



HAL
open science

Impact des facteurs biotiques sur le réseau métabolique des écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte

Yan Rafrafi

► **To cite this version:**

Yan Rafrafi. Impact des facteurs biotiques sur le réseau métabolique des écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2012. Français. NNT: . tel-02808950

HAL Id: tel-02808950

<https://hal.inrae.fr/tel-02808950>

Submitted on 6 Jun 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.

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biotechnologie, microbiologie

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement
par

Yan RAFRAFI

Titre :

***Impact des facteurs biotiques sur le réseau métabolique des
écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire en
culture mixte***

le 28 juin 2012 devant la commission d'examen :

Jury

M. Christian LARROCHE	Polytech'Clermont-Ferrand	, Rapporteur
M. Thierry LEBEAU	LPG - Université de Nantes	, Rapporteur
M. Alain GRASMICK	Université Montpellier II	, Examineur
M. Franck POLY	Université Lyon I	, Examineur
M. Eric TRABLY	LBE - INRA Narbonne	, Examineur
M. Jean-Philippe STEYER	LBE - INRA Narbonne	, Directeur de thèse

Impact des facteurs biotiques sur le réseau métabolique des écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte

Résumé

Les cultures mixtes sont aujourd'hui considérées comme une sérieuse alternative aux cultures pures dans le cadre des biotechnologies du fait leur capacité à traiter une large variété de substrats organiques et ce en conditions non stériles. La principale restriction à leur utilisation réside toutefois dans une instabilité du procédé liée à la présence de voies métaboliques non désirées résultant d'interactions microbiennes complexes. Notamment, le rôle des bactéries de faible abondance dans les écosystèmes reste à être élucidé.

Ce travail a donc consisté à déterminer le rôle des bactéries minoritaires dans la production d'hydrogène par voie fermentaire. Dans un premier temps, sept inocula ont été cultivés en réacteurs continus, dans les mêmes conditions opératoires. La même espèce dominante a été observée six fois sur sept mais les performances de production d'hydrogène différaient. Seules la nature et la diversité des espèces minoritaires variaient d'un écosystème à l'autre prouvant ainsi que les bactéries en proportion minoritaires jouent un rôle clé en orientant le métabolisme global de l'écosystème. Dans un second temps, certaines de ces espèces minoritaires ont été utilisées comme perturbateurs biotiques. Pour cela, un écosystème producteur d'hydrogène a été modifié artificiellement en introduisant des souches bactériennes exogènes aux fonctions redondantes et/ou complémentaires des souches indigènes. Les résultats en réacteur batch ont montré que les performances de production d'hydrogène pouvaient ainsi être améliorées. Globalement, les résultats obtenus ne peuvent être expliqués par de simples interactions trophiques et suggèrent la présence de mécanismes d'interactions de coopération entre microorganismes. De plus, sous des conditions opératoires plus favorables, l'insertion de certaines espèces minoritaires a permis de stabiliser l'écosystème microbien, sans pour autant en affecter la production d'hydrogène. Dans tous les cas, les interactions compétitives n'ont pas été favorables à la production d'hydrogène. Enfin, des essais en réacteur continu ont montré que le mode d'implantation des souches peut être un facteur primordial.

TITLE

Impact of the biotic factors upon the metabolic pathways of hydrogen producing ecosystems using fermentative mixed culture

Abstract

Nowadays, mixed cultures are considered as a serious alternative to pure cultures for biotechnology processes. Indeed, mixed cultures can be efficient under non-sterile conditions, and can use a wide variety of organic compounds as substrate. Their main limitation is instability due to the presence of unwanted metabolic pathways resulting from complex microbial interactions. In particular, the role of bacteria in low abundance remains to be elucidated.

This work has therefore consisted to determine the role of minority bacteria in the hydrogen production using fermentative. Seven inocula have been grown in a continuous way in the same operating conditions. Six times on seven, the same bacterium was found to be the dominant species of the ecosystem, despite differences in the hydrogen production. Considering the seven ecosystems obtains, only the nature and the diversity of the low abundance species differed, showing that the bacteria in low abundance play a key role by guiding the overall ecosystem metabolism. In a second step, this work consisted in using some of these minority species as ecological engineers of microbial ecosystem. In order to study this aspect, a hydrogen-producing microbial community has been artificially modified by adding exogenous bacterial strains with redundant functions and/or complementary native strains. Results in batch reactors have shown that the hydrogen production performances could be improved by the addition of certain strains. Results obtained cannot be explained by simple trophic interactions and suggest the presence of interaction mechanism of cooperation among microorganisms. Moreover, under more favorable operating conditions; the addition of certain species in low abundance could stabilize the metabolism of microbial ecosystem without affecting the hydrogen production. In all cases, competitive interactions were not favorable for hydrogen production. Trials were then realized in continuous reactors. These trials have shown that the method used to implant strains in reactors could be a key factor for using the ecological engineers.

Discipline : Biotechnologie, microbiologie

Mots-clés : Hydrogène, fermentation, consortium microbien, voies métaboliques, cultures mixtes

Keywords: Hydrogen, fermentation, microbial consortium, metabolic pathways, mixed cultures

Intitulé et adresse du laboratoire : Institut National de la Recherche Agronomique – Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA-LBE), Avenue des Etangs, 11 11 NARBONNE

Je dédie cette thèse à la mémoire de ma mère.

Elle était admirable à tant d'égards.

Elle était ma supportrice la plus fidèle.

Elle me manque chaque jour.

REMERCIEMENTS

Une fois n'est pas coutume, je voudrais commencer par remercier trois hommes qui ont contribué à faire de moi, du moins je l'espère, un homme meilleur ou tout du moins un meilleur scientifique. En effet, leur exigence permanente, leurs conseils avisés et leur complémentarité scientifique ont grandement contribué à la qualité de ce travail.

Ma gratitude va tout d'abord à M. **Eric TRABLY**, ingénieur de recherche au LBE, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir proposé de faire partie d'un aussi beau projet scientifique. Merci pour ton encadrement tout au long de la thèse. Ta disponibilité sans faille, ton soutien, ta confiance, ta gentillesse, ta rigueur scientifique et ton exigence ont assurément été des facteurs essentiels au bon déroulement de ce travail. Je suis certain que les méthodes de travail que j'ai acquises à tes côtés me seront précieuses pour l'avenir. Je te remercie également de m'avoir laissé gagner au moins une fois au squash même si pour cela j'ai dû attendre que tu aies le genou en vrac, ça valait le coup.

Je remercie ensuite M. **Eric LATRILLE**, ingénieur de recherche au LBE, pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Merci pour tes conseils précieux en matière d'analyse statistique et autres domaines scientifiques. J'ai toujours été fan de ton côté Géo Trouvetou. Je te remercie également pour toute l'aide que tu m'as apportée pour l'instrumentation des fermenteurs et la récupération de toutes les données. Enfin, je te remercie pour ta formidable paëlla qui, rien qu'en y repensant, me donne encore l'eau à la bouche.

Enfin, je remercie M. **Jean-Philippe STEYER**, directeur de thèse et accessoirement directeur du LBE pour avoir accepté de diriger ce travail. Merci Jean-Phi pour ta disponibilité sans limite malgré ton emploi du temps de ministre, pour la pertinence scientifique de tes remarques et pour l'intérêt constant que tu as su porter au sujet tout au long de ces trois années. Merci aussi d'avoir su rester un homme simple et accessible malgré tes responsabilités. Merci pour les repas chez toi avec ta formidable famille. Et enfin merci pour les leçons de squash, même si, à la fin l'élève avait dépassé le maître.

Après avoir salué ces trois Messieurs (avec un grand M), je voulais exprimer toute ma gratitude envers les différents membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail. Un remerciement plus particulier à M. **Christian LARROCHE** et M. **Thierry LEBEAU** qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit en tant que rapporteur.

Et que dire des membres de mon comité de thèse, Mme. **Marie-Thérèse Guidici-Ortoni** et Mme. **Isabelle Meynial-Salle**. Vos commentaires si constructifs et incisifs m'ont permis de grandement améliorer la qualité de ce travail. Merci pour tout ! Isabelle je reviens vers toi pour te remercier de m'avoir accueilli en début de thèse au sein du LISBP afin de m'apprendre à travailler stérilement. Cette semaine dans ton laboratoire m'aura servi tout au long de ma thèse.

A very special thanks goes to the AWMC's fermentation team. So, thank you **Damien, Zuhaida, Steven, Paul, Chris...**

Je voulais également remercier tout le personnel du LBE grâce à qui j'ai pu profiter d'un cadre de travail agréable et de grande qualité. Le caractère pluridisciplinaire des équipes réunies à Narbonne m'a beaucoup apporté sur le plan scientifique. Il a contribué à faire de ce travail une expérience particulièrement enrichissante.

Merci à **l'équipe de microbiologie** de m'avoir accueilli comme si j'étais des leurs. L'apprentissage de la microbiologie au plombier que j'étais n'a pas dû être facile tous les jours. Merci d'avoir supporté mes chansons et mes blagues dont la qualité laissait parfois à désirer. Donc un grand merci à **Anaïs, Gaëlle et Valérie** pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur patience. Merci à **Gaëlle** de m'avoir formé au monde merveilleux du μL . Merci à **Anaïs** de m'avoir fait quelques extractions d'ADN, PCR et autres CE-SSCP et d'avoir été ma plus fervente supportrice au volley. Je voulais également exprimé toute ma gratitude envers M. **Jérôme Hamelin**, chargé de recherche au LBE. Ta disponibilité, ton soutien, ton humour, ta patience et ton tact dans les moments difficiles ont été un atout majeur pour cette thèse. Nos innombrables discussions dans le domaine de l'écologie microbienne m'ont tant appris que je ne peux que t'en être reconnaissant. Il faut absolument qu'on se débrouille pour repartir en conférence avec Amel ; l'Allemagne n'a jamais été aussi belle qu'en votre compagnie.

Merci à **Thierry** pour les heures de rigolades passées devant l'HPLC. Maintenant tu peux me le dire, tu ne les envoyais pas les tickets de tombolas que je t'achetais pour la CGT (en 5 ans je n'ai jamais rien gagné, c'est quand même un peu louche). Merci à **Guillaume** et à **Mickaël** pour les magnifiques armoires électriques que vous m'avez fabriqué. Et merci à toi Guigui pour les super sorties ski que tu as su organiser, pour ta gentillesse et ta spontanéité. Mercie à **Virginie** pour avoir toujours répondu présente dès que j'avais un problème avec SILEX.

Merci à **Michel** pour m'avoir introduit au sein du LBE. Merci à **Hélène** de m'avoir fait revenir. Merci à la dream team (**Alexandra, Annie, Nadine et Sylvie**) de m'avoir toujours dépanné quand j'avais un problème administratif. Merci à **Renaud** de m'avoir fait construire ta terrasse, merci à **Fred** de m'avoir permis de participer à la construction de ta piscine et surtout pour les apéros qui s'en suivaient. Merci à **Nico** et **Diana** pour leur gentillesse et leur convivialité. Merci à **Pascal et Philippe** pour leur bonne humeur communicative. Et merci à **Jean-Philippe, Nadine, Claire, Jean-Jacques, Jérôme, Kim, Domi, Nathalie, Audrey, Isabelle, Marjolaine, Denis** et **Véro** pour tous les formidables moments que l'on a partagés ensemble.

Et bien sûr, un très grand merci à tous les précaires de la recherche avec qui j'ai partagé tant de choses. J'ai une grande pensée pour mes deux stagiaires qui ont collaboré à ce travail. Merci à **Marie** d'avoir eu des résultats si intéressants et surtout un grand merci à **Simon** pour avoir obtenu des résultats si compliqués à interpréter. Vive le Poirrier effect !! Merci à **Marianne** pour tout ce que tu as fait sur le projet InGEcoH, pour nos rigolades dans le bureau et nos discussions interminables. Merci à **Amel**, ma comparse et amie du premier jour de thèse. Le mot ragot prend une autre dimension quand je suis avec toi. Je ne peux pas parler de ragots sans parler de **Kauff** et de **Florian** (allias Mimol). Merci les gars, on quadrillait la zone et rien ne pouvait nous échapper. Merci à **Florence** pour ta gentillesse, ton courage et ta bonne humeur. J'ai adoré tous les moments que l'on a passés ensemble surtout pour un certain dîner avec **Math, Mat, Marie-Laure, Romy, Soph** et **Val**. Ce moment là n'était pas loin d'être parfait. Merci aussi à **Maïa, Alexis, Xin Mei, Mel, Charlie, Bruno, Emilie, Quentin, Nico, JB, JC, Thibaut, Sofiane, Romain, Olivier, Liliana, Glenda...** et à tous ceux que j'ai croisé au LBE. Vous m'avez tant apporté.

La longueur des discours atténue parfois la portée qu'on veut leur donner. Nul besoin d'un long monologue pour exprimer ma reconnaissance envers **Marie-Laure** pour avoir été toujours présente dans les bons moments comme dans les moins bons, même quand tu te trouvais à l'autre bout du monde. Ton amitié est quelque chose que je chéris.

Merci aussi à **Caro** pour m'avoir aidé sur cette fin de thèse. Merci pour l'analyse des données de pyro-séquençage, pour l'aide que tu m'as apporté lors de la mise en page et l'impression du manuscrit. Et surtout un grand merci pour ta sincérité, ton écoute, tes conseils, et aussi pour l'infinie patience dont tu as fait preuve lors des innombrables répétitions de soutenances que j'ai effectué devant toi. Merci aussi pour les TLMVPSP, les séances de cinéma où l'on rigolait pendant toute la durée du film, pour les déjeuners et les diners qui parfois ne ressemblaient à rien (C'est Kloug, non ?). Bref, merci d'être ce que tu es. Tu es et tu resteras plus qu'une amie pour moi.

Je remercie également tous mes potes de volley de Roubia, d'Artone et de Box center pour m'avoir permis de m'évader lorsque la pression était trop forte. Donc merci à **Yann, Krouf, Thomas, PE, Pierrick, Jules, Arnaud, Philippe, Franck, La Loche, Flo, Pierre, Vincent, Greg, Elvis, Phil, Stef, Ludo, Lionel et Jack.**

Merci infiniment à **mes parents**, à **ma sœur** et à **ma grand-mère** qui m'ont soutenu à chaque instant malgré l'éloignement et qui ont toujours cru en moi. Il n'y a pas de mots pour vous dire à quel point je vous aime et à quel point je vous suis reconnaissant de tout ce que vous m'avez apporté. C'est à vous que je dédie cette thèse.

Enfin, merci à ma femme **Claire** pour tout l'amour qu'elle me porte. Merci pour ta patience, tes conseils, tes encouragements tout au long de ces années. Merci pour la compréhension dont tu as fait preuve lorsqu'il fallait que je t'abandonne les week-ends pour m'occuper de mes bébés (F1 et F2). Merci pour les innombrables relectures d'articles, de résumés, de présentations ou du manuscrit. Merci pour les Tupperware® que tu me préparais le week-end pour que je ne meurs pas de faim durant la semaine. Bref merci d'avoir toujours été là pour moi, tu tiens une place énorme dans mon cœur.

SOMMAIRE

Liste des figures	9
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations	13
Introduction	15
Chapitre I. Contexte bibliographique	23
I.1 La production d'hydrogène	23
I.1.1 L'hydrogène vecteur énergétique d'avenir	23
I.1.2 Utilisation de l'hydrogène.....	24
<i>I.1.2.1 Utilisation dans l'industrie chimique</i>	24
<i>I.1.2.2 Utilisation dans l'industrie pétrolière</i>	25
<i>I.1.2.3 Utilisation par combustion dans un moteur</i>	25
<i>I.1.2.4 Utilisation en pile à combustible hydrogène</i>	26
<i>I.1.2.5 Mélange hydrogène / gaz naturel</i>	28
<i>I.1.2.6 L'hydrogène de demain</i>	29
I.1.3 Les modes de production de l'hydrogène	29
<i>I.1.3.1 Production d'hydrogène à partir du reformage des combustibles fossiles</i>	29
<i>I.1.3.2 Production d'hydrogène à partir de sources non émettrices de gaz à effet de serre</i>	31
I.1.3.2.1 Réformage de la vapeur d'eau.....	31
I.1.3.2.2 Electrolyse de l'eau	31
I.1.3.2.3 Pyrolyse de la biomasse	33
I.1.3.2.4 Nucléaire.....	33
<i>I.1.3.3 Production biologique d'hydrogène</i>	34
I.1.3.3.1 Les hydrogénases, enzymes clés de la production d'hydrogène par voie fermentaire	34
I.1.3.3.2 Les photo-bioprocédés	36
I.1.3.3.3 La fermentation sombre	41
<i>I.1.3.4 Comparaison des modes de production</i>	41
I.2 La production d'hydrogène par voie fermentaire	43
I.2.1 Les voies métaboliques de la fermentation sombre	44

1.2.1.1	<i>Les voies productrices d'hydrogène</i>	45
1.2.1.2	<i>Les voies consommatrices d'hydrogène</i>	47
1.2.1.3	<i>Les voies disséminatrices de la production d'hydrogène</i>	48
I.2.2	La microbiologie de la fermentation sombre	50
1.2.2.1	<i>Utilisation de cultures pures dans la production d'hydrogène par voie fermentaire</i> .51	
1.2.2.1.1	<i>Clostridium sp.</i>	54
1.2.2.1.2	<i>Enterobacter sp.</i>	54
1.2.2.1.3	<i>Escherichia coli</i>	54
1.2.2.1.4	<i>Les espèces peu étudiées</i>	55
1.2.2.1.5	<i>Cas particulier des bactéries thermophiles et extrêmophiles</i>	55
1.2.2.2	<i>Utilisation de co-cultures pour la production d'hydrogène par voie fermentaire</i>	56
1.2.2.3	<i>Utilisation de cultures mixtes pour la production d'hydrogène par voie fermentaire</i>	58
1.2.2.3.1	<i>Les bactéries productrices d'hydrogène en cultures mixtes</i>	59
1.2.2.3.2	<i>Les bactéries autres que Clostridium sp. et Enterobacter sp. retrouvées dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène</i>	60
I.2.3	Conduite d'un procédé de culture mixte pour produire de l'hydrogène	65
1.2.3.1	<i>Sources et préparation des inocula microbiens</i>	65
1.2.3.2	<i>Paramètres opératoires appliqués pour la production d'hydrogène</i>	66
1.2.3.2.1	<i>Temps de séjour hydraulique (TSH)</i>	66
1.2.3.2.2	<i>Pression partielle en hydrogène</i>	67
1.2.3.2.3	<i>pH</i>	69
1.2.3.2.4	<i>Température</i>	71
1.2.3.2.5	<i>Nature et concentration du substrat</i>	72
1.2.3.2.6	<i>Composition du milieu de culture</i>	74
I.3	Interactions microbiennes et processus environnementaux	75
I.3.1	<i>Le neutralisme</i>	76
I.3.2	<i>La compétition</i>	76
I.3.3	<i>Le mutualisme ou synergisme</i>	77
I.3.4	<i>Le commensalisme</i>	78
I.3.5	<i>L'amensalisme ou l'antagonisme</i>	78
I.3.6	<i>Le parasitisme ou la prédation</i>	79
I.3.7	<i>Interactions trophiques ou nutritionnelles</i>	80
I.3.8	<i>Les molécules antimicrobiennes</i>	81
I.3.9	<i>Les interactions microbiennes directes</i>	83

Chapitre II. Matériel et Méthodes.....	87
II.1 Cultures en mode continu	88
II.1.1 Matériel biologique.....	88
II.1.1.1 <i>Inocula</i>	88
II.1.1.2 <i>Souche pure d'E. coli</i>	89
II.1.2 Milieu de culture.....	89
II.1.3 Mise en place du bioréacteur.....	90
II.1.4 Déroulement d'une expérimentation.....	93
II.2 Cultures en mode batch.....	95
II.2.1 Matériel biologique.....	95
II.2.1.1 <i>Les souches bactériennes pures</i>	95
II.2.1.2 <i>Consortia bactériens</i>	96
II.2.2 Milieux de culture.....	97
II.2.3 Techniques et conditions de culture.....	98
II.3 Analyses physico-chimiques.....	101
II.3.1 Mesure des concentrations en acides gras volatils (AGVs).....	101
II.3.2 Mesures des concentrations en acides organiques et en sucres par HPLC.....	102
II.3.3 Mesure de la concentration en biomasse.....	103
II.3.4 Mesure de la composition du biogaz.....	104
II.3.5 Suivi de la croissance des cultures par mesure de la densité optique (DO).....	106
II.3.6 Modélisation de la production d'hydrogène par voie fermentaire sombre.....	106
II.4 Analyses microbiologiques, étude des communautés microbiennes	107
II.4.1 Conservation des échantillons.....	108
II.4.2 Extraction et purification de l'ADN total.....	108
II.4.3 Amplification de l'ADN par PCR.....	109
II.4.4 La CE-SSCP (Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism).....	110
II.4.5 Le clonage-séquençage des séquences d'intérêt.....	112
II.5 Analyse statistique	113

Chapitre III. Etude des interactions microbiennes responsables de la production d'hydrogène en cultures mixtes et rôle des bactéries minoritaires	119
III.1 Problématique de l'étude	119
III.2 Objectifs de l'étude	120
III.3 Hypothèses de travail -postulats.....	120
III.4 Déroulement de l'étude	120
III.5 Performances de production d'hydrogène.....	122
III.5.1 Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps, obtention de l'état d'équilibre.....	122
III.5.2 Les performances de production d'hydrogène à l'équilibre	123
III.6 Le réseau métabolique des différentes cultures à l'équilibre.....	124
III.7 Structure des communautés microbiennes présentes dans les sept réacteurs.....	127
III.7.1 Evolution dynamique des écosystèmes producteurs d'hydrogène.....	127
III.7.2 Structure des communautés microbiennes à l'équilibre	130
III.8 Discussion.....	133
III.8.1 Corrélation entre performances de production d'hydrogène et réseau métabolique de l'écosystème	133
III.8.2 Bactéries majoritaires : productrices d'hydrogène.....	135
III.8.3 Les bactéries minoritaires comme espèces clés orientant le réseau métabolique de l'écosystème	136
III.8.3.1 <i>Clostridium beijerinckii</i> minoritaire et compétitrice	137
III.8.3.2 Les bactéries homolactiques : compétitrices ou amensales	137
III.8.3.3 <i>Escherichia coli</i> , espèce clé pilotant le métabolisme des <i>Clostridium</i> sp. ?.....	138
III.9 Conclusion sur le rôle des bactéries minoritaires dans la production d'hydrogène par voie fermentaire.....	140
Chapitre IV. Etude dynamique de consortia microbiens : influence des paramètres opératoires sur la structure des communautés microbiennes productrices d'hydrogène.....	143
IV.1 Problématique de l'étude	143
IV.2 Objectifs de l'étude	144

IV.3 Hypothèses de travail -postulats.....	144
IV.4 Déroulement de l'étude	144
IV.5 Effet de l'augmentation de la concentration en sulfate de fer	146
IV.5.1 Les performances de production d'hydrogène.....	146
IV.5.1.1 Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps, définition de l'état d'équilibre.....	146
IV.5.1.2 Productivités et rendements en hydrogène des deux fermenteurs	147
IV.5.2 Métabolisme des deux écosystèmes.....	148
IV.5.3 Dynamique de la structure des communautés microbiennes des deux fermenteurs F1 et F2.....	152
IV.5.4 Discussion	155
IV.6 Effet de l'augmentation de la charge en substrat carboné.....	159
IV.6.1 Productivités et rendements en hydrogène des deux fermenteurs	159
IV.6.2 Métabolisme global des deux écosystèmes.....	161
IV.6.3 Dynamique de la structure des communautés microbiennes des deux fermenteurs F1 et F2 lors de l'augmentation de la charge appliquée.....	164
IV.6.4 Discussion	166
IV.7 Conclusion de l'étude de l'influence des paramètres opératoires.....	169
Chapitre V. La perturbation biotique comme facteur de contrôle des cultures mixtes productrices d'hydrogène	173
V.1 Problématique de l'étude	173
V.2 Objectif de l'étude.....	173
V.3 Hypothèses et postulats	174
V.4 Déroulement de l'étude	174
V.5 Introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène (Eco A) placée dans un milieu non-optimisée (carence en sulfate de fer)	176
V.5.1 Caractérisation des souches pures et du consortium Eco A.....	178
V.5.1.1 Caractérisation de la concentration maximale de biomasse dans un milieu carencé en sulfate de fer.....	178
V.5.1.2 Caractérisation par CE-SSCP des souches pures et de la culture Eco A.....	179

V.5.1.3	<i>Caractérisation des performances de production d'hydrogène des différentes souches et d'Eco A</i>	181
V.5.1.4	<i>Caractérisation du réseau métabolique des différentes souches pures et d'Eco A..</i>	183
V.5.2	Impact de l'ajout d'une souche pure sur la culture mixte productrice d'hydrogène Eco A	186
V.5.2.1	<i>Influence de l'ajout des souches pures sur la concentration maximale en biomasse de l'écosystème</i>	186
V.5.2.2	<i>Influence de l'ajout des souches pures sur les performances de production d'hydrogène du consortium Eco A</i>	187
V.5.2.3	<i>Influence de l'ajout des souches pures sur le métabolisme global de l'écosystème Eco A</i>	188
V.5.2.4	<i>Réseau métabolique et production d'hydrogène des mélanges possédant une forte variabilité de résultat entre triplicats</i>	190
V.5.2.5	<i>Caractérisation par CE-SSCP des communautés microbiennes présentes dans les différents mélanges.....</i>	191
V.5.3	Discussion	195
V.5.3.1	<i>Souches pures, trois niveaux de production d'hydrogène</i>	195
V.5.3.2	<i>Eco A, un consortium placé dans des conditions non optimales</i>	197
V.5.3.3	<i>Impact des bactéries exogènes sur le métabolisme et la production d'hydrogène du consortium Eco A.....</i>	198
V.5.4	Conclusion de l'étude	204
V.6	Introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène simplifiée (Eco B) placée dans un milieu optimisée (supplémenté en sulfate de fer).....	206
V.6.1	Caractérisation des souches pures et du consortium Eco B	207
V.6.1.1	<i>Caractérisation de la concentration maximal de biomasse dans un milieu supplémenté en sulfate de fer</i>	207
V.6.1.2	<i>Caractérisation du temps de latence des souches pures et de Eco B.....</i>	209
V.6.1.3	<i>Caractérisation par CE-SSCP des souches pures et de la culture Eco B.....</i>	210
V.6.1.4	<i>Caractérisation des performances individuelles de production d'hydrogène des différentes souches et d'Eco B</i>	211
V.6.1.5	<i>Caractérisation du réseau métabolique des différentes souches pures et d'Eco B..</i>	213
V.6.2	Impact de l'ajout d'une souche pure dans la culture mixte productrice d'hydrogène Eco B	215
V.6.2.1	<i>Influence de l'ajout des souches pures sur les performances de production d'hydrogène du consortium Eco B</i>	215

V.6.2.2	<i>Influence de l'ajout des souches pures sur le métabolisme global de l'écosystème Eco B</i>	216
V.6.2.3	<i>Caractérisation par CE-SSCP des communautés microbiennes présentes dans les différents mélanges</i>	218
V.6.3	Discussion	220
V.6.3.1	<i>Souches pures, trois niveaux de production d'hydrogène</i>	220
V.6.3.2	<i>Eco B, un écosystème simplifié et placé dans un milieu optimisé pour la production d'hydrogène</i>	222
V.6.3.3	<i>Impact des bactéries exogènes sur le métabolisme et la production d'hydrogène du consortium Eco B</i>	224
V.6.4	Conclusion de l'étude	226
V.7	Introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène diverse (Eco C) placée dans un milieu optimisée (supplémenté en sulfate de fer)	228
V.7.1	Caractérisation du consortium Eco C.....	228
V.7.1.1	<i>Caractérisation de la concentration maximale de biomasse d'Eco C dans un milieu supplémenté en sulfate de fer</i>	228
V.7.1.2	<i>Caractérisation de la structure de la communauté microbienne d'Eco C par CE-SSCP</i>	229
V.7.1.3	<i>Caractérisation des performances de production d'hydrogène d'Eco C</i>	230
V.7.1.4	<i>Caractérisation des voies métaboliques d'Eco C</i>	232
V.7.1.5	<i>Caractérisation de l'évolution des communautés microbiennes au sein du consortium Eco C</i>	234
V.7.2	Impact de l'ajout d'une souche pure dans la culture mixte productrice d'hydrogène Eco C	237
V.7.2.1	<i>Influence de l'ajout des souches pures sur la cinétique de production d'hydrogène du consortium Eco C</i>	237
V.7.2.2	<i>Influence de l'ajout des souches pures impactant la cinétique de production d'hydrogène d'Eco C sur les performances du consortium</i>	240
V.7.2.3	<i>Influence de l'ajout des souches pures impactant la cinétique de production d'hydrogène d'Eco C sur les performances du consortium</i>	241
V.7.2.4	<i>Caractérisation des voies métaboliques empruntées par l'écosystème lors de l'ajout de Clostridium acetobutylicum, de Clostridium pasteurianum et de Lactobacillus bulgaris</i>	241
V.7.2.5	<i>Caractérisation des voies métaboliques empruntées par l'écosystème lors de l'ajout d'Escherichia coli, d'Enterococcus casseliflavus, de Desulfovibrio vulgaris et de Ralstonia eutropha</i>	243

V.7.2.6	<i>Caractérisation par CE-SSCP des communautés présentes dans les mélanges ayant eu un impact sur les cinétiques de production d'hydrogène d'Eco C</i>	246
V.7.2.7	<i>Caractérisation par CE-SSCP des communautés présentes dans les mélanges n'ayant pas eu un impact sur les cinétiques de production d'hydrogène d'Eco C</i>	248
V.7.3	Discussion	252
V.7.3.1	<i>Eco C, un écosystème aux performances variables</i>	252
V.7.3.2	<i>Impact des bactéries exogènes sur le consortium Eco C.....</i>	256
V.7.4	Conclusion de l'étude	261
V.8	Introduction d'<i>Escherichia coli</i> dans une culture mixte productrice d'hydrogène en réacteur continu.....	263
V.8.1	Ensemencement d' <i>Escherichia coli</i> à 2% d'abondance relative.....	264
V.8.1.1	<i>Performances de production d'hydrogène</i>	264
V.8.1.2	<i>Métabolisme des deux écosystèmes F1 et F2 avant et après l'introduction d'<i>Escherichia coli</i></i>	265
V.8.1.3	<i>Implantation de la souche d'<i>Escherichia coli</i> dans la culture mixte</i>	266
V.8.2	Ensemencement d' <i>Escherichia coli</i> à 15% d'abondance relative.....	270
V.8.2.1	<i>Performances de production d'hydrogène.....</i>	270
V.8.2.2	<i>Métabolisme des deux écosystèmes</i>	271
V.8.2.3	<i>Implantation de la souche dans la culture mixte</i>	272
V.8.3	Discussion	275
V.8.4	Conclusion de l'étude	278
V.9	Conclusion sur la perturbation biotique des cultures mixtes productrices d'hydrogène	279
Chapitre VI	Conclusion – Perspectives	281
Références Bibliographiques		287
Liste des annexes		311

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Principe de fonctionnement d'une pile à combustible à hydrogène.....	27
Figure I-2: Schéma de principe de l'électrolyse de l'eau	32
Figure I-3 : Structure schématique du site actif de la [NiFe]-hydrogénase (a) et de la [FeFe]-hydrogénase (b) .	35
Figure I-4 : Production biologique d'hydrogène par biophotolyse directe de l'eau	36
Figure I-5 : Production biologique d'hydrogène par biophotolyse indirecte de l'eau	38
Figure I-6 : Schéma de principe de la photofermentation.....	39
Figure I-7 : Schéma réactionnel général de la digestion anaérobie.	44
Figure I-8 : Principales voies métaboliques impliquées dans la production de biohydrogène par voie fermentaire.	45
Figure I-9 : Principales voies métaboliques concurrentes de la production de biohydrogène par voie fermentaire	48
Figure I-10 : Image de l'interaction directe entre <i>Desulfovibrio vulgaris Hildenborough</i> et <i>Clostridium acetobutylicum</i> prise par microscope électronique à balayage.	58
Figure I-11 : Rôles possible des micro-organismes coexistant avec les bactéries productrices d'hydrogène lors de la production d'hydrogène par voie fermentaire.....	60
Figure I-12 : Production d'hydrogène en fonction du temps de séjour hydraulique.	67
Figure I-13 : Évolution de l'énergie libre standard de Gibbs (à pH 7 et 25°C) des réactions de conversion d'acides gras volatils en acétate avec production d'hydrogène ou de réactions de respiration inorganique, en fonction de la pression partielle en hydrogène du milieu.	68
Figure I-14 : Effet du pH sur les performances de production d'hydrogène en culture mixte à partir du glucose.	71
Figure I-15 : Effet de la température sur la production d'hydrogène en cultures mixtes pour une gamme de températures allant de 20°C à 55°C.	72
Figure I-16 : Echange bactérien de molécules cytoplasmiques via des nanotubes intercellulaires.	84
Figure II-1 : Photographie du réacteur continu de production d'hydrogène par voie fermentaire.	90
Figure II-2 : Principe du compteur à gaz utilisé lors des expérimentations en mode continu.	91
Figure II-3 : Photographie d'un compteur à gaz utilisé lors des expérimentations en mode continu.....	92
Figure II-4 : Représentation schématique d'un réacteur continu de production d'hydrogène par voie fermentaire, utilisé dans le cadre de ces travaux.	93
Figure II-5 : Protocole d'ensemencement des souches pures et du consortium lors de leur confrontation.....	99
Figure II-6 : Fiole à plasma connectée au système de mesure du biogaz dit « par éprouvette renversée ».	100
Figure II-7 : Chromatographe Varian GC 3900 et son passeur automatique.....	102
Figure II-8 : Photographie du micro-chromatographe R3000 (SRA Instruments) multiplexé.	105
Figure II-9 : Principe de la CE-SSCP	111
Figure II-10 : Séquenceur capillaire SSCP ABI Prism 3130 genetic analyser.	112
Figure III-1 : Approche expérimentale utilisée dans le cadre de l'étude des interactions microbiennes responsables de la production d'hydrogène en culture mixte et le rôle des bactéries minoritaires.	121
Figure III-2 : Evolution au cours du temps de la productivité en hydrogène pour les sept réacteurs	122
Figure III-3 : Bilan DCO des sept réacteurs à l'équilibre	125
Figure III-4 : Distribution des métabolites produits par les différentes cultures à l'état d'équilibre.	125
Figure III-5 : Evolution de la structure des communautés microbiennes au cours du temps. Exemple de la culture inoculée à partir de manioc fermenté (Man).	129
Figure III-6 : Profils CE-SSCP des sept écosystèmes producteurs d'hydrogène à l'équilibre.	131
Figure IV-1 : Approche expérimentale développée dans le cadre de l'étude de l'influence de stress environnementaux sur la stabilité et les performances d'un consortium microbien.....	145
Figure IV-2 : Evolution de la production d'hydrogène des fermenteurs F1 (a) et F2 (b) avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer dans le milieu.	146
Figure IV-3 : Productivités et rendements de production d'hydrogène des deux fermenteurs continus F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer dans le milieu.	147
Figure IV-4 : Bilan DCO des fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer.....	149
Figure IV-5 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer.	150

Figure IV-6 : Pourcentage molaire des différents métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer.	152
Figure IV-7 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 juste avant l'augmentation de la concentration en FeSO_4 (t-1), puis de un (t+1) à six (t+6) jours après.	153
Figure IV-8 : Performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2 à différentes concentrations de glucose.	160
Figure IV-9 : Proportionnalité entre la productivité en hydrogène de F1 et F2 et la concentration en glucose.	161
Figure IV-10 : Bilan DCO des fermenteurs F1 et F2 lors de la montée en charge en glucose.	162
Figure IV-11 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 lors de la montée en charge en glucose.	163
Figure IV-12 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 à différentes concentrations en glucose.	165
Figure V-1 : Approche expérimentale développée dans le cadre de l'introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène en batch.	175
Figure V-2 : Approche expérimentale développée dans le cadre de l'introduction d'un facteur biotique dans une culture mixte productrice d'hydrogène en réacteurs continus.	176
Figure V-3 : Concentration maximal en biomasse des souches pures et du consortium Eco A sur le milieu de culture A.	178
Figure V-4 : Profils de CE-SSCP des souches pures ajoutées au consortium Eco A.	180
Figure V-5 : Profil de CE-SSCP du consortium Eco A.	181
Figure V-6 : Volume d'hydrogène produit par les souches pures et le consortium Eco A.	182
Figure V-7 : Hydrogène et métabolites produits par les différentes souches pures et l'écosystème de référence Eco A.	184
Figure V-8 : Concentration maximale en biomasses du consortium Eco A et des mélanges entre les différentes souches pures et Eco A.	186
Figure V-9 : Hydrogène et métabolites produits par le consortium Eco A et les différents mélanges souche pure / Eco A.	189
Figure V-10 : Production individuelle d'hydrogène et de métabolites des réplicats des mélanges Eco A / souche pure ayant une forte variabilité de résultat.	190
Figure V-11 : Structure des communautés microbiennes des différents mélanges Eco A / souche pure en fin de batch.	193
Figure V-12 : Concentration maximale des souches pures et du consortium Eco B sur le milieu de culture B.	208
Figure V-13 : Profils de CE-SSCP des souches pures ajoutées au consortium Eco B.	210
Figure V-14 : Profil de CE-SSCP du consortium Eco B.	211
Figure V-15 : Hydrogène et métabolites produits par les différentes souches pures et l'écosystème de référence Eco B.	214
Figure V-16 : Hydrogène et métabolites produits par le consortium Eco B et les différents mélanges souche pure / Eco B.	217
Figure V-17 : Structure des communautés microbiennes des différents mélanges Eco B / souche pure en fin de batch.	219
Figure V-18 : Comparaison de la production d'hydrogène cumulée d'Eco A et d'Eco B.	223
Figure V-19 : Comparaison de la structure des communautés microbiennes d'Eco A et d'Eco B.	224
Figure V-20 : Concentration maximale en biomasse d'Eco C et des souches pures sur le milieu de culture B.	229
Figure V-21 : Structure de la communauté microbienne composant Eco C.	230
Figure V-22 : Cinétiques de production d'hydrogène des trois réplicats du consortium Eco C.	231
Figure V-23 : Hydrogène et métabolites produits par les différents réplicats du consortium Eco C.	233
Figure V-24 : Evolution de la structure de la communauté microbienne de chaque réplikat d'Eco C après inoculation (t_0) et après 40 heures d'incubation à 37°C.	235
Figure V-25 : Evolution des communautés bactériennes des trois réplicats d'Eco C au cours des différentes phases de production d'hydrogène.	236
Figure V-26 : Cinétique moyenne de production d'hydrogène d'Eco C et des mélanges présentant une seule phase plateau.	238
Figure V-27 : Cinétique moyenne de production d'hydrogène d'Eco C et des mélanges présentant une production d'hydrogène à deux phases.	239
Figure V-28 : Impact de l'ajout de <i>Clostridium acetobutylicum</i> , de <i>Clostridium pasteurianum</i> et de <i>Lactobacillus bulgaris</i> sur le réseau métabolique d'Eco C.	242

Figure V-29 : Impact de l'ajout d' <i>Escherichia coli</i> , d' <i>Enterococcus casseliflavus</i> , de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> et de <i>Ralstonia eutropha</i> sur les voies métaboliques d'Eco C lors de la première phase plateau.	244
Figure V-30 : Impact de l'ajout d' <i>Escherichia coli</i> , d' <i>Enterococcus casseliflavus</i> , de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> et de <i>Ralstonia eutropha</i> sur les voies métaboliques d'Eco C lors de la deuxième phase plateau.	245
Figure V-31 : Structure des communautés microbiennes d'Eco C au premier plateau et des mélanges entre Eco C et <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> et <i>Lactobacillus bulgaris</i> après consommation total du substrat (t_{final}).	247
Figure V-32 : Structure des communautés microbiennes, après la première phase de production d'hydrogène, d'Eco C et des confrontations entre Eco C et <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Desulfovibrio vulgaris</i> et <i>Ralstonia eutropha</i>	249
Figure V-33 : Structure des communautés microbiennes, après la deuxième phase de production d'hydrogène, d'Eco C et des confrontations entre Eco C et <i>E. coli</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>DvH</i> et <i>R. eutropha</i>	251
Figure V-34 : Comparaison de la structure des communautés microbiennes d'Eco A, d'Eco B et d'Eco C.	252
Figure V-35 : Comparaison de la production d'hydrogène cumulée d'Eco A, d'Eco B et d'Eco C.	253
Figure V-36 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d' <i>Escherichia coli</i> à 2% d'abondance relative.	265
Figure V-37 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 juste avant l'injection d' <i>E. coli</i> à 2 % d'abondance relative ($t-1$), juste après (t_0) puis une heure après ($t+1$) jusqu'à 24 heures après ($t+24$).	267
Figure V-38 : Abondance relative du pic d' <i>E. coli</i> en fonction du temps comparé à la cinétique de concentration d'un micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance.	269
Figure V-39 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d' <i>Escherichia coli</i> à 15% d'abondance relative.	271
Figure V-40 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 juste avant l'injection d' <i>E. coli</i> à 15 % d'abondance relative ($t-1$), juste après (t_0) puis une heure après ($t+1$) jusqu'à 24 heures après ($t+24$).	273
Figure V-41 : Abondance relative du pic d' <i>E. coli</i> en fonction du temps comparé à la cinétique de concentration de ce même micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance.	274
Figure V-42 : Proportionnalité entre la concentration en lactate des deux fermenteurs et l'abondance relative des espèces <i>Bacillus</i> et <i>Sporolactobacillus</i> des deux écosystèmes.	276

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Les différents types de piles à combustible	28
Tableau I-2 : Modes de production de l'hydrogène : principes, avantages, inconvénients.....	42
Tableau I-3 : Exemples de souches pures productrices d'H ₂ par voie fermentaires.....	52
Tableau I-4 : Classification des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux espèces (A et B) en fonction de leurs effets apparents	76
Tableau II-1 : Principales caractéristiques et critères de choix des souches pures étudiées	96
Tableau II-2 : les différents composés analysés par l'HPLC R410 et leur temps de rétention associé.	103
Tableau II-3 : Amorces utilisées pour la PCR.....	110
Tableau III-1 : Performances de production d'hydrogène des sept réacteurs à l'équilibre	123
Tableau III-2 : Ratio (Bu/Ac) et ratio théorique H ₂ /[2 × (Bu + Ac)] des sept réacteurs à l'équilibre.	127
Tableau III-3 : Affiliation phylogénétique des séquences de clones correspondant au numéro des pics des profils de CE-SSCP et l'abondance relative de chaque espèce dans les différents écosystèmes calculée à partir de l'air de chaque pic correspondant. Le pourcentage de similarité des séquences par rapport aux espèces identifiées est également fourni.	132
Tableau III-4 : Comparaison des performances de production d'hydrogène en réacteur continu avec la littérature	133
Tableau IV-1 : Affiliation phylogénétique des pics des profils de CE-SSCP fourni à partir des analyses de pyroséquençage. Le pourcentage de similarité des séquences par rapport aux espèces identifiées est également fourni.	155
Tableau V-1 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène des souches pures et du consortium. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d'hydrogène.	183
Tableau V-2 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco A et des différents mélanges souche pure/consortium.	187
Tableau V-3 : Caractérisation des temps de latence des souches pures et du consortium Eco B.	209
Tableau V-4 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène des souches pures et du consortium Eco B.	212
Tableau V-5 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco B et des différents mélanges souche pure / consortium.	216
Tableau V-6 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco C.	231
Tableau V-7: Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco C et des différents mélanges souche pure / consortium impactant la cinétique d'Eco C.	240
Tableau V-8 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco C et des différents mélanges souche pure / consortium non impactant la cinétique d'Eco C.	241
Tableau V-9 : Performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d'Escherichia coli à 2% d'abondance relative.	264
Tableau V-10 : Performances de production des deux fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d'Escherichia coli à 15% d'abondance relative.	270

LISTE DES ABREVIATIONS

AGV :	Acides gras volatils
ANOVA :	Test statistique de comparaison des variances (à un facteur)
CE-SSCP :	Single Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
DA :	Digestion Anaérobie
DCO :	Demande Chimique en Oxygène
D.O :	Densité optique
EPS :	Exopolysaccharides
Fd :	Ferredoxine
H ₂ :	Hydrogène
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance
MES :	Matières en suspension
MVS :	Matières volatiles en suspension
NAD :	Nicotinamide adenine dinucléotide.
NED :	Nutrition et Ecosystème Digestif
PCR :	Polymerase Chain Reaction
rpm :	Rotation par minute
SILEX :	Système d'Information pour L'Expérimentation
TSH :	Temps de séjour hydraulique
UASB :	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

INTRODUCTION

Dans un contexte global de recherche de nouvelles énergies et de réduction des gaz à effet de serre, l'hydrogène (H_2) est considéré comme un vecteur énergétique d'avenir (Lang *et al.*, 2012). En effet, l'hydrogène possède une forte densité énergétique (122 kJ.g^{-1}) et sa combustion ne génère que de l'eau, ce qui constitue une alternative aux énergies fossiles. Actuellement, les technologies les plus matures d'un point de vue industriel consistent à produire l'hydrogène soit par reformage du gaz naturel soit par électrolyse de l'eau. Ces procédés permettent de produire de grandes quantités d'hydrogène mais sont coûteux énergétiquement, génèrent des quantités importantes de CO_2 et consomment des ressources fossiles elles-mêmes en voie d'épuisement, surtout dans le cas du reformage du gaz naturel.

En complément de ces filières, l'hydrogène peut être produit par voie biologique, et est alors dénommé bio-hydrogène ($bioH_2$). Le biohydrogène est un intermédiaire clé du monde du vivant où il joue le rôle de vecteur énergétique en assurant le transfert efficace d'électrons entre de nombreuses espèces microbiennes (Latrille *et al.*, 2011). En appliquant des conditions environnementales spécifiques à certains procédés biologiques, il est possible de limiter l'activité des microorganismes responsables des étapes de consommation d'hydrogène pour ne garder que celles de production. Ce faisant, les procédés biologiques constituent des modes de production attractifs puisqu'ils peuvent être opérés à de faibles températures (moins de 100°C) et à pression atmosphérique (Hawkes *et al.*, 2007 ; Manish & Banerjee, 2008).

Cependant, la rareté des ressources et les faibles productivités des procédés biologiques par rapport à la demande mondiale en hydrogène font que la production de biohydrogène ne concurrencera pas nécessairement les procédés physico-chimiques, mais sera susceptible de trouver sa place au sein de certaines filières biologiques, et notamment au sein de la filière de valorisation des déchets organiques. Dans un concept de bio-raffinerie environnementale qui vise à traiter et à raffiner les produits issus de la biomasse en couplant judicieusement une succession de procédés biologiques et/ou chimiques afin d'améliorer la valorisation multi-produits d'une filière, la production de $bioH_2$ est potentiellement une sortie opératoire d'intérêt industriel. Dans ce cadre, la production de biohydrogène par fermentation constitue une étape particulièrement intéressante. En effet, les voies fermentaires permettent non seulement de produire de l'hydrogène à partir de substrats renouvelables, complexes, non stériles et peu onéreux, mais aussi d'atteindre des vitesses de production élevées dans des

procédés intensifs, contrairement à d'autres procédés biologiques comme la production d'hydrogène par des micro-algues (Das, 2009 ; Mohammadi *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2012). De plus, cette production est couplée à la production d'autres molécules d'intérêt comme des acides organiques, des alcools et du CO₂ qui peuvent à leur tour être utilisés dans d'autres procédés afin de produire de l'énergie : il est alors possible de coupler un procédé de production d'hydrogène par voie fermentaire avec un procédé de photofermentation ou d'électrolyse microbienne pour convertir les sous-produits métaboliques microbiens en H₂ et CO₂ (Gómez *et al.*, 2011). Cependant, du fait de la présence de composés inhibiteurs issus des sorties de fermentation et des différences importantes de productivité observées entre les modes d'opération de ces procédés, le dimensionnement de telles installations doit reposer sur des bases de connaissance solides.

Dans le cas d'une fermentation orientée vers la production d'hydrogène, plusieurs types d'écosystèmes microbiens peuvent être utilisés. Jusqu'à présent, la majorité des études a porté sur l'utilisation de cultures pures microbiennes, en présence de sucres simples ou peu complexes. Mais devant le large éventail des sources organiques complexes potentiellement valorisables et disponibles dans l'environnement, mais non stériles, l'utilisation de cultures pures n'est pas adaptée. Les efforts de recherche portent désormais sur l'utilisation de cultures microbiennes mixtes plus robustes, possédant des capacités d'adaptation plus grandes face aux changements de conditions opératoires (Manish & Banerjee, 2008 ; Guo *et al.*, 2010 ; Dinamarca & Bakke, 2012). L'intérêt de l'utilisation de cultures mixtes dans la production de biohydrogène par voie fermentaire réside, en effet, dans le fait que les communautés microbiennes diverses sont susceptibles de fournir de multiples combinaisons de voies métaboliques pour transformer tout substrats complexes dont les déchets (Li & Fang, 2007).

Cependant, de nombreuses limitations subsistent pour atteindre une dégradation optimale de ces substrats organiques en cultures mixtes : ainsi, les rendements moyens de conversion des hydrates de carbone atteignent au maximum 2,5 mol H₂.mol hexose⁻¹ alors que le maximum théorique est de 4 mol H₂.mol hexose⁻¹ (Hawkes *et al.*, 2007). De plus, des problèmes d'instabilité des procédés liés à la présence de métabolismes dérivés de consommation de l'hydrogène produit sont à prendre en considération.

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à tester et optimiser les paramètres opératoires de la production fermentaire d'hydrogène par cultures mixtes pour tenter de lever ces limitations. Par exemple, les conditions de pH, de température et de temps

de séjour hydraulique ont été largement étudiées mais toutes les études ne convergent pas car ces conditions dépendent fortement des performances intrinsèques des communautés microbiennes présentes dans le système (Aceves-Lara *et al.*, 2008b ; Wang & Wan, 2009a ; Quéméneur *et al.*, 2010). En effet, la structure même de l'écosystème influe sur les performances de fermentation (Hung *et al.*, 2011b). Le choix de l'inoculum de départ est donc un paramètre important à prendre en compte et un grand nombre de sources environnementales d'inocula a déjà été testé pour produire de l'hydrogène par voie fermentaire. À titre d'exemple, ont été utilisés les sorties de digesteurs de boues issues du traitement des eaux usées urbaines, des composts de déchets d'élevage ou de déchets municipaux, des boues anaérobies d'effluents, des sols, et toutes autres sortes de lixiviats (Wang & Wan, 2009a). Ainsi, la majorité des inocula servant à la production d'hydrogène sont issus de procédés de digestion anaérobie. Ils contiennent donc une grande concentration de méthanogènes hydrogénéotrophes. Il est donc nécessaire d'effectuer des prétraitements avant leur utilisation pour tenter d'éliminer ces consommatrices d'hydrogène. La majorité de ces prétraitements est basée sur la faculté des clostridies (principales bactéries étudiées productrices d'hydrogène par voie fermentaire) à sporuler et le traitement thermique est de loin la méthode la plus utilisée.

Cependant, il reste difficile de déterminer si la microflore prétraitée constitue la culture mixte la plus efficace pour la production d'hydrogène. En effet, ces prétraitements modifient substantiellement la structure de l'écosystème et peuvent éliminer également des espèces bactériennes susceptibles d'interagir positivement avec les bactéries productrices d'hydrogène (Hung *et al.*, 2011a). Pour mieux comprendre les interactions qui peuvent survenir entre ces bactéries productrices d'hydrogène et les autres espèces microbiennes présentes dans les cultures mixtes, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble de la population microbienne. Or jusqu'à présent, la plupart des études se sont focalisées sur les espèces dominantes telles que *Clostridium* sp ou *Enterobacter* sp. et le rôle des bactéries minoritaires pouvant interagir dans ce cas est souvent négligé. Néanmoins, à l'image de ce qui est observé à l'échelle macroscopique, certaines de ces espèces minoritaires peuvent avoir des effets sur un écosystème global qui dépasse de loin leur abondance (Smee, 2010). Il en va de même au niveau microscopique où la dominance par le nombre ne reflète pas nécessairement l'importance fonctionnelle des bactéries minoritaires (en nombre) qui peuvent exercer un rôle essentiel dans la communauté (Zengler & Palsson, 2012). L'influence de ces espèces clés

s'exercent à travers un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes que sont les interactions entre micro-organismes.

