté prétraité thermiquement (Man^{pth}), le manioc fermenté (Man), les cæcotrophes prétraités thermiquement (Cæ^{pth}), les cæcotrophes (Cæ) et le mélange des trois inocula non prétraité thermiquement (Mix). Pour les deux catégories (P et Y), les résultats obtenus ont été comparés deux à deux à l'aide du t-test. Les valeurs indiquées par une même lettre ne diffère pas statistiquement ($p > 0,05$; t-tests).

Ainsi le contrôle seul des conditions opératoires des fermenteurs ne permet pas de garantir les performances du procédé (Rafrafi *et al.*, 2013). Afin de mieux appréhender ces résultats, une caractérisation des communautés microbiennes a été réalisée par CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism) (Figure 4), confirmant que les performances de production en hydrogène, et plus largement le réseau métabolique de l'écosystème à l'équilibre, était significativement impacté par la structure des populations microbiennes. De plus, résultat très remarquable, la bactérie dominante à l'équilibre était strictement identique dans 6 cas sur 7 et quelque soit l'écosystème étudié, seul la composition en microorganismes minoritaires (<20% en abondance) variant. **Ces populations minoritaires étaient donc à l'origine des fluctuations observées sur la production effective en hydrogène** (lien fort entre structure de population et fonctionnalité globale) (Figure 4) (Rafrafi *et al.*, 2013). Après identification des espèces en présence, il peut en être conclu que la présence de bactéries lactiques compétitrices pour la source en substrat peut conduire à une réduction des rendements et productivités en hydrogène, alors même que ces microorganismes restent minoritaires à l'état d'équilibre des chimostats. De plus, ces résultats ont permis de conforter l'hypothèse de l'importance de certaines espèces clés minoritaires à l'impact physiologique très important (notamment *E.coli*), (voir Tableau 3). **Ce résultat unique a permis ainsi de démontrer l'influence d'espèces minoritaires dans le comportement d'un consortium bactérien.**

Numéro des pics	Affiliation proche de	Similarité des séquences (%)	Abondance relative des espèces dans chaque écosystème (%)						
			BDA ^{pth}	BDA	Man ^{pth}	Man	Cæ ^{pth}	Cæ	Mix
1	<i>Clostridium butyricum</i>	100	74,0	-	-	-	-	-	-
2	<i>Clostridium pasteurianum</i>	100	-	89,1	67,7	66,8	74,0	78,8	73,2
3	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99	15,7	-	18,3	12,6	15,8	18,8	16,8
4	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	99	3,5	-	-	-	-	-	-
5	<i>Bacillus coagulans</i>	99	1,8	-	-	-	-	-	-
6	<i>Bacillus racemilacticus</i>	100	5,0	10,9	-	-	-	-	-
7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	-	-	14,0	13,6	-	-	10,0
8	<i>Lactobacillus casei</i>	100	-	-	-	7,0	-	-	-
9	<i>Lactobacillus nagelii</i>	99	-	-	-	-	7,3	-	-
10	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	99	-	-	-	-	2,9	-	-
11	<i>Escherichia coli</i>	100	-	-	-	-	-	2,4	-

Tableau 3 : Affiliation phylogénétique des séquences de clones correspondant au numéro des pics des profils de CE-SSCP et abondance relative de chaque espèce dans les différents écosystèmes calculée à partir de l'aire de chaque pic correspondant. Le pourcentage de similarité des séquences par rapport aux espèces identifiées est également fourni.