Ce travail de thèse vise ainsi à étudier le **lien** existant entre **la structure d'une communauté microbienne**, **les individus** qui la composent et **les fonctions macroscopiques** qui leur sont associées avec pour objet d'étude des écosystèmes microbiens fermentaires. Pour ce faire, nous avons cherché à obtenir et à caractériser plusieurs écosystèmes fermentaires simplifiés producteurs d'hydrogène à partir de **divers inocula naturels**. Puis nous avons tenté de modifier la structure des communautés microbiennes ainsi obtenues en jouant sur les **paramètres opératoires** ou en perturbant directement l'écosystème à l'aide de **facteurs biotiques**. Ceci nous a permis de mettre en évidence les liens existants entre les changements de structure de communauté et les changements métaboliques observés. Nous avons également pu identifier certaines **espèces-clés** capables, malgré leur faible abondance, de modifier le métabolisme de l'écosystème global.

Ce document est constitué de six chapitres.

Le premier chapitre consiste en une *Etude Bibliographique* qui rappelle le contexte scientifique et technique de la production d'hydrogène en détaillant son utilisation et ses modes de production actuels. Un focus particulier est effectué sur la production d'hydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes. Les micro-organismes impliqués dans ces cultures et les différents types d'interactions survenant dans de tels écosystèmes ont fait l'objet d'une attention particulière.

La partie *Matériel et Méthodes* constitue le deuxième chapitre de cette thèse et décrit l'ensemble des techniques expérimentales qui ont été mises en œuvre au cours de ce travail.

La partie *Résultats et Discussion* est décomposée en trois chapitres qui comprennent plusieurs études. Chacune de ces études comprend une partie qui décrit les résultats obtenus et une partie « *Discussion* » qui les reprend en les interprétant, les discutant et les comparant à la littérature disponible.

Ainsi, le chapitre III est dédié à l'étude de l'influence de la structure des communautés microbiennes présentes dans les écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire. L'objectif est d'obtenir des écosystèmes les plus variés possible à partir de différents inocula et de caractériser leurs performances en termes de production d'hydrogène. Cette étude a été réalisée en mode continu à l'aide de chimostats. En effet, le fonctionnement en mode chimostat a permis de contrôler strictement le taux de croissance par le taux de dilution, et ainsi de simuler la survie d'une population bactérienne dans des conditions limitantes en nutriments. A la fin de ce chapitre, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle clé des bactéries minoritaires dans la production d'hydrogène en cultures mixtes.

Le chapitre IV concerne la modification de la structure de deux communautés productrices d'hydrogène à l'aide de deux paramètres opératoires de ce type de procédé que sont la concentration en sulfate de fer et la charge en substrat. Les objectifs de cette étude sont, d'une part, de déterminer le comportement d'un écosystème producteur d'hydrogène face à des limitations environnementales en micro et macronutriments et, d'autre part, d'évaluer l'influence sur les changements de structure des communautés microbiennes et des fonctions macroscopiques associées (métabolisme global, performances de production d'hydrogène). De la même manière que l'étude précédente, cette étude a été réalisée en chimostat. Cette étude nous a permis de faire le lien entre les changements de structure microbienne dus à des stress environnementaux et les performances observées des différents chimostats.

Le chapitre V met en avant une phase proactive de modification de la structure des communautés microbiennes en présentant l'utilisation de certaines espèces exogènes pour modifier la structure et donc les performances de communautés microbiennes productrices d'hydrogène. Ce chapitre a pour ambition d'évaluer l'effet de l'introduction d'un facteur biotique sur le métabolisme d'un écosystème producteur d'hydrogène. Plus précisément, il s'agit de déterminer si la production d'hydrogène via une culture mixte peut être contrôlée grâce à l'introduction de souches exogènes à l'écosystème, l'important étant de déterminer si les nouvelles espèces introduites peuvent interagir dans de tels écosystèmes. Les études de ce chapitre se sont d'abord déroulées en batch afin de tester un grand nombre d'espèces représentatives de la phylogénie et dont le métabolisme est en lien ou non avec l'hydrogène. Au final, *E. coli* a été identifiée comme potentiellement intéressante et des essais d'introduction de cette souche dans un système de production d'hydrogène en chimostat ont

été réalisés. Ce chapitre nous a permis d'identifier des espèces bactériennes pouvant être utilisées comme facteur biotique pour modifier le métabolisme d'une culture mixte productrice d'hydrogène.

Enfin, une dernière partie *Conclusions et Perspectives* permet de conclure sur les différents points abordés et d'émettre des perspectives tant d'un point de vue de la production d'hydrogène par voie fermentaire que du domaine de l'écologie microbienne en général, notamment en revenant sur les observations de ce travail de thèse autour du lien existant entre la structure de la communauté microbienne, les individus qui la composent et les fonctions macroscopiques associées.

SOMMAIRE DU CHAPITRE

Chapitre I. Contexte bibliographique.....	23
I.1 La production d'hydrogène	23
I.1.1 L'hydrogène vecteur énergétique d'avenir	23
I.1.2 Utilisation de l'hydrogène.....	24
<i>I.1.2.1 Utilisation dans l'industrie chimique.....</i>	<i>24</i>
<i>I.1.2.2 Utilisation dans l'industrie pétrolière.....</i>	<i>25</i>
<i>I.1.2.3 Utilisation par combustion dans un moteur.....</i>	<i>25</i>
<i>I.1.2.4 Utilisation en pile à combustible hydrogène</i>	<i>26</i>
<i>I.1.2.5 Mélange hydrogène / gaz naturel.....</i>	<i>28</i>
<i>I.1.2.6 L'hydrogène de demain.....</i>	<i>29</i>
I.1.3 Les modes de production de l'hydrogène	29
<i>I.1.3.1 Production d'hydrogène à partir du reformage des combustibles fossiles.....</i>	<i>29</i>
<i>I.1.3.2 Production d'hydrogène à partir de sources non émettrices de gaz à effet de serre.31</i>	<i>31</i>
I.1.3.2.1 Réformage de la vapeur d'eau.....	31
I.1.3.2.2 Electrolyse de l'eau	31
I.1.3.2.3 Pyrolyse de la biomasse	33
I.1.3.2.4 Nucléaire.....	33
<i>I.1.3.3 Production biologique d'hydrogène</i>	<i>34</i>
I.1.3.3.1 Les hydrogénases, enzymes clés de la production d'hydrogène par voie fermentaire	34
I.1.3.3.2 Les photo-bioprocédés.....	36
I.1.3.3.3 La fermentation sombre.....	41
<i>I.1.3.4 Comparaison des modes de production</i>	<i>41</i>
I.2 La production d'hydrogène par voie fermentaire.....	43
I.2.1 Les voies métaboliques de la fermentation sombre	44
<i>I.2.1.1 Les voies productrices d'hydrogène</i>	<i>45</i>
<i>I.2.1.2 Les voies consommatrices d'hydrogène.....</i>	<i>47</i>
<i>I.2.1.3 Les voies disséminatrices de la production d'hydrogène.....</i>	<i>48</i>
I.2.2 La microbiologie de la fermentation sombre	50
<i>I.2.2.1 Utilisation de cultures pures dans la production d'hydrogène par voie fermentaire.51</i>	<i>51</i>
I.2.2.1.1 Clostridium sp.	54
I.2.2.1.2 Enterobacter sp.....	54

I.2.2.1.3	Escherichia coli.....	54
I.2.2.1.4	Les espèces peu étudiées	55
I.2.2.1.5	Cas particulier des bactéries thermophiles et extrêmophiles.....	55
I.2.2.2	<i>Utilisation de co-cultures pour la production d'hydrogène par voie fermentaire.....</i>	<i>56</i>
I.2.2.3	<i>Utilisation de cultures mixtes pour la production d'hydrogène par voie fermentaire</i>	<i>58</i>
I.2.2.3.1	Les bactéries productrices d'hydrogène en cultures mixtes.....	59
I.2.2.3.2	Les bactéries autres que Clostridium sp. et Enterobacter sp. retrouvées dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène	60
I.2.3	Conduite d'un procédé de culture mixte pour produire de l'hydrogène	65
I.2.3.1	<i>Sources et préparation des inocula microbiens.....</i>	<i>65</i>
I.2.3.2	<i>Paramètres opératoires appliqués pour la production d'hydrogène.....</i>	<i>66</i>
I.2.3.2.1	Temps de séjour hydraulique (TSH)	66
I.2.3.2.2	Pression partielle en hydrogène	67
I.2.3.2.3	pH	69
I.2.3.2.4	Température	71
I.2.3.2.5	Nature et concentration du substrat	72
I.2.3.2.6	Composition du milieu de culture.....	74
I.3	Interactions microbiennes et processus environnementaux	75
I.3.1	Le neutralisme.....	76
I.3.2	La compétition	76
I.3.3	Le mutualisme ou synergisme	77
I.3.4	Le commensalisme.....	78
I.3.5	L'amensalisme ou l'antagonisme.....	78
I.3.6	Le parasitisme ou la prédation	79
I.3.7	Interactions trophiques ou nutritionnelles.....	80
I.3.8	Les molécules antimicrobiennes	81
I.3.9	Les interactions microbiennes directes	83

CHAPITRE I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

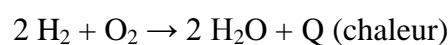
I.1 LA PRODUCTION D'HYDROGENE

I.1.1 L'HYDROGENE VECTEUR ENERGETIQUE D'AVENIR

L'hydrogène, nom commun de la molécule de dihydrogène (H₂), est la forme moléculaire de l'élément hydrogène, qui existe à l'état gazeux aux conditions normales de pression et de température. Il fut découvert en 1766 par Cavendish. L'hydrogène est le troisième élément le plus abondant de la planète (Levin *et al.*, 2004). Cependant, l'hydrogène est peu disponible à l'état pur malgré son omniprésence dans l'environnement. Par conséquent, il ne peut être considéré comme une énergie primaire car son utilisation nécessite des étapes préliminaires de production, de purification et de stockage. On parle alors de vecteur énergétique.

L'hydrogène est l'espèce chimique la plus énergétique par unité de masse. A titre de comparaison, l'énergie massique de combustion de l'hydrogène est de 122 kJ.g⁻¹ alors que celles du méthane ou de l'essence sont seulement de 50 kJ.g⁻¹ et de 45 kJ.g⁻¹, respectivement. Cependant, la molécule de dihydrogène est également celle qui possède le plus faible poids moléculaire (2 g.mol⁻¹). Par conséquent, à poids égal, l'hydrogène occupe beaucoup plus de volume qu'un autre gaz ce qui implique que son énergie volumique de combustion est relativement faible (10 kJ.L⁻¹) soit trois fois moins que celle du méthane ou encore vingt fois moins que celle de l'essence. Cette dernière propriété engendre donc des contraintes fortes de compression lors de son stockage et de son transport sous forme gazeuse (Aceves-Lara *et al.*, 2008a).

Néanmoins, l'hydrogène est régulièrement cité comme vecteur énergétique d'avenir notamment grâce au caractère propre de sa combustion qui ne libère que de la chaleur et de l'eau selon l'équation suivante :



I.1.2 UTILISATION DE L'HYDROGENE

Selon l'Association Française de l'Hydrogène (AFH2), la production mondiale d'hydrogène actuelle s'élève à 630 milliards de Nm³ par an, soit environ 57 millions de tonnes par an. Cette production ne représente que 1,5 à 2% de la consommation d'énergie primaire et, à l'exception des besoins pour l'espace, elle est employée essentiellement dans l'industrie chimique et pétrochimique, notamment pour la synthèse d'ammoniac, la désulfuration des hydrocarbures, ou encore pour la production de méthanol (Hetland & Mulder, 2007).

De nombreux projets existent pour le développement de l'hydrogène comme vecteur d'énergie, notamment en vue d'une utilisation dans des piles à combustibles ou comme carburant pour véhicule.

I.1.2.1 UTILISATION DANS L'INDUSTRIE CHIMIQUE

L'hydrogène est une des matières de base des industries chimiques. A ce jour, la consommation mondiale d'hydrogène par l'industrie chimique s'élève environ à 26 millions de tonnes par an (Association Française de l'Hydrogène).

Les usages de l'hydrogène dans l'industrie sont nombreux, mais il est principalement utilisé dans :

- La synthèse d'ammoniac (NH₃), matière première de base dans l'industrie des engrais (50% de la consommation mondiale)
- L'hydrogénation des corps gras : huile et graisses alimentaires, savon, lubrifiants, peintures
- La synthèse d'amines, de méthanol, de peroxyde d'hydrogène, d'acides, d'esters,...
- La préparation et élaboration de semi-conducteurs

Dans l'industrie, les unités de production et de consommation sont souvent localisées sur les mêmes sites. Certaines unités peuvent produire de l'hydrogène comme coproduit et celui-ci rentre dans un réseau de distribution local et est directement utilisé par une autre unité du site.

I.1.2.2 UTILISATION DANS L'INDUSTRIE PETROLIERE

Au cours de ces dernières années, les besoins de l'industrie pétrolière pour le raffinage sont devenus les plus importantes sources de consommation d'hydrogène, avec plus de 50% de la consommation mondiale.

En effet, les raffineries produisent à partir de pétrole brut un grand nombre de produits commercialisables (essence, diesel, kérosène, naphta, ...) qui doivent répondre à des normes précises. Dans un schéma classique de raffinage industriel, des unités de traitement sous-produisent de l'hydrogène (cracking thermique ou catalytique, reformeur catalytique...) alors que d'autres en sont consommatrices (hydrocracking, hydrotraitement, désulfuration...).

Les spécifications de plus en plus strictes des carburants et des produits pétroliers a fait croître la demande en hydrogène et a conduit à des bilans globaux déficitaires en hydrogène. C'est pourquoi la plupart des raffineries sont désormais amenées à produire de l'hydrogène supplémentaire dont elles ont besoin dans des unités de « vaporeformage » en transformant des charges légères d'hydrocarbures en gaz de synthèse (mélange H_2 , CO , CO_2 , CH_4 et H_2O) par réaction avec la vapeur d'eau sur un catalyseur à base de nickel.

I.1.2.3 UTILISATION PAR COMBUSTION DANS UN MOTEUR

L'important pouvoir calorifique massique de l'hydrogène rend sa combustion très intéressante. Actuellement, la principale application industrielle de l'hydrogène-énergie dans le transport reste la propulsion spatiale. Il est toutefois à noter que ce mélange est extrêmement difficile à utiliser en transport collectif car fortement explosif.

Tout comme le gaz naturel, l'hydrogène peut être brûlé dans un moteur ou une turbine afin de produire de l'électricité et de la chaleur. Toutefois, selon l'Association Française de l'Hydrogène (fiche 5.1.1) les moteurs de combustion doivent être adaptés, en particulier au niveau des volumes de moteurs et des matériaux utilisés car :

- le carburant introduit dans les cylindres est gazeux, il est donc nécessaire de posséder des injecteurs adaptés,
- lors de l'admission, l'hydrogène occupe un volume relativement grand par rapport à celui qu'occupe l'essence, ce qui diminue la quantité de fluide de travail (mélange air-hydrogène) à chaque cycle et réduit de 20 à 25% la puissance spécifique du moteur,

- l'hydrogène est très sensible à l'autoallumage et aux retours de flamme vers le collecteur d'admission. Pour éviter cet effet, il faut utiliser des électrodes de bougies en iridium et non en platine qui est susceptible d'agir comme un catalyseur d'autoallumage. En outre le moteur doit être propre, en particulier exempt de dépôts de carbone qui à leur tour pourraient être à l'origine d'auto-allumage.

- la combustion étant environ six fois plus rapide que celle de l'essence, un réglage précis du moteur est donc indispensable.

Quant aux matériaux constituant le moteur ils doivent être choisis résistants à l'hydrogène, en particulier pour éviter les risques de corrosion fissurante.

L'utilisation industrielle de l'hydrogène se développe également pour le transport en véhicules. De nombreux développements sont en cours. Mais comme cité précédemment, il est nécessaire de réaliser quelques modifications sur les moteurs : adaptation des injecteurs, taille du moteur, utilisation de matériaux résistants à l'hydrogène, modification des bougies et réglage du moteur différent (AFH2, fiche 5.1.1). Plusieurs constructeurs automobiles ont réalisé des démonstrations de véhicules fonctionnant à l'hydrogène (BMW, Mazda). Toutefois, du fait d'un problème de volume du moteur, le développement des véhicules fonctionnant à hydrogène s'oriente plutôt vers l'utilisation de piles à combustibles.

I.1.2.4 UTILISATION EN PILE A COMBUSTIBLE HYDROGENE

La pile à combustible permet de convertir l'hydrogène en électricité (Figure I-1). Une pile est constituée de deux électrodes séparées par un électrolyte, matériau qui bloque les électrons et qui laisse circuler les ions. L'anode et la cathode sont respectivement alimentées en continu par de l'hydrogène et de l'oxygène (ou de l'air), en produisant un courant électrique, de la chaleur et de l'eau.

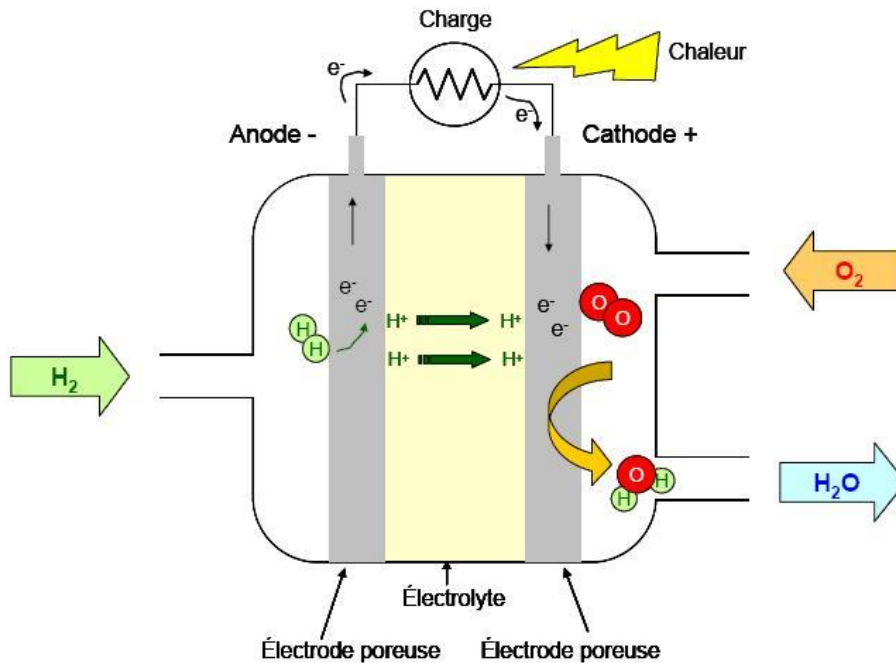


Figure I-1 : Principe de fonctionnement d'une pile à combustible à hydrogène

Pour une pile H_2 / O_2 à $25^\circ C$, le rendement théorique de conversion de l'hydrogène en électricité est de l'ordre de 80 - 95% (selon si l'eau est formée à l'état liquide ou de vapeur), avec des rendements observés en pratique plutôt de l'ordre de 40 – 50% (Boudellal, 2007).

En fonction de l'électrolyte utilisé, il existe différentes technologies de piles :

- AFC : pile à combustible alcaline
- PEMFC : pile à combustible à membrane polymère ou membrane échangeuse d'ions
- PAFC : pile à combustible à acide phosphorique
- MCFC : pile à combustible à carbone fondu
- PCFC : pile à combustible à céramique protonique
- SOFC : pile à combustible à oxyde solide

En fonction des besoins, la technologie utilisée sera différente. Le Tableau I-1 récapitule la nature de l'électrolyte, l'ion échangé entre les deux électrodes, le niveau de température et les domaines d'application possibles des principaux types de piles utilisés.

Tableau I-1 : Les différents types de piles à combustible

Type de pile	Electrolyte	Espèce ionique	T (°C)	Domaine d'utilisation
AFC	Potasse (liquide)	OH ⁻	80	Espace, transports, stationnaire Gamme : 1 - 100 kW
PEMFC et DMFC	Polymère (solide)	H ⁺	80	Portable, transports, stationnaire Gamme : 10 mW - 1 MW
PAFC	Acide phosphorique (liquide)	H ⁺	200	Stationnaire, transports Gamme : 200 kW - 10 MW
MCFC	Sels fondus (liquide)	CO ₃ ²⁻	650	Stationnaire Gamme : 500 kW - 10 MW
PCFC	Céramique (solide)	H ⁺	400 à 600	Stationnaire, transports Gamme : 1 kW - 10 MW
SOFC	Céramique (solide)	O ₂ ⁻	600 à 100	Stationnaire, transports Gamme : 1 kW - 10 MW

L'utilisation des piles à combustible en stationnaire est similaire à celle des cogénérateurs : l'objectif est la fourniture d'électricité et de chaleur. L'avantage de la pile à combustible, par rapport à une cogénération, est un meilleur rendement électrique : autour de 30 à 50% selon les piles contre 30% maximum pour un moteur (U.S.Department of Energy, 2007).

Les piles à hydrogène sont également utilisées par les constructeurs automobiles (PEMFC). Plusieurs prototypes existent déjà, tant au niveau des véhicules personnels ou de transports collectifs. Plusieurs programmes de démonstrations ont déjà vu le jour et certains modèles sont désormais commercialisés directement aux particuliers, e.g. Mercedes classe B F-Cell ou Honda FCX Clarity.

I.1.2.5 MELANGE HYDROGENE / GAZ NATUREL

Il est également envisageable de brûler l'hydrogène dilué avec un autre gaz. Ainsi, des essais ont été réalisés en utilisant de l'hythane[®], mélange de méthane (gaz naturel) et d'hydrogène. Une amélioration des performances des moteurs a été observée en dopant le gaz naturel avec 10 à 20% d'hydrogène (Ji *et al.*, 2010). Des programmes d'utilisation de l'hythane[®] à l'échelle urbaine ont été lancés ces dernières années. Ainsi, le projet Althytude (Alternative Hydrogène dans les Transports Urbains à Dunkerque) mené entre 2005 et 2010 a démontré que ce carburant alternatif permet d'améliorer la combustion du gaz naturel et de diminuer

ainsi les émissions polluantes (NO_x et particules). Cette étude montre le potentiel de l'hydrogène pour le secteur des transports. Alors que les coûts freinent le déploiement des technologies utilisant l'hydrogène en tant que vecteur énergétique unique, l'hythane[®] paraît être une approche séduisante car moins onéreuse et surtout rapide à mettre en place car s'adaptant aux technologies existantes. Ce mélange permettrait en effet de passer en douceur de l'utilisation du gaz naturel dans les transports à celle de l'hydrogène, sans avoir besoin de recourir aux piles à combustible.

I.1.2.6 L'HYDROGENE DE DEMAIN

L'hydrogène est actuellement, principalement utilisé dans l'industrie chimique et pétrochimique. Cependant, si l'hydrogène est amené à devenir un vecteur énergétique largement répandu en complément du vecteur électrique, les besoins en hydrogène augmenteront considérablement passant de 630 milliards Nm³ par an à l'heure actuelle à plus de 12 600 milliards de Nm³ par an à l'horizon de 2050 (AFH2, 2011).

Pour cela, il sera nécessaire d'augmenter très fortement les capacités actuelles de production en hydrogène par tous les modes possibles.

I.1.3 LES MODES DE PRODUCTION DE L'HYDROGENE

Le caractère propre de la combustion de l'hydrogène implique que l'impact écologique de son utilisation dépende totalement de son mode de production. Plusieurs procédés de production de l'hydrogène sont actuellement mis en œuvre au niveau industriel. Le plus utilisé est le reformage à partir de combustibles fossiles. Ce procédé permet de produire 94 % de la production mondiale d'hydrogène. D'autres techniques peuvent être utilisées, telles que l'électrolyse de l'eau, la pyrolyse de la biomasse ou encore la production d'hydrogène par voie biologique.

I.1.3.1 PRODUCTION D'HYDROGENE A PARTIR DU REFORMAGE DES COMBUSTIBLES FOSSILES

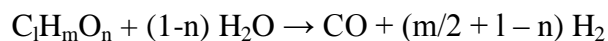
A l'heure actuelle, le principal procédé de production d'hydrogène est le reformage à la vapeur de combustibles fossiles, principalement à partir de gaz naturel (Amin *et al.*, 2011). Le principe est le suivant : en présence de vapeur d'eau et de chaleur, les atomes de carbone du méthane (CH₄) se dissocient de l'eau (H₂O). Après deux réactions successives, ils se

reformement séparément pour obtenir, d'un côté, de l'hydrogène (H₂) et, de l'autre, du dioxyde de carbone (CO₂). Le reformage à la vapeur est donc un processus en plusieurs étapes réalisées sous pression, à fortes températures et en présence de catalyseurs métalliques (Riis *et al.*, 2006). Les deux étapes sont les suivantes :

- Formation du gaz de synthèse : $\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{chaleur} \rightarrow \text{CO} + 3 \text{H}_2$
- Conversion du monoxyde de carbone : $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{chaleur} + \text{CO}_2 + \text{H}_2$

Lors de la première étape, le méthane réagit avec la vapeur d'eau en présence d'un catalyseur au nickel, dans des conditions spécifiques de température (840 – 950°C) et de pression (20 – 30 bar). La seconde réaction (ou water gas shift) peut être réalisée en une ou deux étapes : le choix du procédé détermine l'avancement global de la réaction et le rendement final obtenu. Le procédé conduit à la production d'un gaz composé d'H₂, CO₂, CO et CH₄. La composition type du gaz produit est la suivante : 70 – 75% H₂, 10 – 15% CO₂, 5% CO, 5% CH₄ (AFH2, 2011). La phase de production est ensuite suivie d'une étape d'épuration.

Des procédés similaires peuvent être utilisés pour produire de l'hydrogène à partir de résidus lourds (l'oxydation partielle) ou de charbon (gazéification) selon la réaction suivante :



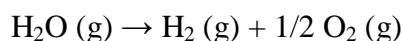
La production d'hydrogène par reformage a l'inconvénient de rejeter massivement du gaz carbonique (CO₂) dans l'atmosphère

L'avantage majeur du reformage est la possibilité de produire de fortes quantités d'hydrogène, à faible coût. Mais son prix de revient reste le triple de celui du gaz naturel seul. Comme ce mode de production est polluant, coûteux en énergie et que les ressources en énergies fossiles sont appelées à décroître, diversifier les modes de production s'avère indispensable.

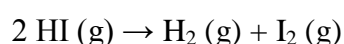
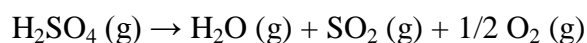
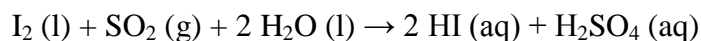
 I.1.3.2 PRODUCTION D'HYDROGENE A PARTIR DE SOURCES NON EMETTRICES DE GAZ A EFFET DE SERRE

I.1.3.2.1 Réformage de la vapeur d'eau

L'hydrogène peut également être produit à partir de la rupture d'une molécule d'eau sous forme gazeuse selon la réaction :



Cette réaction est très coûteuse énergétiquement ($\Delta G = + 118 \text{ kJ.mol}^{-1}$) et elle ne peut se produire qu'à des températures proches de 2 000°C. L'utilisation de cycles thermochimiques permet de réduire la quantité d'énergie nécessaire à la rupture des molécules d'eau en abaissant la température à 1250 °C (Maddy *et al.*, 2003). Les cycles thermochimiques permettent de décomposer l'eau en hydrogène et oxygène par une série de réactions chimiques en cycle fermé, c'est-à-dire avec un recyclage complet des réactifs en présence. Le cycle thermochimique du sulfure-iode est le plus utilisé (Barbarossa *et al.*, 2006 ; Giaconia *et al.*, 2007) et a été proposé par *General Atomic* en 1982 suivant les réactions :



Cette méthode a été améliorée grâce à l'utilisation de catalyseurs comme le complexe Ag–Pd/PdO et le Fe₂O₃ (Barbarossa *et al.*, 2006) qui permettent de réduire la température utilisée jusqu'à 600 °C.

I.1.3.2.2 Electrolyse de l'eau

L'hydrogène peut également être produit par simple électrolyse de l'eau. Un courant électrique permet alors de dissocier l'eau en hydrogène et en oxygène. L'électrolyte utilisé peut être une solution aqueuse acide ou basique (généralement de l'acide sulfurique ou de l'hydroxyde de potassium) avec la présence d'une membrane polymère échangeuse de protons ou une membrane céramique conductrice d'ions O₂⁻ entre les deux électrodes (Figure I-2).

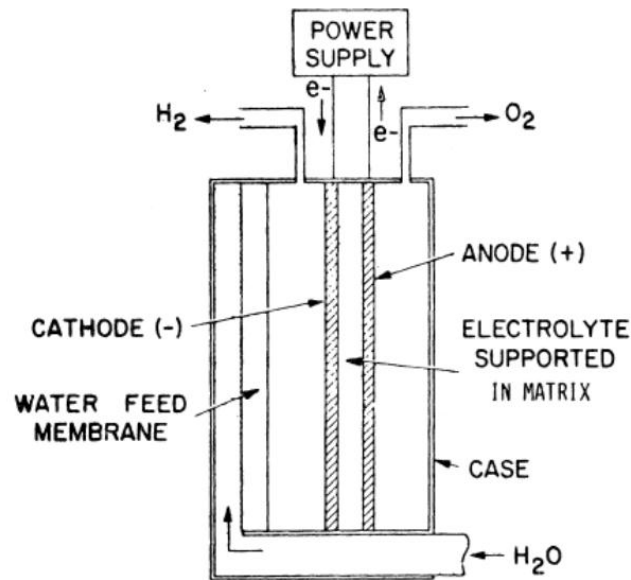


Figure I-2: Schéma de principe de l'électrolyse de l'eau (M.S. Casper (Ed), 1978)

L'électrolyse industrielle est généralement réalisée à partir d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (25 – 40% en masse) : la potasse est préférée à la soude du fait d'une meilleure conductivité. Les réactions ont lieu à une température comprise entre 80°C et 1 000°C selon l'électrolyte utilisé (Lessing, 2007). Les réactions sont les suivantes :

- à l'anode : $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- + \text{O}_2$
- à la cathode : $4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2$

Même si l'hydrogène produit par électrolyse est d'une grande pureté, ce procédé consomme beaucoup d'électricité. La consommation électrique des électrolyseurs industriels est de l'ordre de 4 à 6 kWh/Nm³ (AFH2, 2011). Aussi, ce type de production est essentiellement utilisé pour de petites installations ou dans le cas où l'énergie électrique est peu coûteuse. Aujourd'hui, seulement 5% de l'hydrogène mondial est produit par électrolyse de l'eau (Rapport enea consulting, 2011).

Il existe, à l'heure actuelle, des applications fonctionnant à partir d'électricité provenant d'énergies renouvelables (éolien, solaire), mais elles sont encore peu développées. De même, il est envisageable de développer la photoélectrolyse, la lumière solaire agissant sur une cellule photoélectrochimique, qui, immergée dans l'eau, produit directement de l'hydrogène et

de l'oxygène. Les avantages de ce processus direct de production résident dans la diminution des coûts de l'électrolyseur et dans l'augmentation possible de l'efficacité globale du processus. Toutefois, ce procédé n'est encore qu'à l'étude et est difficilement applicable à grande échelle (Lee *et al.*, 2012).

I.1.3.2.3 Pyrolyse de la biomasse

La biomasse peut être transformée en hydrogène par des techniques semblables à celles qui sont utilisées pour les combustibles fossiles. En utilisant les résidus et les pertes agricoles, ou la biomasse spécifiquement développée pour des usages d'énergie, il est possible de produire de l'hydrogène par l'intermédiaire de la pyrolyse ou de la gazéification. Ceci permet de réduire les impacts sur l'environnement car la quantité de CO₂ émise au cours de la conversion de la biomasse en hydrogène est à peu près équivalente à celle qu'absorbent les plantes au cours de leur croissance. Toutefois, les rendements obtenus sont inférieurs à ceux du reformage de combustibles fossiles et les procédés sont encore en cours de développement (Demirbas, 2007).

Certains auteurs proposent de diminuer les coûts en utilisant directement des déchets solides (Dowaki *et al.*, 2007) ou des boues de station d'épuration (Midilli *et al.*, 2002).

I.1.3.2.4 Nucléaire

Certains prototypes de réacteurs nucléaires de quatrième génération fonctionnent entre 850 à 1 000 °C, températures considérablement plus élevées que celle des centrales nucléaires existantes. L'hydrogène peut alors être produit directement à partir de l'énergie thermique libérée avec des rendements de l'ordre de 50% (O'Brien *et al.*, 2010).

L'électrolyse à haute température permet d'utiliser directement la chaleur et l'électricité produites par l'énergie nucléaire. De plus, l'avantage d'un réacteur nucléaire qui produit à la fois électricité et hydrogène est qu'il peut moduler la production entre les deux. Par exemple, l'usine pourrait produire de l'électricité pendant la journée et la nuit de l'hydrogène, correspondant à son profil de production électrique et à la variation quotidienne de la demande. Toutefois, les réacteurs de quatrième génération ne sont pas attendus avant 2030 et il n'est pas certain qu'ils puissent assurer à la fois la sécurité et la répartition de la distribution (Epiney, 2010).

I.1.3.3 PRODUCTION BIOLOGIQUE D'HYDROGENE

L'hydrogène peut également être produit par voie biologique, c'est-à-dire à l'aide de micro-organismes. Ces procédés peuvent être divisés en deux groupes distincts :

- les photobioprocédés, nécessitant un apport de lumière
- la fermentation en absence de lumière ou « dark fermentation ».

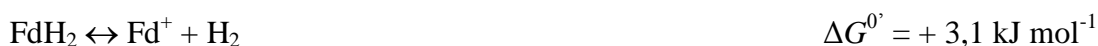
Ils peuvent également être combinés de façon à accroître la production d'hydrogène avec, par exemple, la combinaison d'une étape anaérobie de fermentation suivie d'une étape de photofermentation des sous-produits formés (Argun & Kargi, 2011 ; Chandra & Mohan, 2011 ; Lo *et al.*, 2011)

De nombreux micro-organismes sont en effet capables de produire de l'hydrogène, sous certaines conditions, par photolyse de l'eau ou par photofermentation. Ils ont des représentants dans les trois domaines du monde microbien : *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya* (Kalia & Purohit, 2008). Cette faculté est due à leurs systèmes enzymatiques et plus particulièrement aux hydrogénases omniprésentes (Hallenbeck & Benemann, 2002).

I.1.3.3.1 Les hydrogénases, enzymes clés de la production d'hydrogène par voie fermentaire

La production biologique d'hydrogène fait intervenir 2 types d'enzymes spécifiques : les hydrogénases et les nitrogénases. Les hydrogénases sont les enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène. Les nitrogénases peuvent quant à elles produire de l'hydrogène sous certaines conditions spécifiques : en l'absence de substrats azotés disponibles, les nitrogénases peuvent en effet réduire les protons en hydrogène. Toutefois, ce n'est pas leur métabolisme principal et les rendements sont substantiellement inférieurs à ceux des hydrogénases (Hallenbeck & Benemann, 2002).

Les hydrogénases sont des enzymes catalysant la réduction de deux protons en hydrogène selon les réactions suivantes (Desai *et al.*, 1999) :



Fd étant une ferrédoxine, et NAD la nicotinamide adénine dinucléotide.

Les hydrogénases jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique microbien. La plupart de ces enzymes sont retrouvées chez les *Bacteria* et les *Archaea* qui utilisent l'hydrogène comme source d'électrons. Ces enzymes, très sensibles à l'oxygène, sont classées en trois types selon la composition de leur centre actif (Vignais & Billoud, 2007) :

- les [FeFe]-H₂ases,
- les [NiFe]-H₂ases ; certaines enzymes de cette classe possèdent, en plus, un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. Ce sont les [Ni-Fe-Se]-H₂ases.
- les H₂ases sans métaux, caractérisées par l'absence de cluster [Fe-S] et la présence d'un centre à fer mononucléaire.

In vivo, les [FeFe]-H₂ases fonctionnent préférentiellement dans le sens de la production d'hydrogène. En revanche et toujours *in vivo*, les [NiFe]-H₂ases fonctionnent dans les deux sens. La configuration de leurs centres actifs (Figure I-3) leur permet d'avoir une bonne affinité aux molécules de gaz hydrophobes comme l'hydrogène (Nicolet *et al.*, 2002 ; Vignais & Billoud, 2007). Les cinétiques enzymatiques sont comprises entre 6 000 et 9 000 s⁻¹, traduisant une grande spécificité de la réaction (Melis & Melnicki, 2006). L'activité catalytique des [FeFe]-H₂ases est 10 à 100 fois plus élevée que celle des [NiFe]-H₂ases. Les [NiFe]-H₂ases ont été les plus étudiées jusqu'à présent. Par contre, peu d'information est encore disponible sur les H₂ases sans métaux (Vignais & Billoud, 2007).

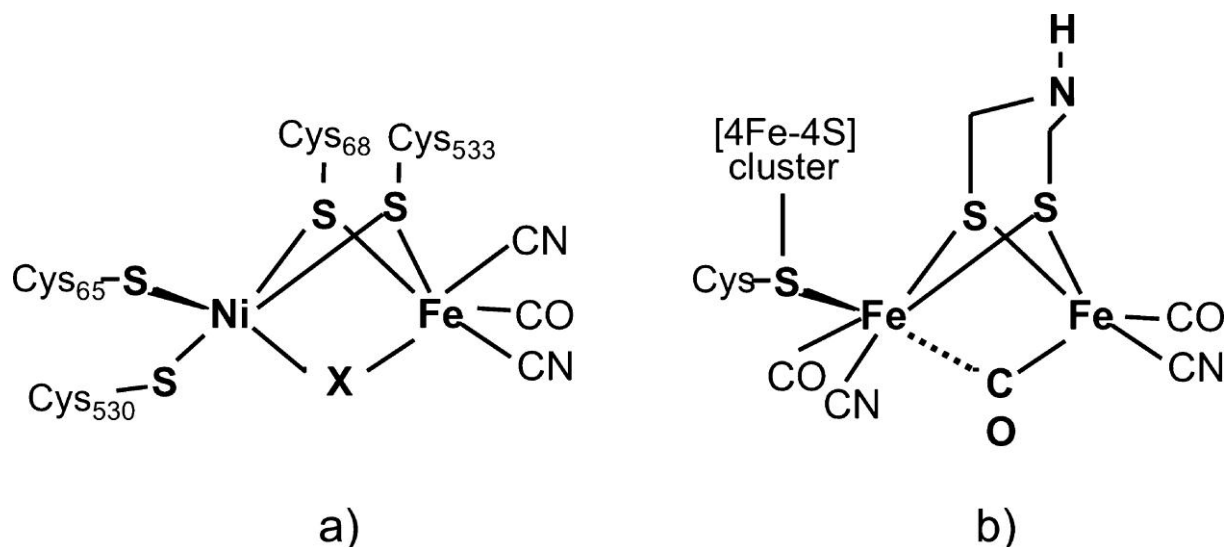


Figure I-3 : Structure schématique du site actif de la [NiFe]-hydrogénase (a) et de la [FeFe]-hydrogénase (b) selon (Vignais & Billoud, 2007).

I.1.3.3.2 Les photo-bioprocédés

Les photo-bioprocédés font intervenir différents types de micro-organismes : des micro-algues pro- et eucaryotes ou encore des bactéries pourpres photosynthétiques. Ces micro-organismes phototrophes sont capables de produire de l'hydrogène, sous certaines conditions, par photolyse de l'eau ou photofermentation.

- **La biophotolyse directe**

Lors de la biophotolyse directe, l'appareil photosynthétique de certaines micro-algues, telle que *Chlamydomonas reinhardtii*, est utilisé pour scinder les molécules d'eau en oxygène et en hydrogène en présence d'oxygène, selon la réaction de photolyse suivante (Eroglu & Melis, 2011) :



Cette réaction est réalisée à l'aide du photosystème II des micro-organismes (Hallenbeck & Benemann, 2002). La Figure I-4 présente les mécanismes de production d'hydrogène par biophotolyse directe.

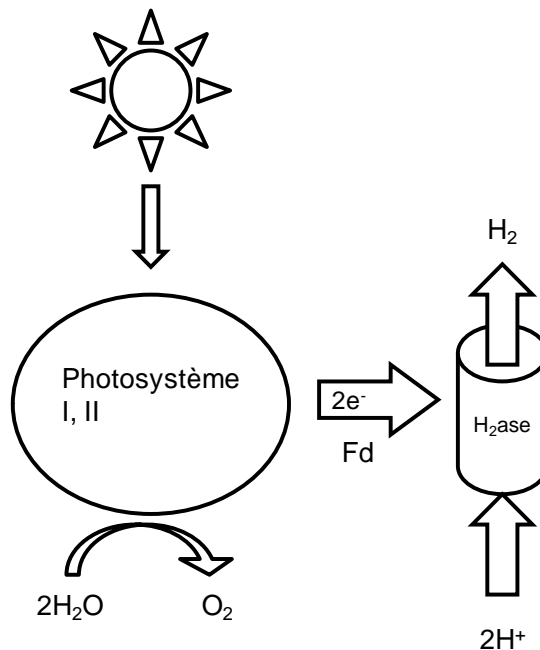


Figure I-4 : Production biologique d'hydrogène par biophotolyse directe de l'eau (d'après Hallenbeck & Benemann, 2002)

La biophotolyse directe de l'eau repose sur le principe de la photosynthèse. Toutefois, au lieu de conduire à la production d'hydrates de carbone et de biomasse, le métabolisme est réorienté sous certaines conditions de culture, vers la production d'hydrogène. Ici, la lumière est absorbée par le photosystème II (PSII) ce qui génère des électrons : les molécules d'eau sont dissociées en protons tout en libérant de l'oxygène. Ces électrons sont ainsi libérés et transférés à la ferrédoxine par l'intermédiaire du photosystème I (PSI). L'hydrogénase est l'accepteur final d'électrons, transmis directement de la ferrédoxine, ce qui permet la production d'hydrogène par réduction des protons préalablement obtenus (Levin *et al.*, 2004).

Les productivités en hydrogène retrouvés dans la littérature sont faibles, de l'ordre de 0,07 mmol.h⁻¹.L⁻¹ (Manish & Banerjee, 2008). Ce procédé est en effet limité par la forte sensibilité des hydrogénases vis-à-vis de l'oxygène, qui est ici un produit de la réaction. Pour être envisageable à l'échelle industrielle, le procédé de biophotolyse directe de l'eau devrait être effectué à une pression partielle en oxygène proche de 1 atm, ce qui est environ 1 000 fois supérieur à la pression partielle acceptable par les hydrogénases (Manish & Banerjee, 2008). C'est le principal verrou technologique de ces procédés.

- **La biophotolyse indirecte**

Certains micro-organismes, comme les cyanobactéries, peuvent également réaliser la biophotolyse de façon indirecte par le biais d'un cycle hétérocyste avec fixation de l'azote. L'activité des cyanobactéries suit deux processus :

- la photosynthèse (par le biais des photosystèmes I et II) avec accumulation de glucide et production d'oxygène
- l'utilisation des glucides accumulés pour fixer l'azote de l'air

Figure I-5 présente les mécanismes de production d'hydrogène par biophotolyse indirecte.

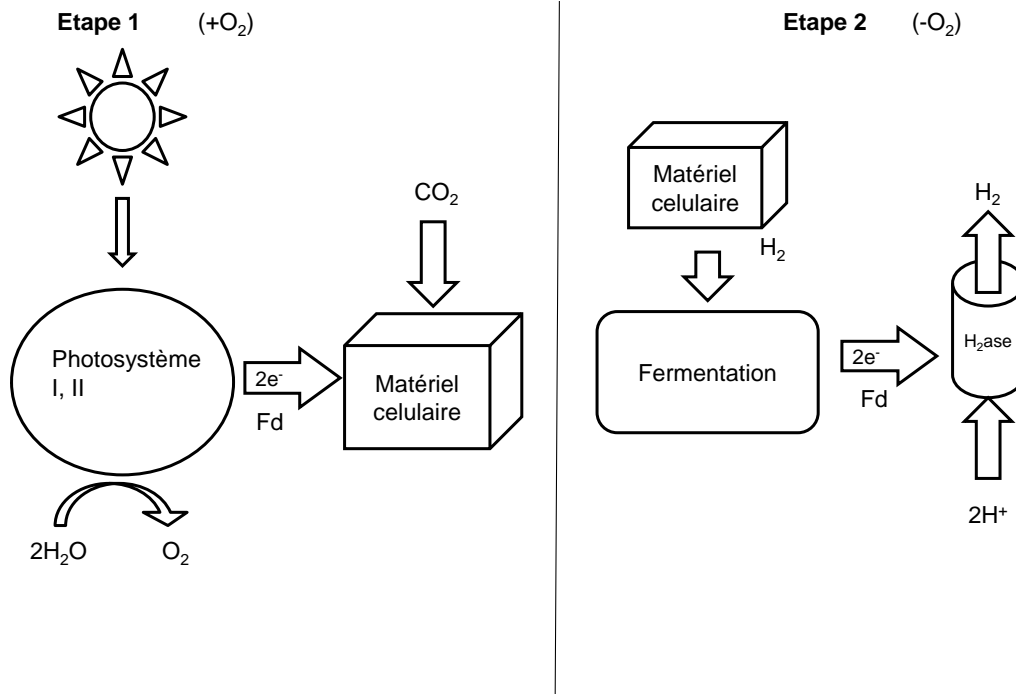
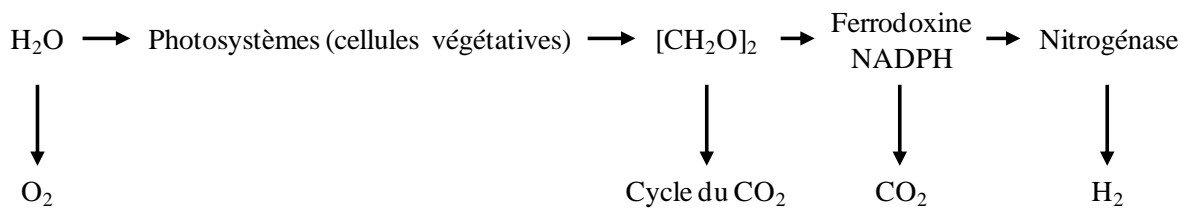


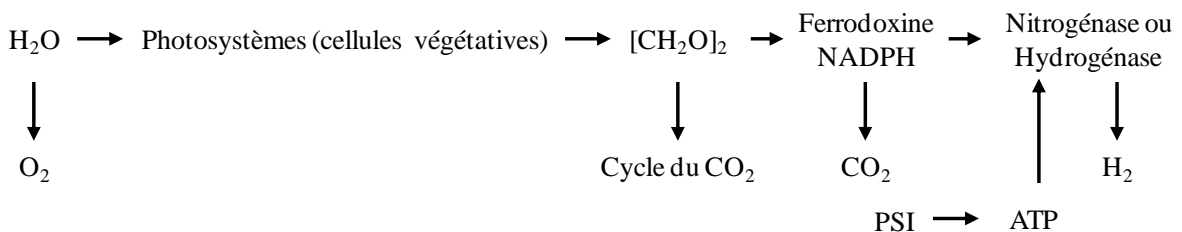
Figure I-5 : Production biologique d'hydrogène par biophotolyse indirecte de l'eau (Hallenbeck & Benemann, 2002)

Ces 2 processus sont réalisés avec une séparation soit temporelle (cycle jour/nuit pour les cyanobactéries sans hétérocyste), soit spatiale (cyanobactéries avec hétérocystes). Les cyanobactéries peuvent produire de l'hydrogène par le biais de nitrogénase selon le modèle suivant (Chader *et al.*, 2007) :

Bactéries fixatrices d'azote avec hétérocyste



Bactéries fixatrices d'azote sans hétérocyste



Les conditions rapportées comme étant nécessaires pour la production d'hydrogène par les cyanobactéries sont de la lumière, du CO_2 (source carbone) et une carence en azote dans le milieu (Kapdan & Kargi, 2006). Ceci étant, une productivité de $0,355 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ a été atteinte, grâce à une souche mutante d'*Anabaena variabilis*, soit 50 fois plus que le procédé de photolyse directe (Manish & Banerjee, 2008).

- **La photo-fermentation**

Lors de la photo-fermentation, les bactéries pourpres, comme *Rhodobacter* ou *Rhodospseudomonas*, peuvent produire de l'hydrogène à partir de substrats carbonés simples, tels que des acides organiques à courtes chaînes ou du glucose, et d'énergie lumineuse (Das & Veziroglu, 2008 ; Carlozzi *et al.*, 2010 ; Abo-Hashesh *et al.*, 2011).

La Figure I-6 présente les mécanismes de production d'hydrogène par photofermentation de composés organiques (Hallenbeck & Benemann, 2002).

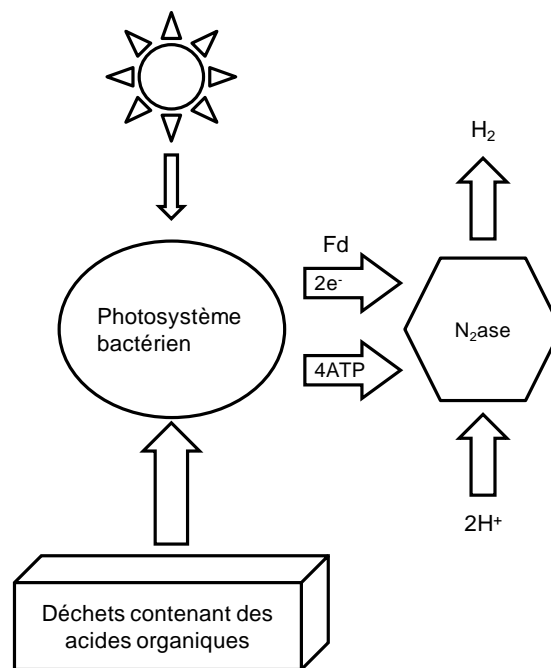
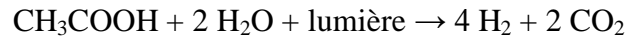


Figure I-6 : Schéma de principe de la photofermentation (Hallenbeck & Benemann, 2002)

Le système photosynthétique des bactéries pourpres est plus simple que celui des microalgues : il ne comprend qu'un seul photosystème. Il n'est cependant pas assez puissant pour permettre la photolyse directe de l'eau. Ces bactéries peuvent toutefois utiliser des acides organiques simples en tant que donneurs d'électrons. Les électrons libérés sont alors utilisés pour réduire la ferrédoxine et produire de l'hydrogène grâce aux nitrogénases. Cette

production d'hydrogène n'est réalisable que sous des conditions spécifiques : milieu anaérobie et carencé en azote (Levin *et al.*, 2004). A partir d'acide acétique, la réaction est la suivante :



Le rendement théorique de conversion de l'énergie lumineuse en hydrogène est proche des 100%, ceci sans considérer la teneur énergétique du substrat organique (Hallenbeck & Benemann, 2002). En pratique, dans les photobioréacteurs, le rendement de conversion est beaucoup plus faible. Les rendements de conversion obtenus sont proches de 4%, sauf pour quelques mutants qui atteignent 35% (Akkerman *et al.*, 2002 ; Abo-Hashesh *et al.*, 2011). Ces faibles rendements peuvent être en partie expliqués par l'inhibition de la conversion due à l'excès de lumière (Hallenbeck & Benemann, 2002).

En ce qui concerne la productivité, les valeurs rapportées dans la littérature pour ce procédé sont de l'ordre de 150 mmol.L⁻¹.h⁻¹ (Levin *et al.*, 2004).

- **Conclusion sur les photo-bioprocédés**

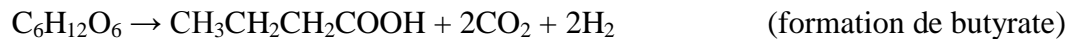
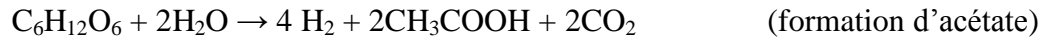
Même si les rendements de conversion théoriques sont élevés, ces procédés comportent encore quelques inconvénients comme :

- de faibles rendements expérimentaux,
- l'inhibition de la réaction par l'oxygène produit, que ce soit pour les hydrogénases ou les nitrogénases
- l'apport de lumière, d'autant plus lorsque la turbidité du réacteur augmente

Afin de résoudre ces deux derniers points, de nombreuses recherches tentent de supprimer ou limiter l'inhibition du système photosynthétique II par l'oxygène à l'aide de techniques d'ingénierie métabolique. De même, plusieurs équipes travaillent à la conception de photobioréacteurs permettant d'optimiser l'apport de lumière au sein du réacteur (fibres optiques par exemple) et ainsi favoriser la production d'hydrogène.

I.1.3.3.3 La fermentation sombre

En anaérobiose, des bactéries du type *Clostridium* ou *Enterobacter* sont capables de produire de l'hydrogène lors de la transformation de la matière organique grâce à des hydrogénases. Les voies de fermentation du glucose en acétate et en butyrate sont en effet les deux principales voies de production d'hydrogène par fermentation sombre :



Contrairement aux photo-bioprocédés, la fermentation sombre ne nécessite pas l'apport de lumière, et est donc potentiellement plus simple à mettre en œuvre. De plus, elle permet de produire de l'hydrogène à partir de matrices réelles complexes comme les déchets alimentaires ou les résidus de culture (Guo *et al.*, 2010). En outre, les productivités observées en laboratoire sont du même ordre de grandeur que celles observées avec un procédé optimisé de photofermentation : 80 mmol.L⁻¹.h⁻¹ (Manish & Banerjee, 2008). De ce fait, la production d'hydrogène par voie fermentaire a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années et sera largement développé dans la partie suivante.

I.1.3.4 COMPARAISON DES MODES DE PRODUCTION

Le principe des différents modes de production d'hydrogène, ainsi que leurs principaux avantages et inconvénients sont résumés dans le Tableau I-2.

Tableau I-2 : Modes de production de l'hydrogène : principes, avantages, inconvénients

TECHNIQUES	PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
LES PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES			
Réformage :	Chauffage à haute température (à 840-950°C) pour obtenir des éléments gazeux ensuite séparés par un jeu de températures à partir de : <ul style="list-style-type: none"> - combustibles fossiles (vaporeformage): $C_nH_m + n H_2O \rightarrow n CO + (m/2 + n) H_2$ $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$ - charbon : (gazéification du charbon), coke et solides carbonés autres. - vapeur d'eau 	Technologie mature, peu coûteuse	Rejet de CO ₂ , utilisation d'énergies fossiles
Electrolyse de l'eau :	Séparation de la molécule d'eau 80°C < Température < 1000°C, réaction inverse d'une pile : <ul style="list-style-type: none"> - Anode : $H_2O \rightarrow 2H^+ + 2e^- + 1/2O_2$ $\Delta G^\circ = 285kJ.mole^{-1}$ (apport électrique nécessaire) - Cathode: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ 	Technologie mature, pas de rejet de CO ₂	Coûteuse énergétiquement ; Taille des installations
Pyrolyse de la biomasse :	Chauffage (sans flamme) à haute température de corps organiques complexes, pour produire des éléments simples. Utilisation de déchets solides et de boues d'épuration possible.	Pas de production de CO ₂	Coûteuse énergétiquement
Nucléaire :	Utilisation de réacteurs de 4 ^{ème} génération	Pas de rejet de CO ₂	Déchets nucléaires Technologie non mature
Photoélectrolyse :	Utilisation de la lumière solaire qui agit sur une cellule photoélectrique produisant des bulles d'H ₂ et d'O ₂ si elle est immergée dans l'eau.	Pas de rejet de CO ₂	A l'état de recherche
LES PROCEDES BIOLOGIQUES			
Bio-photolyse de l'eau	Réaction réalisée par des algues et des cyanobactéries (ex. : l'algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) $2 H_2O + hv \rightarrow 2 H_2 + O_2$ (couplage de la photosynthèse et de l'action d'hydrogénases ¹)	Besoin d'eau et de lumière Pas de rejet de CO ₂	Coûts des photo-bioréacteurs Faible conversion de l'énergie solaire Production d'H ₂ limitée par rapport aux procédés physico-chimiques
Photo-fermentation	Réaction réalisée par des bactéries photosynthétiques anoxygènes (bactéries pourpres, hétérotrophes) (ex. : <i>Rhodobacter capsulatus</i>) Utilisation de la lumière et des nitrogénases ² , sous carence d'azote $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + hv \rightarrow 12 H_2 + 6CO_2$	Rendement théorique de conversion en H ₂ élevé Valorisation des déchets organiques	Production d'H ₂ limitée par rapport aux procédés physico-chimiques Production séquencée (cycle de la photosynthèse et/ou stress bactérien)
Fermentation sombre	Réaction réalisée par des bactéries anaérobies strictes (ex. <i>Clostridium butyricum</i>) ou facultatives (ex. <i>Enterobacter cloacae</i>) lors de la transformation de la matière organique grâce à des hydrogénases ¹ . $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4 H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$ $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	Production à partir de matière organique variée, Pas besoin de lumière	Purification de l'H ₂ nécessaire, Sensibilité à la pression d'H ₂ , Accumulation de métabolites secondaires

(1) Hydrogénase : enzyme catalysant l'oxydation réversible de l'H₂.

(2) Nitrogénase : enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃).

I.2 LA PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE

La production anaérobie d'hydrogène se réalise spontanément dans des écosystèmes naturels et fait partie d'un processus microbien plus vaste appelé digestion anaérobie (DA). Lors de la digestion anaérobie, les différentes activités microbiennes orientent les flux métaboliques (essentiellement le flux de carbone) des molécules complexes vers une minéralisation totale de la matière (méthane et CO₂) (Moletta, 2008). De nombreux micro-organismes interagissent entre eux pour que les différentes étapes de décomposition de la matière organique puissent avoir lieu.

D'une façon générale ce processus est divisé en quatre étapes (Moletta, 2008) (Figure I-7) :

- (i) Dans un premier temps, sous l'action d'enzymes extracellulaires sécrétées par des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium* sp.) ou anaérobies facultatives (*Acetobacter* sp. ou *Streptococcus* sp.), la matière organique de haut poids moléculaire est hydrolysée en monomères (monosaccharides, acides gras, acides aminés et bases azotées).
- (ii) Ensuite, lors de l'acidogénèse, des micro-organismes fermentaires tels qu'*Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. et *Clostridium* sp. transforment les différents monomères en acides gras volatils (*i.e.* acides acétique, propionique, butyrique, valérique, caproïque,...), en alcools (e.g. éthanol, butanol,...), en autres acides organiques (e.g. acide lactique), en dioxyde de carbone et en hydrogène.
- (iii) Puis l'étape d'acétogénèse permet la transformation des différents composés issus des phases précédentes en acétate. Elle s'effectue sous l'action de bactéries acétogènes elles-mêmes syntrophes des méthanogènes car certaines réactions (à partir du propionate, du butyrate et de l'éthanol) ont une énergie libre standard de Gibbs positive ($\Delta G^{0'} > 0$) : ceci montre que ces réactions sont thermodynamiquement défavorables dans des conditions normales de réaction et ne peuvent finalement avoir lieu que sous une pression partielle en hydrogène inférieure à 10⁻⁴ppm (Fukuzaki *et al.*, 1990). Cette étape peut également être réalisée par des bactéries non-syntrophes des méthanogènes, anaérobies strictes, qui produisent de l'hydrogène (Hattori, 2008). Ces dernières sont également capables de consommer l'hydrogène avec du CO₂ par homoacétogénèse.
- (iv) Finalement, la méthanogénèse permet à des archaebactéries, appelées méthanogènes, de transformer l'acétate ou le CO₂ et l'hydrogène en méthane (CH₄).

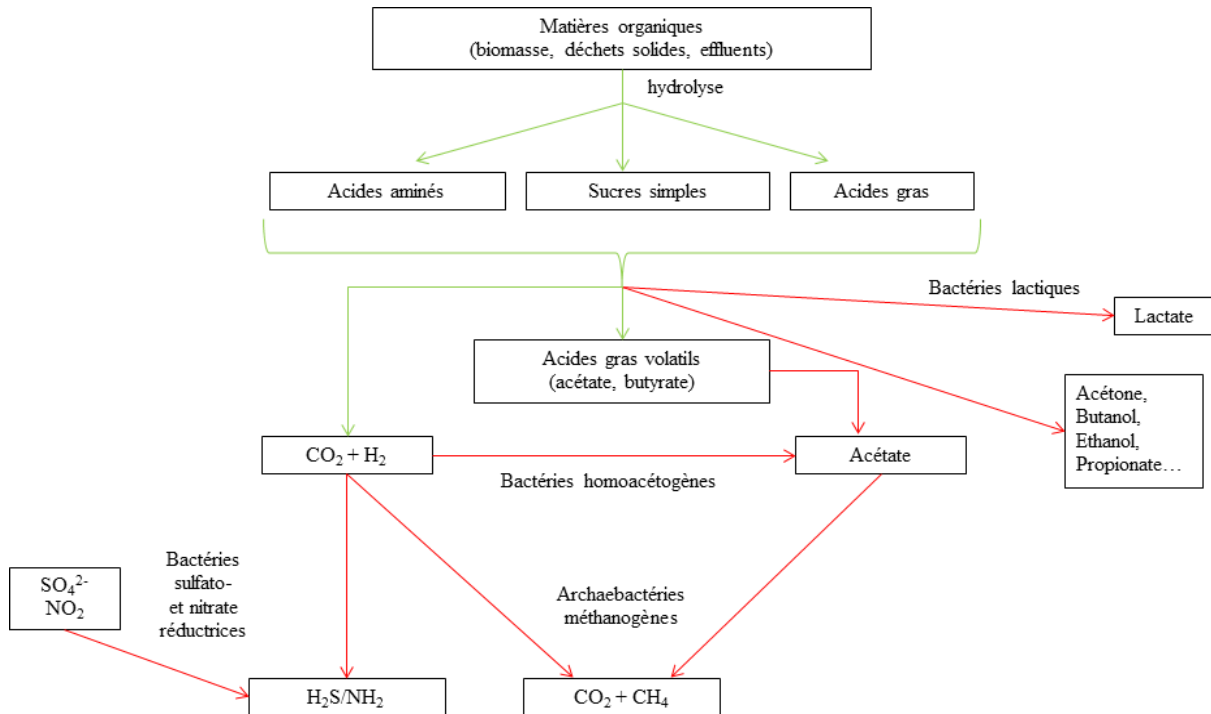


Figure I-7 : Schéma réactionnel général de la digestion anaérobie. Les flèches en vert indiquent les voies de production d'hydrogène alors que les flèches en rouge indiquent les voies de consommation d'hydrogène ou disséminatrices du potentiel d'hydrogène (bilan H_2 neutre) (adapté de Latrille et al., 2011).

La production d'hydrogène se déroule lors de l'étape d'acidogénèse. Différents types de micro-organismes sont alors capables de synthétiser ce gaz et de nombreuses études ont été menées pour caractériser les voies métaboliques utilisées par ces micro-organismes (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

I.2.1 LES VOIES MÉTABOLIQUES DE LA FERMENTATION SOMBRE

De nombreuses voies métaboliques ont été proposées pour la production d'hydrogène par voie fermentaire. La Figure I-8 illustre les principales voies de la fermentation sombre lors de la dégradation du glucose.

Dans un premier temps, le glucose est converti en pyruvate selon la voie de la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas). Cette conversion est accompagnée par la production d'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de la forme réduite de la nicotinamide adénine nucléotide (NADH). Ensuite, le pyruvate est transformé en acétylcoenzyme A (acétyl-CoA), en dioxyde de carbone et en hydrogène par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase et une hydrogénase. Le pyruvate peut également être converti en

acétyl-CoA et en formiate qui peut à son tour être transformé en CO₂ et en hydrogène par certaines entérobactéries comme *Escherichia coli* (Seppälä *et al.*, 2011). Finalement, l'acétyl-CoA est converti en acétate, butyrate, ou éthanol en fonction des micro-organismes actifs, de l'état d'oxydation, de la charge en substrat et des conditions environnementales.

Une partie du NADH est utilisé pour la formation de butyrate et d'éthanol et le NADH résiduel peut-être oxydé pour produire de l'hydrogène (Li & Fang, 2007).

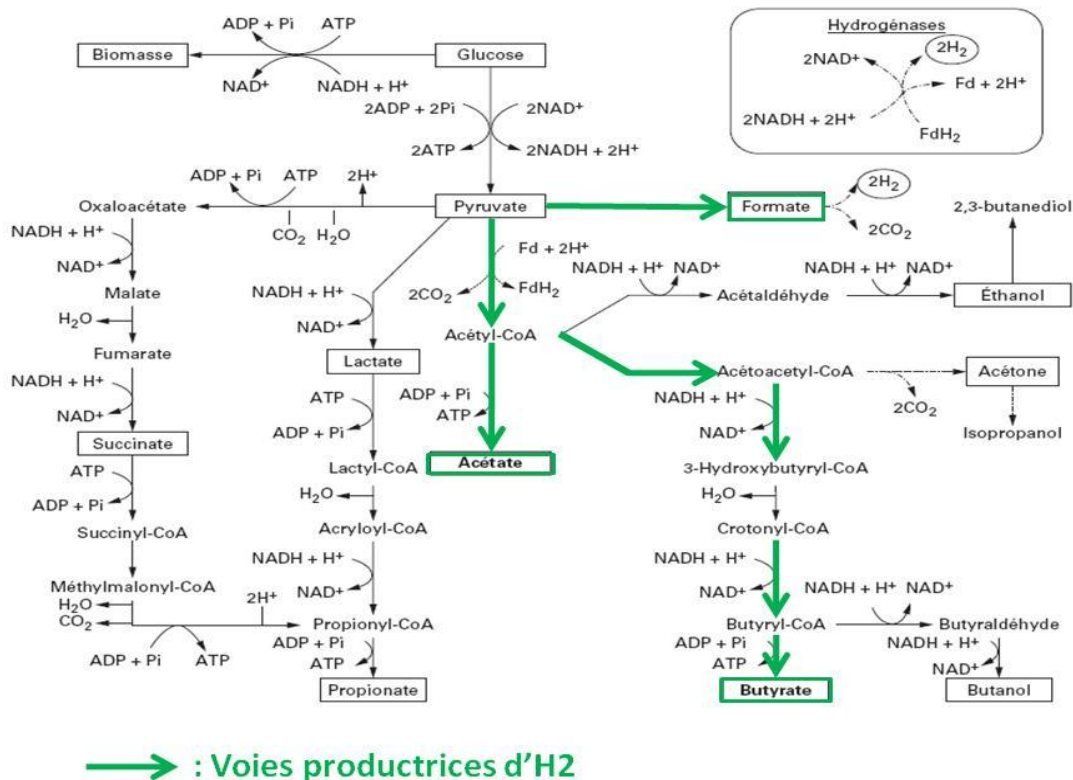


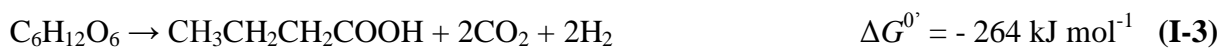
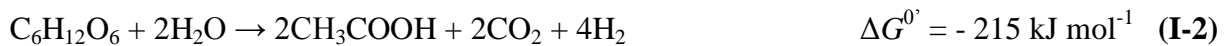
Figure I-8 : Principales voies métaboliques impliquées dans la production de biohydrogène par voie fermentaire (adapté de Latrille *et al.*, 2011).

I.2.1.1 LES VOIES PRODUCTRICES D'HYDROGENE

D'un point de vue stœchiométrique, il est théoriquement possible de produire 12 moles d'hydrogène par mole de glucose (Equation I-1). Cependant, cette réaction reste théorique et est biologiquement limitée par l'activité cellulaire (Bartacek *et al.*, 2007 ; Hallenbeck & Benemann, 2002). A ce jour, elle n'a pu être réalisée que par voie enzymatique (Woodward *et al.*, 2000).



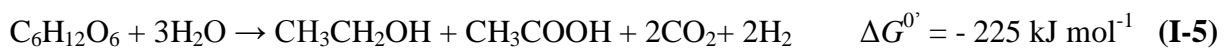
Parmi l'ensemble des sous-produits issus des divers métabolismes microbiens, les deux voies métaboliques principales produisant de l'hydrogène à partir de carbohydrate sont associées à la voie « acétate » et à la voie « butyrate ». Ces voies sont bien connues chez de nombreuses espèces de *Clostridium* sp. ou dans la famille des *Enterobacteriaceae* (Figure I-8). La voie de production d'acétate entraîne un rendement molaire de 4 moles d'hydrogène par mole d'hexose équivalent (Equation I-2), alors que dans la voie « butyrate », le rendement théorique en hydrogène est plus faible avec 2 moles d'hydrogène par mole d'hexose équivalent (Equation I-3) (Hawkes *et al.*, 2007).



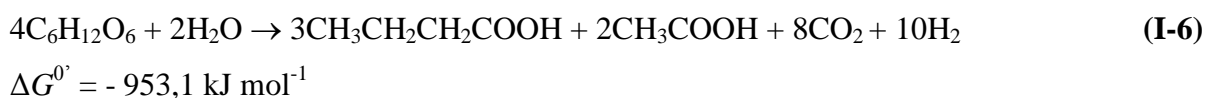
Certains micro-organismes comme *E. coli* sont également capables de produire de l'hydrogène en utilisant la voie formiate (Equation I-4).



Enfin, en cultures mixtes, Li et Fang (2007) ont proposé une autre voie possible, via la production d'acétate et d'éthanol produisant ainsi deux moles d'hydrogène par mole de glucose (Equation I-5).



Cependant, la grande majorité des études en cultures mixtes et en réacteurs continus ont montré que l'acétate et le butyrate étaient les principaux métabolites produits, avec le butyrate en excès par rapport à l'acétate (Hawkes *et al.*, 2007). Cette observation a amené Hawkes *et al.* (2007) à proposer l'équation suivante (Equation I-6).pour décrire la production d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte :



D'après l'Equation I-6, les rendements de production d'hydrogène en culture mixte devraient être proches de 2,5 moles d'hydrogène par mole d'hexose. Or les rendements actuels de

production d'hydrogène sont, dans la plupart des cas, inférieurs à cette valeur. Ceci s'explique notamment par la présence de voies consommatrices d'hydrogène ou de voies disséminatrices du potentiel hydrogène.

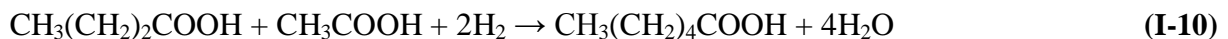
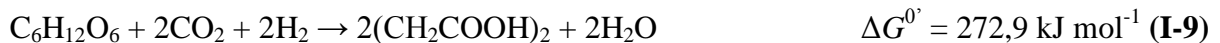
I.2.1.2 LES VOIES CONSOMMATRICES D'HYDROGENE

L'hydrogène est un excellent vecteur énergétique pour le transfert d'électrons entre espèces microbiennes. C'est en effet un intermédiaire moléculaire clé au sein de la chaîne trophique et certains micro-organismes utilisent l'hydrogène comme substrat, en parfaite symbiose avec les producteurs d'hydrogène.

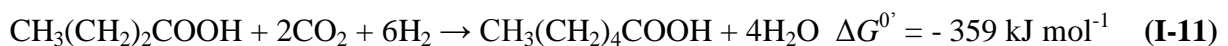
Les espèces les plus connues sont les archaebactéries qui produisent du méthane à partir de l'H₂ et du CO₂ et sont dites « hydrogénotrophes ». En anaérobiose, elles sont considérées comme les principales consommatrices d'hydrogène. La réaction de méthanisation est dans ce cas également thermodynamiquement très favorable (Equation I-7). Elle est même plus favorable que la réaction de production de méthane à partir d'acétate dont le ΔG^0 est plus élevé (- 31 kJ.mol⁻¹).



Il existe d'autres voies métaboliques de consommation directe de l'hydrogène. Ainsi, les voies de formation de propionate (Equation I-8), de succinate (Equation I-9) voire de caproate à partir de butyrate et d'acétate (Equation I-10 et I-11) peuvent être associées à une consommation d'hydrogène.



$$\Delta G^{0'} = - 359 \text{ kJ mol}^{-1}$$



Les bactéries sulfato-réductrices sont également capables de consommer l'hydrogène par réduction des sulfates (Equation I-12). Cette réaction est thermodynamiquement favorable et peut se produire à de très faible taux en hydrogène (10^{-6} atm). C'est pourquoi la présence de faible concentration d'ions sulfate dans le milieu (environs 500 mg.L^{-1}) réduit significativement les performances de production d'hydrogène.



Enfin, les bactéries homoacétogènes, comme *Clostridium aceticum* ou *Clostridium thermoaceticum*, consomment le CO_2 et l' H_2 pour former de l'acétate selon la réaction d'homoacétogénèse suivante (Equation I-13) :



I.2.1.3 LES VOIES DISSEMINATRICES DE LA PRODUCTION D'HYDROGENE

Sans directement consommer l'hydrogène, les voies disséminatrices consomment une partie du substrat qui ne pourra donc pas être utilisé pour produire de l'hydrogène. Les principales voies concurrentes de la production d'hydrogène sont présentées dans la Figure I-9.

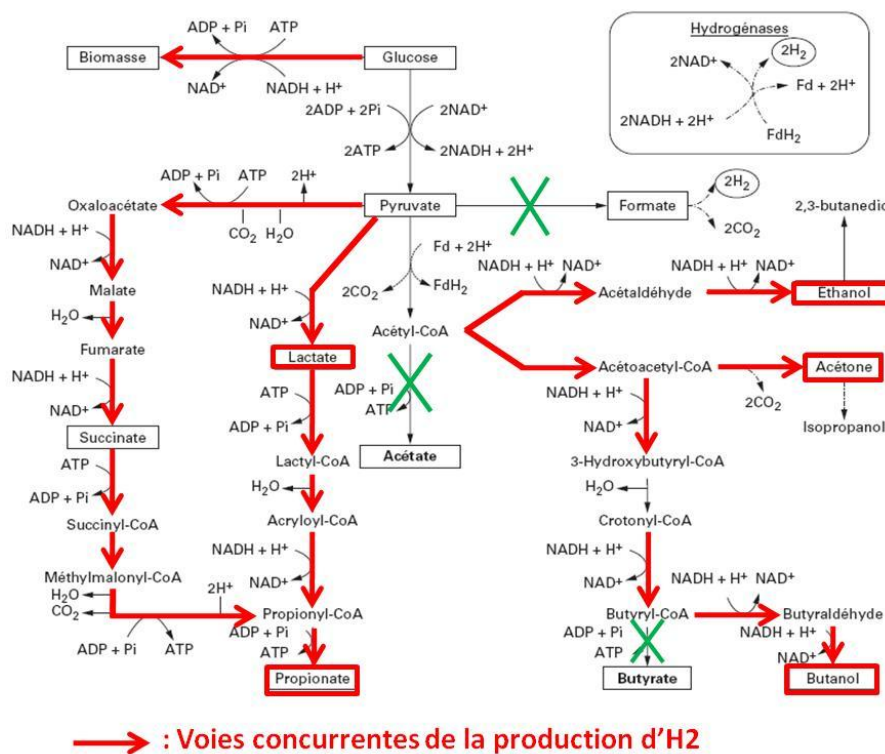


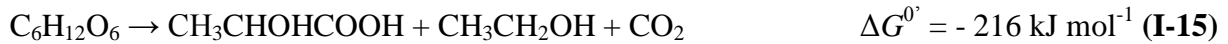
Figure I-9 : Principales voies métaboliques concurrentes de la production de biohydrogène par voie fermentaire (adapté de Latrille et al., 2011).

La première voie disséminatrice commune à tous les micro-organismes correspond à la consommation d'une partie du glucose pour la production de biomasse. Chez certaines espèces thermophiles productrices d'hydrogène, e.g *Thermotoga* sp., la production de biomasse est faible ce qui permet d'obtenir des rendements de production d'hydrogène proches du maximum théorique (van Niel *et al.*, 2002 ; Eriksen *et al.*, 2008). Cependant, dans ces cas, la productivité d'hydrogène (quantité d'hydrogène produite par litre de réacteur et par jour) est très faible (inférieure à $10 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Alors que chez les espèces du genre *Enterobacter* sp. la production de biomasse est beaucoup plus importante avec des rendements en hydrogène plus faibles (entre 0,8 et $1 \text{ mol H}_2.\text{mol hexose}^{-1}$) mais des productivités nettement plus importantes (supérieure à $50 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Li & Fang, 2007 ; Shin *et al.*, 2007).

En plus de la production de biomasse, des voies métaboliques alternatives peuvent apparaître au sein même des micro-organismes producteurs d'hydrogène, notamment à cause de stress environnementaux. Ainsi, même en culture pure, les bactéries du genre *Clostridium* peuvent produire de l'éthanol, de l'acétone, du butanol, du lactate ou du propionate. La production d'alcools par ces voies alternatives a conduit au terme de « solvantogénèse ». Lors de la solvantogénèse, la production d'hydrogène est impossible à cause de la compétition pour l'élément réducteur NADH (Figure I-9). La solvantogénèse est étroitement liée au phénomène de stress cellulaire qui induit généralement la sporulation chez *Clostridium* sp. (Khanal *et al.*, 2004). Ainsi, la production d'hydrogène peut être perturbée par divers facteurs comme un choc thermique, une baisse brutale du pH (une ou deux unités), la présence d'oxygène dans le milieu (trace), un excès ou une carence d'un élément nutritif dans le milieu (substrat, azote, fer...). La solvantogénèse peut également apparaître lors de l'accumulation des sous-produits de fermentation hydrogène (concentrations en acétate et/ou butyrate supérieures à 60mM) ou la sécrétion de bactériocines dans le milieu par d'autres espèces fermentaires retrouvées en cultures mixtes tel que *Lactobacillus* (Noike *et al.*, 2002).

En cultures mixtes, outre les voies précédemment citées, d'autres voies d'utilisation des sucres peuvent être utilisées pour la croissance des micro-organismes fermentaires non producteurs d'hydrogène. Ces micro-organismes rentrent alors en compétition pour le substrat avec les bactéries productrices d'hydrogène.

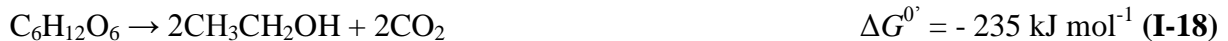
C'est le cas par exemple des bactéries lactiques (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp. ou *Bifidobacterium* sp.) qui réalisent les voies de fermentation homolactiques (Equation I-14) hétérolactiques (Equation I-15) ou de type « *Bifidum* » (Equation I-16) pour leur croissance.



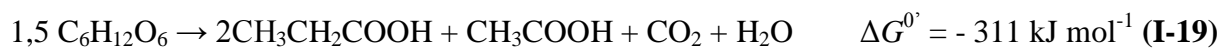
Certaines bactéries acétogènes du genre *Sporomusa* sp. ou *Clostridium* sp. peuvent même fermenter le glucose en utilisant une voie de fermentation homo-acétique (Equation I-17).



La voie de production d'éthanol (Equation I-18) bien connue chez la levure, existe également chez certains micro-organismes (genre *Zymomonas* sp.).



Enfin, la fermentation propionique peut être réalisée par un grand nombre de micro-organismes qui produisent du propionate et de l'acétate à partir de la fermentation du glucose (Equation I-19).



I.2.2 LA MICROBIOLOGIE DE LA FERMENTATION SOMBRE

De nombreuses bactéries sont capables de produire de l'hydrogène par fermentation. Cette production peut se réaliser en culture pure, en co-culture ou en cultures mixtes. Dans le cas des co-cultures ou des cultures mixtes, les bactéries productrices d'hydrogène peuvent être associées à des bactéries non productrices d'hydrogène et diversifier le métabolisme de l'écosystème, favorisant ainsi son adaptation à des substrats complexes.

I.2.2.1 UTILISATION DE CULTURES PURES DANS LA PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE

Comme le montre le Tableau I-3 ,beaucoup de micro-organismes possèdent la capacité de produire de l'hydrogène, aussi bien des anaérobies strictes (*Clostridium sp.*, *Ruminococcus sp.*), des anaérobies facultatives (*Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Citrobacter sp.*) et quelques aérobies strictes (*Alcaligenes sp.*) (Li & Fang, 2007). Le Tableau I-3 présente également le substrat et le type de culture utilisé ainsi que les rendements obtenus pour les différentes souches étudiées.

Tableau I-3 : Exemples de souches pures productrices d'H₂ par voie fermentaires

Souche	Substrat	Type de culture	Productivité max en H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	rendement max H ₂	Réf.
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Glucose	Batch	8,9	2 mol.mol glc ⁻¹	(Zhang <i>et al.</i> , 2006a)
<i>Clostridium beijerinckii</i> Fanp3	Glucose	Batch	15,33	2,52 mol.mol glc ⁻¹	(Pan <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Saccharose / xylose	Batch	8,36	0,73 mol.mol xylose ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sucrose	Batch	8,21	2,78 mol.mol sucrose ⁻¹	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	Saccharose / xylose	Batch	9,83	0,95 mol.mol DCO ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH1	Saccharose	Batch	13,76	2,07 mol.mol hexose ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	Saccharose	Batch	19,66	2,07 mol.mol hexose ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH5	Saccharose	Batch	15,73	2,07 mol.mol hexose ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH7	Saccharose	Batch	16,71	2,07 mol.mol hexose ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Chitine et <i>N</i> -acetyl-glucosamine (GlcNAc)	Batch	-	1,9 mol.mol GlcNAc ⁻¹	(Evyernie <i>et al.</i> , 2000)
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulose	-	-	-	(Carere <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellobiose	Batch	-	1 mol.mol glc ⁻¹	(Islam <i>et al.</i> , 2006)
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Sources cellulosiques	Batch	-	1,6 mol.mol glc ⁻¹	(Levin <i>et al.</i> , 2006)
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	continu	2,58	3 mol.mol lactose ⁻¹	(Collet <i>et al.</i> , 2004)
<i>Clostridium</i> sp. strain no. 2	Cellulose	continu	16,3	2,14 mol.mol glc ⁻¹	(Taguchi <i>et al.</i> , 1996)
<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glucose	Batch	12,27	2,53 mol.mol glc ⁻¹	(Pan <i>et al.</i> , 2008a)
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	<i>N</i> -acetyl-glucosamine (GlcNAc)	Batch	-	1,9 mol.mol GlcNAc ⁻¹	(Evyernie <i>et al.</i> , 2000)
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	<i>N</i> -acetyl-glucosamine (GlcNAc)	Batch	1,1	2,4 mol.mol GlcNAc ⁻¹	(Evyernie <i>et al.</i> , 2001)
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glucose	Batch / continu	11,8	1 mol.mol glc ⁻¹	(Yokoi <i>et al.</i> , 1995)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glucose	Batch	-	-	(Jo <i>et al.</i> , 2008a)
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Glycérol	Batch / continu	5,8	0,6 mol.mol glycerol ⁻¹	(Nakashimada <i>et al.</i> , 2002)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Amidon hydrolysé	Batch	17,39	1,09 mol.mol d'amidon ⁻¹	(Fabiano & Perego, 2002)

Souche	Substrat	Type de culture	Productivité max en H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	rendement max H ₂	Réf.
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Molasse	continu	16,5	3,5 mol.mol de sucre ⁻¹	(Tanisho & Ishiwata, 1995)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Glucose	continu cellule fixée	75,6	-	(Kumar & Das, 2001)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Saccharose / glucose	Batch	25,95	6 mol.mol sucrose ⁻¹	(Kumar & Das, 2000)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Cellobiose	Batch	25,56	5,4 mol.mol cellobiose ⁻¹	(Kumar & Das, 2000)
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Glucose	Batch	-	0,56 mol.mol gluc ⁻¹	(Rachman <i>et al.</i> , 1997)
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM1183	Glucose	Batch	-	1,54 mol.mol gluc ⁻¹	(Lu <i>et al.</i> , 2009b)
<i>Klebsiella</i>	Saccharose / xylose	Batch	8,36	0,73 mol.mol xylose ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Escherichia coli</i> MC13-4	Glucose	Batch	19,66	1,27 mol.mol glc ⁻¹	(Ishikawa <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Continu	-	2 mol.mol glc ⁻¹	(Turcot <i>et al.</i> , 2008)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Batch	-	2 mol.mol glc	(Bisailon <i>et al.</i> , 2006)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KU001	Glucose	Batch	-	2,4 mol.mol glc ⁻¹	(Ueno <i>et al.</i> , 2001)
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Amidon ou pyruvate	Continu	9,46	3,33 mol.mol amidon ⁻¹	(Kanai <i>et al.</i> , 2005)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Saccharose	Batch	12,12	2,53 mol.mol hexose ⁻¹	(O-Thong <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thermotoga elfii</i>	Glucose	Batch	4,5	3,3 mol.mol glc ⁻¹	(van Niel <i>et al.</i> , 2002)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Glucose	Batch	-	2,4 mol.mol glc ⁻¹	(Eriksen <i>et al.</i> , 2008)
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Saccharose	Batch	-	5,9 mol.mol sucrose ⁻¹	(van Niel <i>et al.</i> , 2002)
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	Glucose	Continu	8,4	3,32 mol.mol glc ⁻¹	(Yokoyama <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. GZ1	Boue de STEP	Batch	-	0,007 mol.g DCOt ⁻¹	(Guo <i>et al.</i> , 2008)
Hydrogen-producing bacteria B49	Glucose	Batch	-	0,1 mL.L culture ⁻¹	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ruminococcus albus</i>	Glucose	Continu / batch	-	0,42 (continu) / 2,52 (batch) mol.mol glc ⁻¹	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2008)
<i>Hafnia alvei</i>	Glucose	Batch	-	-	(Podestá <i>et al.</i> , 1997)
<i>Citrobacter amalonaticus</i> Y19	Glucose	Batch	16	2 mol.mol glc ⁻¹	(Oh <i>et al.</i> , 2008)
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glucose	Continu	32,2	1,93 mol.mol glc ⁻¹	(Xing <i>et al.</i> , 2008)

Il résulte du Tableau I-3 que *Clostridium* sp. et *Enterobacter* sp. sont les deux genres les plus étudiés dans le cadre de la production d'hydrogène par voie fermentaire. Viennent ensuite *E. coli* et d'autres espèces un peu moins connues comme productrices d'hydrogène telles que *Pseudomonas* sp., *Ruminococcus* sp. ou *Citrobacter* sp.

I.2.2.1.1 *Clostridium* sp.

Parmi l'ensemble des espèces mésophiles connues pour produire de l'hydrogène, les espèces du genre *Clostridium* représentent les micro-organismes les plus performants vis-à-vis du rendement de production en hydrogène. Les principaux micro-organismes utilisés sont *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*. (Nandi & Sengupta, 1998 ; Prasertsan *et al.*, 2009) Les rendements les plus couramment rapportés sont de l'ordre de 1,8 à 2 mol H₂.mol glucose⁻¹ même si pour *Clostridium butyricum* des rendements proches de 3 mol H₂.mol glucose⁻¹ ont déjà été observés. Généralement, les productivités avoisinent 25 mmol.L⁻¹.h⁻¹ (Jo *et al.*, 2008b).

I.2.2.1.2 *Enterobacter* sp.

Dans le domaine de la production d'hydrogène par voie fermentaire sombre, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae* sont les deux espèces anaérobies facultatives les plus étudiées (Zhang *et al.*, 2011). Les rendements observés de conversion du glucose en hydrogène restent en moyenne assez faibles (entre 0,2 et 1 mol H₂. mol glucose⁻¹) mais de fortes productivités ont été relevées (25 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ en cellules libres et jusqu'à 180 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ en systèmes immobilisés), les sous-produits métaboliques possibles étant toutefois très variés (lactate, éthanol, ...) (Kumar & Das, 2000).

I.2.2.1.3 *Escherichia coli*

E. coli est le micro-organisme le plus utilisé en laboratoire et son métabolisme fermentaire lié à l'hydrogène est bien connu. *E. coli*, et plus généralement les bactéries anaérobies facultatives, présentent la particularité de détourner une partie de leur métabolisme pour produire de l'hydrogène via la voie de synthèse du formiate. Certaines souches peuvent alors atteindre des rendements de 2 mol H₂. mol glucose⁻¹ (Turcot *et al.*, 2008). Les rendements atteints par les souches sauvages sont proches de 1 mol H₂. mol glucose⁻¹ (Podestá *et al.*, 1997). Les productivités en réacteur sur glucose approchent les 30 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ avec des

cellules libres et $50 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ avec des micro-organismes immobilisés, valeurs du même ordre de grandeur que celles observées avec les micro-organismes anaérobies strictes du genre *Clostridium* (entre 5 et $20 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

I.2.2.1.4 Les espèces peu étudiées

Certaines espèces du genre *Ruminococcus*, dont *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*, ont montré la possibilité de produire de l'hydrogène à partir de glucose, en produisant surtout de l'acétate et du formiate, avec des rendements proches de $2,5 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ et des productivités de l'ordre de $5 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

D'autres espèces, moins connues pour la production d'hydrogène, telles que *Klebsiella pneumoniae* (anaérobie facultative) permettent d'atteindre des rendements théoriques plus élevés allant jusqu'à $6,68 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol hexose}^{-1}$ en conditions microaérobies, conditions qui restent toutefois très difficiles à maintenir en pratique (Chen *et al.*, 2006).

Sont également retrouvées ponctuellement dans la littérature des souches de *Bacillus* sp. avec des rendements faibles en hydrogène de l'ordre de $0,5 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ ou des souches de *Citrobacter freundii* qui, quant à elles, montrent des performances similaires à celles *E. coli* avec un rendement de $0,8 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ et une productivité maximale de $33 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

I.2.2.1.5 Cas particulier des bactéries thermophiles et extrêmophiles

Les conditions thermophiles ($> 50^\circ\text{C}$) permettent d'accélérer les réactions de transformation et d'éviter les contaminations bactériennes. En cultures mixtes, les conditions thermophiles permettent de sélectionner préférentiellement les espèces du genre *Thermoanaerobacterium*. Les rendements observés sont alors de l'ordre de $2,5 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ (Ueno *et al.*, 2001 ; O-Thong *et al.*, 2008).

Certaines espèces du genre *Clostridium* sont également capables de produire de l'hydrogène en conditions thermophiles (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermolacticum*) avec des rendements compris entre 2 et $3 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ (Collet *et al.*, 2004 ; Islam *et al.*, 2006).

Dans le cas de bactéries extrêmophiles ($> 70^{\circ}\text{C}$), tel que *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* et *Caldicellulosiruptor owenensis*, Zeidan et van Niel (2010) ont rapporté des rendements proches du maximum théorique via la voie acétate avec $3,8 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$. Toutefois, les productivités observées restent faibles (environ $10 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), au regard de leur faible taux de croissance (entre $0,1$ et $0,2 \text{ h}^{-1}$ à comparer à 1 h^{-1} de *Clostridium* sp.).

Enfin, un autre genre d'intérêt industriel est *Thermotoga* sp., bactéries poussant à des températures extrêmes ($> 80^{\circ}\text{C}$). En dépit du faible taux de productivité ($< 5 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), les rendements rapportés vont de $2,5$ à $3,6 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ pour les espèces de *Thermotoga elfii*, *Thermotoga maritima* et *Thermotoga neapolitana*.

I.2.2.2 UTILISATION DE CO-CULTURES POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE

Une co-culture consiste à construire un consortium microbien en mélangeant deux ou plusieurs souches pures préalablement isolées. L'intérêt de l'utilisation de co-cultures par rapport aux cultures mixtes réside dans le fait que leur faible diversité microbienne permet un meilleur contrôle de l'association de leurs métabolismes vers une fonction d'intérêt. En effet, Bader et al. (2010), ont prouvé que l'association de certains micro-organismes pouvait mener à de meilleurs rendements dans les bioprocédés et permettait notamment d'utiliser des substrats plus complexes. En ce qui concerne la production de biohydrogène, des rendements stables proches de $2,5 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ ont ainsi été obtenus sur une co-culture de *Clostridium butyricum* et *Enterobacter aerogenes*, ce dernier permettant d'utiliser l'oxygène résiduel du milieu, toxique pour les espèces du genre *Clostridium* (Yokoi *et al.*, 2002). En y associant une bactérie du genre *Rhodobacter*, dont la particularité est de produire de l'hydrogène par photofermentation à partir d'acides organiques (butyrique, acétique, lactique) dans des milieux carencés en azote ammoniacal, les rendements cumulés observés en hydrogène peuvent atteindre jusqu'à $6 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ (Yokoi *et al.*, 2002).

Dans une autre étude, Liu *et al.* (2008) ont étudié la production d'hydrogène à partir de cellulose microcristalline à l'aide d'une co-culture de *Clostridium thermocellum* JN4 et *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. Lorsqu'elle est cultivée seule, JN4 dégrade la cellulose microcristalline en hydrogène, éthanol, acétate et lactate. Le rendement en hydrogène est alors de $0,8 \text{ mol} \cdot \text{mol glucose}^{-1}$ avec le lactate comme produit principal. Lorsque les auteurs rajoutent la souche T. *thermosaccharolyticum* GD17 à la culture, la

production d'hydrogène est multipliée par 2 et le rendement passe à 1,8 mol. mol glucose⁻¹ avec le butyrate comme produit principal et le lactate n'est plus détecté en fin de batch. Ainsi, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17 utilise le lactate produit par *Clostridium thermocellum* JN4 et le transforme en hydrogène et en butyrate. Les deux bactéries utilisent donc des mécanismes métaboliques complémentaires.

De la même manière, Geng *et al.* (2010) ont utilisé une co-culture de *Clostridium thermocellum* et *Clostridium thermopalmarium* pour produire de l'hydrogène à partir de cellulose. *C. thermocellum* est capable de dégrader la cellulose et de produire de l'hydrogène mais en faible quantité, alors que *C. thermopalmarium* n'est pas capable de dégrader la cellulose mais produit beaucoup d'hydrogène à partir des produits de dégradation de cette dernière. Ainsi, la co-culture de ces deux espèces bactériennes permet d'augmenter la production d'hydrogène à partir de cellulose de près d'un facteur huit.

Les études précédemment citées, mettent en place des relations commensales avec l'établissement d'interactions trophiques entre les différents partenaires pour augmenter la production d'hydrogène. Ce sont en effet les interactions les plus étudiées et les plus simples à observer. Mais des études récentes commencent à s'intéresser aux interactions non trophiques qui peuvent survenir au sein des cultures mixtes productrices d'hydrogène. Des résultats probants ont été obtenus dans le cadre du projet ANR InGEcoH à partir d'une co-culture de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH) et de *Clostridium acetobutylicum* (Cab) (Benomar *et al.*, en cours de soumission). Cette étude réalisée au sein de l'unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) de Marseille a prouvé que la présence de (DvH) était susceptible de multiplier la productivité en hydrogène de (Cab) par 2,5 lors de leur co-culture. Or, de manière intéressante, il a été démontré que cette augmentation de performance était due à une interaction directe entre *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* et *Clostridium acetobutylicum*. En effet, les deux partenaires interagissent physiquement (Figure I-10). De cette manière, DvH va modifier le métabolisme de Cab en orientant le flux métabolique vers les voies liées à la production d'hydrogène (acétate et butyrate) et en diminuant le flux conduisant à la voie lactate.

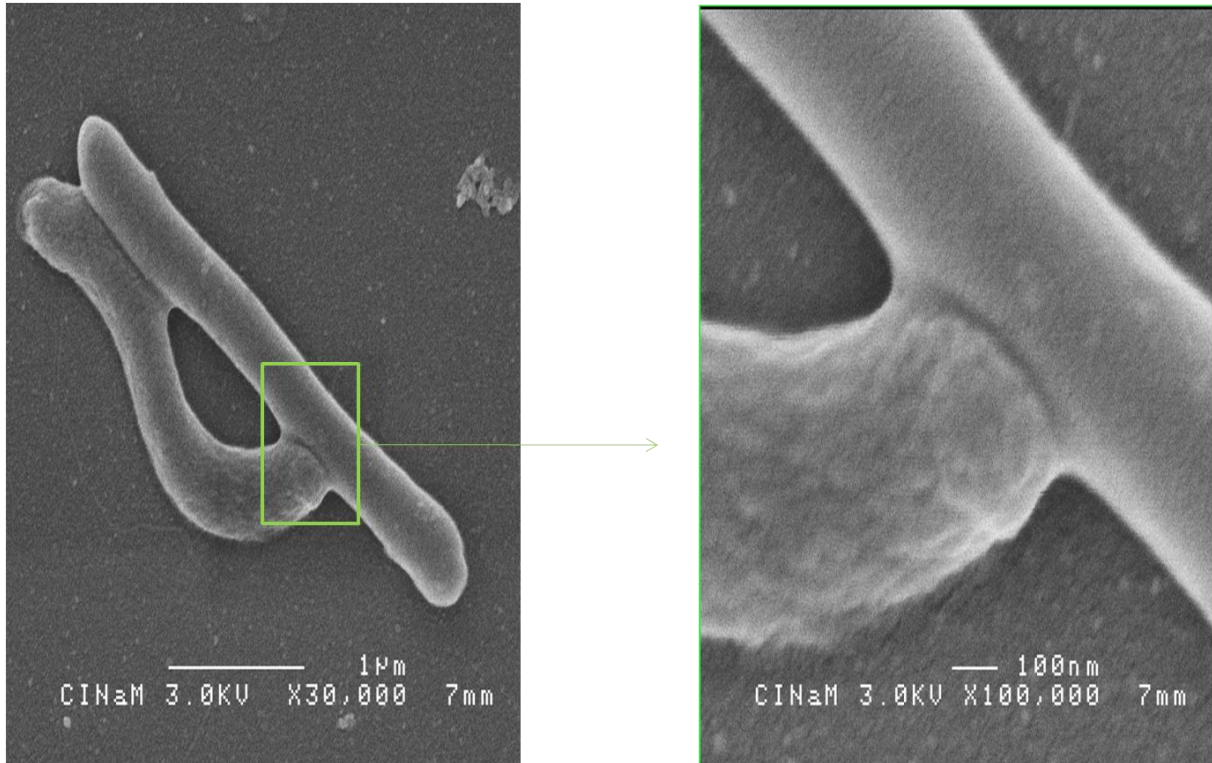


Figure I-10 : Image de l'interaction directe entre *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* et *Clostridium acetobutylicum* prise par microscope électronique à balayage.

Quelles que soient les études, l'utilisation de co-cultures, judicieusement choisies, augmente les performances de production d'hydrogène. Cependant, l'association de ces différentes cultures pures, nécessitent des milieux adaptés, et reste sensible aux contaminations bactériennes extérieures.

I.2.2.3 UTILISATION DE CULTURES MIXTES POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE

L'intérêt de l'utilisation de cultures mixtes dans la production de biohydrogène par voie fermentaire réside dans le fait que les communautés microbiennes complexes sont susceptibles de fournir des combinaisons utiles de voies métaboliques pour la transformation de substrats complexes tels que les déchets (Guo *et al.*, 2010). En effet, la dégradation de substrats complexes, tel que les ordures ménagères ou les résidus agricoles, nécessite l'intervention de nombreuses communautés bactériennes et notamment de bactéries

hydrolytiques capables de rendre le substrat utilisable pour les communautés intervenant en aval de l'étape d'hydrolyse.

De plus, les communautés bactériennes complexes possèdent de plus grandes facultés d'adaptation que les cultures pures. Elles sont également potentiellement plus robustes face aux changements de conditions opératoires et aux contaminations microbiennes extérieures ce qui permet de travailler en conditions non stériles et ainsi diminuer les coûts des procédés.

Le bon fonctionnement des cultures mixtes dans le cadre de la production d'hydrogène par voie fermentaire dépend de la performance de tous les micro-organismes présents dans le système, ce qui implique que la compréhension de la structure des communautés microbiennes présentes est une étape cruciale vers l'optimisation et l'amélioration de ces procédés de fermentation sombre. Une gamme étendue de sources microbiennes a déjà été utilisée afin d'obtenir des inocula pour la production de biohydrogène (boues, sols, compost...). L'ensemble de ces inocula présente des performances de conversion différentes et leur origine peut impacter le procédé. En effet, et contrairement aux procédés de méthanisation moins influencés par l'origine de l'inoculum, il a été prouvé que cette origine, et donc l'historique de l'inoculum, pouvait affecter les rendements globaux de conversion en fermenteurs (Wang & Wan, 2009a). Mais plus encore que l'origine de l'inoculum, ce qui affecte réellement les performances en cultures mixtes, c'est l'ensemble de la communauté bactérienne présente dans le fermenteur et les interactions métaboliques existant au sein de cette communauté. Ainsi, les performances de production d'hydrogène dépendent aussi bien des micro-organismes producteurs d'hydrogène que des bactéries co-existantes non productrices d'hydrogène (Xing *et al.*, 2005 ; Hung *et al.*, 2011a).

1.2.2.3.1 Les bactéries productrices d'hydrogène en cultures mixtes

L'ensemble des espèces bactériennes productrices d'hydrogène du Tableau I-3 est susceptible d'être retrouvé en cultures mixtes. Cependant, en fonction des conditions appliquées, lors des différentes études, l'espèce majoritaire *a priori* productrice d'hydrogène sélectionnée sera différente. Ainsi, la plupart des études avec *Clostridium* sp. ou *Enterobacter* sp. sont conduites à un pH compris entre 5,5 – 6,5 et une température de 37°C (Li & Fang, 2007). Un pH compris entre 7 et 8 et une température de 30 - 35°C permettent plutôt de sélectionner des espèces des genres *Citrobacter* et *Pseudomonas* (Guo *et al.*, 2008 ; Oh *et al.*, 2008). Enfin, des pH compris entre 7 et 7,4 et des températures de 60 à 80°C permettent de sélectionner des

espèces thermophiles performantes (Li & Fang, 2007 ; Yokoyama *et al.*, 2009). Néanmoins, dans la majorité des études, l'espèce majoritaire productrice d'hydrogène appartient au genre *Clostridium*. En effet, pour optimiser la sélection des producteurs d'hydrogène et éliminer le maximum de consommateurs, différents prétraitements sont appliqués sur les inocula initiaux. Or la plupart des prétraitements existant sont basés sur la faculté de *Clostridium* à sporuler (Cf. paragraphe I.2.3.1).

I.2.2.3.2 Les bactéries autres que *Clostridium sp.* et *Enterobacter sp.* retrouvées dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène

En cultures mixtes, en plus des principales espèces productrices d'hydrogène, une multitude d'autres micro-organismes peuvent coexister. Ces micro-organismes, non producteurs d'hydrogène, interagissent entre eux et avec les producteurs d'hydrogène et peuvent ainsi engendrer des effets négatifs ou positifs sur la production d'hydrogène. Une représentation schématique des différents rôles possibles, par rapport à la production d'hydrogène, de ces micro-organismes est donnée en Figure I-11.

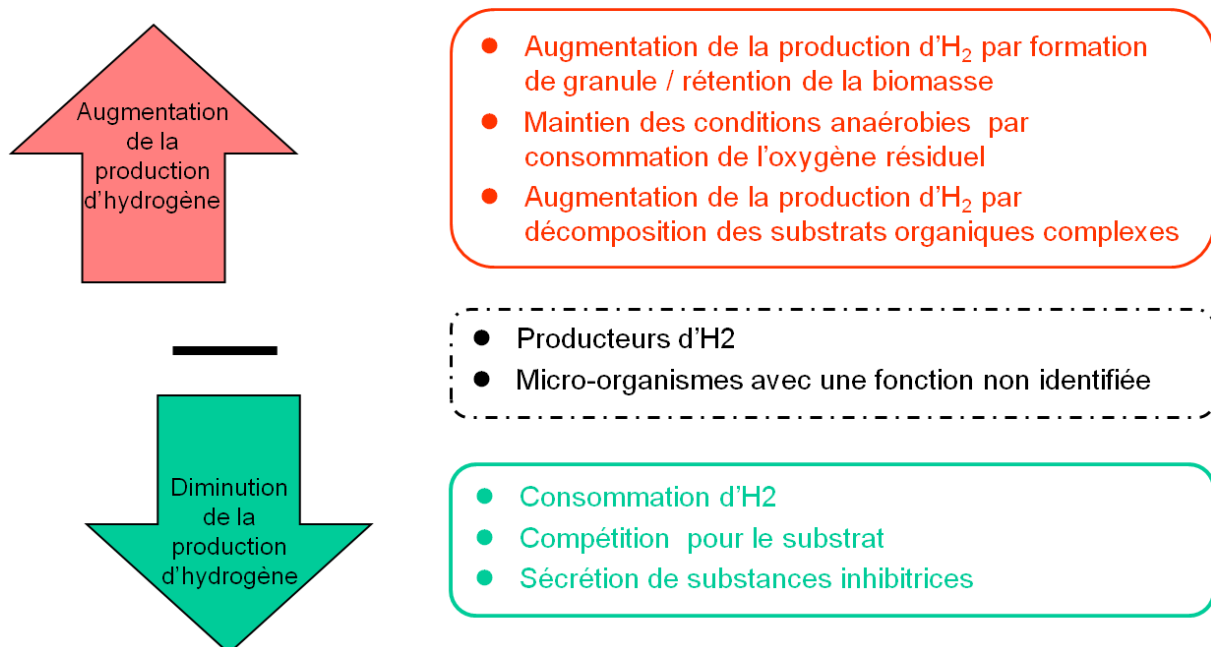


Figure I-11 : Rôles possible des micro-organismes coexistant avec les bactéries productrices d'hydrogène lors de la production d'hydrogène par voie fermentaire (adaptée de Hung *et al.*, 2011a).