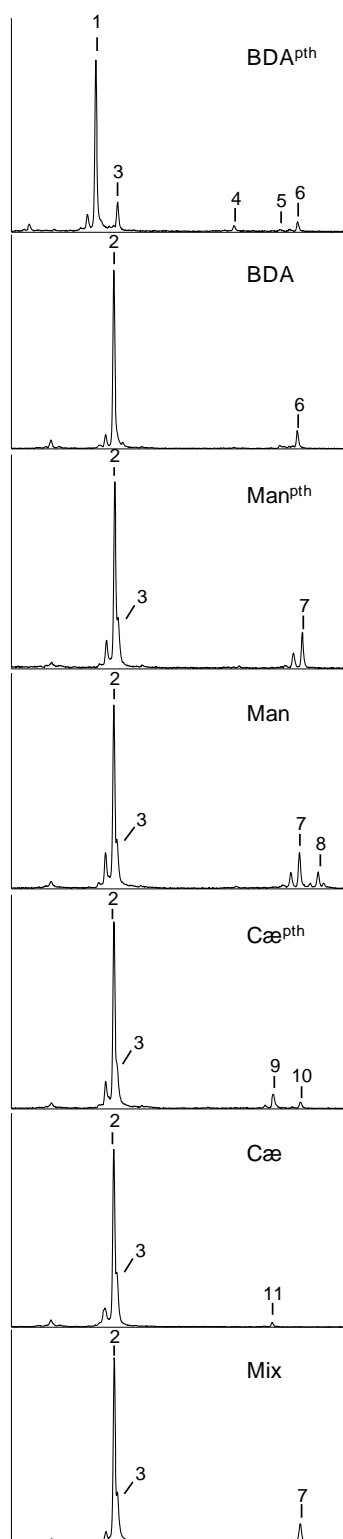


Figure 4 : Profils CE-SSCP des sept écosystèmes producteurs d'hydrogène à l'équilibre. Un profil représentatif de l'écosystème a été représenté pour chaque culture. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics. L'affiliation phylogénétique des séquences de clones correspondant au numéro des pics des profils de CE-SSCP est donnée dans le Tableau 3.

4.2.2 Utilisation d'espèces clés en tant qu'« ingénieur des écosystèmes »

A la suite de l'identification des espèces-clés des écosystèmes microbiens, il fut prévu de les réintroduire, ainsi que d'autres souches ayant un métabolisme lié à l'hydrogène, comme ingénieur des écosystèmes afin de réaliser le contrôle biotique d'écosystèmes producteurs d'hydrogène. Le contrôle biotique a donc été testé sur deux écosystèmes différents, l'un ayant des performances intrinsèques de rendement en hydrogène faible (ECO A) et l'autre étant très instable de par sa structure microbienne (ECO B), en cultures discontinues ou « batch ». De nombreuses souches d'origine phylogénétique différente ont alors été introduites en tant qu'IEM.

Dans le cas d'ECO A, **un effet bénéfique a été observé sur la production d'hydrogène (facteur d'amélioration jusqu'à près de 3.5 fois)** confirmant les résultats lors de l'identification avec notamment un effet positif d'*E.coli* de près de 2.5 fois sur le rendement initial (voir Tableau 4). Ces résultats montrent qu'au-delà d'un effet positif, des souches au potentiel maximal d'amélioration du rendement hydrogène ont été identifiées alors même que celles-ci ne sont pas productrices d'hydrogène et plutôt consommatrices en conditions normales de culture, comme *Ralstonia eutropha* oxydant l'hydrogène en présence d'oxygène, ou *Desulfovibrio vulgaris*, bactéries sulfato-réductrices utilisant l'hydrogène en présence de sulfates (données non montrées).

Dans des conditions non optimales de culture (sans oxygène ou sulfates), **ces souches présentent un réel effet synergique avec les bactéries dominantes du genre *Clostridium* sp.** Ainsi, alors que l'apport de souches hyperproductrices d'hydrogène (*Clostridium pasteurianum*) permet d'améliorer le rendement par simple effet compétitif, l'ajout de souches comme *Escherichia coli* ou *Ralstonia eutropha* qui ne produisent que pas ou peu d'hydrogène en cultures pures, démontrant un réel effet synergique entre microorganismes producteurs (essentiellement *Clostridium* sp) et ces souches minoritaires dans les écosystèmes fermentaire « naturels ».

Mélange	P _{max} (mLH ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		H _{max} (mLH ₂ .L ⁻¹)		Rendement (mol H ₂ .mol ⁻¹ hexose)	
Eco A	9,9	±3,6	441,5	±35,4	0,31	±3,2
Eco A+ <i>Clostridium pasteurianum</i>	26,6 ^{ns}	±15,6	842,4 ^{ns}	±459,6	0,60 ^{ns}	±0,6
Eco A+ <i>Enterobacter cloacae</i>	11,8 ^{ns}	±0,6	657,0*	±80,9	0,47*	±0,7
Eco A+ <i>Escherichia coli</i>	37,8*	±11,2	1 097,6*	±273,9	0,78*	±0,6
Eco A+ <i>Enterococcus casseliflavus</i>	19,1 ^{ns}	±11,4	669,2 ^{ns}	±325,6	0,47 ^{ns}	±2,2
Eco A+ <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27,2 ^{ns}	±17,7	1 056,2 ^{ns}	±561,5	0,75 ^{ns}	±1,6
Eco A+ <i>Ralstonia eutropha</i>	47,0*	±10,9	1 541,4*	±46,0	1,09*	±2,3

Tableau 4 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco A et des différents mélanges souche pure/consortium. Valeurs issues de la modélisation des cinétiques de production d'hydrogène. La significativité statistique des résultats des différents mélanges souche pure/consortium par rapport à Eco A seul est indiqué par les symboles « ns » pour non significatif et * pour statistiquement significatif (p<0,05 ; ANOVA).