Les micro-organismes, non producteurs d'hydrogène, retrouvés dans les écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire peuvent donc être classés en fonction des différents rôles identifiés.

2.2.3.2.1 *Augmentation de la production d'hydrogène par la formation de floccs bactériens et rétention de la biomasse en systèmes continus*

Certains micro-organismes, présents dans les écosystèmes producteurs d'hydrogène, sont capables de sécréter des substances polymériques extracellulaires, communément appelées EPS (Extracellular Polymeric Substances). Or ces EPS favorisent la formation de floccs ou de granules microbiens et ainsi augmentent la concentration de microorganismes présents dans le réacteur.

Fang *et al.* (2002) ont retrouvés dans leur fermenteur des *Sporolactobacillus racemicus* coexistant avec différentes espèces de *Clostridium*. Ils ont montré que *Sporolactobacillus racemicus* pouvait produire des EPS en condition anaérobie et ainsi être responsable de la formation des granules observées. Cette formation de granules favoriserait la rétention de la biomasse au sein du réacteur ce qui augmenterait la productivité en hydrogène du procédé.

De la même façon, Hung *et al.* (2011b) ont montré que *Streptococcus* sp. et *Klebsiella* sp. pouvaient produire des EPS et être ainsi à l'origine de la formation des granules dans leur réacteur granulaire.

D'autres bactéries minoritaires, retrouvées dans les écosystèmes producteurs d'hydrogène, sont connues par ailleurs pour produire des EPS et être à l'origine de la formation de biofilms. Ainsi, les bactéries des genres *Lactobacillus* (Degeest *et al.*, 2001 ; Mondragón-Bernal *et al.*, 2007 ; Boke *et al.*, 2010), *Bacillus* (Marvasi *et al.*, 2010 ; Chowdhury *et al.*, 2011) et d'autres bactéries du type *Escherichia coli* (Stevenson *et al.*, 1996 ; Danese *et al.*, 2000) sont potentiellement capables d'interagir avec les bactéries productrices d'hydrogène pour former des floccs, augmenter leur concentration au sein du réacteur et ainsi augmenter la production d'hydrogène.

2.2.3.2.2 *Augmentation de la production d'hydrogène par le maintien des conditions anaérobies*

Les écosystèmes fermentaires anaérobies comportent régulièrement des bactéries anaérobies facultatives comme *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. ou encore *Bacillus* sp. Ces bactéries sont capables de consommer les traces d'oxygène apportées lors de l'alimentation des réacteurs. Or les clostridies, productrices principales d'hydrogène par voie fermentaire, sont anaérobies strictes. Elles ne peuvent donc pas produire de l'hydrogène en présence d'oxygène. La présence de bactéries anaérobies facultatives dans l'écosystème permet donc d'éviter l'ajout d'agents réducteurs dans le milieu. C'est exactement ce que montre Yokoi *et al.* (1998) en utilisant une co-culture composée de *C. butyricum* et *Enterobacter aerogenes* pour produire de l'hydrogène à partir d'amidon. Une observation similaire a été effectuée par Zhu et Béland (2006) sur une communauté productrice d'hydrogène plus complexe. Les auteurs concluent que le traitement thermique préalable de l'inoculum, élimine les bactéries non sporulantes et réduit la capacité du système à consommer l'oxygène. Cette incapacité à consommer l'oxygène décroît le taux de conversion du substrat en hydrogène.

2.2.3.2.3 *Augmentation de la production d'hydrogène par décomposition des substrats organiques complexes*

Tout comme pour la digestion anaérobie, la dégradation de la matière organique complexe en hydrogène et en acides gras volatils nécessite l'intervention de nombreux organismes. En effet, la dégradation d'ordures ménagères ou de substrats agricoles requiert la présence d'une chaîne trophique entre les différents micro-organismes du consortium. De nombreux auteurs ont rapportés la capacité de *Bifidobacterium* sp. à décomposer les molécules de celluloses ou d'amidon en molécules plus petites directement utilisables par les bactéries productrices d'hydrogène (Cheng *et al.*, 2008 ; Lo *et al.*, 2008 ; Doi *et al.*, 2009). D'autres bactéries minoritaires de ces écosystèmes peuvent également coexister avec *Bifidobacterium* sp. et l'aider à dégrader la matière organique complexe en molécules simples. C'est le cas par exemple de *Olsenella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* sp. (Lo *et al.*, 2008) ou encore de *Megasphaera* sp. (Doi *et al.*, 2009). De plus, des études montrent que des micro-organismes tel que *Bacillus* sp., *Acidaminococcus* sp., *Cytophagales* sp. *Burkholderia cepacia*, et *Acetivibrio cellulolyticus* sont capables d'accomplir la même fonction (Ueno *et al.*, 2006 ; Maintinguer *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2009a ; Lay *et al.*, 2010b).

Des espèces appartenant au genre *Clostridium* mais non responsables de la production d'hydrogène sont également retrouvées dans certains fermenteurs. Par exemple, lors d'une étude récente, Nissilä *et al* (2011) ont identifié *Thermoanaerobium thermosaccharolyticum* comme le principal producteur d'hydrogène alors que *Clostridium cellulosi* et *Clostridium stercorarium* étaient responsables de la dégradation de la cellulose et ainsi favorisaient la production d'hydrogène.

2.2.3.2.4 Les bactéries consommatrices d'hydrogène

Dans la nature, de nombreux micro-organismes sont capables de consommer l'hydrogène. Les archées méthanogènes hydrogénotrophes sont les principaux consommateurs d'hydrogène dans les milieux anaérobies. Elles vivent en association syntrophique avec les bactéries fermentaires qui leur fournissent leurs substrats, i.e. le dioxyde de carbone et l'hydrogène. Les genres les plus représentés sont *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* et *Methanocorpusculum* (Archer & Kirsop, 1990).

En présence d'une concentration non limitante en sulfates, les bactéries sulfato-réductrices entrent également en compétition avec les archées méthanogènes pour leurs substrats communs, i.e. l'hydrogène, le dioxyde de carbone et l'acétate. L'avantage est en faveur des bactéries sulfato-réductrices qui présentent des taux de croissance plus élevés (μ_{\max}) et une plus forte affinité pour ces substrats (Archer & Kirsop, 1990). En présence d'ions sulfates, les flux de carbone et d'énergie peuvent donc être déviés vers la sulfato-réduction.

Enfin, des bactéries homoacétogènes sont capables de produire de l'acétate par réduction du CO₂ par H₂. Dans la nature, ces bactéries contribuent au maintien d'une pression partielle d'hydrogène basse en consommant l'hydrogène. Les plus connues sont *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoautotrophicum* et *Clostridium ljungdahlii*. Cependant de nombreux autres organismes appartenant au genre *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Sporomusa*, *Thermoanaerobacter* sont également capables de réaliser cette réaction (Latrille *et al.*, 2011).

2.2.3.2.5 Consommation du potentiel hydrogène par compétition pour le substrat

Lors de la production d'hydrogène par voie fermentaire, la totalité du substrat consommé n'est pas obligatoirement utilisé pour la production d'hydrogène. En effet, la production de lactate, de propionate, d'éthanol ou encore de butanol n'est pas lié à une production d'hydrogène (Cf. paragraphes I.2.1.2 et I.2.1.3). Dans certains cas, la production de ces

composés est due à un shift du métabolisme des bactéries productrices d'hydrogène qui lorsqu'elles sont placées dans des conditions de stress peuvent détourner leur métabolisme vers la solvantogénèse (Khanal *et al.*, 2004). Cependant, bien souvent en cultures mixtes, la production de ces produits métaboliques, consommateurs du potentiel hydrogène, est due à la présence de micro-organismes non producteurs d'hydrogène dans l'écosystème. Ces micro-organismes rentrent alors en compétition pour le substrat carboné. De fait, les performances de production d'hydrogène sont diminuées et notamment le rendement en hydrogène qui s'exprime en quantité d'hydrogène produit par quantité de substrat consommé. A titre d'exemple, Kim *et al.* (2006b) ont montré que la présence de la bactérie lactique sporulante, *Bacillus racemilacticus*, dans leur culture, augmentait considérablement la concentration de lactate dans le milieu et diminuait le rendement de production en hydrogène. De la même manière, Karadag et Puhakka (2010a) associent une forte concentration de lactate et une faible production d'hydrogène avec la présence de *Bacillus coagulans* dans leur culture mixte. D'autres bactéries du genre *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ont également été retrouvées dans les écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire et sont liées à une forte production de lactate (Corrieu & Luquet, 2007).

Ren *et al.* (2007a ; 2007b) ont rapporté que *Lactococcus* sp. était responsable de la production d'éthanol et de la diminution de la production d'hydrogène dans leur fermenteur. *Megasphaera* et *Pectinatus* ont également été identifiés comme producteurs de propionate par Castelló *et al.* (2009).

Lin *et al.* (2011a), quant à eux ont identifié dans leur fermenteur, *Clostridium pasteurianum* comme unique espèce dominante productrice d'hydrogène. A partir de là, ils considèrent les autres espèces du genre *Clostridium*, tel que *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum*, présentes occasionnellement dans le réacteur, comme des compétitrices de *C. pasteurianum* vis-à-vis du substrat.

2.2.3.2.6 Sécrétion de substances inhibitrices

Des relations d'amensalisme¹ peuvent survenir au sein des cultures mixtes productrices d'hydrogène. Noike *et al.* (2002) ont étudié l'inhibition de la production d'hydrogène par certaines bactéries lactiques. Ils ont observé que la mise en culture de deux bactéries lactiques, *Lactobacillus paracasei* et *Enterococcus durans*, avec deux bactéries productrices

¹ Ces notions seront discutées en paragraphe I.3

d'hydrogène *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium butyricum*, engendrait un passage de la fermentation hydrogène à la fermentation lactique. Ils ont montré que l'effet inhibiteur sur la production d'hydrogène était dû à la sécrétion de bactériocines dans le milieu par les bactéries lactiques. Aussi, les auteurs préconisent l'utilisation d'une température de 50°C pour limiter le développement de ces bactéries lactiques. Dans des conditions mésophiles, la croissance des bactéries lactiques ne peut pas être limitée et l'accumulation de lactate dans le milieu conduit à l'instabilité de la culture mixte (Noike *et al.*, 2002 ; Wang & Zhao, 2009).

I.2.3 CONDUITE D'UN PROCÉDE DE CULTURE MIXTE POUR PRODUIRE DE L'HYDROGENE

I.2.3.1 SOURCES ET PREPARATION DES INOCULA MICROBIENS

Un grand nombre de sources environnementales d'inocula a déjà été testé pour produire de l'hydrogène par voie fermentaire. À titre d'exemple, ont été utilisés les sorties de digesteurs de boues issues du traitement des eaux usées urbaines, des composts de déchets d'élevage ou de déchets municipaux, des boues anaérobies d'effluents, des sols, et toutes autres sortes de lixiviats (Wang & Wan, 2009a). Les sources les plus fréquemment utilisées sont les sorties de compostage actif (phase de fermentation thermophile), les boues de décanteurs et les boues de digesteurs mésophiles (Shin *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2005 ; Lin & Lay, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006b ; Li & Fang, 2007). Aussi, la majorité des inocula servant à la production d'hydrogène est issue de procédés de digestion anaérobie. Ces inocula contiennent donc une forte concentration en méthanogènes (consommateur d'H₂) d'où la nécessité de les prétraiter avant utilisation pour tenter d'éliminer ces consommatrices d'hydrogène.

Les archées méthanogènes sont des microorganismes anaérobies stricts (Ren *et al.*, 2008), non sporulants et dont le taux de croissance est 500 fois moins élevé que les organismes du genre *Clostridium* (0,002 h⁻¹ contre 1h⁻¹). Les différents prétraitements existants s'appuient donc sur ces caractéristiques pour éliminer les méthanogènes de l'écosystème.

Beaucoup de ces prétraitements sont basés sur la faculté des clostridies à sporuler. C'est le cas par exemple des chocs acides avec un pH inférieur à 4 ou basiques avec un pH supérieur à 10 (Kim & Shin, 2008 ; Luo *et al.*, 2010). Les chocs thermiques, des phases de gel/dégel ou des techniques de micro-aération sont également utilisés (Ren *et al.*, 2008).

D'autres traitements ne tentent pas de sélectionner les bactéries sporulantes telles que *Clostridium* sp., mais essayent d'inhiber spécifiquement les méthanogènes. Cette inhibition peut s'effectuer à l'aide de composés chimiques comme le chloroforme (30 mg.L^{-1}), le sodium 2-bromoethanesulfonate ou l'acide 2-bromoethanesulfonique et l'iodopropane (Li & Fang, 2007 ; Luo *et al.*, 2010). Une augmentation brutale de la charge organique appliquée est également connue pour inhiber la méthanogénèse (Moletta, 2008 ; Luo *et al.*, 2010).

Le traitement thermique reste tout de même la méthode la plus couramment utilisée, le traitement classique étant de l'ordre de 90°C pendant 10 à 20 minutes (Wang & Wan, 2009a).

Une association d'un choc thermique suivi d'un choc pH est recommandée par certains auteurs pour sélectionner plus particulièrement les espèces productrices d'hydrogène (Wang & Wan, 2009a).

Dans le cas de cultures continues en chémostat, la diminution du temps de séjour hydraulique permet également de lessiver les méthanogènes qui poussent plus lentement. Cependant, l'utilisation d'un inoculum issu d'un digesteur anaérobie granulaire peut favoriser le maintien des méthanogènes au sein de ces granules. Dans ce cas, un prétraitement thermique peut s'avérer nécessaire.

I.2.3.2 PARAMETRES OPERATOIRES APPLIQUES POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE

I.2.3.2.1 Temps de séjour hydraulique (TSH)

Le temps de séjour hydraulique est défini comme le rapport entre le volume utile du réacteur et le débit d'alimentation. C'est également l'inverse du taux de dilution D . En chémostat, le temps de séjour hydraulique est utilisé pour sélectionner des populations microbiennes particulières dont le taux de croissance est supérieur au taux de dilution imposé par le débit d'alimentation ($\mu_{\max} > D$). Or, les bactéries productrices d'hydrogène ont généralement un taux de croissance supérieur aux consommatrices. Un TSH court permet donc de sélectionner ces dernières et de lessiver les consommatrices et notamment les méthanogènes.

Chen *et al.* (2001) ont calculé le taux de croissance maximum spécifique (μ_{\max}) auquel des boues se sont acclimatées à la production d'hydrogène à partir de saccharose et ont trouvé une valeur de $0,172 \text{ h}^{-1}$. Ainsi, un TSH inférieur à 6 h ($D < 0,172 \text{ h}^{-1}$) est recommandé.

La Figure I-12 représente la production d'hydrogène en fonction de différents temps de séjour hydrauliques trouvés dans différentes études par Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo (2009). Une augmentation de la production d'hydrogène a été observée lorsque le temps de séjour hydraulique diminuait avec une valeur critique de TSH aux alentours de 6 heures. Au-delà de cette valeur critique, un risque de lessivage de la biomasse est observé.

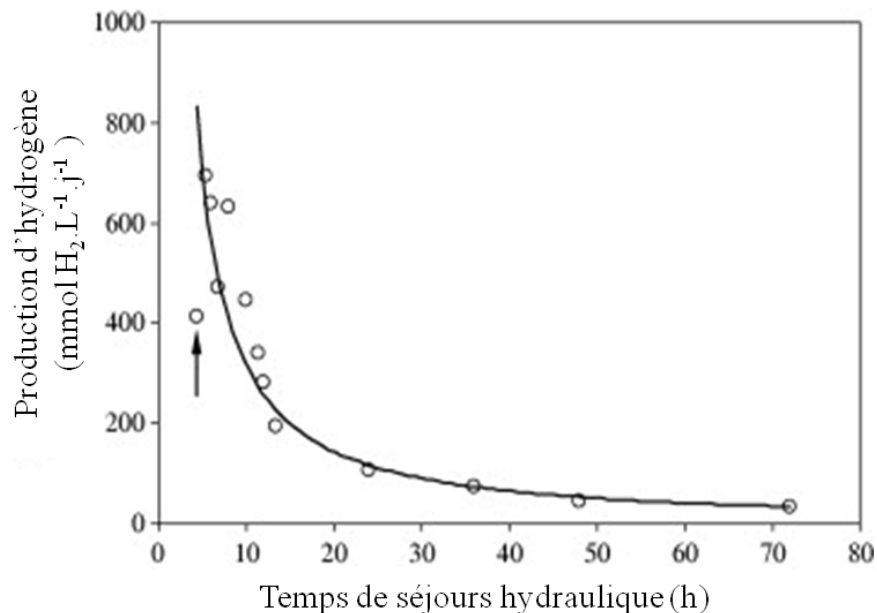


Figure I-12 : Production d'hydrogène en fonction du temps de séjour hydraulique. La flèche indique un lessivage probable du réacteur lors de l'application d'un temps de séjour hydraulique trop faible (d'après Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009)

I.2.3.2.2 Pression partielle en hydrogène

La pression partielle en hydrogène joue également un rôle important dans la production d'hydrogène par voie fermentaire car elle va conditionner la valeur de l'enthalpie libre de bon nombre de réactions métaboliques. Or les réacteurs anaérobies présentent une sursaturation des gaz dans la phase liquide ce qui favorise la formation de bulles de gaz. Cette sursaturation intervient lorsque l'activité biologique est maximale et ceci augmente la pression partielle en hydrogène dans le milieu. Généralement, une forte pression partielle en hydrogène entraîne une diminution de l'activité des hydrogénases en rendant les réactions de production d'hydrogène thermodynamiquement défavorables (Kim *et al.*, 2006a). En effet, l'énergie libre standard de Gibbs est positive pour la formation d'hydrogène à partir du NADH (Collet *et al.*,

2005). De la même façon la production d'hydrogène à partir de la ferrédoxine réduite nécessite une faible pression partielle en hydrogène.

Par ailleurs, la réaction inverse de l'homoacétogénèse pourrait être théoriquement possible à un niveau extrêmement bas de pression partielle en hydrogène (Equation I-20). Cette conversion est thermodynamiquement défavorisée en condition mésophile et nécessite une faible pression partielle en hydrogène (Latrille *et al.*, 2011).



De plus, un changement métabolique vers la production de lactate et/ou la formation d'éthanol, de butanol et d'acétone peuvent être observées pour de fortes concentrations en hydrogène dans le milieu (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

En cultures mixtes, la production d'hydrogène commence elle-même à être inhibée pour des pressions partielles en hydrogène supérieures à 10^{-3} atm (Figure I-13).

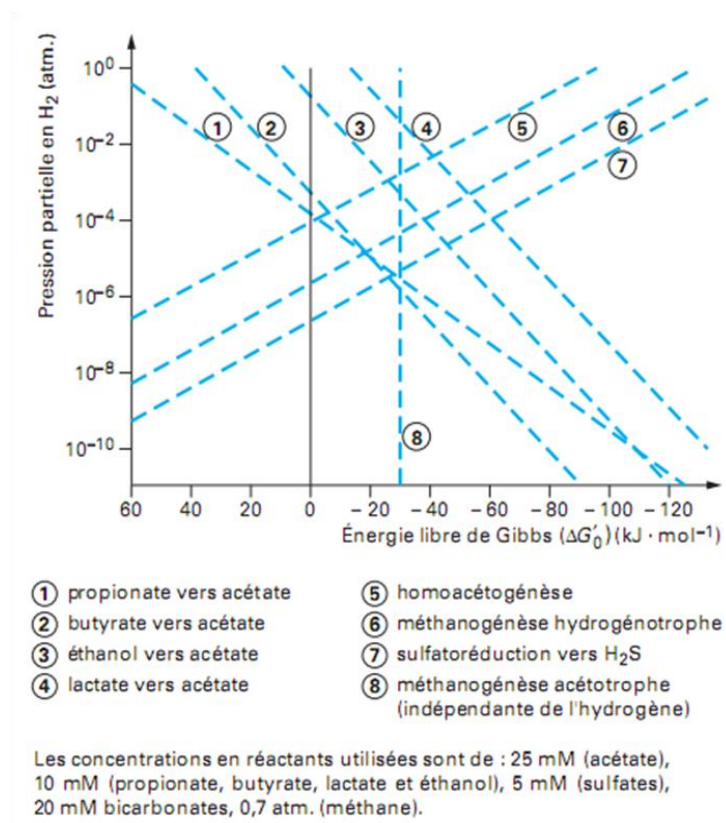


Figure I-13 : Évolution de l'énergie libre standard de Gibbs (à pH 7 et 25°C) des réactions de conversion d'acides gras volatils en acétate avec production d'hydrogène ou de réactions de respiration inorganique, en fonction de la pression partielle en hydrogène du milieu (*d'après Latrille et al. 2011*).

Dans les milieux naturels anaérobies, les bactéries hydrogénotrophes comme les méthanogènes, permettent de garder la pression partielle en hydrogène de l'écosystème à un niveau très bas. Dans les procédés de production d'hydrogène par voie fermentaire, des méthodes artificielles, permettent d'abaisser cette pression partielle en hydrogène (Latrille *et al.*, 2011): Notamment, il est possible de diluer l'hydrogène du milieu liquide ou gazeux en y injectant un gaz inerte comme l'argon, l'azote ou le dioxyde de carbone. Mizuno *et al.* (2000) sont par exemple passés d'un rendement de 0,85 à 1,43 mol H₂.mol hexose⁻¹ en faisant buller continuellement de l'azote dans leur milieu. L'inconvénient majeur de cette technique est une forte dilution de l'hydrogène qui nécessite une énergie importante pour sa purification ultérieure (Latrille *et al.*, 2011).

D'autres auteurs proposent également l'utilisation de membrane de séparation afin de séparer l'hydrogène des autres gaz. Il s'agit alors de submerger directement la membrane dans le milieu liquide mais les risques de colmatage sont importants (Liang *et al.*, 2002 ; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

Enfin, il est possible de diminuer la pression partielle d'hydrogène en augmentant la vitesse d'agitation du mélange ce qui a pour effet d'augmenter le coefficient de transfert gaz / liquide et donc de réduire la sur-concentration en hydrogène dans la phase liquide. Ainsi, Aceves-Lara *et al.* (2008b) ont fait varier la vitesse d'agitation entre 150 et 300 rpm, et une production d'hydrogène optimale a été obtenue pour une vitesse d'agitation de 300 rpm dans le cas de mélasses d'industries sucrières. De même Lay (2000) a montré que le fait de passer de 100 à 500 rpm permettait d'augmenter le rendement en hydrogène d'un facteur 2.

I.2.3.2.3 pH

Beaucoup d'études ont montré que le pH est un facteur clé lors de la production d'hydrogène. En effet, le pH influe sur la sélection des microorganismes présents dans la culture mixte. Par exemple, un pH en dessous de 6 favorise plutôt la croissance de *Clostridium* et limite celle des bactéries hydrogénotrophes (Hawkes *et al.*, 2007). Le pH permet également d'orienter le métabolisme de la culture. Un pH autour de 6 favorise la production d'hydrogène via la voie acétate et butyrate (Fang & Liu, 2002). Zoetemeyer *et al.* (1982) ont montré qu'un pH supérieur à 7 favorisait l'homoacétogénèse et la formation de formate et d'éthanol. De même, Fang et Liu (2002) ont montré que la production d'acétate était favorisée à un pH de 6,5 alors que celle de butyrate est favorisée à un pH inférieur à 6,0. Plus précisément, Liu *et al.* (2006)

ont montré que la production d'acétate était optimale à un pH de 5,2 et que la production d'hydrogène était alors à son maximum. A contrario, Liu *et al.* (2006) ont observé que, lorsque le pH descendait en dessous de 4,8, la production d'hydrogène diminuait et que le butyrate commençait alors à s'accumuler. D'autres pH optimaux ont été reportés dans la littérature en fonction du produit métabolique désiré, e.g. 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 compris entre 5,0 et 6,0 pour le propionate (Hwang *et al.*, 2004). Enfin, si le pH n'est pas régulé, la formation de solvants est observée en fin de fermentation (Ginkel *et al.*, 2001 ; Fang & Liu, 2002 ; Van Ginkel & Logan, 2005a). Ainsi, une baisse du pH, due à l'accumulation d'acides organiques dans le milieu, induit le passage à la voie de solvantogénèse et donc une diminution de la production d'hydrogène (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

Li et Fang (2007) ont répertorié 22 pH optimaux dans la littérature, ces pH étant principalement obtenus lors d'étude en batchs ou en réacteurs discontinus où le pH n'est pas régulé (pH initiaux). Pour les études comportant une régulation du pH sur substrat simple, les pH optimaux sont compris entre 5,2 et 7,0. Ceci dépend essentiellement du type de substrat traité, le pH optimal se situant entre 5 et 6 pour des substrats riches en sucres simples (type glucose). Ainsi Fang et Liu (2002) ont testé l'influence du pH sur la production d'hydrogène à partir de glucose en réacteur continu dont le temps de séjour hydraulique était fixé à 6h, et ont trouvé un rendement en hydrogène optimal pour un pH de 5,5 (Figure I-14). Un pH plus proche de la neutralité (pH 7) est recommandé pour des substrats plus complexes, type amidon. Par contre, lorsque le substrat est un effluent ou un déchet complexe, non stérile, la gamme de pH optimal est plus réduite et est comprise entre 5,2 et 5,6 afin d'éviter la méthanogénèse.

De plus, le pH modifie l'activité de l'hydrogénase (Wang & Wan, 2009a). Andersch *et al.* (1983) ont montré que l'activité *in vivo* des hydrogénases d'une culture acidogène maintenue à pH 5,8 était 2,2 fois supérieure à l'activité d'une culture maintenue à pH 4,5. Généralement, l'activité des hydrogénases est plus faible lorsque la cellule est maintenue à un pH inférieur à 5,2 (George & Chen, 1983).

Un changement de pH peut également induire un changement de population de la culture microbienne (Hawkes *et al.*, 2007). Le pH optimum dépend de l'espèce dominante au sein du consortium. Ainsi, le pH optimal pour la production d'hydrogène sera compris entre 4,5 et 6

si l'espèce majoritaire de la culture appartient au genre *Clostridium*, entre 6 et 6,5 pour *Enterobacter* et entre 6 et 7 pour *Thermoanaerobacterium* (Bartacek *et al.*, 2007).

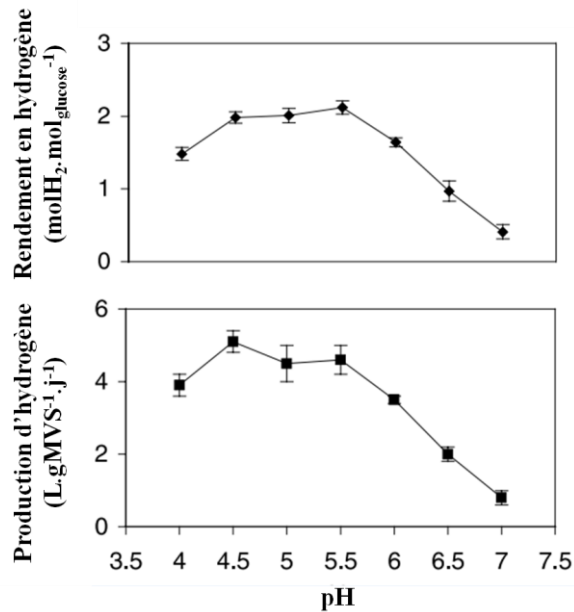


Figure I-14 : Effet du pH sur les performances de production d'hydrogène en culture mixe à partir du glucose d'après les travaux de Fang et Liu (2002).

I.2.3.2.4 Température

Comme pour tout procédé biologique, la température est un facteur important. La plupart des travaux portant sur la production d'hydrogène ont été conduits dans quatre gammes de température : températures ambiantes (15-30°C) ; mésophiles (32-39°C) ; thermophiles (50-64°C) et hyperthermophiles (>65°C). La grande majorité des études semblent montrer que, dans une gamme de température donnée, les performances de production d'hydrogène croît avec la température (Figure I-15). Cependant, Li et Fang (2007) à travers une étude bibliographique ont montré que les taux de production et les rendements en hydrogène étaient globalement similaires pour les températures mésophiles et thermophiles, et plus faibles pour les températures ambiantes.

Par ailleurs, Lin and Chang (2004) ont 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.* (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°C à 41°C. Ils ont observé que l'augmentation de la température orientait le métabolisme de la production d'éthanol vers la production de butyrate et augmentait ainsi le rendement de conversion du substrat en hydrogène.

De même, Wang et Wan (2008c) ont testé l'effet de la température dans une gamme allant de 20°C à 55°C avec du glucose comme substrat. Ils ont alors montré que le taux de production d'hydrogène augmentait lorsque la température augmentait de 20°C à 40°C puis ce taux diminuait pour les températures supérieures à 40°C (Figure I-15).

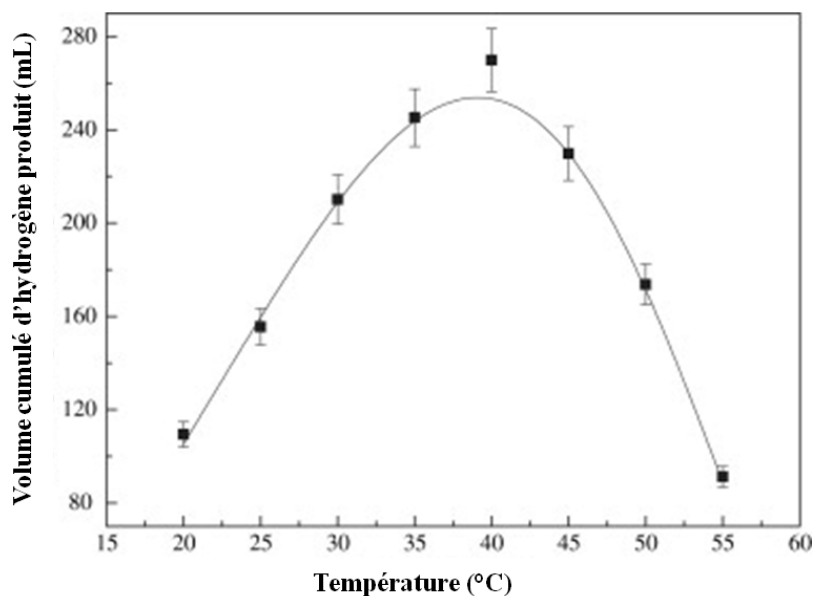


Figure I-15 : Effet de la température sur la production d'hydrogène en cultures mixtes pour une gamme de températures allant de 20°C à 55°C (Wang & Wan, 2008c).

I.2.3.2.5 Nature et concentration du substrat

Une grande variété de substrats, plus ou moins complexes, ont été testés pour la production d'hydrogène par voie fermentaire. En effet, la gamme de substrat utilisé s'étend du sucre simple à la fraction fermentescible des ordures ménagères, en passant par les résidus agricoles. Dans tous les cas, un substrat efficace pour la production d'hydrogène devra être facilement biodégradable, avec une forte concentration en glucides, abondant, facilement disponible et peu onéreux (Guo *et al.*, 2010). Généralement, la biodégradabilité des substrats complexes est corrélée à leur quantité de glucides, qui est la source principale de production d'hydrogène (Guo *et al.*, en cours de soumission). Aussi, Lay et al. (2003) ont montré que le potentiel de production d'hydrogène d'un substrat riche en carbohydrates (riz, pomme de

terre) était vingt fois supérieur à celui d'un substrat riche en lipides (viande grasse et peau de poulet) et en protéines (œuf et viande maigre).

Cependant, pour les études en laboratoire, les substrats simples restent les plus utilisés. Notamment, les substrats les plus utilisés pour produire de l'hydrogène sont : le glucose (Lin & Chang, 1999 ; Fang & Liu, 2002 ; Van Ginkel & Logan, 2005b ; Li *et al.*, 2008 ; Quéméneur *et al.*, 2010) ; le saccharose (Chen *et al.*, 2001 ; Chen & Lin, 2003 ; Lo *et al.*, 2008 ; Mariakakis *et al.*, 2011) et la cellulose (Ueno *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2009 ; Nissilä *et al.*, 2011).

La nature même de ces substrats simples a un effet sur la production d'hydrogène. A titre d'exemple, Quéméneur *et al.* (2011a) ont étudié l'effet des caractéristiques de différents sucres sur la production en hydrogène et sur la population microbienne sélectionnée. Pour ce faire, ils ont utilisé comme substrat deux monosaccharides (glucose et fructose), trois disaccharides (saccharose, maltose, cellobiose) et un trisaccharide (maltotriose). Ils ont montré d'une part, que le nombre d'oses influait sur la production d'hydrogène en observant une meilleure production d'hydrogène avec les monosaccharides qu'avec les di- et trisaccharides montrant ainsi l'importance négative de l'étape d'hydrolyse sur la production d'hydrogène. D'autre part, il fut observé que la nature même de la liaison osidique (alpha ou beta) pouvait influencer les performances de production d'hydrogène et la communauté bactérienne sélectionnée. En effet, Quéméneur *et al.* (2011a) ont montré que la complexité de la communauté bactérienne augmente avec le nombre d'oses et que la communauté bactérienne est bien plus diverse lorsque la liaison est du type beta.

Enfin, il a été démontré que, dans une gamme appropriée, l'augmentation de la concentration en substrat pouvait améliorer les performances de production d'hydrogène (Wang & Wan, 2009a). Pour les sucres simples tel que le glucose, la concentration optimale est de l'ordre de 10 g.L⁻¹ (Hallenbeck & Benemann, 2002 ; Aceves-Lara *et al.*, 2008b ; Mu *et al.*, 2009). Une telle concentration en substrat permet dans un même temps d'inhiber la méthanogénèse (Moletta, 2008).

I.2.3.2.6 Composition du milieu de culture

En plus de la matière organique qui sert de source de carbone et d'énergie aux micro-organismes, ces derniers ont des besoins nutritionnels en macroéléments (azote, phosphore...) et en microéléments tels que les éléments métalliques comme le fer, le magnésium, le sodium, le cobalt, le nickel ou le zinc.

L'azote est un élément indispensable à la croissance bactérienne. Il est indispensable à la synthèse des acides aminés, des bases des acides nucléiques (purines et pyrimidines), de cofacteurs enzymatiques et d'autres substances cellulaires. Sa concentration optimale varie entre 0,01 et 7 g.L⁻¹ selon les études (Wang & Wan, 2009a). Cependant, la concentration en azote est intimement liée à la concentration en carbone et plus que la quantité d'azote, c'est le rapport carbone sur azote (C/N) qui est à prendre en compte. Ce rapport C/N peut varier entre 3,3 et 130 (Li & Fang, 2007). Lin et Lay (2004a) ont trouvé un ratio C/N optimal de 47 en utilisant le saccharose comme substrat. De manière intéressante, ils ont montré que le ratio C/N avait une influence sur le métabolisme de l'écosystème avec un passage de la production d'acétate vers la production d'éthanol lorsque le ratio C/N diminuait.

Le phosphate est nécessaire pour la production d'hydrogène aussi bien pour ces qualités nutritionnelles que pour ses capacités de tampon du milieu. Hawkes *et al.* (2002) ont comparé plusieurs rapports C/P de la littérature. Le ratio C/P variait entre 6 et 260 et ils ont conclu que l'optimum se situait aux alentours de 130. Un ratio optimal similaire a été trouvé par Lin et Lay (2004b). Ils ont testé différents rapports C/P dans une gamme allant de 9 à 800 et ils ont trouvé un rapport C/P optimum de 120.

Parmi l'ensemble des éléments métalliques nécessaires à la production d'hydrogène, le fer en a été le plus étudié (Lee *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2006c ; Wang & Wan, 2008b ; Karadag & Puhakka, 2010b). En effet, le fer est un constituant essentiel du site actif des hydrogénases (Cf. paragraphe I.1.3.3.1). Plusieurs concentrations en Fe²⁺ ont été testées, de 0 mg à 4 000 mg Fe²⁺.L⁻¹. Il n'y a cependant pas consensus sur un optimum qui varie de 10 à 1 760 mg.L⁻¹. Néanmoins tous les auteurs s'accordent sur le rôle limitant de la concentration en fer sur l'activité des hydrogénases (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

I.3 INTERACTIONS MICROBIENNES ET PROCESSUS ENVIRONNEMENTAUX

Comme précédemment abordé dans le paragraphe I.2.2.3.2, une multitude de micro-organismes peuvent coexister dans une culture mixte. Ces micro-organismes interagissent entre eux et peuvent ainsi engendrer des effets sur la structure de la communauté microbienne et/ou les fonctions qui lui sont associées. Cette partie bibliographique présente les principaux types d'interaction qui peuvent survenir dans une culture mixte. Une interaction biologique (ou biotique) désigne un processus impliquant des échanges ou des relations réciproques entre deux ou plusieurs éléments (espèces, groupes, biocénoses) dans un écosystème (Elsas *et al.*, 2006). Les interactions constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes dont la classification s'avère nécessaire : (i) Si une interaction biologique a lieu entre deux individus ou populations issus d'espèces différentes alors l'interaction sera qualifiée d'interspécifique. Ces interactions sont souvent nutritionnelles (trophiques). Un micro-organisme dépend alors d'un autre micro-organisme pour la dégradation de produits ou de substrats spécifiques, ou différents micro-organismes sont en compétition pour le même substrat (Reiss *et al.*, 2009). Dans d'autres cas, pour conquérir une niche environnementale, un micro-organisme peut exercer un effet nuisible sur les autres micro-organismes, par exemple par la production d'antibiotiques ou de composés toxiques (Willey, 2007). (ii) Si une interaction concerne deux individus ou plusieurs individus issus d'une même population alors elle sera qualifiée d'intraspécifique et implique des mécanismes d'interaction intra et extra cellulaires. Récemment d'autres mécanismes d'échange direct de molécules ou d'électron via des connexions cytoplasmiques, des pilis ou des nanotubes ont également été mis en évidence (Zengler & Palsson, 2012). Ce type d'interaction entre espèces peut permettre aux organismes d'occuper une niche écologique qui leur serait inaccessible sans cela, les conditions, e.g. manque d'oxygène, carence en azote ou en d'autres nutriments, leur étant défavorables.

Les effets des interactions sur des individus ou sur des populations ont pu être observés bien avant que leurs mécanismes ne soient expliqués. C'est pourquoi, historiquement, les interactions ont été caractérisées par leurs effets apparents avant même qu'elles ne le soient en fonction du mécanisme biologique impliqué.

En 1953, Odum proposa une description des interactions considérant que chaque individu ou population peut avoir un effet positif (synergisme, mutualisme, commensalisme), négatif (amensalisme, compétition, prédation) ou neutre (absence d'effet) sur la croissance d'un autre individu ou d'une population (Odum, 1953). La nature de l'interaction bidirectionnelle établie

entre deux partenaires dépend du signe des effets unidirectionnels de chacun des deux partenaires sur l'autre partenaire (Tableau I-4). Six types d'interactions ont ainsi été définis : le neutralisme, la compétition, le mutualisme ou synergisme, le commensalisme, l'amensalisme ou l'antagonisme (Fredrickson, 1977).

Tableau I-4 : Classification des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux espèces (A et B) en fonction de leurs effets apparents (d'après Fredrickson, 1977).

Interaction	Organisme interagissant ^a	
	A	B
Neutralisme	0	0
Compétition	-	-
Mutualisme, synergisme	+	+
Commensalisme	+	0
Amensalisme, antagonisme	-	0
Parasitisme, prédation	+	-

^aSymbole : 0 sans effet ; - défavorable pour l'organisme ; + favorable pour l'organisme.

I.3.1 LE NEUTRALISME

Dans le cas du neutralisme, l'individu est indifférent aux modifications environnementales résultant de l'activité d'autres individus, c'est un cas rare en microbiologie. Ce type d'interaction se produit entre deux espèces ayant des niches écologiques différentes ou se développant dans des milieux nutritionnels riches, comme *Clostridium tyrobutyricum* et *Lactobacillus* sp. dans le fromage à pâte pressé cuite.

I.3.2 LA COMPÉTITION

Lors de la compétition, l'interaction est défavorable à terme pour les deux partenaires. Généralement elle intervient lorsque différents micro-organismes d'une population ou d'une communauté cherchent à s'approprier une même ressource, qu'il s'agisse d'occuper un endroit physique ou de consommer un aliment limitant particulier. Si un des deux organismes en compétition peut dominer le milieu en occupant physiquement l'habitat, ou en ayant une plus grande affinité pour le nutriment limitant, il supplantera l'autre organisme. Ce phénomène a été étudié par Gause en 1934 qui l'a décrit comme le principe d'exclusion compétitive (Gause, 1934). Gause découvrit que si deux paramécies entraient en compétition

directe pour une même ressource, une des deux populations de protozoaire était rapidement exclue. De cette expérience, le principe suivant en a été tiré : si les populations de deux espèces exploitent une ressource limitante unique, elles ne peuvent coexister indéfiniment dans un milieu stable et homogène, la plus compétitive des deux espèces finissant par éliminer l'autre. Ce principe revient à dire que deux espèces ne peuvent partager la même niche écologique (ensemble des exigences écologiques). Le corollaire du principe de Gause consiste à dire que si deux espèces écologiquement semblables coexistent, c'est qu'elles ont nécessairement réalisé une différenciation de niches. Dans les chémostats, où du milieu stérile est introduit dans le réacteur à la même vitesse que le milieu contenant les micro-organismes en est éliminé, une compétition pour un substrat limitant peut avoir lieu entre des micro-organismes ayant une affinité différente pour ce substrat. Ceci peut conduire, pour un ensemble de conditions données, à l'exclusion de la population dont la croissance est la plus lente, à moins qu'elle ne développe d'autres types d'interactions avec son environnement comme la formation de floccs ou d'un biofilm ce qui lui permet de survivre, de croître et de conquérir une niche écologique qui dans le cas contraire ne lui serait pas accessible.

I.3.3 LE MUTUALISME OU SYNERGISME

Le mutualisme et le synergisme désignent une relation dans laquelle les deux partenaires tirent un bénéfice mutuel de leur association. Un exemple très explicite de ce type de relation peut être trouvé dans les écosystèmes méthanogènes anoxiques, comme les digesteurs anaérobies, les sols inondés ou l'estomac de nombreux animaux. Dans ces milieux, les acides gras peuvent être dégradés pour produire de l'hydrogène et du méthane par l'interaction de deux groupes microbiens différents : les bactéries fermentaires et les archées méthanogènes. Les bactéries fermentaires utilisent des protons comme accepteurs finaux d'électrons lors de la synthèse de l'ATP en produisant de l'hydrogène. Ces bactéries ne gagnent une énergie suffisante pour leur croissance que si l'hydrogène qu'elles génèrent est immédiatement consommé, à cause de limitations thermodynamiques. Or les produits gazeux (hydrogène et CO₂) sont efficacement employés par les archées méthanogènes comme substrats pour produire du méthane ce qui maintient une faible pression partielle en hydrogène dans l'environnement. Puisque la production accrue d'hydrogène et sa consommation stimulent les vitesses de croissance des deux groupes microbiens, la relation est bénéfique pour tous les participants (Moletta, 2008).

I.3.4 LE COMMENSALISME

Dans le cas du commensalisme, l'interaction est bénéfique pour l'un des partenaires (le commensal) mais n'est ni avantageuse ni défavorable pour le second. Il s'agit d'un processus unidirectionnel. Les relations commensales entre micro-organismes incluent des situations où un métabolite produit par un micro-organisme sert de substrat à une autre espèce. C'est le cas par exemple de la nitrification, avec la transformation oxydative de l'ion ammonium en ion nitrite par des micro-organismes du genre *Nitrosomonas*, suivi de l'oxydation du nitrite en nitrate par des bactéries du genre *Nitrobacter*. Dans ce cas, *Nitrobacter* sp. tire un bénéfice de son association avec *Nitrosomonas* sp., puisqu'elle utilise le nitrite pour obtenir l'énergie nécessaire à sa croissance (Gee *et al.*, 1990). Il existe aussi une interaction commensale lorsqu'un groupe microbien modifie son environnement et le rend indirectement plus propice à la croissance d'un autre organisme. Par exemple, des souches d'*Escherichia coli* vivent naturellement dans le côlon humain. Lorsque *E. coli*, bactérie anaérobie facultative, a épuisé l'oxygène du côlon, les bactéries anaérobies strictes comme *Bacteroides* sp. sont alors à même d'y croître (Tancredi, 1992). Dans ce cas-là, l'association est bénéfique pour les microorganismes anaérobies mais *E. coli* ne tire aucun avantage évident des bactéries anaérobies strictes. Le commensalisme peut impliquer d'autres modifications environnementales, comme le pH. Ainsi, la synthèse d'acides lors de la fermentation stimule la prolifération d'organismes acido-tolérants qui, à pH plus élevé, ne constituent qu'une fraction minoritaire de la communauté microbienne. Enfin, lors de la formation des biofilms, la colonisation d'une surface nouvellement exposée par un type de micro-organismes (le colonisateur initial) rend possible l'attachement d'autres micro-organismes à sa surface en modifiant les propriétés physico-chimiques de cette dernière (O'Toole *et al.*, 2000 ; Habouzit, 2010).

I.3.5 L'AMENSALISME OU L'ANTAGONISME

Lors d'une relation d'amensalisme, l'interaction est pénalisante pour un partenaire et sans effet sur le second. Il s'agit d'un processus unidirectionnel, basé sur l'excrétion par un organisme d'un composé spécifique qui présente un effet négatif sur un autre organisme. Ce type d'interaction est caractérisé par la mise sous conditions de stress du micro-organisme qui subit l'effet négatif. Ce dernier doit s'adapter pour contrer l'activité de l'autre espèce. S'il n'en est pas capable, il ne survit pas. Un exemple classique d'amensalisme est la production

d'antibiotiques qui peuvent inhiber la croissance voire lyser un micro-organisme qui y est sensible. Ainsi, l'érythromycine est un antibiotique à spectre large naturellement produit par *Streptomyces erythraeus*. Il empêche la croissance des bactéries Gram positives comme *Streptococcus pneumonia* ou Gram négative comme *Legionella* sp. et *Haemophilus* sp., par perturbation de la synthèse des protéines (Morar *et al.*, 2012).

D'autres relations d'amensalisme impliquent une production microbienne de composés organiques spécifiques qui provoquent des ruptures dans la paroi cellulaire ou la membrane cytoplasmique des micro-organismes cibles. C'est notamment le cas des bactériocines sécrétées par les bactéries lactiques retrouvées dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène par voie fermentaires (Cf. paragraphe I.3.8).

I.3.6 LE PARASITISME OU LA PREDATION

Le parasitisme, ou la prédation, sont des associations profitables pour une espèce et pénalisante pour la seconde. La frontière entre le parasitisme et la prédation s'avère difficile à établir. En effet, la différence se fait essentiellement par le devenir de l'hôte qui, dans le cas de la prédation, est systématiquement éliminé. Au contraire, le parasitisme comprend juste un prélèvement de nourriture sur l'hôte, et/ou l'installation physique dans ou sur l'hôte. Dans le cas du parasitisme, il y a toujours une coexistence entre parasite et hôte. Selon l'équilibre établi entre les deux organismes, cette coexistence peut varier et passer d'une relation parasite stable à une relation qui peut être considérée comme une prédation. En effet, la prédation chez les micro-organismes implique une espèce prédatrice qui attaque sa proie, et l'élimine. Par exemple, les espèces bactériennes de *Bdellovibrio* sp. sont des chasseurs actifs, mobiles, qui se déplacent à la recherche d'une possible proie bactérienne Gram-négative. Lorsqu'il détecte sa proie, *Bdellovibrio* sp. accélère sa nage jusqu'à ce qu'il rentre en collision avec elle. Il perce alors un trou dans la paroi cellulaire et s'insinue dans l'espace périplasmique. En grandissant il forme un filament qui finit par former des septums et donner des bactéries filles. La lyse de la paroi libère de nouvelles cellules de *Bdellovibrio* sp. (Sockett & Lambert, 2004 ; Angert, 2005).

En plus de définir les interactions par les effets qu'exerce un organisme A sur un organisme B, il est possible de définir les interactions microbiennes par les mécanismes qui sont mis en jeu.

I.3.7 INTERACTIONS TROPHIQUES OU NUTRITIONNELLES

Une interaction trophique désigne une association d'espèces entre plusieurs éléments biologiques : espèces, groupes, biocénoses (l'ensemble des êtres vivants coexistant dans un espace défini) dans un écosystème (relations interspécifiques), ou entre deux ou plusieurs individus d'une même population (relations intraspécifiques), interagissant pour leur nutrition. A l'état naturel, l'environnement microbien est en constante évolution du fait de la consommation des ressources organiques et la formation de produits métaboliques par les populations microbiennes (Willey, 2007). Par exemple, la limitation en source de carbone affecte la synthèse de biomasse et le déficit en substrat énergétique force les populations à s'adapter en changeant de métabolisme. Le résultat final est souvent une modification de composition de la communauté microbienne (Nielsen *et al.*, 2011). L'action simultanée de toutes les cellules d'une même espèce lors de leur croissance peut alors modifier l'environnement physicochimique et perturber le développement des autres espèces – nous parlerons ici d'interactions trophiques indirectes. Des études empiriques et théoriques suggèrent que la structure et la force des liens trophiques ont une grande influence sur les caractéristiques des écosystèmes comme la diversité des espèces, ou la stabilité et la dynamique des populations qui les composent (Yoshida *et al.*, 2007).

Ce type d'interaction est très fréquent dans l'environnement. Par exemple, Gossner *et al.* (1999) ont mis en évidence des liens trophiques entre deux bactéries thermophiles: *Thermicanus aegyptius* produit du formiate et du lactate et *Moorella thermoacetica* le consomme en produisant de l'acétate. Cette découverte était fortuite car il s'agissait initialement d'étudier des cultures pures qui se sont finalement avérées être des co-cultures (Gossner *et al.*, 1999). De la même façon fut découverte une association trophique commensale entre une bactérie aéro-tolérante (*Clostridium intestinale*) et une bactérie acétogène (*Sporomusa rhizae*) provenant de la rhizosphère de joncs (*Juncus roemerianus*). En conditions anoxique *C. intestinale* produit de l'hydrogène et du butyrate à partir du saccharose, alors qu'en présence d'oxygène elle ne produit que du lactate. *S. rhizae*, quant à elle, est incapable d'utiliser du saccharose pour sa croissance. En co-culture, elle va donc

utiliser l'hydrogène, le lactate et le formate produit par *C. intestinale* pour se développer. De plus, *C. intestinale* détoxifie le milieu en transformant l'oxygène, conférant ainsi une protection à *S. rhizae*, sensible à l'oxygène (Gossner *et al.*, 2006).

Des associations trophiques symbiotiques ont aussi lieu entre des bactéries fermentaires qui génèrent de l'hydrogène et des bactéries méthanogènes qui le consomment. Pour renforcer les observations faites dans des milieux naturels, des co-cultures de laboratoire montrent qu'associer des bactéries fermentaires et méthanogènes conduit à un taux de croissance et à un rendement en biomasse supérieurs à ceux obtenus en cultures pures (Bonchosmolovskaya & Stetter, 1991 ; Muralidharan *et al.*, 1997). A titre d'exemple, la bactérie hyper-thermophile *Thermotoga maritima* croît en fermentant divers hydrates de carbone tout en produisant de l'hydrogène. Cet hydrogène est inhibiteur pour sa propre croissance. En co-culture avec une souche méthanogène hydrogénotrophe comme *Methanococcus jannaschii*, cet effet inhibiteur est levé et la densité cellulaire est significativement accrue (Muralidharan *et al.*, 1997 ; Johnson *et al.*, 2006).

D'autres études utilisant des techniques d'empreintes moléculaires et des outils mathématiques de modélisation montrent l'existence d'interactions trophiques dans des chémostats nitrifiants entre des populations de bactéries nitritantes et des populations de bactéries nitratantes (Dumont *et al.*, 2009). En effet, l'oxydation de l'ion ammonium en ion nitrate s'effectue grâce à une chaîne trophique durant laquelle, dans un premier temps, les bactéries nitritantes du genre *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio* oxyde l'ammonium en nitrite. Dans un deuxième temps, ce nitrite est utilisé par les bactéries nitratantes du genre *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* et *Nitrospira* pour produire du nitrate (Dumont *et al.*, 2009).

I.3.8 LES MOLECULES ANTIMICROBIENNES

D'autres molécules synthétisées par les micro-organismes sont des facteurs d'interactions cellulaires au sens où elles entravent la croissance de certaines espèces de micro-organismes. Elles existent sous diverses formes : bactériocines, antibiotiques, ou encore de type pesticides.

A titre d'exemple, de nombreuses études ont montrées que les bactéries lactiques sont capables de sécréter des bactériocines dans leur environnement (Upreti & Hinsdill, 1975 ; Giraffa *et al.*, 1989 ; Kouakou *et al.*, 2010 ; Borrero *et al.*, 2011). Les bactériocines produites

par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les autres bactéries. Elles peuvent être bactériostatiques, c'est-à-dire inhiber la croissance de certains micro-organismes, ou bactéricides et éliminer directement certains micro-organismes. De nombreux autres espèces bactériennes sont capables de sécréter ces bactériocines, c'est le cas entre autres, d'*Escherichia coli* (Gordon & O'Brien, 2006), *Enterobacter cloacae* (de Graaf *et al.*, 1968) et *Clostridium perfringens* (Ionesco & Bouanchaud, 1973).

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, le rôle des antibiotiques sécrétés par certains micro-organismes pour lutter contre les microbes de leur environnement en les éliminant, nous apparaît comme familier. Cependant, des études relativement récentes montrent que les antibiotiques peuvent agir comme des molécules signaux. Il semblerait que la majorité des composés organiques de faible poids moléculaire sécrétés par les micro-organismes peuvent jouer un rôle dans la communication intercellulaire. Ainsi de nombreux antibiotiques, comme la rifampicine ou l'érythromycine, même à de faibles concentrations, peuvent moduler l'expression de gènes (Goh *et al.*, 2002). Certains auteurs émettent l'hypothèse que leur activité première est de faciliter les interactions intra- et inter-espèces des communautés microbiennes. Ainsi, ces molécules peuvent affecter l'expression des gènes liés à la virulence, la colonisation, la mobilité, la réponse au stress, et / ou la formation de biofilm (Romero *et al.*, 2011). Le but est de maintenir la communauté microbienne dans l'environnement tout en conservant les interactions de ces populations avec les micro-organismes environnants (Joint *et al.*, 2002 ; Yim *et al.*, 2007).

Selim *et al* (2007) ont montré que la paenimyxine, bio-pesticide synthétisé par *Paenibacillus* sp. strain B2, a un effet spécifique sur certaines bactéries du sol. En effet, la paenimyxine n'a pas d'effet significatif sur la densité de la population bactérienne totale mais elle modifie la structure des communautés bactériennes du sol. Cependant, cet effet n'est que transitoire puisqu'il n'a pu être observé que lors des quatre premiers jours de traitement. Aucune modification significative n'a pu être observée après 7, 14 et 28 jours en comparaison avec le témoin sans traitement. Ceci illustre à la fois la temporalité des interactions microbiennes et l'extraordinaire plasticité et adaptabilité des communautés bactériennes du sol.

I.3.9 LES INTERACTIONS MICROBIENNES DIRECTES

En plus des communications bactériennes via la sécrétion de facteurs extracellulaires, d'autres types d'interactions mettant en jeu des mécanismes de contact direct entre les micro-organismes ont été observés. Ces interactions permettent notamment l'échange direct de molécules ou d'électrons via des connexions cytoplasmiques, des pilis ou des nanotubes. Dans certains cas, des connexions cytoplasmiques ont été observées entre des cellules voisines afin d'échanger des informations moléculaires. Chez les cyanobactéries, par exemple, le mouvement des molécules de petites tailles (par exemple, les sucres et des acides aminés) s'effectue au sein de filaments, qui sont en réalité de véritables canaux intercellulaires. Ce partage cytoplasmique permet l'établissement d'une coopération vitale entre les hétérocystes fixatrices d'azote et les cellules photosynthétiques (Giddings & Staehlin, 1981 ; Golden & Yoon, 2003 ; Mullineaux *et al.*, 2008).

La conjugaison constitue également un type supplémentaire d'échange moléculaire impliquant des interactions physiques entre cellules bactériennes voisines. Au cours de ce processus, l'ADN est transféré d'un donneur à un receveur par un pili, une forme de tubes qui relie physiquement les cellules qui participent (Madigan *et al.*, 2009). Dans la nature, la conjugaison est un mécanisme clé du transfert horizontal de gènes (Juhas *et al.*, 2009), par lequel une information génétique héréditaire, plutôt qu'un signal moléculaire non héréditaire, est livré.

D'autre part certains auteurs ont montré que ce type d'interactions directes permettait de transférer directement des électrons entre plusieurs micro-organismes. Ainsi, Summers *et al.* (2010) ont mis en évidence un échange directe d'électron dans des agrégats formés de deux espèces de *Geobacter* : *Geobacter metallireducens* et *Geobacter sulfurreducens*. Zengler et Palsson (2012) suggèrent que ce mécanisme de transfert d'électron pourrait exister chez d'autres types d'associations microbiennes comme les consortia méthanogènes et que celui-ci pourrait représenter une alternative au transfert d'hydrogène inter-espèces. Curieusement, l'échange d'électrons à des échelles de l'ordre du centimètre a déjà été observé dans l'environnement, que ce soit dans le sol avec une communauté de *Shewanella oneidensis* (Ball, 2007), que dans des sédiments marins (Nielsen *et al.*, 2010). Dans tous ces cas, ces mécanismes de transfert longue distance ne sont pas clairement explicités à l'heure actuelle.

Par ailleurs, Dubey et Ben-Yehuda (2011) ont également prouvé l'existence d'interactions physiques entre des bactéries grâce à la synthèse de nanotubes qui relient entre elles les cellules voisines, ce qui leur permet de transférer directement des informations génétiques ainsi que des éléments cellulaires tels que des protéines. Les auteurs ont tout d'abord observé la formation de ces nanotubes dans une culture de *Bacillus subtilis*. Ils ont ensuite montré que la formation de ces nanotubes pouvait même être interspécifique, en l'observant entre *B. subtilis* et *Staphylococcus aureus*, deux bactéries Gram positives, et entre *B. subtilis* et une bactérie Gram négative : *Escherichia coli*. Ainsi, les auteurs proposent que les nanotubes représentent une forme majeure de la communication bactérienne dans la nature, en fournissant un réseau d'échanges de molécules cellulaires inter et intra-espèces (Figure I-16).

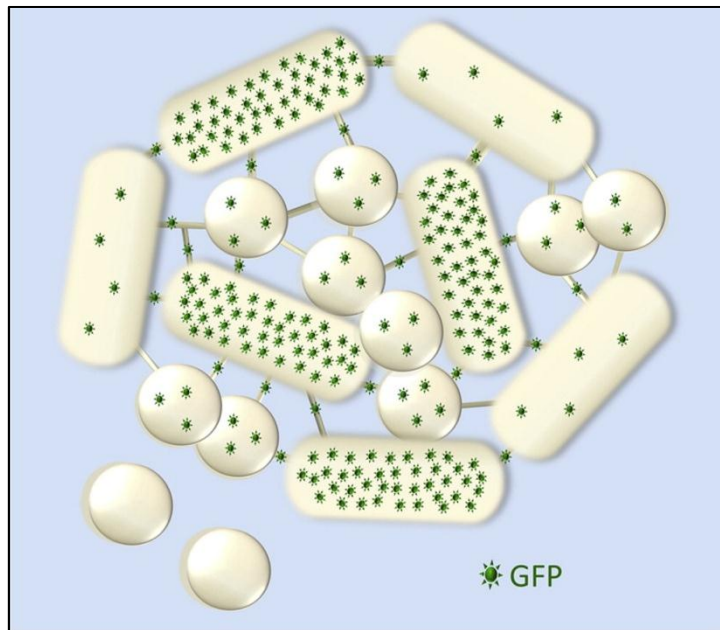


Figure I-16 : Echange bactérien de molécules cytoplasmiques via des nanotubes intercellulaires.
Mécanisme proposé par Dubey et Ben-Yehuda (2011).

SOMMAIRE DU CHAPITRE

Chapitre II. Matériel et Méthodes	87
II.1 Cultures en mode continu	88
II.1.1 Matériel biologique	88
II.1.1.1 <i>Inocula</i>	88
II.1.1.2 <i>Souche pure d'E. coli</i>	89
II.1.2 Milieu de culture	89
II.1.3 Mise en place du bioréacteur	90
II.1.4 Déroulement d'une expérimentation.....	93
II.2 Cultures en mode batch.....	95
II.2.1 Matériel biologique	95
II.2.1.1 <i>Les souches bactériennes pures</i>	95
II.2.1.2 <i>Consortia bactériens</i>	96
II.2.2 Milieux de culture	97
II.2.3 Techniques et conditions de culture.....	98
II.3 Analyses physico-chimiques.....	101
II.3.1 Mesure des concentrations en acides gras volatils (AGVs).....	101
II.3.2 Mesures des concentrations en acides organiques et en sucres par HPLC	102
II.3.3 Mesure de la concentration en biomasse.....	103
II.3.4 Mesure de la composition du biogaz.....	104
II.3.5 Suivi de la croissance des cultures par mesure de la densité optique (DO).....	106
II.3.6 Modélisation de la production d'hydrogène par voie fermentaire sombre	106
II.4 Analyses microbiologiques, étude des communautés microbiennes	107
II.4.1 Conservation des échantillons.....	108
II.4.2 Extraction et purification de l'ADN total	108
II.4.3 Amplification de l'ADN par PCR.....	109
II.4.4 La CE-SSCP (Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism)	110
II.4.5 Le clonage-séquençage des séquences d'intérêt	112
II.5 Analyse statistique	113

Ce chapitre, divisé en cinq parties, décrit l'ensemble du matériel et des méthodes mis en œuvre lors de ce travail. Les deux premières parties décrivent respectivement la mise en œuvre de cultures en mode continu et en mode batch. La troisième partie correspond aux différentes méthodes d'analyse utilisées lors des expérimentations et pour l'exploitation des résultats. La quatrième partie décrit les techniques de biologie moléculaire utilisées pour l'analyse des communautés microbiennes présentes dans les différents procédés. La dernière partie fait le point sur les tests d'analyse statistique utilisés tout au long de ce travail.

CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lors des différentes expérimentations effectuées au cours de cette thèse, deux systèmes de cultures ont été utilisés. La culture en batch est un système fermé dans lequel les éléments nutritifs ne sont pas renouvelés et les produits ne sont pas éliminés. La croissance exponentielle des micro-organismes ne dure que quelques générations et la phase stationnaire apparaît rapidement. Cependant, c'est un système simple à mettre en place, peu onéreux et qui permet de tester de nombreux facteurs simultanément.

Un système ouvert dans lequel les conditions de culture sont gardées constantes par l'apport de nutriments et l'élimination des produits microbiens en continu a également été utilisé. Ces conditions sont réalisées dans des systèmes de culture continue où une population microbienne peut être maintenue longtemps en phase exponentielle de croissance et à une concentration constante. Les cultures continues, ou chémostats, sont des dispositifs onéreux et complexes à mettre en œuvre. Cependant, elles permettent d'atteindre un régime stationnaire, idéal pour l'étude dynamique d'écosystèmes microbiens, et permettent également d'exercer une pression de sélection plus importante par le biais du temps de séjour hydraulique, équivalent au temps de doublement des microorganismes.

II.1 CULTURES EN MODE CONTINU

II.1.1 MATERIEL BIOLOGIQUE

II.1.1.1 INOCULA

Lors de la mise en œuvre des cultures continues, plusieurs sources d'inoculum, de différentes origines, ont été sélectionnées de façon à obtenir des écosystèmes producteurs d'hydrogène les plus variés possibles. Ainsi, deux boues de digesteurs anaérobies ont été utilisées. La première est issue d'un digesteur anaérobie du laboratoire traitant des vinasses (BDA). La deuxième provient d'un digesteur anaérobie de type Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) traitant les effluents de la sucrerie de Saint Louis à Marseille.

Un inoculum original, provenant d'écosystèmes digestifs d'animaux réalisant naturellement la digestion anaérobie, a également été testé. Ainsi, des cæcotrophes (Cæ) (crottes molles de lapin) provenant d'un groupe de 10 lapereaux, préparés par l'équipe de Nutrition et Ecosystème Digestif (NED) de l'INRA de Toulouse, ont été prélevés puis mélangés. L'utilisation de plusieurs animaux a permis d'obtenir un inoculum composite s'affranchissant des possibles fluctuations temporelles et des variations inter-animaux.

Du manioc fermenté (Man) a également été utilisé. Cet inoculum d'origine végétale, moins divers que les précédents, est connu pour posséder des bactéries du genre *Clostridium* favorisant la fermentation butyrique (Miambi *et al.*, 2003), ce qui le rend potentiellement intéressant pour la production d'hydrogène. Le manioc contient beaucoup de fibres. Il a donc été préalablement dilué dans de l'eau physiologique autoclavée (9 g NaCl.L^{-1}) et broyé à température ambiante pendant 5 minutes dans un mixeur (préalablement stérilisé à l'eau bouillante) afin d'homogénéiser la préparation.

Afin de d'augmenter la diversité de l'inoculum initial, un mélange (Mix) des boues du digesteur anaérobie du laboratoire traitant des vinasses, des cæcotrophes et du manioc fermenté a été réalisé avec le même ratio en matières volatiles en suspension (MVS).

Pour diminuer la diversité initiale de l'inoculum et tenter d'éliminer les bactéries consommatrices d'hydrogène non sporulantes, un traitement thermique (90°C , 10 minutes) de chaque inoculum brut a été effectué. Pour ce faire, les cæcotrophes, tout comme le manioc,

ont été préalablement dilués dans de l'eau physiologique autoclavée (9 g NaCl.L⁻¹) pour favoriser l'effet du traitement.

Au final, 8 inocula auront été utilisés lors des expérimentations en culture continue.

II.1.1.2 SOUCHE PURE D'E. COLI

Pour tester l'influence de facteurs biotiques sur le consortium producteur d'hydrogène en réacteur continu, une souche d'*Escherichia coli* K12 a été cultivée à 37°C en conditions stériles. La culture s'est déroulée en plusieurs étapes : (i) Une première phase, consistant à produire de la biomasse, s'est déroulée en aérobiose dans le milieu de culture utilisé pour les cultures continues. Toutes les 24 heures, afin de garder la culture active, 10 % de la culture a été repiqué dans des erlenmeyers de 200 mL de volume utile contenant du milieu frais, et ce à trois reprises. (ii) Dans un deuxième temps, pour s'approcher des conditions du continu, 10 % de la dernière culture a été repiqué dans 200 mL de milieu frais mais en anaérobiose dans des fioles plasma de 600 mL. Afin d'adapter la culture à ces nouvelles conditions, trois repiquages espacés de 24 h ont été effectués. (iii) Enfin, la biomasse a été concentrée par centrifugation des deux dernières cultures (4000 g, 10 min, 20°C). Le culot a alors été remis en suspension dans 150 mL de milieu frais, en conditions anaérobies et replacé en incubation pendant 12 h avant injection de la culture dans le réacteur continu.

II.1.2 MILIEU DE CULTURE

Le milieu Starkey, modifié pour les besoins de l'étude, a été sélectionné pour les expérimentations en continu. Ce milieu, développé par les partenaires du projet InGEcoH afin de permettre la croissance en co-culture de *Desulfovibrio Vulgaris* et de *Clostridium acetobutylicum*, est carencé en sulfate de fer.

Du glucose, à une concentration finale de 10 g.L⁻¹, a été ajouté en tant qu'unique source de carbone dans un milieu de culture contenant les nutriments suivants (en mg.L⁻¹) : K₂HPO₄, 500 ; NH₄Cl, 2 000 ; extrait de levure, 200 ; HCl 37%, 55 ; MgCl₂, 55 ; FeSO₄(NH₄)₂SO₄, 7 ; ZnCl₂, 1 ; MnCl₂, 1,2 ; CuSO₄, 0,4 ; CoSO₄, 1,3 ; BO₃H₃, 0,1 ; Mo₇O₂₄(NH₄)₆, 1 ; NiCl₂, 0,05 ; Na₂SeO₃, 0,01 ; CaCl₂, 60. Quelques gouttes d'antimousse ont été également ajoutées à l'alimentation. Le milieu ainsi préparée était limitée en sulfate de fer.

Lors de la préparation du milieu, une solution de glucose à 160 g.L^{-1} et une solution de nutriments concentrée 8 fois ont été préparées de façon hebdomadaire. Les différentes solutions et l'eau osmosée nécessaires à leur dilution ont été autoclavées à 121°C pendant 30 minutes. La solution de glucose et la solution de nutriments ont été autoclavées séparément pour éviter les réactions de Maillard. Ensuite l'alimentation a été préparée quotidiennement de façon stérile sous une hotte à flux laminaire (Esco Labculture Class II Type A2) et dégazée à l'azote pendant 10 minutes avant son branchement sur le réacteur.

II.1.3 MISE EN PLACE DU BIOREACTEUR

Un ou deux réacteurs Applikon® à cellules libres, autoclavables, de 3 litres de volume total et fonctionnant avec 1,5 litre de volume utile, ont été utilisés pour les cultures en mode continu (Figure II-1). L'homogénéité du contenu du réacteur a été assurée par une turbine Rushton à 6 pales. L'agitation a été effectuée par entrainement magnétique pour permettre une étanchéité absolue et ainsi éviter les fuites d'hydrogène via l'arbre d'agitation. Trois baffles ont été disposées près des parois de chaque réacteur afin d'optimiser l'efficacité du mélange. Ainsi, les réacteurs utilisés seront considérés comme des réacteurs infiniment mélangés.



Figure II-1 : Photographie du réacteur continu de production d'hydrogène par voie fermentaire.

L'alimentation a été réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique à débit variable (Masterflex moteur L/S économique 20-600 t/min, tuyaux Masterflex L/S 16). Le volume de liquide était maintenu constant grâce à une sonde de niveau. Lorsque le liquide rentre en contact avec la sonde, un courant alternatif de faible intensité y circule et actionne un relais qui démarre une pompe de soutirage (Masterflex, tuyaux Masterflex L/S 16) dont le débit est supérieur à celui de la pompe d'alimentation.

Pour chaque réacteur, un pH-mètre, relié à un ordinateur via un convertisseur analogique/numérique TES (Leroy Automation), a permis l'acquisition en ligne du pH. La température a également pu être enregistrée en ligne puisque les sondes pH utilisées disposaient aussi d'une sonde de température Pt 100. Le pH était régulé grâce à l'ajout de soude à 2 mol.L^{-1} , la pompe d'ajout étant pilotée directement à l'aide du pH-mètre. Le système de régulation de température était composé d'une sonde de platine Pt 100 et d'une couverture chauffante en silicone enroulée autour de la cuve du réacteur.

La quantité de gaz produite a été mesurée à l'aide d'un compteur de gaz fabriqué au laboratoire (Figure II-2 et Figure II-3). Avant chaque expérience, les compteurs ont été étalonnés à l'aide d'un débitmètre d'étalonnage (Bios, Definer 220) à des débits allant de 4 à 15 mL.min^{-1} .

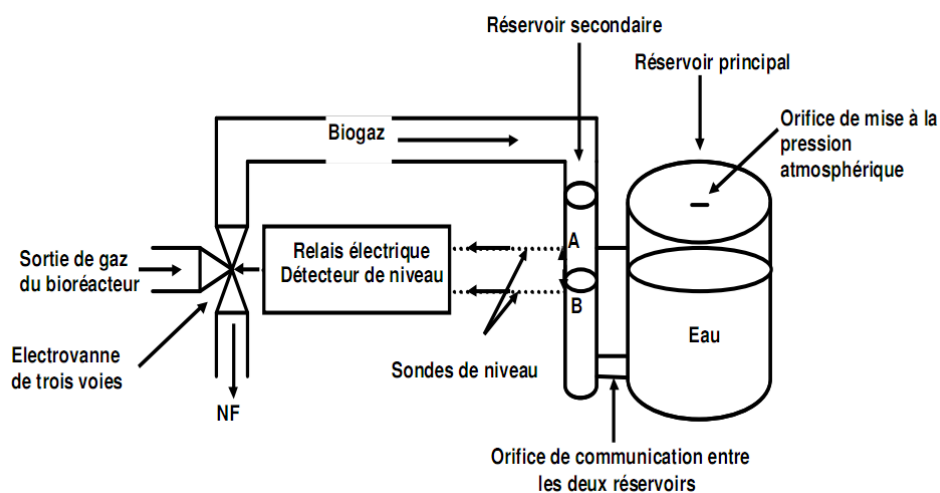


Figure II-2 : Principe du compteur à gaz utilisé lors des expérimentations en mode continu.

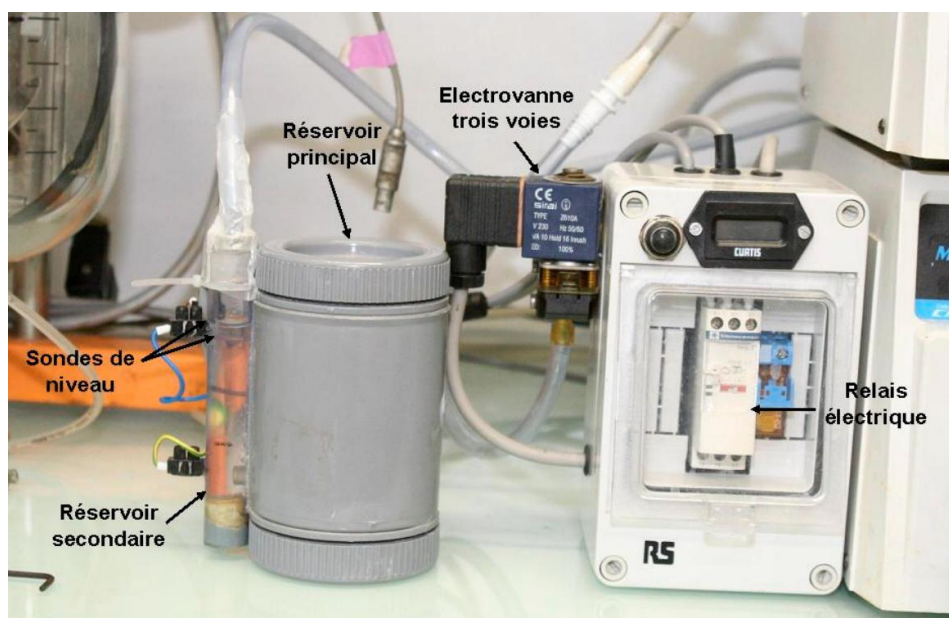


Figure II-3 : Photographie d'un compteur à gaz utilisé lors des expérimentations en mode continu.

Pour déterminer la composition du gaz et de calculer la quantité d'hydrogène produite, un millilitre de biogaz a été directement prélevé dans le ciel gazeux du réacteur, à l'aide d'une seringue pour analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Lors de la dernière série d'expérimentations, un micro-chromatographe (micro-GC) multiplexé (Cf. paragraphe II.3.4) a été directement branché sur la sortie gaz des réacteurs, ce qui a permis de mesurer la composition du biogaz en ligne et en continu.

Toutes les mesures effectuées en ligne ont ensuite été récupérées sur le Système d'Information pour L'EXpérimentation (SILEX). Ce système informatique, basé sur une gestion des données mySQL, développé en partie au sein du laboratoire, permet entre autres de récupérer les données en ligne pour archivage et de les visualiser via une interface web PHP. Il offre la possibilité d'acquérir et de visualiser tous les différents types de mesures (en ligne et hors ligne) autour du procédé, commentaires inclus.

La représentation schématique d'un réacteur continu de production d'hydrogène par voie fermentaire, utilisé dans le cadre de ces travaux, est présenté Figure II-4.

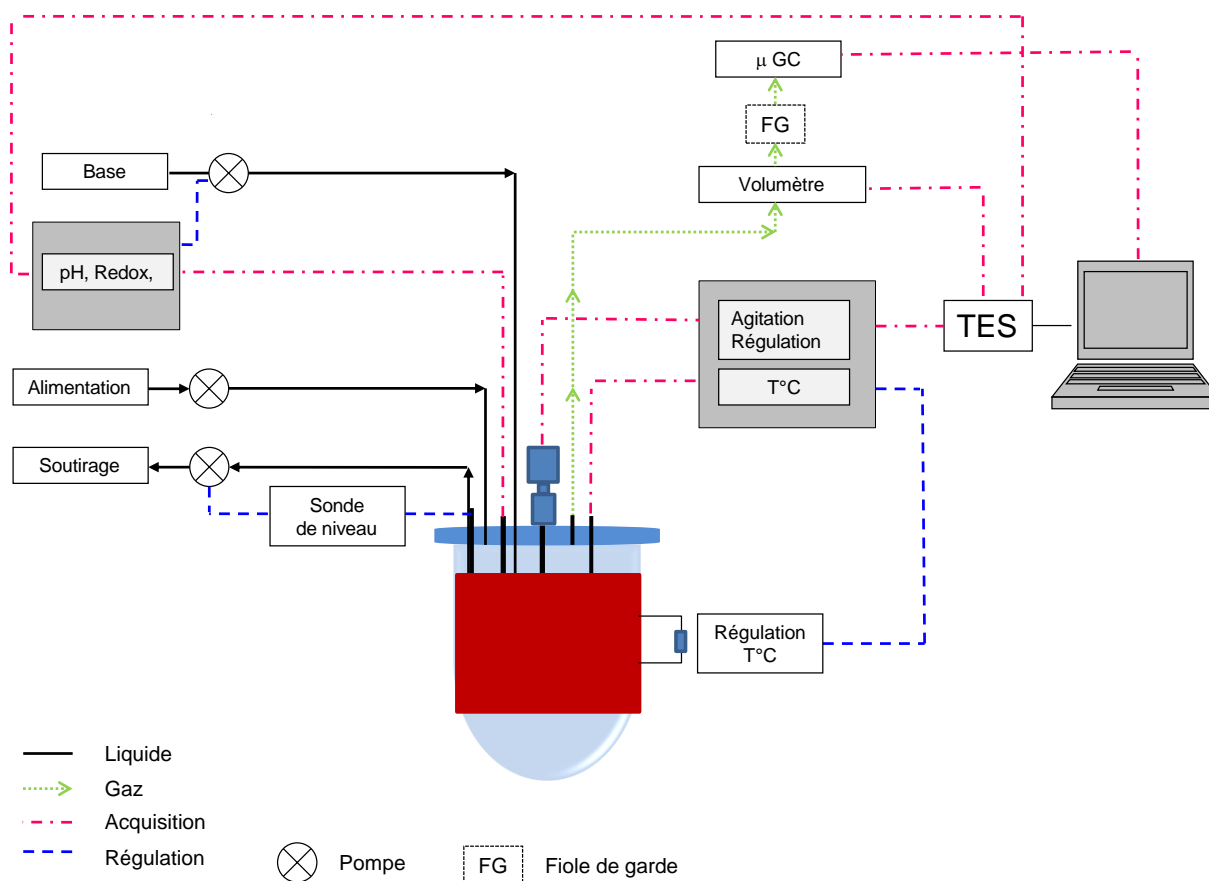


Figure II-4 : Représentation schématique d'un réacteur continu de production d'hydrogène par voie fermentaire, utilisé dans le cadre de ces travaux.

II.1.4 DEROULEMENT D'UNE EXPERIMENTATION

Pour toutes les expérimentations réalisées en mode continu, des conditions opératoires considérées comme optimales pour la production d'hydrogène, ont été appliquées (Aceves-Lara *et al.*, 2008b) : Le temps de séjour hydraulique (TSH) a été fixé à 6 heures, le pH régulé à 5,5, et la température fixée à 37°C. La vitesse de mélange, quant à elle, a été fixée à 300 rotations par minute (rpm) et a été vérifiée régulièrement à l'aide d'un tachymètre laser numérique (Rotaro™ 3.0).

Chaque expérimentation s'est déroulée de la manière suivante : le réacteur, préalablement autoclavé, a été rempli stérilement sous la hotte à flux laminaire avec 1,5 L de milieu de culture et inoculé de façon à obtenir 0,6 g MVS.L⁻¹. Le pH du milieu a été ajusté à 5,5 en utilisant de l'acide chlorhydrique 0,1 N et le réacteur a été purgé pendant 15 minutes avec de l'azote pour atteindre l'anaérobiose. Chaque test a démarré avec une période de batch de 24 heures durant laquelle le pH n'était pas régulé. Vingt-quatre heures après l'inoculation et

après confirmation d'une activité biologique (chute du pH et/ou production de gaz), la régulation du pH a été mise en route et le réacteur a été démarré en mode continu.

Tout au long des différentes expérimentations en continu, des prélèvements de 2 x 2 mL ont été réalisés, de façon régulière, directement en sortie de réacteur. Les échantillons ainsi prélevés ont été immédiatement centrifugés à 13 400 rpm pendant 10 minutes. Le culot cellulaire, stocké à -20°C, a alors permis de caractériser les populations bactériennes par une méthode de typage moléculaire (paragraphe II.4). Le surnageant, stocké à -20°C, a été utilisé pour doser les acides gras volatils (AGV) par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ainsi que les sucres et les métabolites tels que l'éthanol ou le lactate par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

A l'équilibre, des prélèvements de 50 mL ont été effectués pour mesurer la concentration en biomasse dans le réacteur selon la méthode décrite dans le paragraphe II.3.3.

II.2 CULTURES EN MODE BATCH

Faciles à mettre en place et permettant de suivre plusieurs conditions simultanément, les cultures en batch ont permis de tester l'effet de l'ajout de nombreux facteurs biotiques sur le fonctionnement d'un écosystème producteur d'hydrogène. A noter que, lors de ces études le pH n'a pas été régulé, et seul le pH initial fut fixé et ceci de façon optimale, en présence d'un tampon MorpholinoEthaneSulfonate - MES (Quéméneur *et al.*, 2011b). La culture en batch ne permet pas de renouveler le substrat et lorsque celui-ci est totalement consommé, il est nécessaire de réensemencer les échantillons dans une nouvelle fiole avant la phase de déclin de la croissance (et de reconsommation potentielle de l'hydrogène).

Plusieurs séries d'expérimentations en batch ont été effectuées.

II.2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE

II.2.1.1 LES SOUCHES BACTERIENNES PURES

Dans le cadre des différentes expérimentations réalisées en mode batch, neuf souches bactériennes phylogénétiquement et physiologiquement diverses ont été sélectionnées. Le Tableau II-1 présente les principales caractéristiques des souches étudiées. Les souches provenant du laboratoire de microbiologie de l'Université de Neuchâtel (Suisse) ont été conservées sur boîtes de Pétri à 4°C. Les souches provenant de l'institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ont été initialement lyophilisées ou conservées dans un milieu adapté contenant 15 % de glycérol.

Tableau II-1 : Principales caractéristiques et critères de choix des souches pures étudiées (source NEU : Université de Neuchâtel)

Genre	Espèce	DSMZ	NEU	Métabolisme	Métabolisme hydrogène	Gram	Sporulant
<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	792T		Anaérobie strict	+	+	+
<i>Clostridium</i>	<i>pasteurianum</i>	525T		Anaérobie strict	+	+	+
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		1007	Aéro-anaérobie facultatif	+	-	-
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>		1027	Aéro-anaérobie facultatif	+	-	-
<i>Enterococcus</i>	<i>casseliflavus</i>		110	Aéro-anaérobie facultatif	0	+	-
<i>Lactobacillus</i>	<i>bulgaris</i>	20049		Aéro-anaérobie facultatif	0	+	-
<i>Desulfovibrio</i>	<i>vulgaris</i>	19637		Anaérobie strict	+ / -	-	-
<i>Ralstonia</i>	<i>eutropha</i>		2114	Aérobie strict	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	50090	1182	Aérobie strict	0	-	-

Pour la colonne Métabolisme hydrogène: +/0/- équivaut respectivement à Producteur/Neutre/Consommateur

II.2.1.2 CONSORTIA BACTERIENS

Plusieurs consortia bactériens ont été utilisés au cours des différentes études. Un premier consortium (Eco A) était issu d'une sortie de digesteur anaérobie traitant des vinasses et mis en œuvre au laboratoire. Le prélèvement a été aussi chauffé à 90°C pendant 10 minutes afin de diminuer la diversité du consortium et de sélectionner les bactéries sporulantes (dont celles appartenant au genre *Clostridium* connu pour produire de l'hydrogène) et d'éliminer les méthanogènes, consommatrices d'hydrogène. Des aliquots de 0,5 mL de Eco A, mélangés à 0,5 mL de milieu contenant 15% de glycérol, ont ensuite été stockés à -20°C.

Un second consortium (Eco B) provenait des repiquages successifs de Eco A dans le milieu de culture A décrit ci-dessous dans le paragraphe II.2.2.

Enfin, un troisième consortium (Eco C) était constitué de boues granulaires prélevées en sortie d'un digesteur anaérobie de type UASB traitant les effluents de la sucrerie Saint Louis à Marseille. La mise en réacteur et sous agitation de ces boues granulaires au LBE a permis l'homogénéisation du consortium par dégradation des granules formées lors du passage dans le réacteur UASB. Ainsi, 300 mL de sortie de réacteur ont donc été prélevés puis chauffés à 90°C durant 10 min dans un bain marie thermostaté.

II.2.2 MILIEUX DE CULTURE

Deux milieux de culture ont été utilisés lors des différentes études en batch. Les deux milieux sélectionnés ont permis la croissance de toutes les souches pures ainsi que des différents consortia bactériens. Cependant, le deuxième milieu a été supplémenté, notamment au niveau de la concentration en fer, pour permettre une plus grande production d'hydrogène des consortia.

Pour le premier milieu de culture sélectionné (milieu A), du glucose, à une concentration finale de 10 g.L^{-1} , a été ajouté en tant qu'unique source de carbone dans un milieu de culture contenant $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ de tampon MES (Acide 2-morpholino éthanesulfonique) ainsi que les nutriments suivant (en mg.L^{-1}) : K_2HPO_4 , 500 ; NH_4Cl , 2 000 ; MgSO_4 , 300 ; FeSO_4 , 50 ; FeCl_2 , 1,5 ; HCl 25%, 7,15 ; ZnCl_2 , 0,07 ; MnSO_4 , 0,117 ; CuCl_2 , 0,015 ; CoCl_2 , 0,025 ; BO_3H_3 , 0,06 ; NaMoO_4 , 0,025 ; NiCl_2 , 0,025.

Pour le deuxième milieu de culture sélectionné (milieu B), du glucose à 10 g.L^{-1} a également été utilisé comme unique source de carbone. Le milieu contenait également $7,4 \text{ g.L}^{-1}$ de tampon MES (Acide 2-morpholino éthanesulfonique) et les nutriments suivant (en mg.L^{-1}) : Extrait de levure, 200 ; K_2HPO_4 , 40 ; KH_2PO_4 , 500 ; NaHCO_3 , 400 ; NaCl , 80 ; MgSO_4 , 300 ; FeSO_4 , 250 ; CaCl_2 , 8.

Dans les deux cas, le pH du milieu de culture a été ajusté à pH 6 à l'aide d'une solution de NaOH 5 N. Il a ensuite été réparti dans des fioles de 50 à 600 mL en fonction des expérimentations. Afin d'éliminer l'oxygène du ciel gazeux des fioles, ainsi que l'oxygène dissous présent dans la solution, le milieu a été mis à barboter sous flux d'azote N_2 pendant 10 minutes. Les flacons ont ensuite été fermés hermétiquement, avant d'être autoclavés (121°C , 20min) puis stockés à 4°C en attendant d'êtreensemencés. Pour les souches se développant sur des substrats spécifiques la composition du milieu a été adaptée en conséquence. Ainsi, *Ralstonia eutropha* a été cultivée sur du milieu complet contenant en plus 10 g.L^{-1} de fructose. De même, *Desulfovibrio vulgaris* a été cultivée sur du milieu complet contenant du lactate à 2 g.L^{-1} .

II.2.3 TECHNIQUES ET CONDITIONS DE CULTURE

L'ensemble des souches pures et consortia utilisés ont été cultivés stérilement et en anaérobiose. Le travail en conditions stériles s'est effectué près de la flamme ou sous une hotte à flux laminaire avec une utilisation d'alcool à 70%. Des témoins négatifs (milieu sans souche ni consortia) ont été utilisés pour vérifier la stérilité tout au long des manipulations.

Pour les tests de croissance et de production d'hydrogène des souches pures et des consortia, différents volumes d'inoculum ont étéensemencés à 1, 2, 5, ou 10% (v/v) dans le milieu de culture, puis incubés à 37°C dans un bain-marie. Toutes les cultures ont été réalisées au moins en duplicat. Cette étape a permis de caractériser les cinétiques de croissance et de production d'hydrogène de chaque culture par mesure de la densité optique à 600 nm (Cf. paragraphe II.3.5). Les résultats ont ensuite été utilisés lors des tests de confrontation des souches pures et des consortia pour déterminer les temps d'ensemencement des différentes cultures.

Pour les tests de confrontation, les souches pures et les consortia ont d'abord été cultivés séparément dans des fioles placées à 37°C. Les cultures ont été démarrées avec un temps de décalage, de façon à ce que toutes les cultures soient synchrones au début de la phase exponentielle de croissance, au moment du mélange. Puis les mélanges ont été réalisés en inoculant directement les souches pures et leur milieu de culture dans les fioles contenant les consortia sans laver les cellules au préalable. En fonction des études, différentes doses d'inoculation ont été testées. Enfin, les souches ont été inoculées soit à des densités optiques (DO) identiques, soit en essayant d'avoir le même nombre de cellules par mélange (Figure II-5). Dans tous les cas, les mélanges ont été réalisés en triplicats.

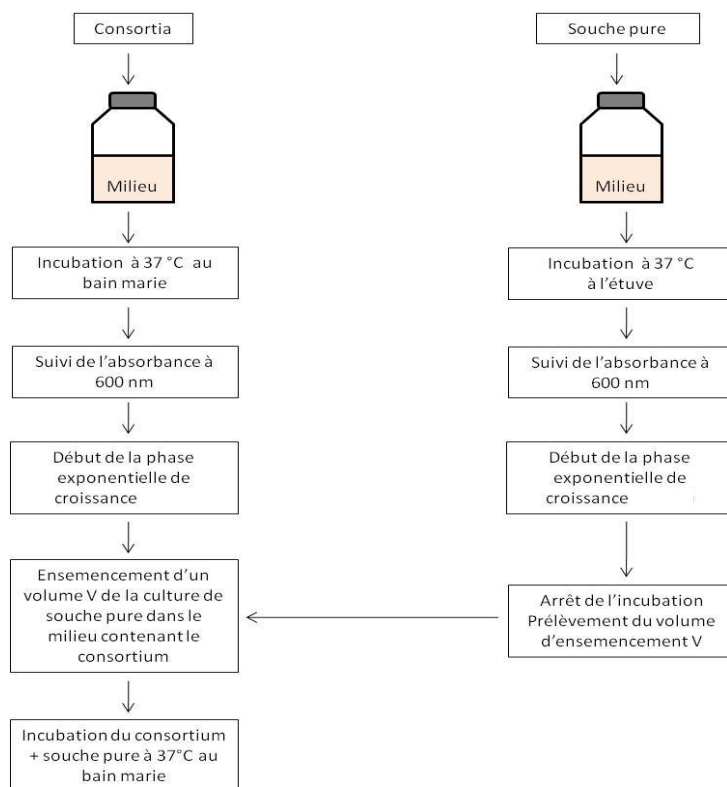


Figure II-5 : Protocole d'ensemencement des souches pures et du consortium lors de leur confrontation.

Des prélèvements gazeux ont été effectués régulièrement pour mesurer la production d'hydrogène. Des prélèvements liquides (2 mL) ont également été effectués à différentes étapes de la production d'hydrogène. Une partie du prélèvement (300 μ L) a été utilisée pour mesurer la $DO_{600\text{ nm}}$ des cultures. Le reste (1 700 μ L) a été centrifugé à 13 400 rpm pendant 10 minutes afin d'obtenir un culot cellulaire permettant de caractériser les populations bactériennes par une méthode de typage moléculaire (paragraphe II.4). Le surnageant a été utilisé pour doser les acides gras volatils (AGV) par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ainsi que les sucres et les métabolites tels que l'éthanol ou le lactate par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C avant d'être analysés.

Lors de ces tests en batch, deux techniques de mesure du volume de biogaz produit ont été utilisées :

Lors d'une première série d'expérience, le volume de biogaz produit a été régulièrement mesuré par vidange, et déplacement de liquide, dans des colonnes renversées reliées à une aiguille. La solution qui était traversée par le biogaz contenait du NaCl (2%) et son pH était

maintenu inférieur à 2 pour éviter la dissolution du CO₂ produit dans le biogaz. Le schéma du montage est représenté sur la Figure II-6.

Ensuite, un millilitre de biogaz a été directement prélevé dans le ciel gazeux de la fiole pour analyse par CPG. Ainsi, il a été possible de déterminer la composition du gaz et de calculer la quantité d'hydrogène produite (Cf. paragraphe II.3.4).

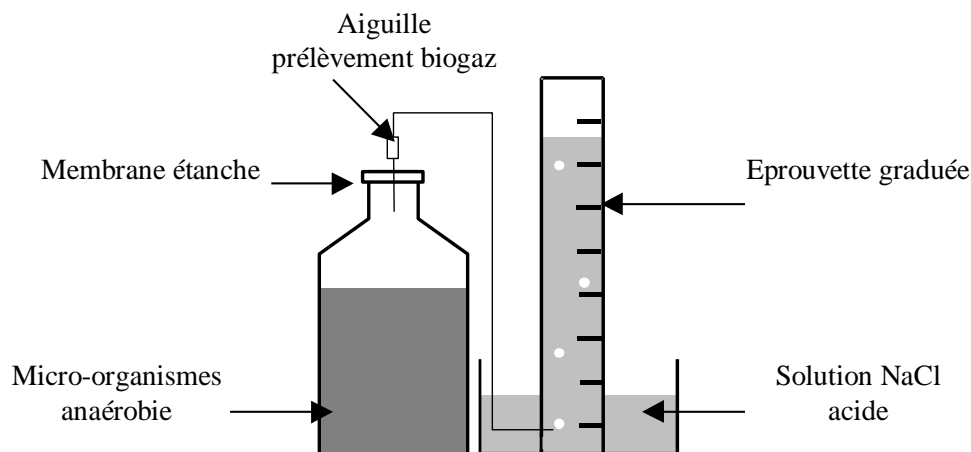


Figure II-6 : Fiole à plasma connectée au système de mesure du biogaz dit « par éprouvette renversée ».

Dans les séries d'expériences ultérieures, les fioles étaient directement branchées à un micro-GC multiplexé ce qui a permis de mesurer la composition du biogaz en ligne. De plus, un système comprenant un manomètre et une vanne de mise à pression atmosphérique intégrés au micro-GC a permis de calculer directement le volume d'hydrogène produit (Cf. paragraphe II.3.4).

II.3 ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

II.3.1 MESURE DES CONCENTRATIONS EN ACIDES GRAS VOLATILS (AGVs)

Les concentrations en AGVs ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse. La CPG permet de séparer des composants d'un mélange afin de les identifier et de les quantifier. Elle utilise un gaz vecteur comme éluant (phase mobile) et la phase stationnaire solide, se trouve sur la paroi de la colonne à capillaire. Les composés vont migrer plus ou moins vite dans la colonne selon leur affinité avec l'éluant. Il sera alors possible de les identifier grâce à leur temps de rétention. Cette analyse a permis de mesurer les concentrations en acétate, propionate, butyrate, iso-butyrate, valérate et iso-valérate d'un échantillon liquide grâce à une table d'identification préprogrammée. Bien que le système soit entièrement automatisé, une solution d'acide éthyl 2 butyrique à 1g.L^{-1} , servant d'étalon interne, doit être ajoutée à l'échantillon à analyser (volume à volume) afin de servir de référence.

L'analyse des échantillons est effectuée sous un gradient de température à l'aide d'un chromatographe Varian GC 3900 équipé d'un détecteur à ionisation de flammes (Figure II-7). Un passeur automatique vient compléter l'ensemble. Une seringue prélève automatiquement le liquide et le place dans l'injecteur qui est chauffé à haute température (210°C). Le liquide se volatilise et les gaz migrent dans la colonne semi-capillaire FFAP de 15 m de long et de 0,52 mm de diamètre, Phase ECTM 1000. Les conditions opératoires étaient les suivantes : gradient de température du four de 80°C à 120°C (rampe de 10°C par minute); température de l'injecteur 210°C , température du détecteur : 280°C , pression du gaz vecteur (azote) : 335 kPa, pression d'hydrogène 50 kPa ; pression d'air : 100 kPa, débit de gaz : $6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

L'acquisition des données a été réalisée grâce au logiciel Galaxie Work Station de Varian (version 1.9.3.2).



Figure II-7 : Chromatographe Varian GC 3900 et son passeur automatique.

II.3.2 MESURES DES CONCENTRATIONS EN ACIDES ORGANIQUES ET EN SUCRES PAR HPLC

Les concentrations en sucres résiduel et en sous-produits métaboliques tels que les acides organiques (lactate, formate, AGV), les alcools (éthanol, butanol...) ou les solvants (acétone) ont été évaluées par analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'HPLC, équipée d'un passeur automatique, est couplée à un réfractomètre (Waters R410). Une pré-colonne (Micro guard cation H refill cartbridges, Bio-Rad) a été disposée avant la colonne pour filtrer les éventuels résidus. Les composés ont été séparés en utilisant une colonne Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad) placée dans un four. Une solution d' H_2SO_4 à $0.222 \mu\text{l.L}^{-1}$ a été utilisée comme éluant. Après centrifugation à 13 400 rpm pendant 10 minutes l'échantillon est directement placé sur le passeur. Au moment de l'analyse, $10\mu\text{L}$ d'échantillon sont injectés dans la colonne à l'aide d'une seringue automatique.

Les conditions opératoires étaient les suivantes : température de la colonne 35°C ; température du réfractomètre 40°C et débit de l'éluant $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$. Les temps de rétention des différents composés analysés sont présentés dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : les différents composés analysés par l'HPLC R410 et leur temps de rétention associé.

Composés		t _R (min)
Nom	Formule	
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	13,89
Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	15,42
Lactate	CH ₃ CHOHCOOH	20,27
Formate	CHOOH	21,64
Acétate	CH ₃ COOH	23,16
Propionate	CH ₃ CH ₂ OOH	27,24
Ethanol	CH ₃ CH ₂ OH	31,25
Butyrate	CH ₃ (CH ₂) ₂ OOH	33,45
Valérate	CH ₃ (CH ₂) ₃ OOH	47,12
Caproate	CH ₃ (CH ₂) ₄ OOH	76,5

II.3.3 MESURE DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE

La concentration en biomasse, lors des expérimentations en continue, a été évaluée à partir de la mesure des matières volatiles en suspension (MVS), selon les *Standards Methods* (APHA *et al.*, 1995).

Après centrifugation d'un volume V d'échantillon liquide pendant 15 minutes, à 15 000 g et à 4°C, le culot a été introduit dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé. Le creuset a été introduit dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. L'eau ainsi évaporée, il ne reste dans le creuset que les matières en suspension (MES). Le creuset fut alors pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La différence de masse entre le creuset vide et le creuset après son passage à l'étuve correspond donc aux MES contenues dans l'échantillon. En considérant le volume de liquide initial, la mesure est exprimée en g.L⁻¹.

Le creuset fut ensuite mis au four à 550°C pendant 2 heures. Après refroidissement le creuset a été de nouveau pesé, ne restant plus que les matières minérales. La masse des MVS est obtenue par différence entre la masse des MES et la masse des matières minérales.

II.3.4 MESURE DE LA COMPOSITION DU BIOGAZ

Au cours des différentes expériences, deux types de systèmes d'analyse ont été utilisés.

Dans un premier temps, la composition du gaz a été déterminée à partir d'un prélèvement effectué directement dans le ciel gazeux de la fiole ou du réacteur à l'aide d'une seringue. Ainsi, 0,5 ou 1 mL de gaz a été analysé par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe utilisé est un GC-8A de chez Shimadzu équipé d'un catharomètre et relié à un intégrateur Shimadzu CR-8A. Ce chromatographe a permis le dosage de 6 gaz : CO₂, N₂O, H₂, O₂, N₂ et CH₄. La séparation est réalisée grâce à deux colonnes. La première est une colonne Hayesep Q (Touzart & Matignon) garnie de Silicagel, d'une longueur de 2 m, d'un diamètre de 3,175 mm avec une granulométrie de 80 à 100 mesh. Cette colonne permet la séparation du CO₂ et du N₂O. La séparation des quatre autres gaz est réalisée par un tamis moléculaire 5 Å (Touzart & Matignon) d'une longueur de 2 m, d'un diamètre de 3,175 mm avec une granulométrie de 80 à 100 mesh. Les deux colonnes sont montées en série et séparées par une colonne vide de 10 m de long qui ralentit le passage du gaz au niveau du tapis moléculaire. Le gaz vecteur utilisé est de l'argon placé à 2,8 bar. La température du four est de 30°C, celle de l'injecteur et du détecteur de 100°C. La détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre (principe du pont de Wheatstone) dont l'intensité du courant était fixé à 80 mA.

Dans une deuxième partie de la thèse, le gaz a été analysé à l'aide d'un micro-chromatographe R 3000 (SRA Instruments) multiplexé (Figure II-8). Le multiplexage des voies sur la vanne d'injection a permis l'analyse en ligne et de façon automatique, des deux réacteurs continus et de trente fioles selon une séquence définie par l'utilisateur. Le micro-chromatographe utilise la technique de micro-CPG associé à un micro-catharomètre pour quantifier l'O₂, le CO₂, l'N₂, l'H₂ et le CH₄. Une première micro-colonne MolSieve 5 Å, de 10 m de longueur et de 0,32 mm de diamètre, utilisant l'argon comme gaz vecteur, permet de détecter le CO₂. L'He, l'O₂, l'H₂, le N₂ et le CH₄ migrent quant à eux dans une colonne PLOT Q (8 m × 0,32 mm) à l'aide de l'hélium comme gaz vecteur. La température de l'injecteur est de 90 °C, celle des colonnes de 80 °C. La durée d'analyse est de 180 s. La pression à l'intérieur de la colonne est de 30 psi et le détecteur est un micro-catharomètre (μTCD).

Grâce à un manomètre intégré, le R 3000 est également capable de mesurer la pression dans les différentes fioles. En fonction de la valeur mesurée, différents scénarii ont été

envisagés pour éviter les contaminations croisées des gaz de fermentation : Si la pression dans la fiole était inférieure à 0,95 bar le micro-chromatographe enregistrerait la valeur mais n'effectuait pas d'analyse. Pour les fioles dont la pression était supérieure à 1,2 bar, un dégazage était effectué par une vanne de mise à pression atmosphérique jusqu'à atteindre une pression dans la fiole inférieure ou égale à 1,2 bar afin que l'analyse puisse être lancée. Si la pression était comprise entre 0,95 et 1,2 bar, l'analyse était effectuée directement sans mise à pression atmosphérique. Dans les deux derniers cas, le micro-chromatographe mesurait la pression des fioles avant et après analyse. La différence de pression entre deux analyses a permis de calculer le volume de gaz produit dans ce laps de temps.

Pour les deux systèmes, la concentration des échantillons a été déterminée par étalonnage externe. Deux gaz étalons ont été utilisés. Le premier était composé de 2 % (v/v) d'O₂, 10% d'N₂, 25% de CO₂ et de 63 % de CH₄. Le deuxième comprenait 30 % d'H₂ et 70 % de CO₂.

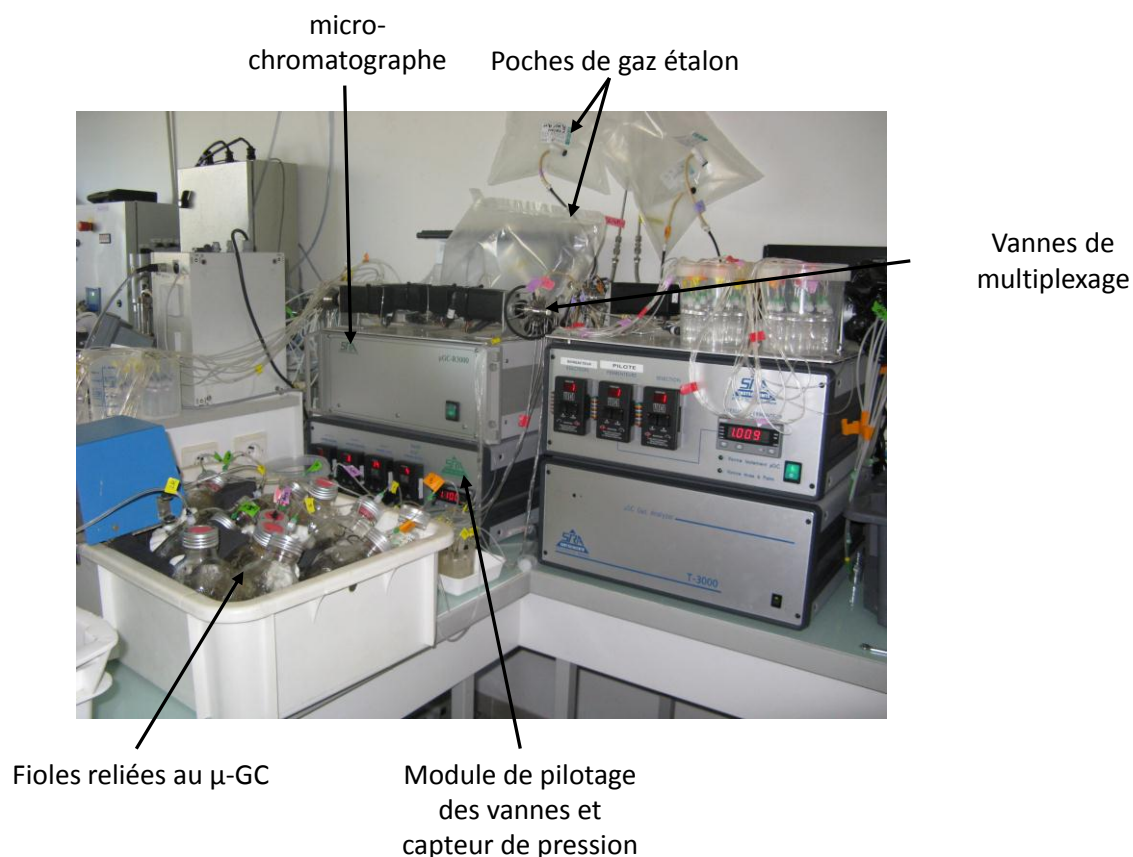


Figure II-8 : Photographie du micro-chromatographe R3000 (SRA Instruments) multiplexé.