De la même manière, l'introduction de souches permet également d'améliorer les performances de stabilisation d'un écosystème au rendement élevé de production d'hydrogène mais d'une instabilité maximale, due à la présence de plusieurs métabolismes successifs (ECO B) (voir Tableau 5).

Ainsi, lors de ces études (Rafrafi, 2012), il a été démontré la possibilité **d'un contrôle biotique des écosystèmes fermentaires producteurs d'hydrogène, tant en amélioration du rendement de conversion des sucres en hydrogène, qu'en stabilisation du procédé de production.** Les

interactions mises en jeu peuvent être d'ordre compétitives, mais au delà les résultats suggèrent que certaines interactions puissent correspondre à une synergie entre microorganismes, notamment lorsque l'un des partenaires ne se trouve pas dans des conditions de croissance optimales. En effet, de manière intéressante, la classification phylogénétique ne semble pas être un facteur pertinent quant à leur mode d'action, mais plutôt le lien entre la physiologie de l'IEM et son rapport au métabolisme hydrogène (les plus favorables étant les consommateurs d'hydrogène placés dans des conditions défavorables à leur croissance, donc dans l'obligation d'interagir), ou sur la stabilité de l'écosystème.

Mélanges	P _{max} (mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		H _{max} (mL H ₂ .L ⁻¹)		Rendement (mol H ₂ .mol ⁻¹ _{glc consommé})	
Eco B	126,8	±52,6	2 156,9	±785,6	1,71	±0,72
Eco B + <i>C. acetobutylicum</i>	50,1*	±3,5	1 372,8 ^{ns}	±216,7	1,18 ^{ns}	±0,18
Eco B + <i>C. pasteurianum</i>	165,2 ^{ns}	±47,8	1 999,2 ^{ns}	±471,4	1,66 ^{ns}	±0,4
Eco B + <i>L. bulgaris</i>	107,6 ^{ns}	±58,5	866,0*	±193,1	1,23 ^{ns}	±0,25
Eco B + <i>E. coli</i>	112,0^{ns}	±3,5	2 157,7^{ns}	±269,7	1,80^{ns}	±0,26
Eco B + <i>E. casseliflavus</i>	106,3 ^{ns}	±23,9	1 551,2 ^{ns}	±537,5	1,24 ^{ns}	±0,42
Eco B + <i>DvH</i>	159,5 ^{ns}	±48,5	1 752,9 ^{ns}	±692,6	1,36 ^{ns}	±0,52
Eco B + <i>R. eutropha</i>	154,0^{ns}	±26,3	2 228,1^{ns}	±399,3	1,75^{ns}	±0,31

Tableau 5 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco B et des différents mélanges souche pure / consortium non impactant la cinétique d'Eco B. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d'hydrogène. La significativité statistique des résultats est indiquée par les symboles ns pour non significatif et * pour statistiquement significatif (p<0,05 ; ANOVA). En gras, les meilleurs compromis entre production d'hydrogène et stabilité métabolique.

4.2.3 Mise en évidence de nouvelles interactions microbiennes

Ainsi, et afin de mieux caractériser les interactions métaboliques pouvant exister au sein de cultures complexes produisant du biohydrogène, l'assemblage de souches modèles a été réalisé en tant que support d'étude avec l'objectif de créer un écosystème purement synthétique mais aux partenaires parfaitement caractérisés (génomés séquencés et métabolismes connus). Les souches étudiées, *i.e.* souche productrice et souche IEM été choisies sur la base des résultats précédents, soit respectivement *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 dénommé Cab, et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough dénommé DvH.

Il a été montré que l'association de ces souches permettait d'améliorer significativement la production d'hydrogène par Cab en présence de DvH d'un facteur de près de 2.5 (Benomar, 2013). Ceci confirme les résultats obtenus précédemment, et démontre un **effet synergique de la présence de DvH**, alors même que cette souche ne produit pas d'hydrogène et ne présente que très peu de croissance dans les conditions de culture (Figure 5).