II.3.5 SUIVI DE LA CROISSANCE DES CULTURES PAR MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE (DO)

Lors des expérimentations en batch, le suivi de la croissance des différentes cultures bactériennes a été effectué par mesure de la DO au cours du temps. Ainsi, un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Tecan - Infinite 200 NanoQuant) a été utilisé. La mesure s'effectuait à une longueur d'onde de 600 nm qui est généralement celle d'absorption des bactéries. Environ 300 μ L ont été prélevés (par seringue) des fioles de culture et placés dans un puits de la microplaque elle-même introduite dans l'appareil de mesure. Un témoin négatif a toujours été réalisé, celui-ci contenant du milieu sans ajout d'inoculum ou de souches pures. Le témoin négatif a permis de mesurer la DO à soustraire aux valeurs mesurées dans les fioles de culture.

II.3.6 MODELISATION DE LA PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE SOMBRE

La détermination des performances de production de l'hydrogène d'une culture a consisté à calculer sa productivité et ses rendements. La productivité ainsi calculé est exprimée en litre ou en mole d'hydrogène produit par litre de culture et par unité de temps. Les rendements de conversion produit/substrat et produit/produit sont exprimés en mole d'hydrogène par mole de glucose consommée.

Du point de vue de la stœchiométrie de réaction, la formation d'une mole d'acétate ou d'une mole de butyrate est accompagnée de la production de deux moles d'hydrogène. L'efficacité des voies métaboliques a pu donc se déterminer par le calcul d'un ratio $H_2/[2 \times (Bu + Ac)]$ représentant la quantité d'hydrogène produit sur deux fois la somme de la quantité de butyrate et d'acétate produits, exprimé en $mol.mol^{-1}$. Ce dernier ratio doit être compris entre 0 et 1. Une valeur égale à 1 indique que l'hydrogène est entièrement produit par les voies acétate et butyrate et qu'il n'est pas consommé par homoacétogénèse.

Dans le cas de cultures en batch, où le substrat introduit initialement a été complètement dégradé, les calculs de productivité ont nécessité un ajustement de courbe aux quantités d'hydrogène cumulées afin d'en déterminer la vitesse de production. Le type de courbe d'ajustement le plus rencontré est la courbe de Gompertz modifiée qui s'applique surtout aux cultures pures (Wang & Wan, 2009b ; Gadhamshetty *et al.*, 2010). Par extension, ce type

d'ajustement a aussi été utilisé pour les cultures mixtes en cultures batch. L'intérêt de cette courbe, décrite par l'équation suivante, est qu'elle fournit une méthode commune pour la comparaison des productivités par rapport aux données de la littérature :

$$H(t) = H_{\max} \exp \left[- \exp \left(\frac{R \cdot e}{H_{\max}} (t_{\text{lat}} - t) + 1 \right) \right]$$

Avec : H (t) : hydrogène cumulé en fonction du temps

H_{max} : quantité maximale d'hydrogène produite

R : productivité ou vitesse spécifique maximale

t_{lat} : temps de latence

e : nombre de Euler

L'ajustement de Gompertz a été réalisé sous Matlab[®] suivant une méthode de régression non linéaire par minimisation de l'erreur des moindres carrés.

II.4 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES, ETUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES

Une vision globale des différents écosystèmes microbiens producteurs d'hydrogène a été obtenue par amplification PCR (« Polymerase Chain Reaction » ou réaction de polymérisation en chaîne) de la région V3 des gènes de l'ADNr 16S et typage moléculaire par CE-SSCP (Single Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism). Cette technique permet d'obtenir la structure, la diversité et la dynamique des communautés microbiennes ainsi que l'abondance relative des espèces présentes. Dans la première série d'expériences en continu, un fragment de 500 paires de bases (pb) du gène codant l'ADNr 16S a été amplifié et cloné chez *Escherichia coli*. Les micro-organismes impliqués ont alors pu être identifiés par comparaison des séquences obtenues à celles présentes dans les banques de données et par analyse phylogénétique. Dans la deuxième série d'expérimentations en continu (Chapitre IV et V), l'identification des populations microbiennes impliquées a été effectuée directement par pyroséquençage.

II.4.1 CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Pour chaque mesure, 2 mL d'échantillon ont été prélevés dans des tubes Eppendorf® puis centrifugés à 13 400 rpm pendant 10 minutes. Le culot sec a alors été récupéré et stocké à -20°C avant analyse.

II.4.2 EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN TOTAL

L'ADN génomique a été extrait et purifié à partir du culot cellulaire des échantillons à l'aide du kit d'extraction et de purification d'ADN (Promega) selon les recommandations du fabricant.

Les différentes étapes sont classiques d'une extraction d'ADN : destruction de la paroi, lyse de la membrane, élimination des impuretés (protéines et autres), précipitation et réhydratation de l'ADN.

Ainsi la première étape, correspondant à une lyse enzymatique des cellules, consiste à reprendre le culot cellulaire dans 480 μL d'EDTA (50 mM) et 120 μL de lysozyme (10 mg.mL⁻¹). Le tout est incubé 30 minutes à 37°C puis centrifugé 2 minutes à vitesse maximum. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot repris dans 600 μL d'une solution de lyse des noyaux (fournie avec le kit) avant d'être incubé 5 minutes à 80°C. Puis 3 μL de Rnase Solution (fournie avec le kit) sont ajoutés. Le tout est alors incubé 15 minutes à 37°C. Ensuite, les protéines et autres impuretés cellulaires sont éliminées à l'aide de 200 μL d'une solution de précipitation fournie avec le kit. Après être passé au vortex durant 20 secondes, le tube est placé dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugé 3 minutes à vitesse maximum. Le surnageant est alors récupéré dans un tube de 1,5 mL stérile ; débute alors l'étape de purification de l'ADN : pour cela, 600 μL d'isopropanol sont ajoutés dans le tube et après 2 minutes de centrifugation à vitesse maximum, le surnageant est retiré avec précaution et le tube laissé à sécher jusqu'à ce que les gouttes d'isopropanol restantes se soient évaporées. Les étapes de purification sont alors répétées en remplaçant l'isopropanol par de l'éthanol à 70%. Après séchage du culot d'ADN, 50 μL d'une solution de réhydratation d'ADN (fournie avec le kit) sont ajoutés dans le tube et ce dernier est placé 1 heure à 65°C.

Après extraction et purification de l'ADN, la pureté et la quantité d'ADN extraits ont été vérifiées par mesure des absorbances à 260 et 280 nm à l'aide du spectromètre Infinite M 200

NanoQuant (Tecan). Le ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} permet de vérifier la pureté de l'ADN. Il doit être compris entre 1,8 et 2.

II.4.3 AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR

La PCR est une procédure rapide pour amplifier *in vitro* des fragments d'ADN grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques qui encadrent la région ciblée, d'une ADN polymérase thermorésistante et de briques élémentaires d'ADN (nucléotides : dNTP). Les amorces, la polymérase utilisée et les temps des différentes étapes des cycles d'amplification varient en fonction des techniques mises en place après la PCR.

Pour la PCR précédant la SSCP, la région V3 du gène codant l'ARNr 16S (d'environ 200 pb) a été amplifiée pour cibler spécifiquement les bactéries à l'aide des amorces universelles W49 et W104 (Tableau II-3). L'amorce w104* est marquée par un fluorochrome, pour permettre la détection du fragment amplifié par le laser de la CE-SSCP. Chaque mix PCR (50 μ L) contenait 36,9 μ L d' H_2O pure, 5 μ L de tampon 10x Pfu Turbo, 4 μ L de dNTP (2,5 mM), 1,3 μ L de W49 (100ng. μ L⁻¹), 1,3 μ L de W104 (100ng. μ L⁻¹), 0,5 μ L Pfu Turbo (2,5 U/ μ L) et 1 μ L d'ADN (dilué si nécessaire). Les cycles PCR ont été effectués dans un Mastercycler epgradient S (Eppendorf). La région V3 est alors amplifiée selon le programme suivant : 2 minutes de dénaturation de l'ADN à 94°C, suivies de 25 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 61°C et 30 secondes de ligation à 72°C. Une fois les 25 cycles terminés, une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C est effectuée.

Pour le clonage et le séquençage, un fragment plus grand (500 pb) du gène codant l'ARNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces W18 et W31 (Tableau II-3). Chaque mix PCR (50 μ L) contenait 35 μ L d' H_2O pure, 5 μ L de tampon 10x Red *Taq*, 4 μ L de dNTP (2,5 mM), 2 μ L de W18 (100ng. μ L⁻¹), 2 μ L de W31 (100ng. μ L⁻¹), 1 μ L Red *Taq* (2,5 U/ μ L) et 1 μ L d'ADN (dilué si nécessaire). Le programme utilisé pour l'amplification fut le même que celui décrit précédemment hormis la température d'hybridation qui était fixée à 50°C et le temps des étapes des 25 cycles, étendu à 1 minute.

Tableau II-3 : Amorces utilisées pour la PCR

Nom	Sequences (5'-3')	Position chez <i>E. coli</i>	Références
W49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	F330	(Delbes <i>et al.</i> , 2001)
W104	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	R533	(Delbes <i>et al.</i> , 2001)
W18	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	F9	(Zumstein <i>et al.</i> , 2000)
W31	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	R500	(Zumstein <i>et al.</i> , 2000)

Dans un premier temps, l'efficacité des différentes PCR a été vérifiée en effectuant une électrophorèse des produits obtenus sur gel d'agarose 2% et BET (Bromure d'Ethidium) suivie d'une visualisation des fragments d'ADN par fluorescence aux UV.

Dans un deuxième temps, l'efficacité des PCR a été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent) qui permet l'analyse des produits PCR par électrophorèse miniaturisée. L'ajout d'un marqueur fluorescent a permis de détecter les fragments d'ADN par fluorescence aux UV induite par un laser.

Ces deux techniques sont basées sur le principe de l'électrophorèse qui permet de séparer les brins d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Les acides nucléiques, chargés négativement, migrent électrophorétiquement sous l'effet d'un champ électrique. La séparation s'effectue à travers la matrice du gel. Le maillage est plus ou moins serré selon le pourcentage d'agarose. Plus les molécules sont petites plus elles migreront rapidement. Dans les deux cas, l'intensité des bandes permet d'estimer les dilutions à effectuer pour la CE-SSCP.

II.4.4 LA CE-SSCP (CAPILLARY ELECTROPHORESIS-SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)

La CE-SSCP est une technique d'empreinte moléculaire qui permet d'avoir rapidement une image représentative de l'ensemble de l'écosystème microbien (Figure II-9). Elle permet de séparer des fragments d'ADN simples brins de taille identique mais de séquence nucléotidique différente. Les fragments, amplifiés à l'aide d'amorces marquées lors de la PCR, sont préalablement dénaturés, introduits sous forme simple brin et leur séparation s'effectue en condition non dénaturante. Chaque fragment d'ADN adopte une structure secondaire simple brin spécifique de sa séquence conduisant à une vitesse de migration précise. Le brin marqué est alors détecté par un laser et visualisé sous forme de pic. Chaque

profil correspond à l'empreinte moléculaire de l'échantillon analysé. Chaque pic de fluorescence témoigne de la présence d'au moins une espèce bactérienne. La surface des pics est proportionnelle à la quantité d'ADN détectée et correspond donc à l'abondance relative d'une espèce au sein de l'écosystème (Delbes *et al.*, 2001).

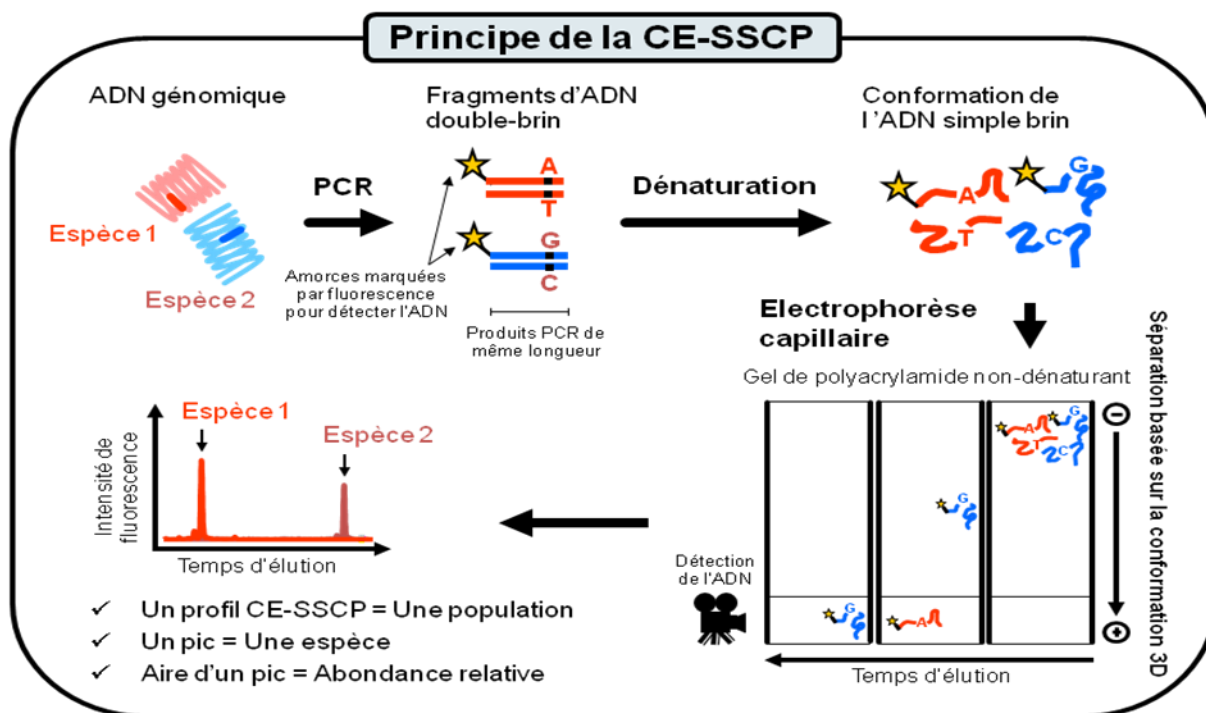


Figure II-9 : Principe de la CE-SSCP (Dumont, 2008).

Les conditions de réalisations ont été les suivantes : 1 μ L de produit PCR amplifié à l'aide du couple d'amorces w49/w104-marqué en 5' (fluorophore FAM) a été dilué dans de l'eau pure (20 à 2 000 fois selon l'intensité du pic détecté par le Bio-analyseur) afin que la fluorescence ne dépasse pas la limite de détection du laser. Ensuite, 1 μ L de cette dilution a été ajouté à 18,8 μ L de formamide et 0,2 μ L de standard interne GeneScan ROX (Applied Biosystems). Ce dernier permet d'attribuer à chaque fragment une position de migration spécifique de sa structure secondaire, donc de sa séquence. Ces échantillons ont ensuite été dénaturés par chauffage (5 min à 95 °C), puis refroidis rapidement (10 min dans de la glace).

La CE-SSCP a été réalisé par l'ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems) (Figure II-10). Les fragments d'ADNr 16S ont migré par électrophorèse capillaire à travers un capillaire (47cm \times 50 μ m) entraînés par un polymère (GeneScan polymer, Applied Biosystems) composé de 5,6%, glycérol 10%, et de TBE 1X. Chaque amorce marquée par un fluorophore a alors été détectée par un laser, qui donna une empreinte sous forme de pics, où chaque pic

correspond à un fragment d'ADN. Les conditions de migration pour chaque échantillon furent : 12 kV et 32°C pendant 30 min.



Figure II-10 : Séquenceur capillaire SSCP ABI Prism 3130 genetic analyser.

Les profils CE-SSCP ont été alignés avec les internes ROX standard pour corriger toute modification de la mobilité électrophorétique entre les différents passages. La somme des surfaces des pics a été normalisée à l'unité avant l'analyse statistique. La complexité des communautés microbiennes a été estimée en utilisant l'indice de Simpson à partir des profils de CE SSCP. Cet indice est calculé à partir du nombre de pic et de leur abondance relative (air sous les pics) (Simpson, 1949). Ces étapes de traitement des profils ont été réalisées à l'aide du package StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009) sur la version 2.9.2 de R (R Development Core Team, 2008).

II.4.5 LE CLONAGE-SEQUENÇAGE DES SEQUENCES D'INTERET

La technique de clonage-séquençage est largement utilisée en écologie microbienne. Elle permet d'identifier les espèces présentes dans l'écosystème microbien étudié.

Le clonage a été réalisé en deux étapes à l'aide du kit de clonage TA de chez Invitrogen. La première phase, dite de ligation, correspond à l'insertion au sein du plasmide du produit de PCR obtenu en utilisant les amorces W18-W31. Elle consista à préparer un mélange de 4 µL de produit PCR préalablement purifié avec des colonnes Qiaquick de Qiagen, 1 µL de salt solution (fourni avec le kit) et 1µL de 4 TOPO vector (fourni avec le kit). Le tout fut mélangé

doucement, laissé 15 minutes à température ambiante et placé dans la glace avant la seconde phase dite de transformation. Elle consista à insérer le vecteur dans une cellule d'*Escherichia Coli*. Durant cette phase, 2 μ L du produit de clonage ont été ajoutés aux cellules compétentes (fournies avec le kit). Le mélange fut placé 20 minutes dans la glace, puis un choc thermique a été réalisé pendant 30 secondes à 42°C. Le tube fut ensuite remplacé dans la glace pour y rajouter 250 μ L de milieu SOC (fourni avec le kit) doucement le long de la paroi. Le tout a alors été incubé horizontalement à 37°C pendant une heure et agité délicatement de façon régulière. Les cellules transformées ont alors été étalées sur cinq boîtes de Pétri contenant du milieu LB en présence de kanamycine (entre 20 et 75 μ L par boîte). Cet antibiotique a permis de s'assurer que seules les bactéries recombinantes poussent. En effet, la présence d'un gène tueur sur le plasmide empêcha les autres cellules de pousser.

Une fois les clones, contenant l'insert, obtenus, ils ont été repiqués un par un de façon à bien les séparer les uns des autres. Une PCR a ensuite été effectuée sur chaque colonie en utilisant les amorces T7 et P13, spécifiques au plasmide de *E. coli*. Une électrophorèse sur gel d'agarose 2% a permis de vérifier la taille du plasmide et ainsi de s'assurer que ce dernier contenait bien l'insert. Une fois cette vérification réalisée, une PCR et une CE-SSCP ont été effectuées sur chaque produit de PCR T7-P13. Chaque profil ainsi obtenu fut alors comparé au profil de la culture productrice d'hydrogène correspondante et permis ainsi l'assignation de chaque pic. Une fois les clones d'intérêts sélectionnés, ils ont été envoyés à la société MilleGen (Toulouse, France) pour séquençage.

Après séquençage, un travail de nettoyage des séquences (suppression des amorces, des séquences chimériques...) a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit (Hall, 1999). Les séquences obtenues ont alors été comparées aux séquences de références de la base de données Genbank à l'aide du logiciel CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) afin de pouvoir les affilier. Des séquences présentant un pourcentage de similarité $\geq 97\%$ ont été considérées comme appartenant au même phylotype.

II.5 ANALYSE STATISTIQUE

Des tests statistiques du type « test d'hypothèse » ont été utilisés lors des différentes études afin de vérifier si les différences observées, en termes de performances de production d'hydrogène ou de métabolisme, étaient significatives ou non.

Au cours de ces travaux, deux types de tests statistiques ont été utilisés : le **t-test**, ou **test de Student** et l'**analyse de la variance (ANOVA)** à l'aide du package « R commander » de R (R Development Core Team, 2008).

Le **t-test**, ou **test de Student** désigne un test d'hypothèse où la statistique calculée suit une loi de Student lorsque l'hypothèse nulle est vraie. Un t-test peut être utilisé notamment pour tester statistiquement l'hypothèse d'égalité de deux moyennes.

Son principe est le suivant : on veut déterminer si la valeur d'espérance μ d'une population de distribution normale et d'écart type σ non connu est égale à une valeur déterminée μ_0 . Pour ce faire, on tire de cette population un échantillon de taille n dont on calcule la moyenne \bar{x} et l'écart-type empirique s . Selon l'hypothèse nulle, la distribution d'échantillonnage de cette moyenne se distribue elle aussi normalement avec un écart type $\sigma=s/\sqrt{n}$. La variable :

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

suit alors une loi de Student avec $n-1$ degrés de liberté.

L'**analyse de la variance (ANOVA)** est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population, c'est à dire qu'ils ont statistiquement une même moyenne. C'est donc une généralisation du t-test. Ainsi pour ce test, l'hypothèse nulle correspond au cas où les distributions suivent la même loi normale et l'hypothèse alternative est qu'il existe au moins une distribution dont la moyenne s'écarte des autres moyennes.

La partie *Résultats et Discussion* est décomposée en trois chapitres qui comprennent plusieurs études. Chacune de ces études comprend une partie qui décrit les résultats obtenus et une partie « *Discussion* » qui les reprend en les interprétant, les discutant et les comparant à la littérature disponible.

Ainsi, le chapitre III est dédié à l'étude de l'influence de la structure des communautés microbiennes présentes dans les écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire. L'objectif est d'obtenir des écosystèmes les plus variés possible à partir de différents inocula et de caractériser leurs performances en termes de production d'hydrogène. Cette étude a été réalisée en mode continu à l'aide de chimostats. En effet, le fonctionnement en mode chimostat a permis de contrôler strictement le taux de croissance par le taux de dilution, et ainsi de simuler la survie d'une population bactérienne dans des conditions limitantes en nutriments. A la fin de ce chapitre, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle clé des bactéries minoritaires dans la production d'hydrogène en cultures mixtes.

Le chapitre IV concerne la modification de la structure de deux communautés productrices d'hydrogène à l'aide de deux paramètres opératoires de ce type de procédé que sont la concentration en sulfate de fer et la charge en substrat. Les objectifs de cette étude sont, d'une part, de déterminer le comportement d'un écosystème producteur d'hydrogène face à des limitations environnementales en micro et macronutriments et, d'autre part, d'évaluer l'influence sur les changements de structure des communautés microbiennes et des fonctions macroscopiques associées (métabolisme global, performances de production d'hydrogène). De la même manière que l'étude précédente, cette étude a été réalisée en chimostat. Cette étude nous a permis de faire le lien entre les changements de structure microbienne dus à des stress environnementaux et les performances observées des différents chimostats.

Le chapitre V s'intéresse à la modification de la structure des communautés microbiennes par apport d'espèces exogènes pour modifier la structure et donc les performances de communautés microbiennes productrices d'hydrogène. Ce chapitre a pour but d'évaluer l'effet de l'introduction d'un facteur biotique sur le métabolisme d'un écosystème producteur d'hydrogène. Plus précisément, il s'agit de déterminer si la production d'hydrogène d'une culture mixte peut être contrôlée grâce à l'introduction de souches exogènes à l'écosystème en décrivant les interactions entre les espèces introduites et l'écosystème initial. Les études de ce chapitre se sont d'abord déroulées en batch afin de tester un grand nombre d'espèces représentatives de la phylogénie et dont le métabolisme est lié ou non à la production

d'hydrogène. Au final, *E. coli* a été identifiée comme potentiellement intéressante et des essais d'introduction de cette souche dans un système de production d'hydrogène en chémostat ont été réalisés. Finalement, nous proposons des espèces bactériennes utilisables comme facteur biotique pour modifier le métabolisme de cultures mixtes productrices d'hydrogène.

SOMMAIRE DU CHAPITRE

Chapitre III. Etude des interactions microbiennes responsables de la production d'hydrogène en cultures mixtes et rôle des bactéries minoritaires	119
III.1 Problématique de l'étude	119
III.2 Objectifs de l'étude	120
III.3 Hypothèses de travail –postulats.....	120
III.4 Déroulement de l'étude.....	120
III.5 Performances de production d'hydrogène.....	122
III.5.1 Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps, obtention de l'état d'équilibre.....	122
III.5.2 Les performances de production d'hydrogène à l'équilibre	123
III.6 Le réseau métabolique des différentes cultures à l'équilibre.....	124
III.7 Structure des communautés microbiennes présentes dans les sept réacteurs.....	127
III.7.1 Evolution dynamique des écosystèmes producteurs d'hydrogène	127
III.7.2 Structure des communautés microbiennes à l'équilibre.....	130
III.8 Discussion	133
III.8.1 Corrélation entre performances de production d'hydrogène et réseau métabolique de l'écosystème	133
III.8.2 Bactéries majoritaires : productrices d'hydrogène.....	135
III.8.3 Les bactéries minoritaires comme espèces clés orientant le réseau métabolique de l'écosystème	136
III.9 Conclusion sur le rôle des bactéries minoritaires dans la production d'hydrogène par voie fermentaire.....	140

CHAPITRE III. ETUDE DES INTERACTIONS MICROBIENNES RESPONSABLES DE LA PRODUCTION D'HYDROGENE EN CULTURES MIXTES ET ROLE DES BACTERIES MINORITAIRES

III.1 PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

Dans le cadre de la production de molécules d'intérêts industriels comme les acides organiques, les alcools ou encore l'hydrogène (H₂), la fermentation en cultures mixtes est désormais considérée comme une alternative sérieuse à l'utilisation de cultures pures. En effet, la production d'hydrogène par fermentation sombre en cultures mixtes peut s'opérer en continu, de façon non stérile et à de faibles coûts. De plus, elle permet de traiter une large gamme de substrats organiques, des hydrates de carbone purs aux déchets organiques ou autres résidus agricoles (Levin *et al.*, 2004 ; Manish & Banerjee, 2008 ; Guo *et al.*, 2010). Cependant, de nombreuses limitations subsistent : ainsi, les rendements moyens observés de conversion des hydrates de carbone atteignent au maximum 2,5 mol H₂.mol hexose⁻¹ alors que le maximum théorique est de 4 mol H₂.mol hexose⁻¹ (Hawkes *et al.*, 2007). Des problèmes d'instabilité chronique des procédés liés à la présence de métabolismes dérivés de consommation d'hydrogène sont également à déplorer. La levée de ces verrous passe par une meilleure compréhension des interactions entre les micro-organismes présents au sein des écosystèmes.

Jusqu'à maintenant, pour la production d'hydrogène, la plupart des études se sont focalisées sur l'espèce majoritaire, et plus particulièrement sur *Clostridium* sp. Néanmoins, les espèces minoritaires peuvent aussi avoir un effet significatif au sein de l'écosystème malgré leur faible abondance. La détermination de la fonction écologique de ces espèces dans leur environnement, ainsi que les métabolismes qui leur sont associés, est donc essentielle pour une meilleure compréhension des processus microbiologiques en cultures mixtes.

III.2 OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les objectifs de cette étude sont non seulement d'évaluer les interactions microbiennes responsables de la production d'hydrogène, mais également d'estimer l'influence de la flore minoritaire sur le métabolisme du consortium microbien total. Dans une moindre mesure, un des objectifs de cette étude est d'identifier des Ingénieurs Ecologiques des Ecosystèmes Microbiens (IEEM) capables d'orienter le réseau métabolique de l'écosystème vers une production accrue d'hydrogène.

III.3 HYPOTHESES DE TRAVAIL -POSTULATS

Cette étude a permis de confirmer ou d'infirmer plusieurs hypothèses : (i) la structure de la population influence les performances de l'écosystème. (ii) Les bactéries minoritaires participent au réseau métabolique de l'écosystème. En effet, la présence d'espèces minoritaires est toujours observée dans des réacteurs continus de cultures mixtes. Or selon le principe d'exclusion compétitive, la diversité microbienne ne devrait pas se maintenir au sein d'un chémostat à moins qu'il n'y ait des interactions entre les espèces autres que la compétition. (iii) les espèces minoritaires peuvent être utilisées comme facteurs biotiques pour orienter les réseaux métaboliques de l'écosystème. Cette hypothèse sera testée de façon plus approfondie dans le chapitre V.

Enfin, cette étude s'est appuyée sur un postulat de départ : les conditions opératoires sont fixes et sont considérées comme optimales pour la production d'hydrogène. Cette affirmation s'appuie notamment sur les résultats de la thèse de doctorat d'Aceves-Lara (Aceves, 2007), réalisée au sein du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, sur l'influence respective des différents paramètres opératoires en cultures mixtes.

III.4 DEROULEMENT DE L'ETUDE

Cette étude s'est déroulée en réacteur continu (ou chémostat) sous des conditions opératoires proches de l'optimum pour la production d'hydrogène (Aceves, 2007 ; Aceves-Lara *et al.*, 2008b). Le temps de séjour hydraulique (TSH) a été fixé à 6 heures. Le pH a été régulé à 5,5 et la température à 37°C. La vitesse de mélange, quant à elle, a été fixée à 300 rotations par minute (rpm). Du glucose, à une concentration finale de 10 g.L⁻¹, a été utilisé en tant qu'unique source de carbone. Trois écosystèmes complexes ont été utilisés comme inoculum :

des boues de digesteur anaérobie traitant des vinasses (BDA), du manioc pré-fermenté (Man) et des cæcotrophes (Cæ) (crottes moles de lapin) fraîchement collectés. De plus, un prétraitement thermique (indice « pth ») de chaque inoculum et un mélange des trois inocula (Mix) ont également été testés. Les conditions opératoires étaient identiques pour toutes les expérimentations. Pour chaque essai, lorsque l'état d'équilibre de la culture était atteint, la structure, la diversité et la dynamique des communautés microbiennes ont été suivies par CE-SSCP (Single Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism). Les espèces présentes ont été identifiées par clonage et séquençage. En plus des analyses microbiologiques, la distribution des produits métaboliques et les performances de production d'hydrogène ont également été mesurées.

La Figure III-1 résume l'approche expérimentale de l'étude.

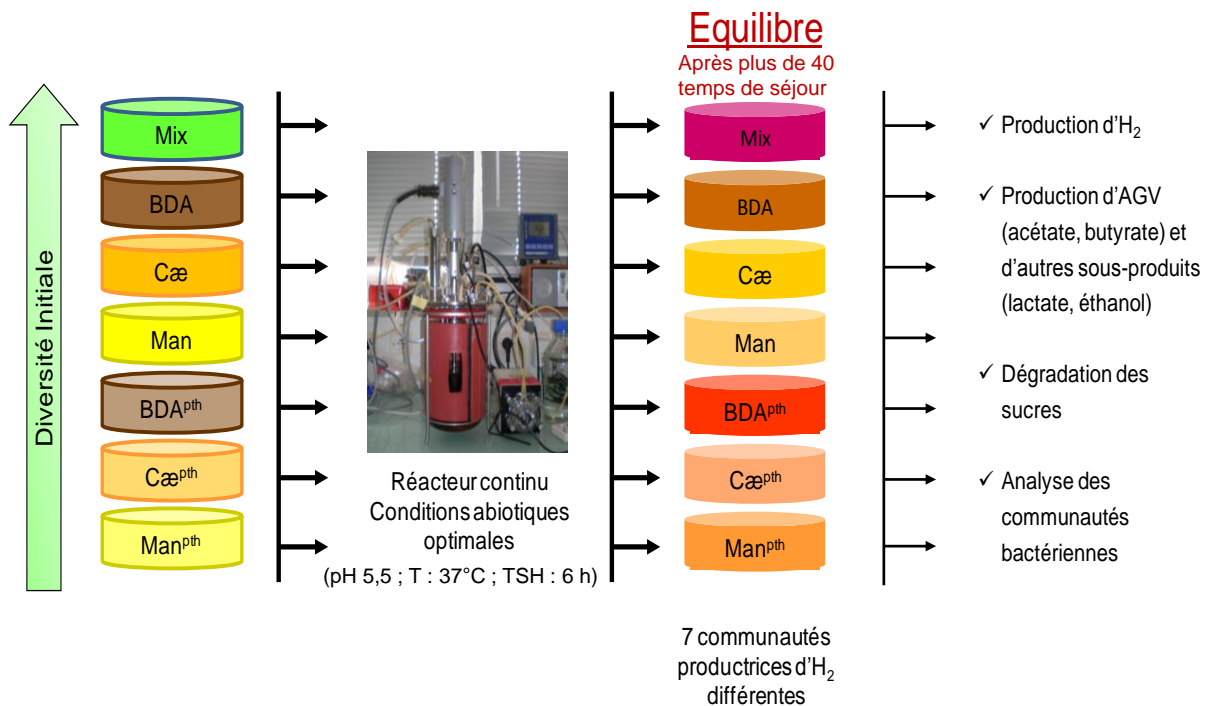


Figure III-1 : Approche expérimentale utilisée dans le cadre de l'étude des interactions microbiennes responsables de la production d'hydrogène en culture mixte et le rôle des bactéries minoritaires.

III.5 PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

III.5.1 EVOLUTION DE LA PRODUCTION D'HYDROGENE AU COURS DU TEMPS, OBTENTION DE L'ETAT D'EQUILIBRE

La Figure III-2 montre l'évolution de la productivité en hydrogène des différents réacteurs au cours du temps.

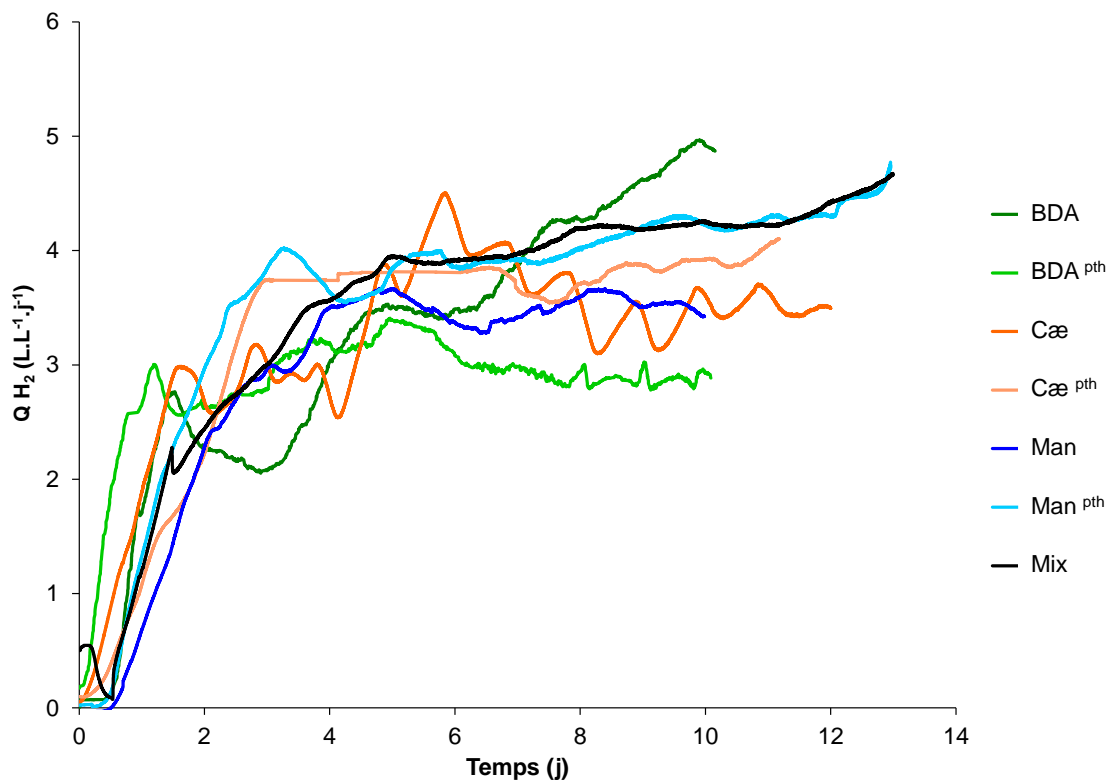


Figure III-2 : Evolution au cours du temps de la productivité en hydrogène pour les sept réacteurs inoculés avec des boues de digesteur anaérobie (BDA), des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement (BDA^{pth}), des cæotrophes (Cæ), des cæotrophes prétraités thermiquement (Cæ^{pth}), du manioc fermenté (Man), du manioc fermenté prétraité thermiquement (Man^{pth}) et un mélange des trois inocula non prétraité thermiquement (Mix).

Excepté pour l'inoculum BDA non prétraitées thermiquement, les courbes de la Figure III-2 présentent toutes la même tendance : une forte augmentation du débit d'hydrogène produit pendant les trois premiers jours. Puis la production s'est stabilisée jusqu'à atteindre un état d'équilibre. Ce dernier a été atteint au bout de 6 jours, soit près de 24 temps de séjour hydrauliques, pour la plupart des essais, i.e. BDA^{pth}, Cæ^{pth}, Man, Man^{pth}, et Mix. Dans le cas de l'inoculum issu des cæotrophes (Cæ), la production d'hydrogène a oscillé entre 4 et 8

jours et l'état d'équilibre n'a été atteint qu'au bout du 8^{ème} jour, c'est-à-dire 32 temps de séjour hydrauliques.

Enfin, dans le cas de BDA, le réacteur a été stoppé au bout de 10 jours, soit 40 temps de séjour. Cependant, même au bout de 40 temps de séjour, l'état d'équilibre stable n'avait toujours pas été atteint. Les performances de production d'hydrogène ont tout de même été calculées à partir de la valeur moyenne obtenue au cours des 8 derniers temps de séjour pour pouvoir être comparées aux autres essais.

Les performances de production d'hydrogène, discutées dans la suite de l'étude, ont été calculées lorsque le réacteur était à l'équilibre pendant au moins 2 jours afin de pouvoir estimer une valeur moyenne sur un minimum de 8 temps de séjour.

III.5.2 LES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE A L'EQUILIBRE

A l'équilibre, les réacteurs sont considérés comme stables et les performances peuvent alors être comparées. Le Tableau III-1 rassemble les performances de production d'hydrogène, en termes de productivité (P) et de rendement (Y), pour chaque culture à l'équilibre.

Tableau III-1 : 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).

	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

A l'équilibre, les différences de performances de production d'hydrogène sont statistiquement significatives ($p < 0,001$; ANOVA). Aucune corrélation n'a pu être observée entre le rendement (Y) et la productivité (P).

Dans le cas de la productivité, cinq groupes statistiques se dégagent ($p < 0,05$; t-test). Ainsi, les productivités observées varient entre 5,47 et 9,07 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹, respectivement pour les réacteurs BDA^{pth} et BDA. Ces deux cultures possèdent des productivités statistiquement

différentes de toutes les autres ($p < 0,05$; t-test). Pour les cultures Cæ et Man les productivités d'hydrogène mesurées sont statistiquement proches ($p > 0,05$; t-test) avec respectivement 6,56 et 6,42 $\text{mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Les cultures Mix et Man^{pth} présentent également des productivités semblables de 8,06 et 8,04 $\text{mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivement. La culture inoculée à partir de Cæ^{pth} présente une productivité intermédiaire de 7,45 $\text{mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Le rendement (Y) a été calculé par rapport à la quantité moyenne de glucose consommé lorsque le réacteur a atteint l'état d'équilibre. Quatre groupes statistiques se dégagent ($p < 0,05$; t-test). Ces groupes sont différents de ceux observés précédemment pour la productivité. Les rendements mesurés varient entre 1,21 et 2,32 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glc}_{\text{consommé}}$. Comme pour la productivité, le plus petit rendement en hydrogène de 1,21 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glc}_{\text{consommé}}$ a été observé pour le réacteur BDA^{pth}. Ce rendement est statistiquement proche de celui calculé pour le réacteur Man avec 1,41 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glc}_{\text{consommé}}$. Les cultures Cæ^{pth} et Man^{pth} présentent des rendements en hydrogène intermédiaires avec respectivement 1,72 et 1,79 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glc}_{\text{consommé}}$. Des rendements supérieurs sont obtenus pour les cultures BDA et Mix (environ 1,9 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glc}_{\text{consommé}}$). Un rendement maximal de 2,32 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glc}_{\text{consommé}}$ a été obtenu avec la culture Cæ. Ce rendement en hydrogène est statistiquement différent du rendement en hydrogène de toutes les autres cultures ($p < 0,05$; t-test).

III.6 LE RESEAU METABOLIQUE DES DIFFERENTES CULTURES A L'EQUILIBRE

Afin de vérifier que tous les métabolites produits ont été quantifiés, un bilan matière de chaque réacteur à l'équilibre a été effectué (Figure III-3). Pour ce faire, l'ensemble des métabolites mesurés en sortie de réacteur a été converti en équivalent DCO et comparé à la DCO entrante (10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucose équivalent à 10,67 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DCO). En considérant toutes les sorties du réacteur (biomasse, gaz et liquide), la DCO totale sortante est identique à la DCO entrante, à plus ou moins 10 %, pour tous les réacteurs. Ceci confirme que le réseau métabolique des différentes cultures est complet et que dans l'ensemble, les métabolites principaux ont été identifiés et quantifiés.

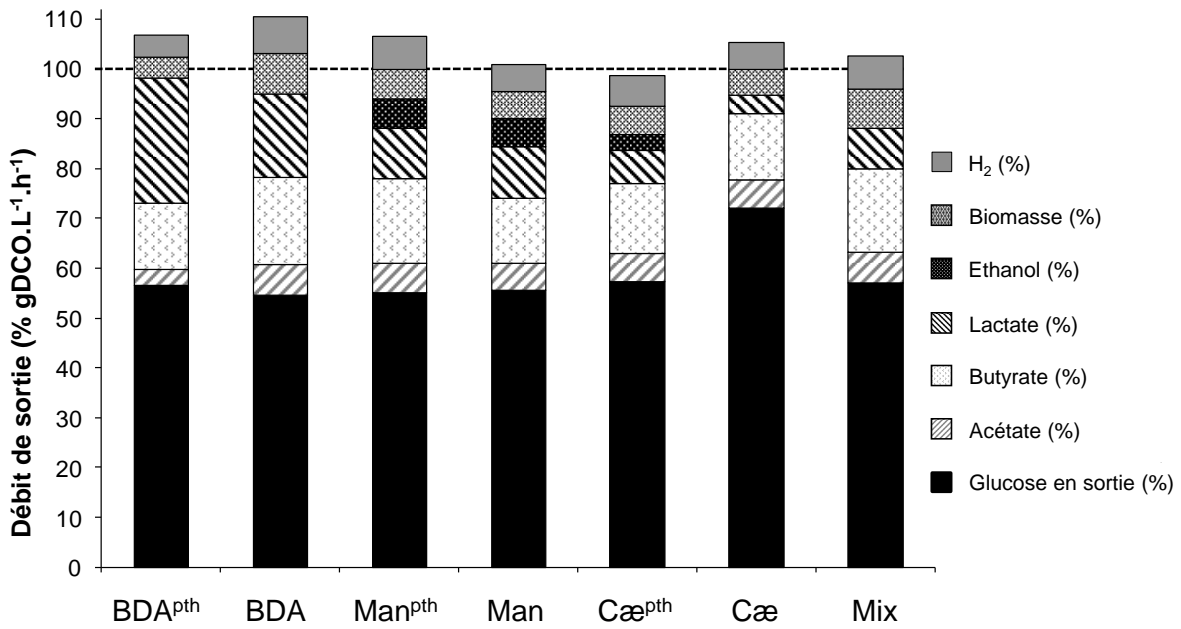


Figure III-3 : Bilan DCO des sept réacteurs à l'équilibre. La formule chimique de la biomasse a été supposée comme étant $C_5H_7NO_2$ (Grady et al., 1999)

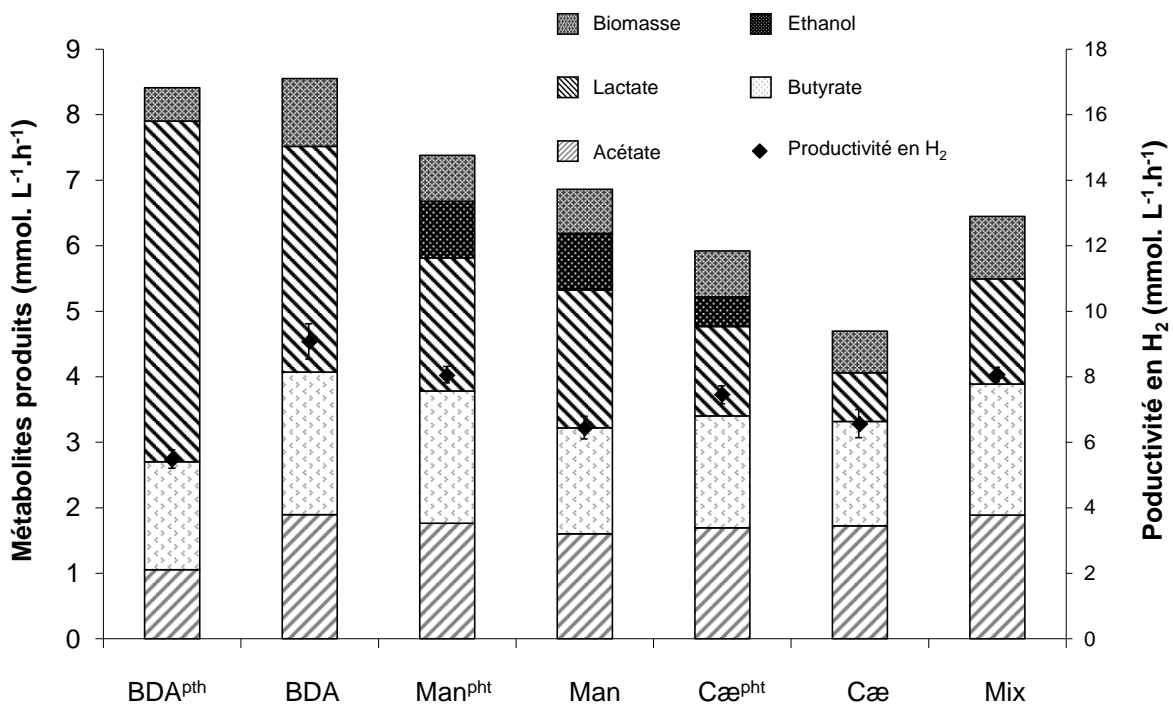


Figure III-4 : Distribution des métabolites produits par les différentes cultures à l'état d'équilibre. L'échelle est fixée de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en $H_2 = 2 (Ac + Bu)$).

La Figure III-4 présente la distribution des métabolites produits pour les sept réacteurs.

Quelle que soit l'origine de l'inoculum, de l'acétate, du butyrate et du lactate ont été produits mais dans des proportions différentes. La culture BDA^{pth} présente la plus faible production de biomasse avec $0,7 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Sa production de lactate est supérieure à celle des autres cultures avec $5,20 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ alors que sa production d'acétate est la plus faible avec $1,06 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Enfin, sa production de butyrate est parmi les plus faibles avec $1,65 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A contrario, la culture BDA présente la plus forte production de biomasse, d'acétate et de butyrate avec $1,03$; $1,90$ et $2,18 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement. Sa production de lactate est également élevée avec $3,44 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Cæ se distingue par ses faibles productions de lactate et de butyrate ($0,75$ et $1,59 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement).

Les cultures Cæ^{pth}, Man et Man^{pth} sont les seules à produire de l'éthanol en plus des métabolites précédemment cités avec respectivement $0,45$; $0,86$ et $0,86 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

La culture Mix possède des productions de lactate, d'acétate et de butyrate intermédiaires avec respectivement $1,60$; $1,89$ et $2 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, alors que sa production de biomasse est parmi les plus forte avec $0,96 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

En utilisant les concentrations en acétate et en butyrate produits, le ratio (Bu/Ac) des différentes cultures à l'équilibre a pu être déterminé (Tableau III-2). Un ratio théorique, permettant de déterminer les voies métaboliques utilisées pour la production d'hydrogène, a également été calculé. Ce ratio correspond au nombre de moles d'hydrogène produit sur deux fois la somme du nombre de moles de butyrate et d'acétate produits : $\text{H}_2/[2 \times (\text{Bu} + \text{Ac})]$. Une valeur égale à 1 indique que l'hydrogène est entièrement produit par les voies de l'acétate et du butyrate et qu'il n'est pas consommé par homoacétogénèse entraînant une surproduction d'acétate. Une valeur supérieure à 1 indique qu'une autre voie de production est active dans l'écosystème comme la voie formiate par exemple (Tableau III-2).

Tableau III-2 : Ratio (Bu/Ac) et ratio théorique $H_2/[2 \times (Bu + Ac)]$ des sept réacteurs à l'équilibre. Les valeurs suivies d'un chiffre identique ne diffèrent pas statistiquement ($p < 0,05$; t-tests).

	BDA ^{pth}	BDA	Man ^{pth}	Man	Cæ ^{pth}	Cæ	Mix
Ratio (Bu/Ac) (mol.mol ⁻¹)	1,56 ¹	1,15 ²	1,14 ²	1,01 ⁴	1,01 ^{3,4}	0,92 ⁵	1,06 ³
$H_2/[2 \times (Bu + Ac)]$ (mol.mol ⁻¹)	1,07 ¹	0,96 ¹	0,95 ¹	1,09 ¹	1,05 ¹	0,99 ¹	1,02 ¹

Le ratio (Bu/Ac) varie en fonction des cultures. Il est supérieur à 1 pour les cultures BDA^{pth}, BDA et Man^{pth} (respectivement 1,56 ; 1,15 et 1,14 mol.mol⁻¹) et proche de 1 pour les cultures Man, Cæ^{pth} et Mix. De manière intéressante, Cæ est la seule culture avec un ratio (Bu/Ac) inférieur à 1 ($p < 0,05$; t-test). Ceci indique que le réseau métabolique utilisé par Cæ diffère de celui des autres cultures.

Pour l'ensemble des réacteurs, les ratios $H_2/[2 \times (Bu + Ac)]$ ne diffèrent pas statistiquement. Ils restent constants et proches de 1 mole d'hydrogène par mole d'AGV_(butyrate+acétate) produits.

En conclusion, la production d'hydrogène est essentiellement due aux voies de production de l'acétate et du butyrate mais la répartition entre ces deux voies est variable d'une culture à l'autre.

III.7 STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES PRESENTES DANS LES SEPT REACTEURS

III.7.1 EVOLUTION DYNAMIQUE DES ECOSYSTEMES PRODUCTEURS D'HYDROGENE

Entre l'inoculum initial et l'écosystème producteur d'hydrogène présent à l'équilibre, la structure de la communauté microbienne a évolué durant l'expérimentation. Comme exemple de changement de structure d'une communauté microbienne au cours du temps, l'évolution de l'écosystème présent au sein du réacteur inoculé avec du manioc (Man) est présentée

Figure III-5. L'écosystème évolue tout au long de la culture en continu jusqu'à ce qu'un état d'équilibre soit atteint au bout d'environ 30 temps de séjour hydrauliques (TSH). Lors de cette évolution, un changement d'espèce majoritaire, la conservation d'une espèce minoritaire et l'émergence d'une nouvelle espèce minoritaire ont été observés. Pendant cette même période, les espèces dont le taux de croissance était inférieur au taux de dilution imposé ont été lessivées. Enfin, tout au long de la période d'équilibre, représentant au moins 8 TSH, la communauté microbienne sélectionnée est restée stable. Ce processus de sélection des écosystèmes a été similaire pour les six autres cultures, avec de légères différences au niveau des membres de la communauté microbienne (voir l'Annexe 1).