En présence de ces deux microorganismes et suite à une caractérisation du métatranscriptome, il a été observé que le métabolisme de Cab était « redirigé » vers les voies de production en hydrogène, et notamment voie butyrate (suractivation de la butyrate kinase d'un facteur 2.5).

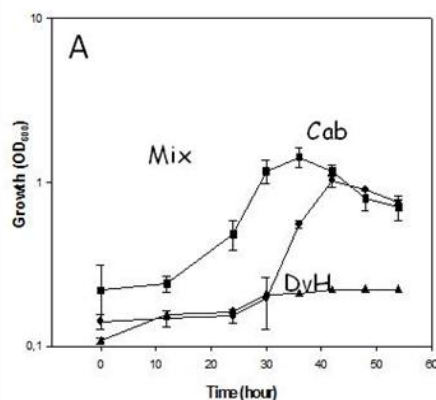


Figure 5 : Courbes de croissance de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ou Cab (●), *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough ou DvH (▲), ou en mixture (■), sur milieu Starkey modifié (sans sulfate)

De plus, il a par ailleurs été montré, que ce mode d'interaction ne se produisait que si un contact direct existait entre les microorganismes, et que les produits de culture seul de Cab ne permettaient pas la croissance de DvH, et inversement les produits de culture de DvH n'induisaient pas d'effet sur le métabolisme de Cab. Le contact direct obligatoire pour l'interaction entre ces deux microorganismes conduit de plus à la formation de structure sous formes d'agrégats (données non montrées). **La mise en évidence de ce nouveau type d'interaction par contact direct entre ces microorganismes est hautement originale et novatrice, avec comme résultat une synergie étroite entre les microorganismes fermentaires** (voir Figure 6) (Benomar *et al.*, 2013). Ce mode d'interaction est fortement lié à une association physique étroite et obligatoire à l'origine de changements métaboliques majeurs chez Cab. Ce mode d'interaction a alors été étudié plus en profondeur afin de mettre en évidence les mécanismes liés à celui-ci. Il a notamment été montré la présence d'une fusion des parois bactériennes, avec la dégradation des peptidoglycanes de Cab, conditionnés par la teneur en substrat. En absence d'interaction, DvH ne peut croître, alors qu'en consortium, les deux microorganismes présentent une croissance, démontrant un bénéfice mutuel de l'interaction. Longtemps suspecté comme moteur de l'interaction, il a par ailleurs été montré que ni l'action des pilis et flagelles (*via* l'utilisation de mutants), ni la présence d'H₂S, élément réducteur fort, n'influaient les échanges (Benomar *et al.*, 2013). En revanche ces éléments pouvaient avoir un effet sur la cinétique d'apparition de ces interactions (interaction plus ou moins rapide). **De plus, l'association physique existant entre les deux microorganismes conduit à la génération d'agrégats, et à leur adhésion à des supports et donc à un biofilm naissant possédant ces propres propriétés physiologiques.**

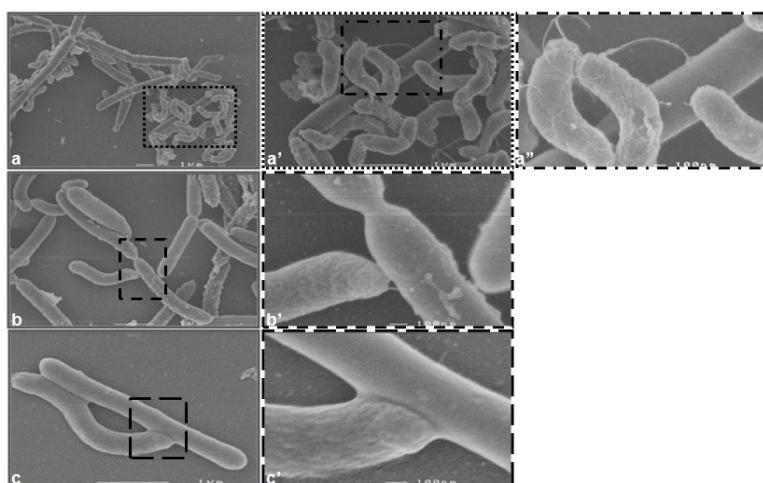


Figure 6 : Analyse par microscopie électronique à balayage de la coculture : (a) An cluster de cellules montrant les interactions entre *D. vulgaris* et *C. acetobutylicum* (X 8000). (a') zoom de l'image a (X 22000). (a'') zoom de l'image a'(X 50000). (b) autre image de la co-culture (X 18000). (b') Zoom de l'image b b (X 80000). (c) autre image de la co-culture (X 30000). (c') zoom de l'image c (X 100000). (n=3).

Conclusions

De nos jours, les bioénergies issues de la biomasse ne représentent qu'un pourcentage infime de la production d'énergie primaire et sont vouées à se développer fortement au travers de l'engagement actuel de la France et de l'Europe, notamment vis à vis du développement des bioéconomies en général à l'horizon de 2020. La recherche de technologies innovantes dite de rupture s'avère donc indispensable pour promouvoir les filières bioénergies en tant qu'alternatives crédibles aux ressources fossiles. Notamment, le biohydrogène constitue une voie d'avenir qui s'insérerait dans un contexte plus large de développement d'une filière énergétique « hydrogène » tout en proposant un moyen de gestion durable des filières agro-énergétiques et de valorisation de sous-produits organiques. Le développement à grande échelle d'une telle filière « biohydrogène » dépendra fortement de la mise en œuvre de technologies robustes et fiables permettant une conversion énergétique efficace de la biomasse.

Longtemps mis à l'écart des recherches biotechnologiques au regard de leur complexité, l'utilisation d'écosystèmes microbiens complexes connaît depuis quelques années un regain d'intérêt fort suite à l'émergence de techniques moléculaires apportant une meilleure compréhension des processus microbiens en jeu. Outre leur grande adaptabilité et flexibilité métabolique, les cultures mixtes microbiennes présentent des propriétés intrinsèques liées aux multiples interactions existant entre micro-organismes et qui peuvent s'avérer d'un intérêt biotechnologique. Néanmoins, la multiplicité et le peu de contrôle des interactions mises en jeu conduisent à une certaine instabilité métabolique de ces écosystèmes.

Le développement des présents travaux à l'interface entre différentes disciplines de microbiologie moléculaire et d'ingénierie microbiologique ont permis des avancées scientifiques majeures en mettant en évidence et caractérisant des interactions physiques et métaboliques nouvelles entre microorganismes en cultures mixtes. Notamment, l'identification de « microorganismes-clés » d'abondance faible dans les écosystèmes fermentaires naturels a permis d'envisager de nouveaux moyens de contrôle, biotiques, des écosystèmes microbiens. En effet, leur réintroduction permettrait de piloter finement le métabolisme global d'un consortium microbien, tant en performance qu'en stabilité. Les interactions en jeu conduisent à la genèse de structures de type « méta-organisme » présentant des propriétés émergentes qui se traduisent ici par une augmentation significative de la production d'hydrogène ($> \times 2.5$). Ce mode d'interaction, hautement original, permet donc d'envisager un contrôle biotique fin des écosystèmes fermentaires.

Au delà même de la production de biohydrogène et des biotechnologies environnementales, l'approche d'ingénierie écologique microbienne, via l'identification d'espèces clés des écosystèmes puis leur utilisation en tant qu'« ingénieur des écosystèmes », ouvre des perspectives intéressantes dans d'autres domaines où les écosystèmes microbiens sont utilisés comme en agroalimentaire, et où l'émergence de propriétés uniques d'un « méta-organisme » issu d'interactions microbiennes contrôlées offrirait des perspectives de développement d'applications biotechnologiques nouvelles.

Remerciements

Les partenaires du projet InGEcoH (ANR BIOE2008-005) sont grandement remerciés pour leur implication ainsi que l'ANR pour l'attribution du financement de ces recherches.