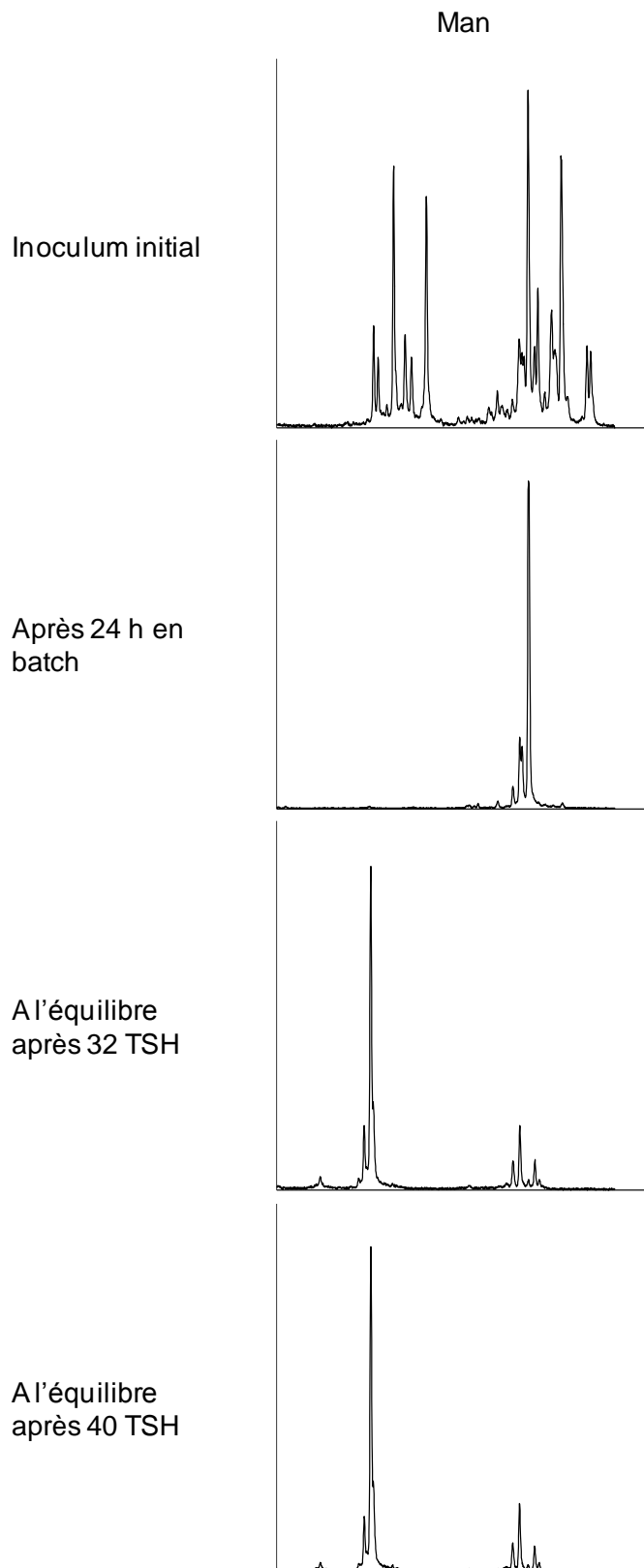


Figure III-5 : Evolution de la structure des communautés microbiennes au cours du temps. Exemple de la culture inoculée à partir de manioc fermenté (Man). Le premier profil de CE-SSCP correspond à la structure de l'inoculum. Il est suivi par le profil de l'écosystème microbien présent après 24 heures de batch. Les deux derniers profils correspondent aux communautés microbiennes présentes dans le réacteur après respectivement 32 et 40 temps de séjour hydraulique. 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. Les dynamiques de toutes les cultures sont données en Annexe 1.

III.7.2 STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES A L'EQUILIBRE

La

Figure III-6 compare les structures stables des communautés microbiennes des différentes cultures à l'équilibre. Tous les profils de CE-SSCP sont composés d'un pic majoritaire (*pic 1* ou *pic 2*) représentant entre 73% et 89% de l'aire totale des pics, et de quelques pics minoritaires (du *pic 3* au *pic 11*). De manière intéressante, à l'exception de la culture inoculée avec des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement (BDA^{pth}), une seule et même espèce majoritaire a été sélectionnée indépendamment de l'inoculum utilisé, et dans des proportions équivalentes d'abondance relative. Ainsi, seuls la nature, le nombre et l'abondance relative des populations bactériennes minoritaires diffèrent d'un écosystème à l'autre.

L'affiliation des séquences d'ADNr 16S des clones qui correspondent aux différents pics sont reportés dans le Tableau III-3. Pour les sept écosystèmes, le pic le plus abondant (espèce majoritaire) a été assigné à une espèce du genre *Clostridium* sp., à savoir *C. butyricum* (*pic 1*) pour la culture BDA^{pth} et *C. pasteurianum* (*pic 2*) pour toutes les autres cultures.

Pour les espèces minoritaires, le *pic 3* a été détecté dans toutes les cultures sauf dans la culture inoculée avec les boues de digesteur anaérobie (BDA). Le *pic 3* a été affilié à *Clostridium beijerinckii* avec 99 % de similarité. Les autres bactéries minoritaires correspondent principalement à des bactéries homolactiques : le *pic 4* et le *pic 5*, respectivement affiliés à *Sporolactobacillus laevolacticus* (99% de similarité) et *Bacillus coagulans* (99% de similarité), ont été détectés dans la culture BDA^{pth}. *Bacillus racemilacticus* (*pic 6*) a été détecté dans les cultures BDA et BDA^{pth}. Pour les cultures inoculées à partir du manioc (Man), du manioc prétraité thermiquement (Man^{pth}) et des cæcotrophes prétraités thermiquement (Cæ^{pth}), les espèces minoritaires ont été affiliées à des bactéries du genre *Lactobacillus* sp. : *L. paracasei*, *L. casei*, *L. nagelii* et *L. ghanensis* pour le *pic 7*, le *pic 8*, le *pic 9* et le *pic 10* respectivement. Finalement, la seule espèce minoritaire (*pic 11*) n'appartenant pas ni au genre *Clostridium* sp., ni à un genre producteur de lactate, a été identifiée comme étant *Escherichia coli* (100% de similarité), et a été obtenue lors de la culture inoculée à partir de cæcotrophes (Cæ).

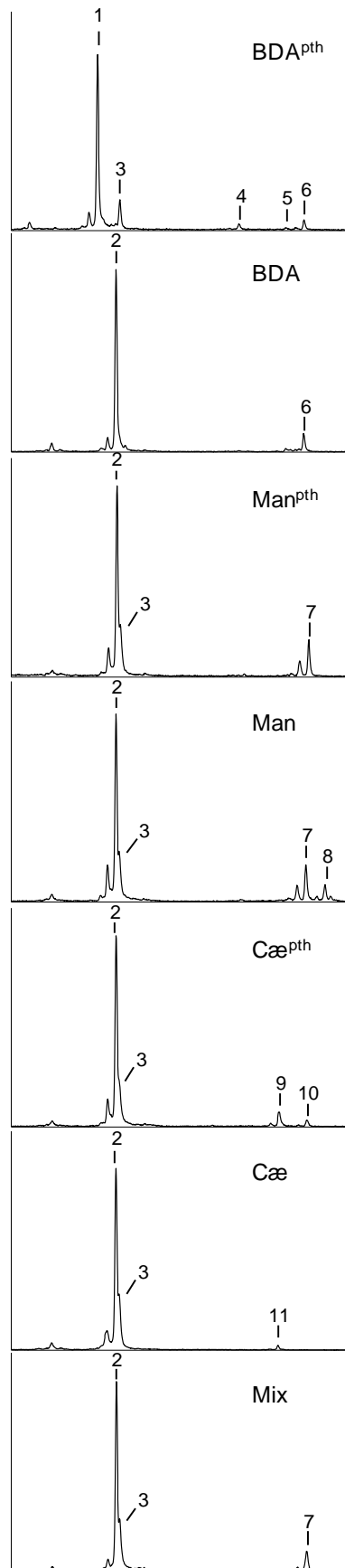


Figure III-6 : Profils CE-SSCP des sept écosystèmes producteurs d'hydrogène à l'équilibre. *Un profil représentatif de l'écosystème a été représenté pour chaque culture. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement 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 III-3.*

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

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	-

III.8 DISCUSSION

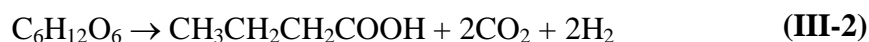
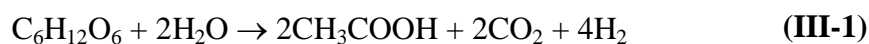
III.8.1 CORRELATION ENTRE PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE ET RESEAU METABOLIQUE DE L'ECOSYSTEME

Alors que les conditions opératoires ne varient pas d'une expérimentation à l'autre, les résultats observés couvrent une large gamme de rendement et de productivité en hydrogène. Ces résultats sont cohérents par rapport à ceux de la littérature (Tableau III-4). Les productivités maximales de 14,2 ; 15 et 96,7 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ observées respectivement chez Kim *et al.* (2006b), Lin & Chang (1999) et Van Ginkel & Logan (2005b), sont supérieures à la productivité maximale de notre étude. Ceci s'explique par la faible quantité de glucose dégradée lors de nos expérimentations. En effet, dans cette étude le facteur limitant n'était pas le glucose mais la concentration en sulfate de fer, conduisant à sélectionner des espèces productrices d'hydrogènes ayant une forte affinité avec le fer comme démontré dans le chapitre IV.

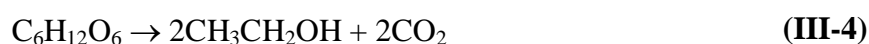
Tableau III-4 : Comparaison des performances de production d'hydrogène en réacteur continu avec la littérature

Inoculum	Substrat	Productivité (mmol H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendement H ₂ (mol H ₂ .mol hexose ⁻¹)	Référence
Différents types traités ou non	Glucose	5,5 – 9,1	1,2 – 2,3	Cette étude
Boues de STEP	Glucose	0,3 – 15	0,6 – 1,7	(Lin & Chang, 1999)
Boues de réacteur hydrogène	Glucose	4,3	2,1	(Fang & Liu, 2002)
Sol agricoles traités thermiquement	Glucose	3,6 – 96,7	1,7 – 2,8	(Van Ginkel & Logan, 2005b)
Boues de digesteur anaérobie traitées thermiquement	Saccharose	14,2	1,2	(Kim <i>et al.</i> , 2006b)
Boues de digesteur anaérobie	Saccharose	0,04 – 10,1-	0,01 – 1,25	(Aceves-Lara <i>et al.</i> , 2008b)
Boues de digesteur anaérobie	Saccharose	-	0,1 – 1,7	(Mariakakis <i>et al.</i> , 2011)

De plus, des différences significatives au niveau des performances de production d'hydrogène à l'équilibre ont été observées dans notre étude. Ces différences sont directement corrélées aux écosystèmes présents dans les réacteurs à l'équilibre qui présentent des métabolismes globaux différents. Ainsi, la culture inoculée à partir de cæotrophes possède le rendement maximum en hydrogène avec 2,32 mol H₂. mol⁻¹ Glc_{consommé}. Mais la Figure III-4 (page 125) montre que la quantité totale de métabolites produits par la culture Cæ est inférieure à celle observée pour les autres cultures. En effet, l'écosystème de la culture Cæ ne dégrade que 25 % du glucose introduit contre 45 % de dégradation pour les autres cultures. Cependant, les principaux métabolites produits par la culture Cæ sont l'acétate (37%) et le butyrate (34%), qui sont les deux principaux métabolites liés à la production d'hydrogène par voie fermentaire. En effet, d'un point de vue stœchiométrique, la formation d'une mole d'acétate ou d'une mole de butyrate est accompagnée par la formation de 2 moles d'hydrogène (Equation III-1 et III-2).

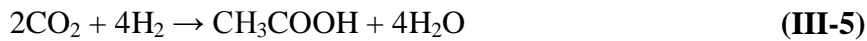


A contrario, il n'y a pas de relation directe entre la production d'hydrogène et la formation de lactate ou d'éthanol (Equation III-3 et III-4). Aussi, pour la culture Cæ, le lactate ne représente que 13 % des métabolites produits et aucune production d'éthanol n'a été observée. L'ensemble de ces résultats indique donc que la dégradation du glucose par la culture Cæ est moins efficace mais plus spécifique par rapport à la production d'hydrogène que celle des autres cultures.



Les autres réacteurs produisent également du biohydrogène en utilisant majoritairement les voies métaboliques de l'acétate et du butyrate, mais les rendements en hydrogène sont plus faibles. Deux hypothèses peuvent expliquer ces rendements plus faibles en hydrogène : premièrement la consommation de l'hydrogène par homoacétogénèse (Equation III-5) ou,

deuxièmement, un shift des voies métaboliques de l'écosystème vers des voies non productrices d'hydrogène comme la voie du lactate ou la voie de l'éthanol.



Le ratio théorique $\text{H}_2/[2 \times (\text{Bu} + \text{Ac})]$ permet d'invalider la première hypothèse. Pour l'ensemble des réacteurs, le ratio $\text{H}_2/[2 \times (\text{Bu} + \text{Ac})]$ reste constant et proche de 1 mole d'hydrogène par mole d'AGV_(butyrate+acétate) produits. Ceci suggère que, quel que soit la culture, il n'y a ni de consommation apparente d'hydrogène due à l'homoacétogénèse, ni de surproduction d'hydrogène via une autre voie métabolique. Les rendements inférieurs en hydrogène observés pour les réacteurs autres que Cæ ont donc été principalement dus à des voies métaboliques non associées à la production d'hydrogène, comme le lactate et l'éthanol.

III.8.2 BACTERIES MAJORITAIRES : PRODUCTRICES D'HYDROGENE

Alors que les conditions opératoires étaient fixées et semblables pour toutes les cultures, la production de métabolites et les performances en hydrogène mesurées pour toutes les expérimentations de cette étude ont été significativement différentes. Ainsi, l'unique paramètre variant d'une expérimentation à une autre et qui puisse expliquer les différences de réseaux métaboliques et de performances en hydrogène, est la structure des communautés bactériennes présentes au sein des réacteurs à l'équilibre. Ceci est de plus conforté par le fait que deux cultures (Man^{pth} et Mix) possédant les mêmes espèces à l'équilibre présentent des performances statistiquement similaires.

Les résultats montrent que, quelle que soit l'origine de l'inoculum, l'écosystème microbien final a été fortement simplifié avec une espèce bactérienne majoritaire et quelques espèces minoritaires. A l'équilibre, et pour toutes les cultures, l'espèce majoritaire des écosystèmes à l'équilibre, appartient au genre *Clostridium*. D'après les résultats de la littérature les espèces du genre *Clostridium* sont généralement retrouvées en proportion majoritaire dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène par voie fermentaire (Wang & Wan, 2009a ; Lin *et al.*, 2011a ; Saraphirom & Reungsang, 2011). De manière plus spécifique, les performances globales de production d'hydrogène sont influencées par l'espèce de *Clostridium* sélectionnée (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, dans notre étude, les plus faibles performances en hydrogène ont été observées pour la culture BDA^{pth}, seule culture avec *Clostridium butyricum* comme espèce majoritaire. Ceci s'explique notamment par le fait que *C. butyricum* produise de l'hydrogène

préférentiellement par la voie du butyrate (avec un ratio butyrate / acétate de 1,56 mol.mol⁻¹). Or d'après les équations 1 et 2, la voie acétate conduit à un rendement en hydrogène supérieur à celui de la voie butyrate : 4 moles d'hydrogène pour la voie acétate contre 2 moles via la voie butyrate. En utilisant principalement la voie butyrate, le rendement en hydrogène de *C. butyricum* est donc plus faible. L'utilisation préférentielle de la voie butyrate par *C. butyricum* a également été reportée dans différentes études avec des ratios acétate/butyrate similaires de 1,55 ; 1,33 et 1,53 mol.mol⁻¹ (Saint-Amans *et al.*, 2001 ; Cai *et al.*, 2010a ; Hiligsmann *et al.*, 2011).

A contrario, *Clostridium pasteurianum* conduit à une production d'acétate et de butyrate plus équilibrée avec des ratios compris entre 0,92 et 1,15 mol.mol⁻¹. *C. pasteurianum* favorise donc la production d'hydrogène par rapport à *C. butyricum* en utilisant préférentiellement la voie acétate. Ceci explique en partie les rendements en hydrogène supérieurs pour les six cultures possédant *C. pasteurianum* comme espèce majoritaire.

III.8.3 LES BACTERIES MINORITAIRES COMME ESPECES CLES ORIENTANT LE RESEAU METABOLIQUE DE L'ECOSYSTEME

Pour expliquer les différentes performances de production d'hydrogène et les réseaux métaboliques exprimés par les écosystèmes, l'espèce majoritaire n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. En effet, pour les six écosystèmes ayant *C. pasteurianum* comme espèce majoritaire (BDA, Man, Man^{pth}, Cæ, Cæ^{pth} et Mix), des différences significatives de performances ont été observées. Ces différences ne peuvent être attribuées qu'à la présence de différentes espèces minoritaires apparaissant après plus de 40 temps de séjour, ces espèces n'excédant jamais plus de 19% d'abondance relative totale. Or, selon le principe d'exclusion compétitive qui stipule qu'un environnement simple, non structuré, contenant seulement une seule ressource ne peut soutenir qu'un seul compétiteur, les bactéries minoritaires auraient dû être lessivées à moins qu'elles interagissent avec leur environnement ou d'autres micro-organismes, ce qui semble être le cas (Hansen & Hubbell, 1980).

III.8.3.1 CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII MINORITAIRE ET COMPÉTITRICE

Clostridium beijerinckii est une des bactéries minoritaires retrouvée dans les cultures BDA^{pth}, Man, Man^{pth}, Cæ, Cæ^{pth} et Mix. Une interaction compétitive de style trophique avec l'espèce *Clostridium* majoritaire est attendue. Elle aurait donc dû disparaître selon le principe d'exclusion compétitive. Le fait qu'elle se maintienne dans la culture peut être expliqué par la formation de floc ou si elle a un taux de croissance très proche de celui *C. pasteurianum*.

Tout comme *C. pasteurianum* et *C. butyricum*, *C. beijerinckii* est connue pour produire de l'hydrogène par les voies acétate et butyrate (Pan *et al.*, 2008b). Cependant, Liu *et al.* (2011a) ont montré lors d'une étude sur différentes souches pures de *Clostridium* que dans certains cas, notamment en cas de stress pH, elle peut devenir une compétitrice vis-à-vis du substrat et produire du propionate, du butanol, du lactate ou de l'éthanol. Dans notre étude, les rôles exacts des différentes espèces de genre *Clostridium* ne peuvent être distingués.

III.8.3.2 LES BACTERIES HOMOLACTIQUES : COMPÉTITRICES OU AMENSALES

En plus des bactéries du genre *Clostridium*, des bactéries homolactiques ont été retrouvées dans six cultures (BDA, BDA^{pth}, Man, Man^{pth}, Cæ^{pth} et Mix). Certaines de ces bactéries présentent des métabolismes susceptibles d'avoir un effet négatif sur la production d'hydrogène. En effet, selon l'équation 3, une des principales caractéristiques du métabolisme de ces bactéries est de produire du lactate à partir du glucose sans production de gaz associée. Ces bactéries lactiques rentrent donc en compétition pour le glucose avec les bactéries du genre *Clostridium*. Cela peut être une des raisons pour lesquelles les concentrations en lactate sont supérieures pour les cultures contenant des bactéries homolactiques. Lors d'une récente étude, Karadag et Puhakka (2010a) ont également associé une forte production de lactate accompagnée d'une faible production d'hydrogène, à la présence de *Bacillus coagulans* dans l'écosystème.

Par ailleurs, Noike *et al.* (2002) ont montré que certaines espèces appartenant au genre *Lactobacillus* peuvent diminuer les performances de production d'hydrogène en sécrétant des bactériocines dans le milieu de culture. Cette relation, de type amensalisme, peut provoquer un stress chez les bactéries du genre *Clostridium* et ainsi entraîner un changement du réseau métabolique de l'écosystème de la production d'hydrogène vers la production de solvant

(essentiellement lactate et éthanol) (Hawkes *et al.*, 2002). Ce phénomène peut expliquer la production d'éthanol observée dans les cultures Man^{pth}, Man et Cæ^{pth}.

Les bactériocines peuvent également présenter un effet indirect en empêchant l'établissement d'autres espèces minoritaires au sein de l'écosystème. Dans une étude récente, Savino *et al.* (2011) ont montré que l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques contre certaines bactéries coliformes de type *E. Coli* empêchait l'installation de ces dernières dans le tractus gastro-intestinal humain. Bien que cet effet joue un rôle majeur dans la santé humaine en contribuant à « l'effet barrière » contre les microorganismes exogènes (Savino *et al.*, 2011), il n'est pas désiré pour les procédés de production d'hydrogène. Ceci pourrait notamment expliquer pourquoi la seule culture (Cæ) où *E. Coli* a pu s'établir, était la seule qui ne contenait pas de bactéries lactiques.

Certaines bactéries homolactiques sont par ailleurs susceptibles d'avoir un effet positif sur la production d'hydrogène. En effet, les bactéries lactiques sont connues pour produire des exopolysaccharides (EPS) (Mondragón-Bernal *et al.*, 2007). Dans les milieux naturels, les EPS jouent un rôle crucial dans le développement des biofilms et dans la colonisation de niches écologiques comme le tractus gastro-intestinal. De plus, les EPS protègent les bactéries contre les conditions hostiles de l'environnement. Dans le cadre de la production d'hydrogène par voie fermentaire, Fang *et al.* (2002) ont montré que certaines espèces du genre *Bacillus* produisent des EPS entraînant la formation de floccs et augmentant ainsi la production d'hydrogène et la concentration de biomasse présente dans le réacteur. Ceci peut expliquer le fait que la culture BDA, qui ne contient que *Bacillus racemilacticus* comme bactérie minoritaire, possède la plus forte concentration en biomasse et, par conséquent, la plus forte productivité en hydrogène.

III.8.3.3 ESCHERICHIA COLI, ESPECE CLE PILOTANT LE METABOLISME DES CLOSTRIDIUM SP. ?

Dans cette étude, la culture Cæ présente le plus fort rendement en hydrogène (2,32 mol H₂. mol⁻¹Glc consommé). Or dans cette culture, seulement deux espèces minoritaires ont été trouvées : *Clostridium beijerinckii* et *Escherichia coli*. Or selon la littérature, *E. Coli* possède de nombreux effets possibles en termes de production d'hydrogène.

Les microorganismes appartenant au genre *Escherichia* peuvent en effet effectuer une fermentation mixte et ainsi produire du lactate, de l'acétate, du succinate, de l'éthanol, du

formiate, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène (Gottschalk, 1985). Ainsi, *E. coli* peut potentiellement produire de l'hydrogène en utilisant la voie formiate (Gottschalk, 1985 ; Kim *et al.*, 2009). Cependant, cette hypothèse n'est pas cohérente avec les résultats de productivité et les quantités d'acétate et de butyrate mesurées pour la culture Cæ : En effet, dans ce cas, le ratio $H_2/[2 \times (Bu + Ac)]$ est égal à 0,99 donc très proche de 1. Ceci suggère que l'hydrogène de la culture Cæ serait exclusivement produit par les voies acétate et butyrate. A moins que la voie formiate et l'homoacétogénèse soit toutes les deux présentes au sein de l'écosystème et que la quantité d'hydrogène produite par la voie formiate soit équivalente à la quantité d'hydrogène consommée via l'homoacétogénèse.

Par ailleurs, certaines études ont porté sur les propriétés de l'association entre *E. Coli* et *Clostridium* pour maintenir un environnement anaérobie en consommant les traces d'oxygène et ainsi augmenter les rendements en hydrogène (Abd-Alla *et al.*, 2011). Cependant, lors de nos expérimentations, toutes les précautions étaient prises pour maintenir les conditions strictement anaérobie et le potentiel d'oxydo-réduction était fortement négatif (-330 mV environ), suggérant que cette relation commensale n'a pas eu lieu dans la culture continue Cæ.

Une autre hypothèse peut être avancée pour expliquer le plus grand rendement en hydrogène : Dubey et Ben-Yehuda (2011) ont récemment montré que certaines bactéries, dont *E. coli*, peuvent former des nanotubes avec des bactéries d'autres espèces et de Gram différents, afin d'interagir directement en échangeant des métabolites et des électrons. Cette hypothèse est renforcée par les travaux du BIP de Marseille (partenaire du projet InGEcoH) qui ont montré qu'en co-culture, *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH) était capable de modifier le réseau métabolique de *Clostridium acetobutylicum ATTC824* (Cab). En effet, DvH orienterait le flux métabolique de Cab vers les voies liées à la production d'hydrogène (acétate et butyrate) tout en diminuant le flux métabolique de la voie lactate et ceci par l'intermédiaire d'une interaction physique directe. Ainsi, si ce type d'interaction était envisagé entre *E. coli* et *Clostridium* sp., ces interactions pourraient détourner le métabolisme de *Clostridium* et l'orienter vers la production d'hydrogène via la voie acétate, ce qui expliquerait pourquoi Cæ est la seule culture avec un ratio butyrate / acétate inférieur à 1. Ce type d'interaction pourrait également expliquer pourquoi *E. Coli* n'est pas lessivé après 40 temps de séjour hydraulique par simple exclusion compétitive.

III.9 CONCLUSION SUR LE ROLE DES BACTERIES MINORITAIRES DANS LA PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE

Au cours de cette étude, il a été montré que la production d'hydrogène par voie fermentaire était clairement influencée par la structure de la communauté microbienne. En effet, en dépit du principe d'exclusion compétitive, à l'équilibre l'ensemble des communautés microbiennes sélectionnées est composé d'une espèce majoritaire et quelques espèces minoritaires. Il en va de même pour la totalité des études retrouvées dans la littérature où l'inoculum de départ est une culture mixte. Or jusqu'à maintenant, la plupart des études se sont focalisées sur l'étude des espèces majoritaires. Et même si les bactéries majoritaires, productrices d'hydrogène, jouent un rôle dans les performances de production d'hydrogène, notre étude montre que le métabolisme global de l'écosystème semblerait être « piloté » par les bactéries minoritaires. Malgré leur faible abondance, ces bactéries possèdent en effet une influence majeure sur les écosystèmes étudiés. En ce sens, elles sont considérées comme des espèces clés contrôlant le métabolisme global dans un contexte de fermentation en cultures mixtes. Ainsi, en cultures mixtes, la communauté microbienne doit être considérée dans son ensemble sans négliger les espèces minoritaires.

Cette étude ouvre également la voie sur l'utilisation des bactéries minoritaires comme facteur biotique en tant qu'Ingénieurs Ecologiques des Ecosystèmes Microbiens (IEEM) pour orienter le réseau métabolique de l'écosystème, ce qui sera présenté dans les chapitres suivants de cette thèse.

SOMMAIRE DU CHAPITRE

Chapitre IV. Etude dynamique de consortia microbiens : influence des paramètres opératoires sur la structure des communautés microbiennes productrices d'hydrogène.....	143
IV.1 Problématique de l'étude	143
IV.2 Objectifs de l'étude	144
IV.3 Hypothèses de travail -postulats.....	144
IV.4 Déroulement de l'étude	144
IV.5 Effet de l'augmentation de la concentration en sulfate de fer	146
IV.5.1 Les performances de production d'hydrogène.....	146
IV.5.2 Métabolisme des deux écosystèmes.....	148
IV.5.3 Dynamique de la structure des communautés microbiennes des deux fermenteurs F1 et F2.....	152
IV.5.4 Discussion	155
IV.6 Effet de l'augmentation de la charge en substrat carboné.....	159
IV.6.1 Productivités et rendements en hydrogène des deux fermenteurs	159
IV.6.2 Métabolisme global des deux écosystèmes.....	161
IV.6.3 Dynamique de la structure des communautés microbiennes des deux fermenteurs F1 et F2 lors de l'augmentation de la charge appliquée	164
IV.6.4 Discussion	166
IV.7 Conclusion de l'étude de l'influence des paramètres opératoires.....	169

CHAPITRE IV. ETUDE DYNAMIQUE DE CONSORTIA MICROBIENS : INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES PRODUCTRICES D'HYDROGENE

IV.1 PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

Dans le chapitre précédent, l'utilisation de systèmes continus, alimentés stérilement et dont les conditions opératoires étaient finement régulées, a permis d'obtenir des structures de communautés microbiennes stables sur plus de trente temps de séjour hydrauliques. Dans la grande majorité des cas, cette stabilité des populations microbiennes était accompagnée d'une stabilité fonctionnelle en termes de performances de production d'hydrogène. Les résultats ainsi obtenus ont montré que la structure des communautés microbiennes, et notamment la présence des microorganismes en proportion minoritaire, avait une influence considérable sur la production de biohydrogène. Mais qu'advierait-il des performances de production d'hydrogène et du métabolisme global de l'écosystème si la structure des communautés microbiennes variait au cours du temps ? Aussi, au cours des études présentées dans ce chapitre, avons-nous tenté de modifier la structure des communautés microbiennes via des changements de conditions opératoires, i.e. de concentrations en micro- et macronutriments. L'augmentation des concentrations en sulfate de fer et en glucose dans le milieu sont deux paramètres qui ont été largement étudiés dans la littérature (Zhang & Shen, 2006 ; Wang & Wan, 2008b ; Karadag & Puhakka, 2010b ; Kim *et al.*, 2006b ; Luo *et al.*, 2008). En effet, le fer est un constituant essentiel du site actif des hydrogénases et la concentration en sucres est un paramètre important pour déterminer la faisabilité économique et technique de la production d'hydrogène à l'échelle industrielle. Cependant, la majorité de ces études s'est focalisée sur les performances de production d'hydrogène sans forcément examiner les effets éventuels sur la structure des communautés microbiennes. L'influence de ces deux paramètres a donc été testée. Notamment les propriétés de stabilité des écosystèmes obtenus et l'influence de leur structure sur les performances de production d'hydrogène ont été étudiées. Pour cela, la structure des communautés microbiennes et les voies métaboliques ont été évaluées avant et après l'application des changements de conditions environnementales (charges en Fer et en glucose).

IV.2 OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les objectifs de cette étude sont, d'une part, de déterminer l'influence des limitations en micro- et macronutriments sur des écosystèmes producteurs d'hydrogène, et d'autre part d'évaluer les liens d'éventuels changements de la structure des communautés microbiennes sur les fonctions macroscopiques (métabolisme global, performances de production d'hydrogène) de la culture.

IV.3 HYPOTHESES DE TRAVAIL -POSTULATS

Cette étude va permettre de confirmer ou d'infirmer les hypothèses suivantes : (i) les conditions opératoires, illustrées par la concentration en sulfate de fer et la concentration en glucose, ont une influence sur la structure d'une communauté microbienne préalablement stabilisée. (ii) les changements de structure, s'ils ont lieu, entraînent des changements au niveau du métabolisme et des performances de l'écosystème, en accord avec ce qui a été montré dans le chapitre III.

Tous comme pour le chapitre précédent, les conditions opératoires (pH, T, TSH et vitesse d'agitation) sont fixes et sont considérées comme optimales pour la production d'hydrogène (Aceves-Lara *et al.*, 2008b).

IV.4 DEROULEMENT DE L'ETUDE

Afin de tester l'influence de la concentration en sulfate de fer puis de la concentration en glucose, deux fermenteurs continus (F1 et F2) ont été utilisés en parallèle (Figure IV-1).

Dans un premier temps, les réacteurs ont été inoculés avec le même inoculum initial : les boues granulaires issues d'un digesteur anaérobie traitant les effluents de la sucrerie Saint Louis à Marseille, préalablement prétraitées thermiquement à 90°C pendant 10 minutes (cet inoculum a été sélectionné pour ses performances non optimales pour la production d'hydrogène). Puis, lorsque la production d'hydrogène des deux fermenteurs s'est stabilisée, la concentration en FeSO₄ du milieu a été augmentée de façon à ne plus être limitante.

Dans un deuxième temps, après obtention d'un deuxième état d'équilibre pour chaque fermenteur, la concentration en glucose du milieu a été augmentée de façon progressive entre

10 et 50 g.L⁻¹. Les autres paramètres opératoires sont restés fixes selon les conditions précédemment déterminées.

Après chaque changement de condition, lorsque l'état d'équilibre de la culture était atteint, la structure, la diversité et la dynamique des communautés microbiennes ont été suivies par CE-SSCP. Des analyses par pyroséquençage ont également permis de déterminer le genre des différentes populations présentes dans l'écosystème à l'instant t. En plus des analyses microbiologiques, la distribution des produits métaboliques et les performances de production d'hydrogène ont été mesurées. Le protocole détaillé de la mise en place et du suivi d'un réacteur continu est présenté dans la partie « Matériel et Méthodes ».

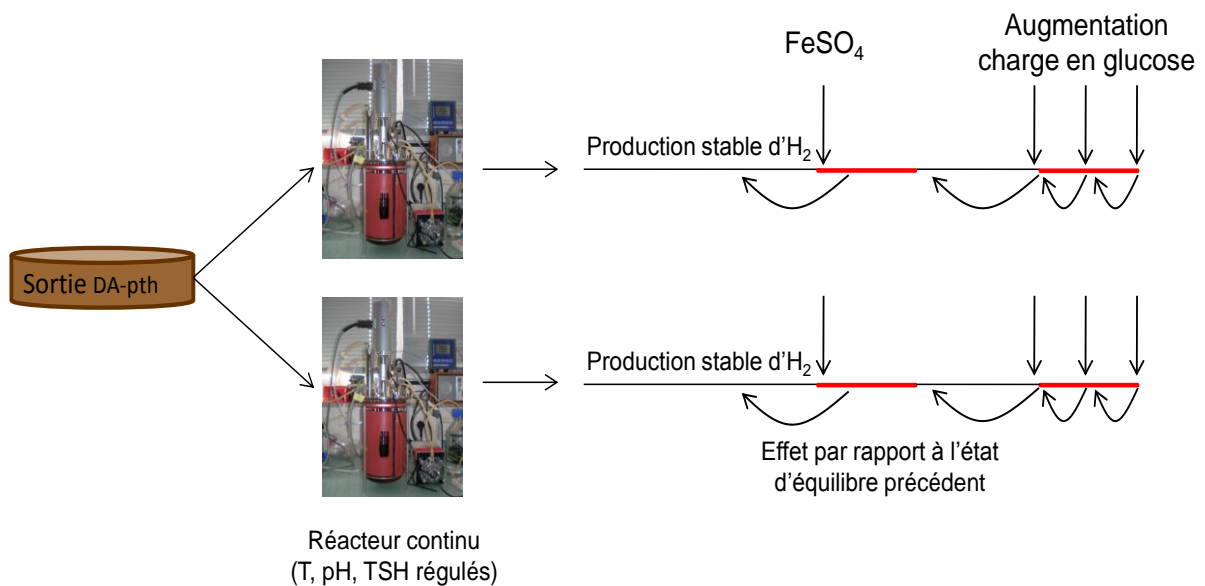


Figure IV-1 : Approche expérimentale développée dans le cadre de l'étude de l'influence de stress environnementaux sur la stabilité et les performances d'un consortium microbien

IV.5 EFFET DE L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN SULFATE DE FER

IV.5.1 LES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

IV.5.1.1 EVOLUTION DE LA PRODUCTION D'HYDROGENE AU COURS DU TEMPS, DEFINITION DE L'ETAT D'EQUILIBRE

La Figure IV-2 montre l'évolution de la production d'hydrogène au cours du temps pour les deux fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer du milieu de culture.

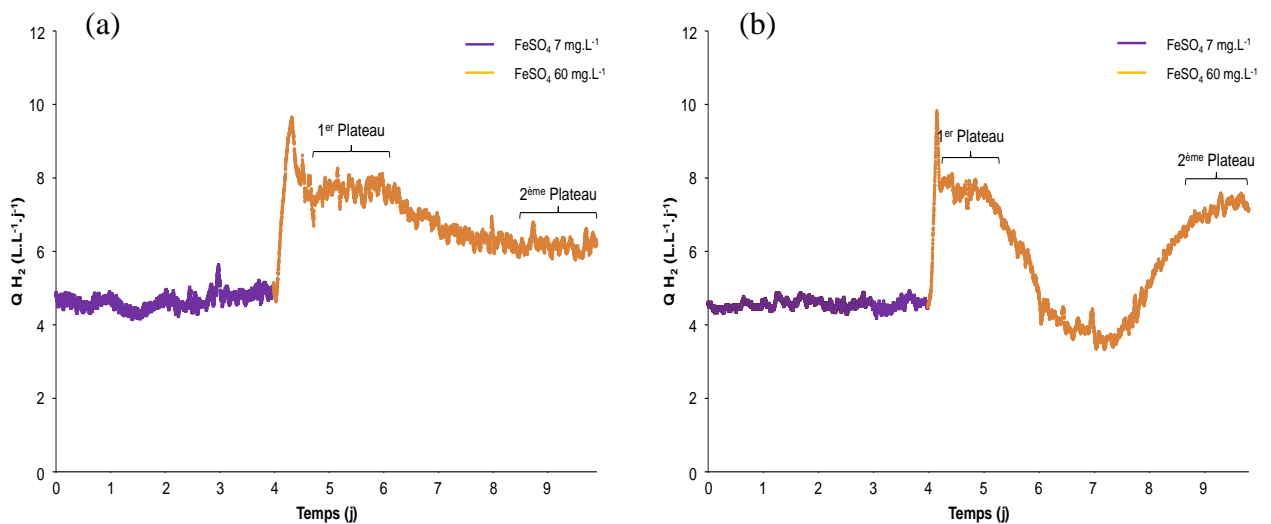


Figure IV-2 : Evolution de la production d'hydrogène des fermenteurs F1 (a) et F2 (b) avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer dans le milieu. La courbe violette représente une concentration de $7 mg.L^{-1} FeSO_4$ contre $60 mg.L^{-1}$ pour la courbe orange.

Avant augmentation de la concentration en sulfate de fer, les deux fermenteurs présentaient une production stable d'hydrogène de l'ordre de $4,5 L.L^{-1}.j^{-1}$. Ils ont alors été considérés comme étant à l'équilibre. Dès que la concentration en $FeSO_4$ a été augmentée, la production d'hydrogène a également augmenté pour atteindre un premier plateau à environ $8 L.L^{-1}.j^{-1}$. Dans les deux cas, le débit en hydrogène est resté stable pendant un à deux jours. Ensuite pour le fermenteur F1, le débit a diminué progressivement jusqu'à atteindre un deuxième plateau à $6 L.L^{-1}.j^{-1}$. Dans le cas du fermenteur F2, la production d'hydrogène a diminué brusquement avant de remonter et d'atteindre un deuxième plateau à $8 L.L^{-1}.j^{-1}$.

Les performances de production d'hydrogène, discutées dans la suite de l'étude, ont été calculées lorsque le réacteur était à l'équilibre avant l'augmentation de la concentration en FeSO_4 puis lors du premier et deuxième plateau d'état d'équilibre.

IV.5.1.2 PRODUCTIVITES ET RENDEMENTS EN HYDROGENE DES DEUX FERMENTEURS

Les performances de production d'hydrogène ont été mesurées pour les deux fermenteurs F1 et F2, aussi bien en termes de productivité que de rendement (Y) avant l'augmentation de la concentration en FeSO_4 puis lors du premier et deuxième plateau après l'augmentation de la concentration (Figure IV-3).

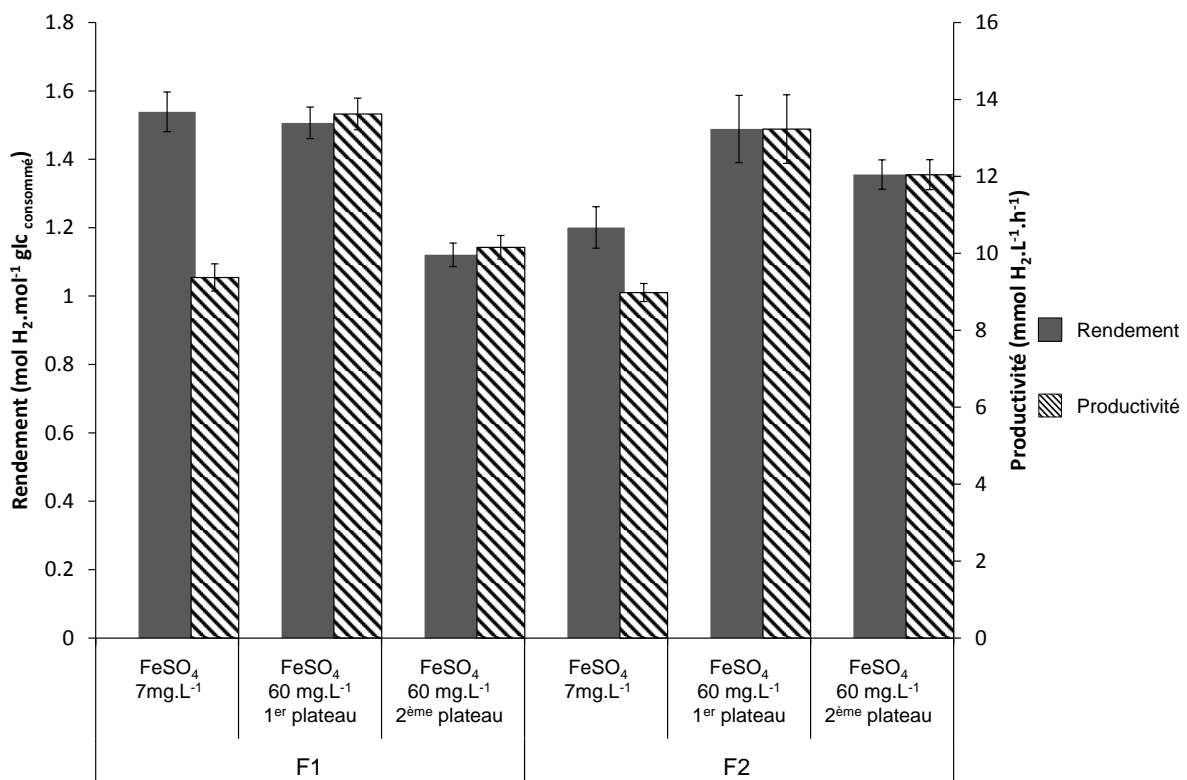


Figure IV-3 : Productivités et rendements de production d'hydrogène des deux fermenteurs continus F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer dans le milieu.

La Figure IV-3 indique qu'initialement, à l'équilibre, les performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2 étaient semblables en termes de productivités ($p > 0,05$; ANOVA) mais différentes en termes de rendements.

L'augmentation de la concentration en FeSO_4 a impacté différemment les rendements en hydrogène de ces deux fermenteurs : dans le cas de F1, aucune différence significative

($p > 0,05$; ANOVA) n'a été observée sur le rendement en hydrogène pour une concentration en FeSO_4 du milieu de 7 mg.L^{-1} et le premier plateau à 60 mg.L^{-1} de FeSO_4 . Néanmoins, le rendement a diminué de manière significative au moment du deuxième plateau en passant de $1,54$ à $1,12 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glc}_{\text{consommé}}$.

Pour le fermenteur F2, les rendements de production d'hydrogène du premier et deuxième plateau après augmentation de la concentration en FeSO_4 ont été significativement supérieurs aux performances à faible concentration en FeSO_4 . Ainsi, le rendement en hydrogène est passé de $1,2 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glc}_{\text{consommé}}$ lorsque la concentration en FeSO_4 était de 7 mg.L^{-1} à $1,49$ et $1,36 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glc}_{\text{consommé}}$ pour le premier et deuxième plateau à 60 mg.L^{-1} de FeSO_4 .

La productivité en hydrogène des deux fermenteurs a également évolué différemment après augmentation de la concentration en sulfate de fer. La productivité de F1 a augmenté de manière significative après augmentation de la concentration en FeSO_4 en passant de $9,37$ à $13,62 \text{ mmol H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Elle a rediminué ensuite jusqu'à l'obtention d'un deuxième plateau pour atteindre des valeurs similaires au premier équilibre avec $10,16 \text{ mmol H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Dans le cas de F2, la productivité est passée respectivement de $9,34$ à $13,23$ puis à $12,05 \text{ mmol H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

IV.5.2 METABOLISME DES DEUX ECOSYSTEMES

Afin de vérifier que tous les métabolites produits ont été quantifiés, des bilans DCO ont été réalisés pour chaque fermenteur à l'équilibre (Figure IV-4). En considérant toutes les sorties du fermenteur (biomasse, gaz et liquide), la DCO sortante est égale, en moyenne, à 97% ($\pm 6\%$) de la DCO entrante. Ceci confirme que les analyses des métabolites des différentes cultures ont été complètes et qu'aucun métabolite ne manquait. Les résultats de la Figure IV-4 montrent également que la concentration en FeSO_4 était initialement limitante dans les deux fermenteurs puisqu'aucune trace de glucose résiduel n'a été retrouvée en sortie des fermenteurs après augmentation de la concentration en FeSO_4 .

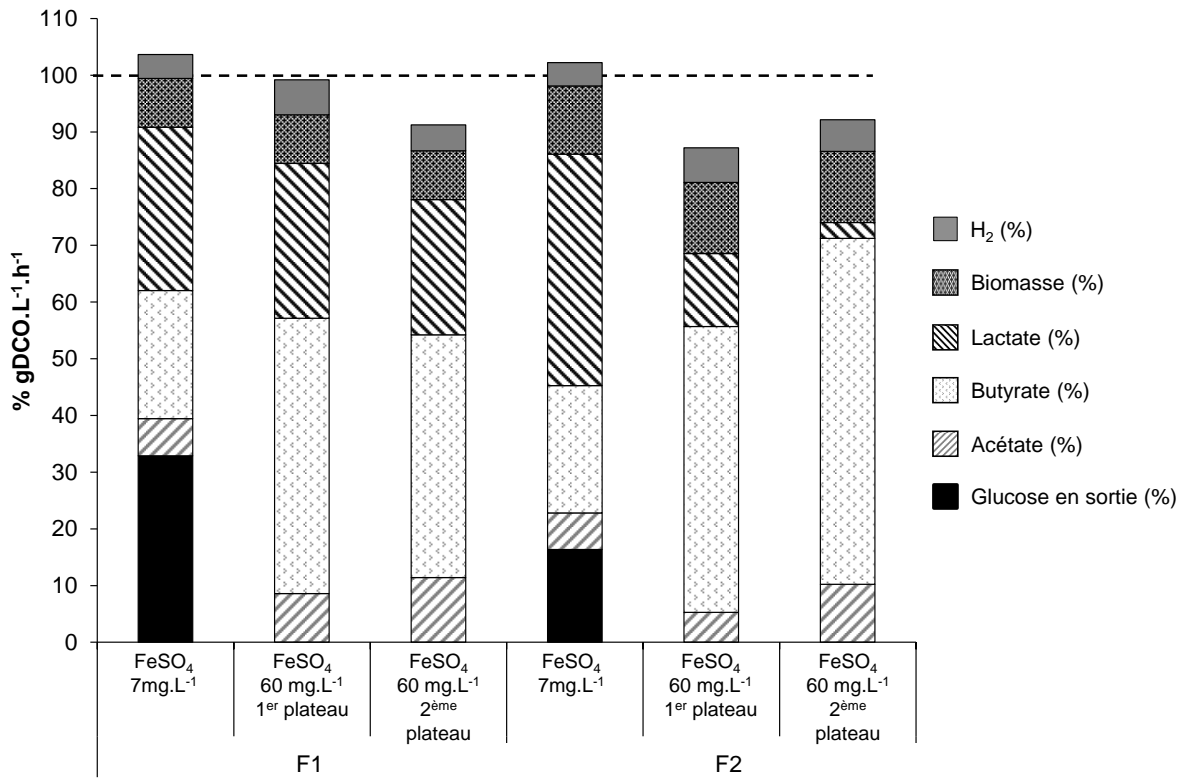


Figure IV-4 : Bilan DCO des fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer.

La Figure IV-5 présente la distribution des métabolites produits pour les deux fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer ainsi que la production d'hydrogène associée.

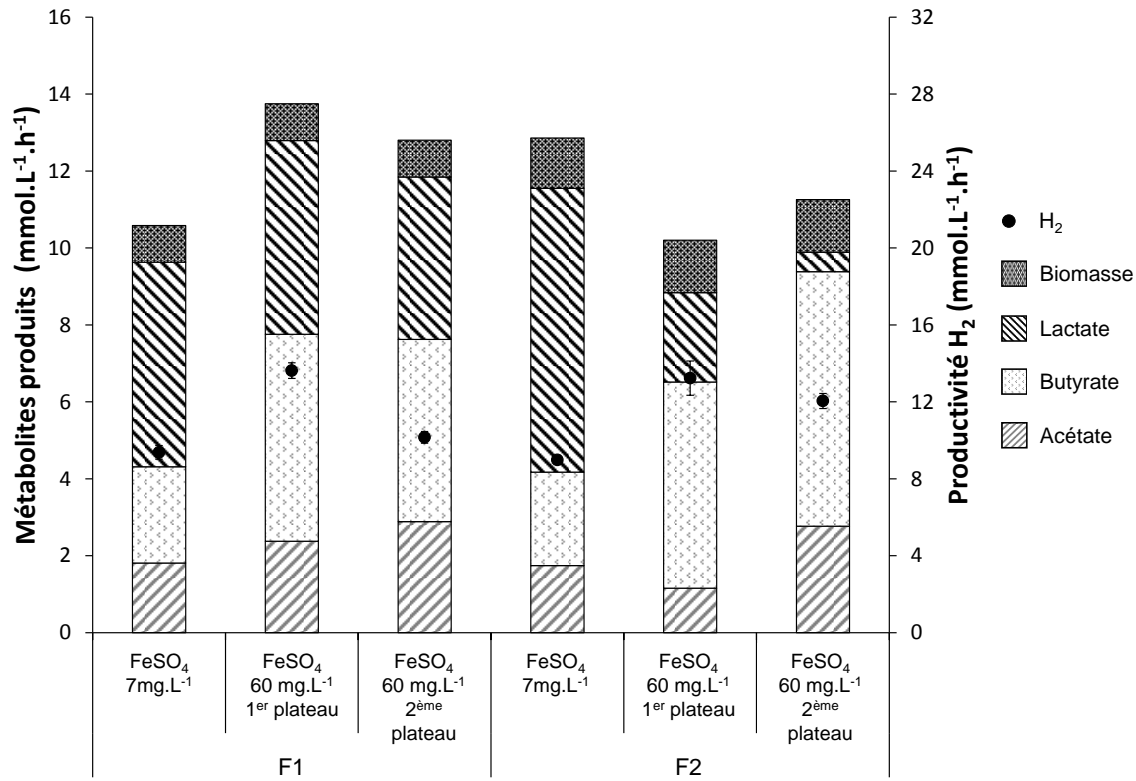


Figure IV-5 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en $H_2 = 2 (Ac + Bu)$).

Comme le montre la Figure IV-5, l'acétate, le butyrate et le lactate sont les trois seuls métabolites produits par les deux fermenteurs et ce, quelle que soit la concentration en $FeSO_4$ du milieu. Aucune production d'éthanol, de butanol ou d'acétone n'est apparue après augmentation de la concentration en $FeSO_4$, le sulfate de fer n'a donc eu aucun effet sur la solvantogénèse.

A l'équilibre et avant augmentation de la concentration en $FeSO_4$, la production d'acétate et de butyrate des deux fermenteurs étaient proches avec $1,81 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ d'acétate et $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de butyrate pour F1 contre $1,75$ et $2,43 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour F2. Une plus forte production de lactate a été observée pour F2 avec $7,37 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ contre $5,32 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour F1.

L'augmentation de la concentration en $Fe SO_4$ a engendré des comportements différents entre les deux fermenteurs. La production d'acétate et de butyrate de F1 a augmenté de manière significative après le passage à 60 mg.L^{-1} de $FeSO_4$ dans le milieu. Ainsi, les concentrations

en acétate et en butyrate sont passées de 1,81 à 2,38 mmol.L⁻¹.h⁻¹ pour l'acétate et de 2,5 à 5,38 mmol.L⁻¹.h⁻¹ pour le butyrate. Ensuite, lors du passage du premier au deuxième plateau, la concentration en butyrate a légèrement diminuée pour atteindre 4,74 mmol.L⁻¹.h⁻¹ alors que la concentration en acétate a continué à augmenter jusqu'à 2,9 mmol.L⁻¹.h⁻¹. Parallèlement, la production de lactate n'a que peu évolué au cours du temps avec respectivement 5,32 ; 4,66 et 5,04 mmol.L⁻¹.h⁻¹.

Dans le cas du fermenteur F2, la production d'acétate a commencé par diminuer après enrichissement du milieu en FeSO₄ avant de réaugmenter de nouveau au niveau du deuxième plateau. La concentration en acétate dans F2 est ainsi passé de 1,75 à 1,16 puis à 2,77 mmol.L⁻¹.h⁻¹. La production de butyrate quant à elle n'a pas cessé d'augmenter d'une étape à l'autre en passant de 2,43 à 5,36 puis à 6,61 mmol.L⁻¹.h⁻¹. A contrario, la production de lactate a fortement diminué au cours du temps avec respectivement 7,37 ; 2,32 et 0,51 mmol.L⁻¹.h⁻¹.