Références bibliographiques

- Ahring B.K., Westermann P., 1987. Kinetics of Butyrate, Acetate, and Hydrogen Metabolism in a Thermophilic, Anaerobic, Butyrate-Degrading Triculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2): 434-439
- Benomar S., Cárdenas M.L., Trably E., Rafrafi Y., Ducret A., Hamelin J., Lojou E., Steyer J.P., Giudici-Ortoni M.T., 2013. Cell-cell interactions in mixed bacterial culture induce metabolic coupling and improve hydrogen production. *Nat. Commun.* (soumis)
- Chang J.J., Chou C.H., Ho C.Y., Chen W.E., Lay J.J., Huang C.C., 2008. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 33 : 5137-5146.
- Chen C.C., Lin C.Y., Lin M.C., 2002. Acid–base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(2): 224-228
- EIA. Energy Information Administration (2007). <http://www.eia.doe.gov/>
- Fang H.H.P., Zhang T., Liu H., 2002. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(1): 112-118.
- Fang H.H.P., Zhu H., Zhang T., 2006. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy* 31 : 2223-2230.
- Fukuzaki S., Nishio N., Shobayashi M., Nagai S., 1990. Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(3): 719-723
- Geng A., He Y., Qian C., Yan X., Zhou Z., 2010. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*. *Bioresour Technol* 2010, 101 : 4029-4033.
- Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J.P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (19): 10660-10673
- Hastings A., Byers J.E., Crooks J.A., Cuddington K., Jones C.G., Lambrinos J.G., Talley T.S., Wilson W.G., 2007. Ecosystem engineering in space and time. *Ecol. Lett.* 10: 153–164
- Koskinen P.E.P., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., 2007. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 97 (4): 742-758
- Latrille E., Trably E., Larroche C., 2011. Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. *Techniques de l'Ingénieur*, article numéro BIO 3351 (19 pages)
- Lee M.J., Zinder S.H., 1988. Hydrogen partial pressure in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6): 1457-1461
- Lee J.Y., Chen X.J., Lee E.J., Min K.S., 2012. Effects of pH and carbon sources on biohydrogen production by co-culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J Microbiol Biotechnol* 22 : 400-406.
- Li C., Fang H.H.P., 2007. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Crit. Rev. Environ. Science Technol.* 37(1): 1-39
- Liu Y., Yu P., Song X., Qu Y., 2008. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *Int J of Hydrogen Energy* 2008, 33 : 2927-2933.
- Masset J., Calusinska M., Hamilton C., Hilgsmann S., Joris B., Wilmotte A., Thonart P., 2012. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnol Biofuels* 2012, 5 : 35-41
- Monlau F., Sambusiti C., Barakat A., Guo X.M., Latrille E., Trably E., Steyer J.P., Carrere H., 2012. Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environmental Science and Technology*, 46 (21): 12217-12225

Monlau F., Barakat A., Trably E., Dumas C., Steyer J.P., Carrere H., 2013. Lignocellulosic materials into Biohydrogen and Biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43 (3): 260-322

Pessiot J., Nouaille R., Jobard M., Singhanian R., Bournilhas A., Christophe G., Fontanille P., Peyret P., Fonty G., Larroche C., 2012. Fed-batch anaerobic valorization of slaughterhouse by-products with mesophilic microbial consortia without methane production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 167, 1728–1743

Rafrafi Y., Trably E., Hamelin J., Latrille E., Meynial-Salles I., Benomar S., Guidici-Ortoni M.T., Steyer J.P., 2013. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, (in press)

Schröder C., Selig M., Schönheit P., 1994. Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch. Microbiol.* 161: 460-470

Soni B.K., Soucaille P., Goma G., 1987. Continuous acetone butanol fermentation : influence of vitamins on the metabolic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:1-5

Stolyar S., Van Dien S., Hillesland K.L., Pinel N., Lie T.J., Leigh J.A., Stahl D.A., 2007. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol. Syst. Biol.* 3(92): 1-14

Tanouchi Y., Smith R., You L., 2012. Engineering microbial systems to explore ecological and evolutionary dynamics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(5): 791-797

Ueno Y., Otsuka S., Morimoto M., 1996. Hydrogen Production from Industrial Wastewater by Anaerobic Microflora in Chemostat Culture. *J. Ferment. Bioeng.* 82(2): 194-197

Vavilin V.A., Rytow S.V., Lokshina L.Y., 1995. Modeling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. *Bioresour. Technol.* 54(2): 171-177

Yokoi H., Maki R., Hirose J., Hayashi S., 2002. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy* 22 : 389-395.

Zhang Z.P., Show K.Y., Tay J.H., Liang D.T., Lee D.J., Jiang W.J., 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem.* 41(10): 2118-2123

Zhang X., Ye X., Finneran K.T., Zilles J.L., Morgenroth E., 2012. Interactions between *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens* in co-culture fermentation with anthrahydroquinone-2, 6-disulfonate (AH(2) QDS) for enhanced biohydrogen production from xylose. *Biotechnol Bioeng.* Aug 7. doi: 10.1002/bit.24627.