Pour les deux fermenteurs, les performances de production d'hydrogène semblent donc être liées aux voies acétate et butyrate, mais le passage du premier plateau au deuxième plateau semble activer des voies de consommation d'hydrogène avec un ratio H₂ produit / [2 (Ac + Bu)] qui est proche de 1 pour le premier plateau des deux fermenteurs (0,9 pour F1 et 1 pour F2) et qui passe dans les deux cas à 0,65 au niveau du deuxième plateau.

L'évolution du pourcentage molaire des différents métabolites et de la biomasse des deux fermenteurs F1 et F2 est présentée Figure IV-6. Cette figure permet d'évaluer l'impact sur la distribution des voies métaboliques suite à l'augmentation de la concentration en sulfate de fer.

Dans le cas de F1, une augmentation de la voie butyrate, qui passe de 23 à 39 %, est observée après l'augmentation de la concentration en FeSO₄ et ce, au dépend de la voie lactate qui passe de 50 à 36 %. La voie acétate est restée constante par ailleurs. Le passage du premier au deuxième plateau a engendré une légère augmentation du flux d'acétate qui passe de 17 à 22 % et une diminution de la voie lactate qui passe de 36 à 32 %.

Pour F2, l'augmentation de la concentration en FeSO₄ a majoritairement influencé la voie butyrate et la voie lactate avec une part de butyrate qui passe de 18 à 52 % puis à 59 % alors que le pourcentage de lactate passait de 58 à 22% puis à 4 %. Parallèlement, la voie acétate

augmentait essentiellement lors du passage du premier au deuxième plateau (de 11 à 24 %) alors que dans un premier temps elle était restée constante.

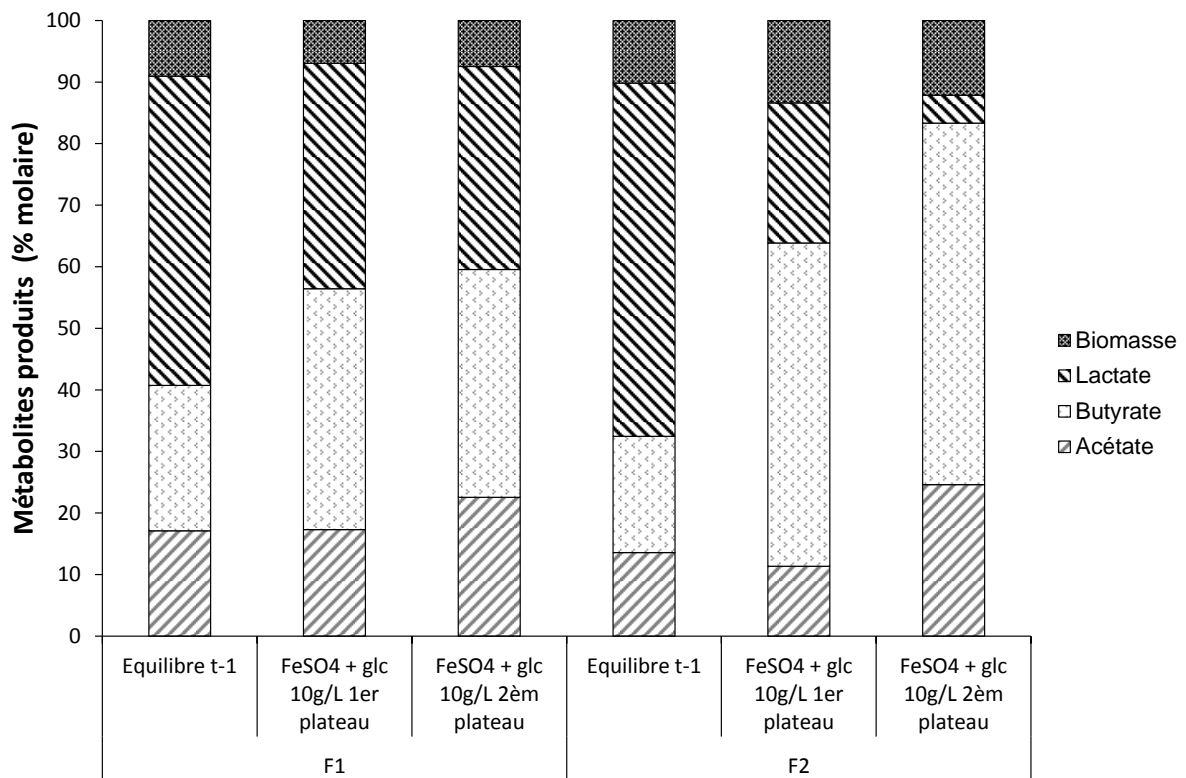


Figure IV-6 : Pourcentage molaire des différents métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après augmentation de la concentration en sulfate de fer.

IV.5.3 DYNAMIQUE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DES DEUX FERMENTEURS F1 ET F2.

De manière à visualiser l'influence de l'augmentation de la concentration en sulfate de fer sur la structure des communautés microbiennes de F1 et F2, des profils de CE-SSCP ont été effectués avant et après supplémentation en FeSO₄ (Figure IV-7).

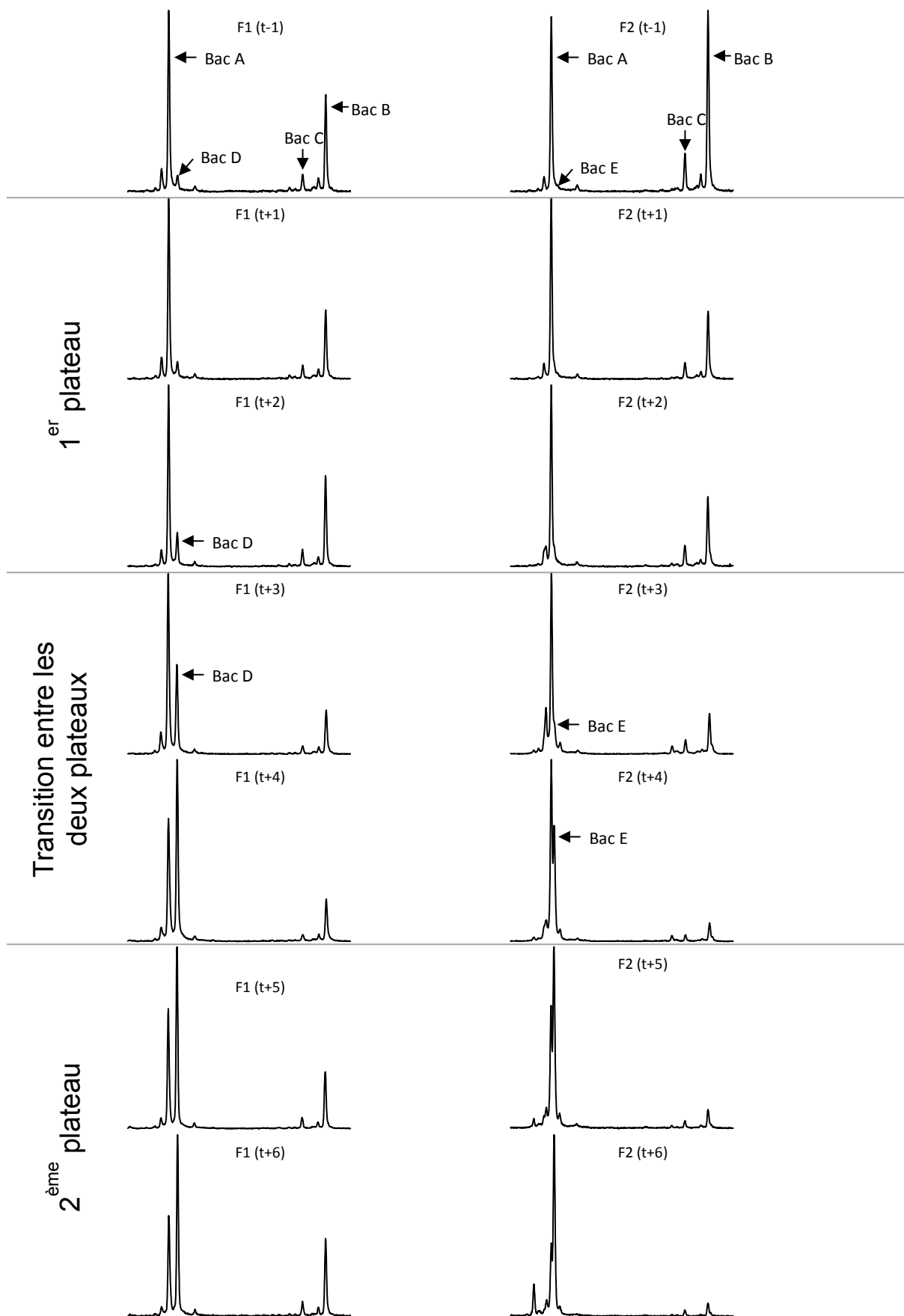


Figure IV-7 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 juste avant l'augmentation de la concentration en FeSO_4 (t-1), puis de un (t+1) à six (t+6) jours après. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics. L'affiliation phylogénétique des pics des profils de CE-SSCP par pyroséquençage est donnée dans le Tableau IV-1

L'observation des profils de CE-SSCP indique qu'à l'équilibre et avant augmentation de la concentration en sulfate de fer du milieu, les espèces présentes dans les deux fermenteurs ainsi que la structure globale de la communauté microbienne étaient identiques, avec toutefois une différence d'abondance relative. Alors que Bac A, Bac B et Bac C sont retrouvées dans les deux cultures, Bac A et Bac B co-dominent l'écosystème de F2 avec Bac C en proportion minoritaire, et F1 est dominé par Bac A, Bac B et Bac C étant retrouvées dans des proportions moins importantes.

Un jour après le passage de 7 à 60 mg.L⁻¹ de FeSO₄, la communauté microbienne de F1 n'a pas changée alors que pour F2 les espèces présentes sont restées les mêmes mais les abondances relatives de Bac B ont été divisées d'un facteur 2. A t+2 jours, l'abondance relative de Bac D commence à croître au sein de l'écosystème du fermenteur F1. L'abondance de Bac D augmente ainsi progressivement au cours des jours jusqu'à ce qu'elle domine la culture F1 à t+4, ce qui correspond au deuxième plateau de la production d'hydrogène de F1. Ensuite, aucune évolution de la communauté microbienne de F1 n'a été observée.

Dans le cas de F2, Bac E a également fait son apparition sur les profils de CE-SSCP de la culture mais à t+3 jours. Des analyses par pyroséquençage, effectuées en parallèle des analyses de CE-SSCP, montrent que Bac E était déjà présente à t-1 mais dans des proportions trop faibles pour être visible en CE-SSCP (0,05%). A partir de t+3 jours, Bac E croît de manière progressive au sein de l'écosystème jusqu'à dominer ce dernier à t+5, moment où la production d'hydrogène de F2 se restabilise au niveau du deuxième plateau. Parallèlement à la croissance de Bac E, Bac B semble inhibée et son abondance relative diminue au cours du temps. Au final (à t+6), son abondance relative aura été divisée par 10 par rapport à t-1.

Les analyses par pyroséquençage ont été effectuées en parallèle des analyses de CE-SSCP sur 4 échantillons (2 de F1 et 2 de F2). La comparaison des abondances relatives des pics des profils de CE-SSCP avec l'abondance des différentes espèces identifiées par pyroséquençage a permis d'affilier les pics de CE-SSCP à une espèce bactérienne (Tableau IV-1). De cette manière Bac A, Bac D et Bac E ont été affiliés à des espèces du genre *Clostridium* sp. : *Clostridium acidisoli* avec 96 % de similarité pour Bac A, *Clostridium proteolyticum* (93 % de similarité) pour Bac D et *Clostridium butyricum* (99% de similarité) pour Bac E. Bac B a été assigné à *Sporolactobacillus laevolacticus* avec 98% de similarité. Enfin Bac C a pu être affilié à *Bacillus thuringiensis* avec 98% de similarité.

Tableau IV-1 : Affiliation phylogénétique des pics des profils de CE-SSCP fourni à partir des analyses de pyroséquençage. Le pourcentage de similarité des séquences par rapport aux espèces identifiées est également fourni.

Dénomination des pics	Affiliation proche de	Similarité des séquences (%)
Bac A	<i>Clostridium acidisoli</i>	96
Bac B	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	98
Bac C	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98
Bac D	<i>Clostridium proteolyticum</i>	93
Bac E	<i>Clostridium butyricum</i>	99

Il est intéressant de noter que *Clostridium acidisoli*, qui est majoritaire lorsque le sulfate de fer est limitant, est phylogénétiquement très proche de *Clostridium pasteurianum* (Kuhner *et al.*, 2000). Or *Clostridium pasteurianum* a été retrouvé 6 fois sur 7 lors de nos expérimentations du chapitre précédent alors que le milieu était carencé en sulfate de fer. Ceci suggère une affinité particulièrement forte de ces deux espèces avec le fer.

IV.5.4 DISCUSSION

Beaucoup d'études ont déjà montré que l'augmentation de la concentration en sulfate de fer engendrait une augmentation des performances de production d'hydrogène jusqu'à une certaine mesure (Lee *et al.*, 2001 ; Yang & Shen, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006c ; Aceves-Lara *et al.*, 2008b ; Lee *et al.*, 2008). Malgré cela, à ce jour, peu d'études ont fait le lien entre les changements de performances observées et d'éventuels changements des populations microbiennes. Karadag et Puhakka (2010b) ont observé, comme dans notre étude, qu'une augmentation de la concentration en fer du milieu provoquait une augmentation du rendement en hydrogène de la culture. Cette augmentation du rendement a été attribuée à un changement du métabolisme de la culture et notamment une sous-expression de la voie éthanol alors que la voie du butyrate était surexprimée. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans cette étude, aucun changement majeur de la communauté microbienne présente dans le fermenteur n'a été relevé. Des résultats similaires avaient également été rapportés par Koskinen *et al.* (2008).

Dans notre étude, l'augmentation de la concentration en sulfate de fer a modifié significativement la structure de la communauté microbienne préalablement stable des deux

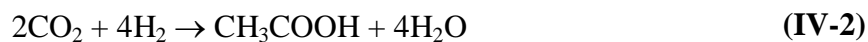
fermenteurs. Ces changements de structure ont entraîné des changements au niveau du métabolisme global de l'écosystème et donc au niveau des performances de production d'hydrogène. Néanmoins, alors que les communautés de départ des deux fermenteurs pouvaient paraître proches, le changement de conditions a conduit à deux comportements totalement différents tant au niveau populationnel que fonctionnel. Le lien structure – fonction reste valable dans les deux cas.

Ainsi, à l'équilibre et avant l'augmentation de la concentration en sulfate de fer dans le milieu, la structure des communautés microbiennes des deux fermenteurs F1 et F2 étaient proches. Dans les deux cas, *Clostridium acidisoli* est retrouvée en proportion majoritaire. Or *C. acidisoli* est connue pour produire de l'hydrogène par voie fermentaire via les voies acétate et butyrate (Kuhner *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2006b ; Sun *et al.*, 2010). De même, *Bacillus thuringiensis*, retrouvée en proportion minoritaire dans les deux cultures est capable de produire de l'hydrogène par voie fermentaire (Porwal *et al.*, 2008 ; Patel *et al.*, 2010). La présence de ces deux espèces dans les deux fermenteurs et dans des proportions proches explique en partie que les productivités en hydrogène de F1 et de F2 soient similaires ($p > 0,05$; t-test). Cependant, les rendements en hydrogène par mole de glucose consommé des deux fermenteurs sont différents, le rendement de F2 étant significativement inférieur à celui de F1. Cette différence est due à la proportion de glucose consommée par les deux cultures. En effet, F2 consomme plus de glucose que F1 (Figure IV-4, page 149) et le surplus de glucose consommé est converti par *Sporolactobacillus laevolacticus* en lactate sans production d'hydrogène associée (Equation IV-1). En effet, *Sporolactobacillus laevolacticus* est une bactérie homolactique, souvent retrouvée dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène et qui ne produit que du lactate à partir du glucose (Andersch *et al.*, 1994 ; Hatayama *et al.*, 2006 ; Barros *et al.*, 2011). Or l'abondance relative de *Sporolactobacillus laevolacticus* est 2,7 fois supérieure dans F2 que dans F1 d'où la plus grande quantité de lactate produite dans ce fermenteur.



Ces résultats sont en complète adéquation avec ceux du chapitre précédent sur le lien entre la structure de la communauté microbienne et les performances de production d'hydrogène. Les changements de communautés microbiennes dus à l'augmentation de la concentration en fer dans le milieu confirment ce résultat.

En effet, le passage de 7 à 60 mg.L⁻¹ de sulfate de fer dans le milieu de culture des fermenteurs continus F1 et F2 est accompagné par des modifications des performances et du métabolisme des deux écosystèmes qui sont directement liées aux changements de populations observés. Dans le cas de F1, l'augmentation de la concentration en sulfate de fer va engendrer, dans un premier temps, une augmentation de la productivité 9,37 à 13,62 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ jusqu'à un premier plateau. Ainsi, en levant la limitation en fer du milieu, la totalité du glucose introduit est consommé et converti, en grande partie, en butyrate et en hydrogène, et ceci sans modifier la structure de la communauté microbienne. Cette stabilité populationnelle explique que le rendement en hydrogène reste constant à 1,5 mol H₂.mol⁻¹Glc_{consommé} entre le moment où le sulfate de fer est à 7 mg.L⁻¹ et le premier plateau à 60 mg.L⁻¹. Dans un deuxième temps, alors que les paramètres opératoires n'évoluent plus, une instabilité du débit d'hydrogène produit est observée jusqu'à l'obtention d'un nouvel équilibre ou deuxième plateau à 10,16 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹. Cette instabilité de la productivité en hydrogène des fermenteurs, est vraisemblablement due aux changements des populations microbiennes dans le fermenteur qui va provoquer un changement du métabolisme global de l'écosystème. Ainsi, l'apparition d'une nouvelle espèce majoritaire appartenant au genre *Clostridium* (*Clostridium proteolyticum*) va déstabiliser les performances de ce dernier jusqu'à ce que la population microbienne se stabilise à nouveau et qu'un nouvel équilibre fonctionnel apparaisse. Cependant, lors de ce nouvel équilibre fonctionnel, des voies de consommation d'hydrogène, comme l'homoacétogénèse (Equation IV-2) ou la voie homoacétique (Equation IV-3) sont activées. Ceci est mis en évidence par le calcul du ratio final d'H₂ produit / [2 (Ac + Bu)]. Ce ratio est nettement inférieur à 1 (0,65) lorsque *Clostridium proteolyticum* domine le milieu ; alors qu'il est égal à 1 lorsque *Clostridium acidisoli* est la seule *Clostridium* majoritaire de l'écosystème. *Clostridium proteolyticum* a déjà été retrouvée dans des écosystèmes producteurs d'hydrogène (Kim *et al.*, 2006a). Elle a alors été identifiée comme productrice d'hydrogène à partir de carbohydrate. Or Jain & Zeikus (1988), lors de l'étude métabolique de *Clostridium proteolyticum*, précisent que cette dernière ne fermente pas les carbohydrates simples mais plutôt des éléments protéiques et produit en majorité de l'acétate et du CO₂. Ceci, en complément de nos résultats, suggère que *Clostridium proteolyticum* est une bactérie homoacétogène. Il est également possible que l'affiliation de *Clostridium proteolyticum* avec seulement 93% de similarité ne soit pas correcte et que Bac D soit en réalité une nouvelle espèce de *Clostridium* homoacétogène non encore identifiée.



Comme pour F1 le passage, pour F2, de 7 à 60 mg.L⁻¹ de sulfate de fer va commencer par provoquer une augmentation de la productivité d'hydrogène. Mais cette fois, l'augmentation de la concentration en FeSO₄ a immédiatement provoqué un changement de la structure de la communauté microbienne avec la diminution de l'abondance relative de *Sporolactobacillus laevolacticus* (Figure IV-7). Cette diminution est à l'origine de la forte diminution de lactate et donc de l'augmentation du rendement en hydrogène. Ensuite, et comme pour F1, le débit d'hydrogène produit par F2 va évoluer au cours du temps. Mais cette fois, la productivité va passer par un minimum avant de remonter et de se re-stabiliser au même niveau que précédemment (Figure IV-2). Cette transition entre les deux états d'équilibre est totalement différente de celle observée pour F1. Il est possible que pour F2 le changement populationnel, avec l'apparition de *Clostridium butyricum* en tant qu'espèce majoritaire et la diminution de l'abondance relative de *Sporolactobacillus laevolacticus*, ai engendré un changement des interactions au sein de l'écosystème. Ainsi, dans un premier temps la compétition entre les deux *Clostridium* sp. a engendré la diminution de la productivité en hydrogène et la perte de la compétition par *Sporolactobacillus laevolacticus* a provoqué la remontée du débit d'hydrogène. Ce dernier n'étant plus en compétition avec les espèces du genre *Clostridium*, le glucose peut être redirigé vers la production d'hydrogène via les voies acétate et butyrate. Dans tous les cas, il semblerait que nouvelles interactions se soient mises en place, *Sporolactobacillus laevolacticus* n'étant pas totalement lessivés du fermenteur.

IV.6 EFFET DE L'AUGMENTATION DE LA CHARGE EN SUBSTRAT CARBONE

Dans la littérature, l'effet de la charge en substrat carboné est très étudié afin de déterminer la faisabilité économique et technique de la production d'hydrogène par voie fermentaire à l'échelle industrielle (Luo *et al.*, 2008 ; Akutsu *et al.*, 2009 ; Lay *et al.*, 2010a ; Lin *et al.*, 2011b). Suite à l'augmentation de la concentration en sulfate de fer, tout le glucose présent dans le milieu a été consommé. Ce dernier est alors devenu le facteur limitant de l'activité microbienne. L'augmentation de la charge en glucose était donc la prochaine étape pour tenter de modifier à nouveau la structure des communautés microbiennes. En plus de la concentration de 10 g.L⁻¹ initiale, des concentrations de 15, 20 et 50 g.L⁻¹ de glucose ont alors été expérimentées. Ainsi, l'effet de la dynamique des populations sur le métabolisme global de l'écosystème et plus particulièrement sur les performances de production d'hydrogène a pu être testé.

IV.6.1 PRODUCTIVITES ET RENDEMENTS EN HYDROGENE DES DEUX FERMENTEURS

Les performances de production d'hydrogène ont été mesurées pour les deux fermenteurs F1 et F2, aussi bien en termes de productivité que de rendement (Y) pour les différentes concentrations en glucose dans le milieu (Figure IV-8).

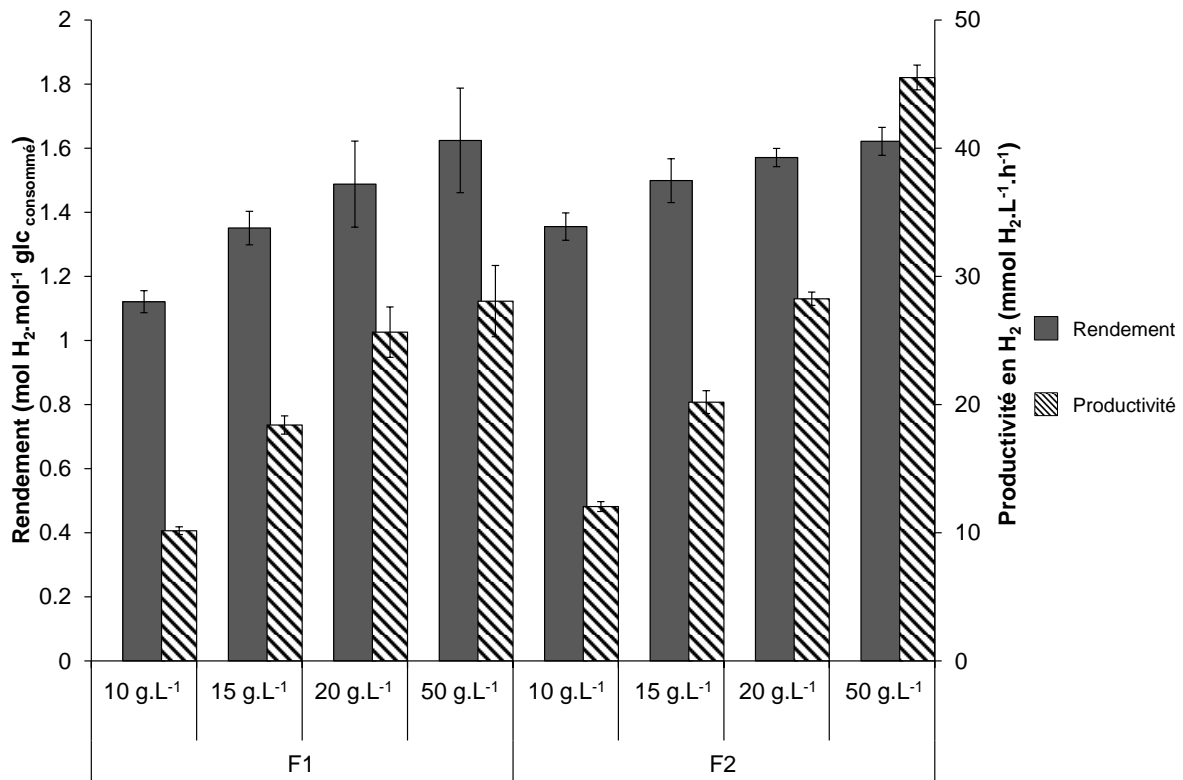


Figure IV-8 : Performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2 à différentes concentrations de glucose.

Le passage de 10 à 15 g.L⁻¹ de glucose a permis d'augmenter les performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs de manière significative. Ainsi la productivité et le rendement en hydrogène de F1 sont passés respectivement de 10,16 à 18,4 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ et de 1,12 à 1,35 mol H₂. mol⁻¹Glc_{consommé}. La productivité a été ainsi multipliée d'un facteur 1,8 et le rendement de 1,2. La productivité de F2 a également été multipliée par 1,6 et le rendement par 1,1.

De la même manière, la productivité des deux fermenteurs a augmenté de manière significative après augmentation de la concentration en glucose à 20 g.L⁻¹ avec un passage de 18,4 à 25,64 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ pour F1 et de 20,19 à 28,26 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ pour F2. Néanmoins, le rendement en hydrogène n'a plus augmenté de manière significative ($p > 0,05$; ANOVA).

A 15 et 20 g.L⁻¹ de glucose, il n'y a pas de différence significative entre F1 et F2 en termes de performances.

Ensuite, pour le fermenteur F1 la productivité et le rendement en hydrogène n'augmente plus de manière significative lorsque la concentration en glucose passe de 20 à 50 g.L⁻¹.

Pour F2, un effet significatif sur la productivité est observé lors du passage de 20 à 50 g.L⁻¹ de glucose dans le milieu. En effet, la productivité en hydrogène est alors augmentée d'un facteur 1,6. Cependant aucun effet significatif sur le rendement n'a pu être mesuré.

Pour les deux fermenteurs, l'augmentation de la productivité observée jusqu'à 20 g.L⁻¹ est proportionnelle à l'augmentation de la charge. A 50 g.L⁻¹ le débit de production d'hydrogène des deux cultures semblent saturer (Figure IV-9).

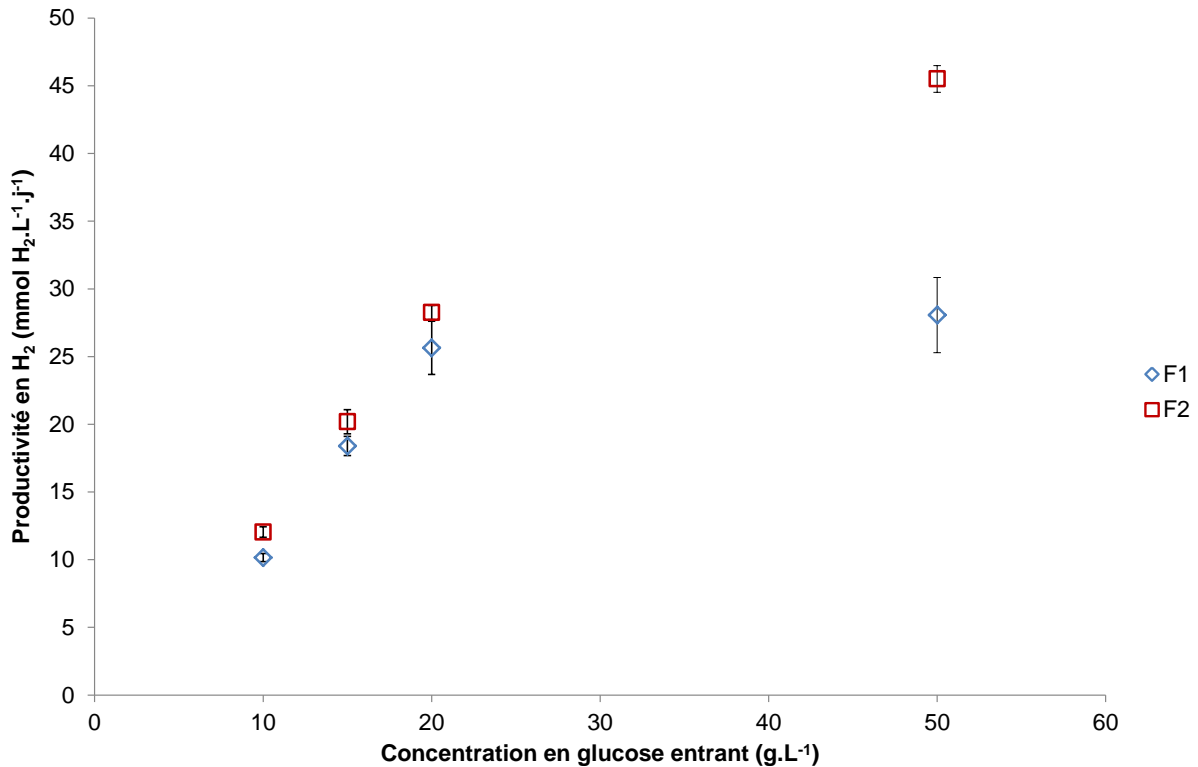


Figure IV-9 : Proportionnalité entre la productivité en hydrogène de F1 et F2 et la concentration en glucose

IV.6.2 METABOLISME GLOBAL DES DEUX ECOSYSTEMES

Afin de vérifier que tous les métabolites produits ont bien été quantifiés, le bilan DCO de chaque fermenteur à l'équilibre a été effectué (Figure IV-10). En considérant toutes les sorties du fermenteur (biomasse, gaz et liquide), le bilan DCO sortant est en moyenne 10 % inférieure à la DCO entrante, et ce pour les deux fermenteurs et pour des concentrations en glucose de 10 et 50 g.L⁻¹. Ceci pourrait être dû aux importantes quantités d'exopolysaccharides (EPS) produites après l'augmentation de la concentration en sulfate de fer et qui ne sont pas prises en compte dans le bilan DCO.

Les résultats de la Figure IV-10 montrent également un comportement différent des deux fermenteurs vis-à-vis de la dégradation du glucose. En effet, pour F2 un autre composé du milieu devient limitant à 50 g.L^{-1} car à cette concentration, tout le glucose n'est pas dégradé. Dans le cas de F1, ce phénomène commence dès 15 g.L^{-1} avec 0,6% de la DCO sortante retrouvée sous forme de glucose. De plus, même à 50 g.L^{-1} la quantité de glucose dégradé n'est pas la même pour les deux fermenteurs, alors que F1 ne dégrade que 37,7 % du glucose entrant, F2 en dégrade 62,2 %.

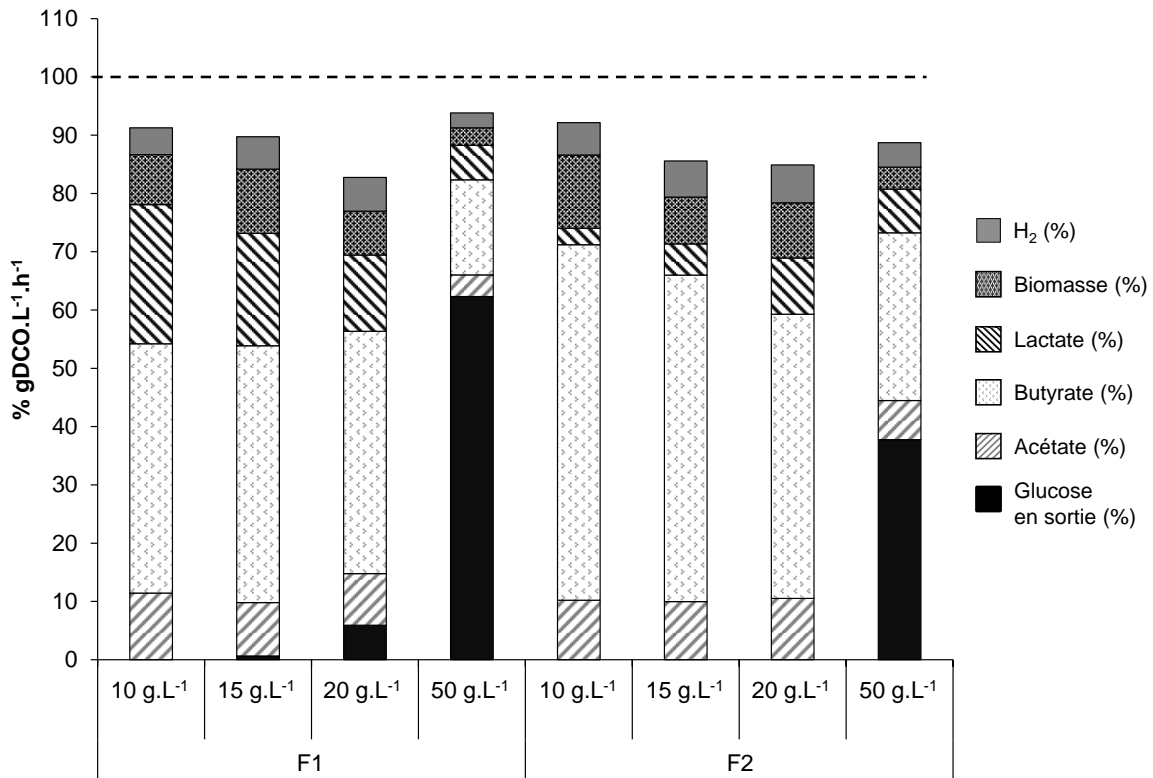


Figure IV-10 : Bilan DCO des fermenteurs F1 et F2 lors de la montée en charge en glucose.

La Figure IV-11 présente la distribution des métabolites produits pour les deux fermenteurs F1 et F2 lors de la montée en charge en glucose ainsi que la production d'hydrogène associée.

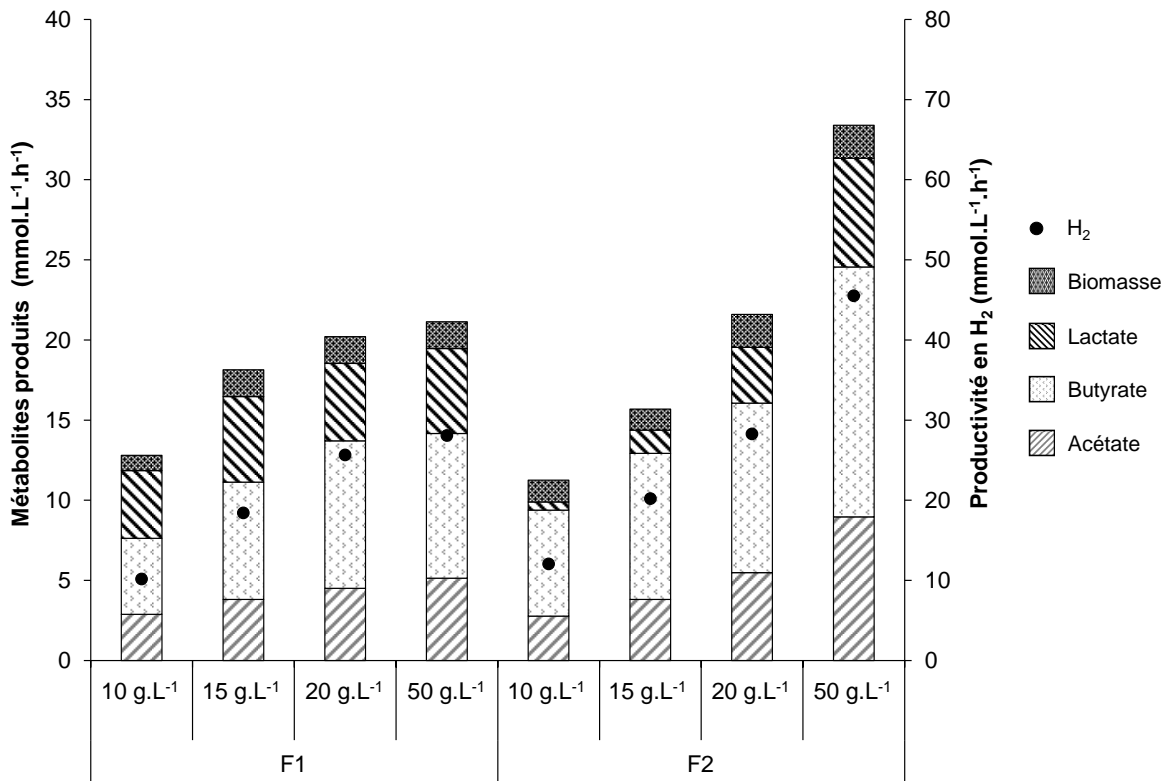


Figure IV-11 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 lors de la montée en charge en glucose. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

L'acétate, le butyrate et le lactate sont les trois seuls métabolites produits par les deux fermenteurs et ce, quelle que soit la concentration en glucose du milieu.

Dans le cas du fermenteur F1, la production de ces différents métabolites augmente de manière significative entre les deux équilibres à 10 et 15 g.L⁻¹ de glucose puisque la concentration en butyrate a été multipliée par un facteur 1,5 alors que les concentrations en acétate et en lactate ont été multipliées par 1,3. Cette augmentation de production de métabolites est du même ordre de grandeur que l'augmentation de la concentration en glucose d'un facteur 1,5. De la même manière, le passage de 15 à 20 g.L⁻¹ de glucose a entraîné une augmentation de la production d'acétate et de butyrate de 1,2 mais la production de lactate est restée identique. A partir de 50 grammes de glucose par litre de milieu, le système, carencé par un autre élément que le glucose (vraisemblablement le sulfate de fer à nouveau), n'a plus augmenté de manière significative sa production de métabolite.

Pour F2, l'augmentation de la charge a entraîné une augmentation systématique de la concentration de l'ensemble des métabolites produits. Le ratio acétate sur butyrate a augmenté également en fonction de la charge en glucose indiquant que le métabolisme de la culture a été dévié vers la voie acétate. En effet, ce ratio est égal à 0,42 pour des concentrations en glucose de 10 et 15 g.L⁻¹ puis passe à 0,51 et 0,57 pour 20 et 50 de glucose. Quant à la production de lactate, elle a doublé de façon systématique entre 10 et 50 g.L⁻¹. La concentration en biomasse a augmentée également en fonction de la concentration en glucose passant de 1,3 g.L⁻¹ pour 10 et 15g.L⁻¹ à 2,1 g.L⁻¹ pour 20 et 50 g.L⁻¹.

IV.6.3 DYNAMIQUE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES DEUX FERMENTEURS F1 ET F2 LORS DE L'AUGMENTATION DE LA CHARGE APPLIQUEE

Afin d'étudier l'influence de l'augmentation de la concentration en glucose sur la structure des communautés microbiennes des fermenteurs F1 et F2, des profils de CE-SSCP ont été réalisés pour chaque concentration en glucose (Figure IV-12).

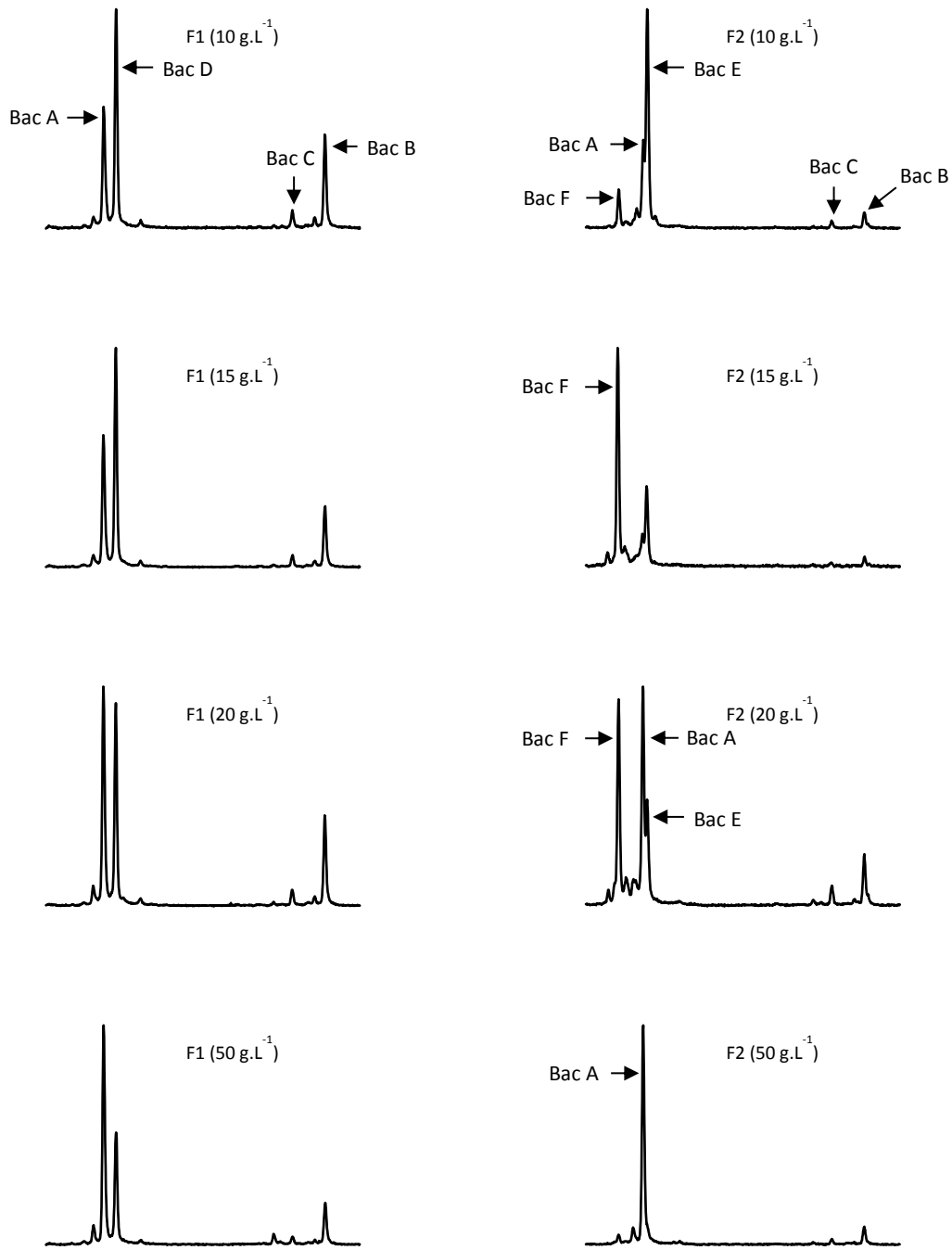


Figure IV-12 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 à différentes concentrations en glucose. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

Dans le cas du fermenteur F1, l'augmentation de la concentration en glucose a eu peu d'effet sur la nature des espèces sélectionnées. En effet, quelle que soit la concentration en glucose, l'écosystème était composé des quatre mêmes espèces : Bac A, Bac B, Bac C et Bac D (identiques à celles de l'étude précédente sur le sulfate de fer). Néanmoins, l'abondance relative de ces espèces a différé en fonction de la concentration en glucose et particulièrement celle de Bac A et Bac D, respectivement *Clostridium proteolyticum* (93 % de similarité) et *Clostridium butyricum* (99% de similarité). A partir de 20 g.L⁻¹ le substrat n'est plus limitant et Bac A semble remporter à nouveau la compétition aux dépens de Bac D et redevient l'espèce majoritaire de l'écosystème.

Pour Bac B et Bac C, qui pour rappel appartiennent respectivement aux genres *Sporolactobacillus* et *Bacillus*, aucune évolution significative de leur abondance relative n'est observée jusqu'à 20 g.L⁻¹. A partir de 50 g.L⁻¹, l'abondance de Bac B diminue pour passer de 15 % à 9 %.

Dans le cas de F2, l'augmentation de la concentration du glucose semble avoir des effets beaucoup plus importants sur la communauté microbienne sélectionnée. Ainsi, lors du passage à 15 g.L⁻¹, une nouvelle espèce (Bac F) vient dominer l'écosystème aux dépens de Bac A et Bac E qui semblent perdre la compétition avec Bac F. Dès le passage à 20 g.L⁻¹, Bac A reprend le dessus sur les deux autres espèces et co-domine l'écosystème avec Bac F. Cette tendance se confirme à 50 g.L⁻¹ où Bac A semble avoir gagné la compétition allant jusqu'à exclure Bac E et Bac F de l'écosystème. Quant aux autres espèces de l'écosystème Bac B et Bac C, elles sont systématiquement présentes en proportion minoritaire tous au long de l'expérimentation.

L'affiliation phylogénétique des pics des profils de CE-SSCP est identique à celle de l'étude précédente (Tableau IV-1, page 155). Aux affiliations du Tableau IV-1 vient se rajouter Bac F qui a été identifié comme *Clostridium akagii* (97% de similarité).

IV.6.4 DISCUSSION

De manière générale, l'augmentation de la charge appliquée dans les fermenteurs engendre des modifications des performances de production d'hydrogène et du métabolisme global de l'écosystème. Ce phénomène a déjà été observée dans la littérature par de nombreux auteurs (Kim *et al.*, 2006b ; Luo *et al.*, 2008 ; Akutsu *et al.*, 2009 ; Lay *et al.*, 2010a ; Lin *et al.*,

2011b ; Mariakakis *et al.*, 2012). Cependant, peu d'étude ont fait le lien entre les différences fonctionnelles observées et les populations microbiennes présentes dans les écosystèmes.

D'un point de vue populationnel, les résultats de notre étude montrent que l'augmentation de la concentration en glucose entre 10 et 50 g.L⁻¹ influence peu les espèces minoritaires du genre *Sporolactobacillus* sp. et *Bacillus* sp. En effet, *Sporolactobacillus laevolacticus* et *Bacillus thuringiensis* sont présentes dans les deux fermenteurs quels que soient les concentrations en substrat et leurs abondances relatives varient peu au cours du temps même si elles ont tendance à diminuer pour de fortes concentrations en glucose. Ceci suggère qu'il existe des interactions fortes au sein de l'écosystème qui empêchent le lessivage de ces espèces minoritaires selon le principe d'exclusion compétitive et que ces interactions sont peu influencées par l'augmentation de la charge. Ces résultats vont à l'encontre de ceux retrouvés par Luo *et al.* (2008). En effet, lors d'une étude en continu sur l'effet de la charge organique sur la composition d'une communauté microbienne productrice d'hydrogène, Luo *et al.* ont montré que les fortes concentrations en substrat favorisaient les espèces du genre *Clostridium* sp et que les espèces minoritaires, qui appartenaient au genre *Selenomonas* sp., étaient lessivés lorsque la charge appliquée augmentait.

Comme le montrent Kim *et al.* (2006b) et Luo *et al.* (2008), l'augmentation de la concentration en glucose a beaucoup d'influence sur les espèces du genre *Clostridium* sp. Quand le substrat est limitant, plusieurs espèces de *Clostridium* co-dominent l'écosystème : *Clostridium proteolyticum* et *Clostridium acidisoli* pour F1 et *Clostridium acidisoli*, *Clostridium butyricum* et *Clostridium akagii* pour F2. Néanmoins dès que le substrat n'est plus limitant (à partir de 20 g.L⁻¹ pour F1 et à 50 g.L⁻¹ pour F2) et que le milieu redevient carencé en un autre élément, *Clostridium acidisoli* reprend le dessus sur les autres espèces et ce dans les deux écosystèmes. Ainsi, cette espèce semble avoir une plus grande affinité avec le fer.

Ces changements populationnels, notamment au niveau des *Clostridium*, sont en lien direct avec les changements fonctionnels observés. Les résultats de notre étude montrent que l'augmentation de la concentration en glucose de 10 à 20 g.L⁻¹ entraîne une augmentation graduelle et significative des performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2. Des résultats similaires ont été rapportés par Kim *et al.* (2006b) lorsqu'ils ont étudié l'effet de la concentration en substrat sur la production d'hydrogène. A l'inverse, d'autres études ont montré une relation négative entre le rendement en hydrogène et la concentration

en hexose (Akutsu *et al.*, 2009 ; Wang & Wan, 2008d ; Lay *et al.*, 2010a). Dans ces études, l'augmentation de la concentration en glucose entraîne une surproduction de métabolites non associés à la production d'hydrogène tel que le formiate, l'éthanol ou le lactate. Dans notre cas, quel que soit sa concentration initiale, le glucose est transformé majoritairement en hydrogène via les voies acétate et butyrate, ce qui explique qu'entre 10 et 20 g.L⁻¹, la productivité en hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2 augmente proportionnellement à la concentration en glucose. Parallèlement à l'augmentation de la productivité, une augmentation du rendement en hydrogène a été observée. Ceci est dû à une diminution des voies consommatrices d'hydrogène tel que l'homoacétogénèse (Equation IV-4) ou la voie homo-acétique (Equation IV-5). En effet, à 10 g.L⁻¹ le ratio H₂ produit / [2 (Ac + Bu)] est de 0,65 ce qui signifie que des voies de consommation d'hydrogène sont actives au sein des écosystèmes. Ce ratio passe à 0,8 lorsque la concentration en glucose est de 15 g.L⁻¹ et même à plus de 0,9 pour des concentrations supérieures, et ce pour les deux fermenteurs. Ce changement du métabolisme global des cultures, avec la diminution, voire la disparition des voies consommatrices d'hydrogènes dans le milieu, est directement lié aux populations bactériennes présentes dans les deux écosystèmes.

Dans le cas de F1, la levée de la limitation en sulfate de fer a favorisé l'apparition de *Clostridium proteolyticum* (Bac D), suspectée d'être homoacétogène (Cf. paragraphe IV.5.4). L'augmentation de la charge a provoqué une diminution de son abondance relative. L'homoacétogénèse était alors moins forte avec moins d'acétate dans le milieu et un rapport (acétate / butyrate) diminuant. Le même phénomène a été observé par Kim *et al.* (2006b). A 10 g DCO.L⁻¹ les auteurs ont en effet retrouvés une bactérie acétogène consommatrice d'hydrogène (*Clostridium scatologenes*). L'augmentation de la concentration en saccharose a alors provoqué une diminution de son abondance relative et à 30 g DCO.L⁻¹ *Clostridium scatologenes* n'était plus retrouvé dans le milieu. Parallèlement, les auteurs ont observé que le rapport (acétate / butyrate) diminuait.

Dans le cas de F2, des phénomènes similaires de conversion du glucose en sous-produits non associés à la production d'hydrogène et/ou de consommation d'hydrogène, ont dû également se produire. Cependant, l'identification des espèces de l'écosystème n'a pas permis de ressortir une espèce en particulier qui serait à l'origine du phénomène. En effet, les trois espèces de *Clostridium* (*Clostridium acidisoli*, *Clostridium butyricum* et *Clostridium akagii*), retrouvées sur les profils SSCP, sont connues pour produire de l'hydrogène via les voies acétate et butyrate à partir du glucose (Kuhner *et al.*, 2000 ; Cai *et al.*, 2010b ; Sun *et al.*,

2010). La compétition entre ces trois *Clostridies* pourrait engendrer un stress qui dévrait une partie du métabolisme de l'écosystème. A partir du moment où la compétition a été remportée par *Clostridium acidisoli* (à 20g.L⁻¹) le ratio H₂ produit / [2 (Ac + Bu)] a augmenté ce qui signifie que la consommation d'hydrogène s'était atténuée.

IV.7 CONCLUSION DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES

Cette étude a permis de montrer l'influence en cultures continues des concentrations en sulfate de fer et en glucose du milieu sur deux consortia. Les résultats ont montré un effet important de ces deux paramètres opératoires sur la structure des communautés des deux fermenteurs que ce soit aussi bien en termes de nature des espèces sélectionnées qu'en termes d'abondance relative de ces espèces dans les écosystèmes. Dans tous les cas, la population bactérienne sélectionnée a directement influencé le métabolisme de l'écosystème et donc les performances de production d'hydrogène. Par ailleurs, de nombreuses études tentent d'optimiser les paramètres opératoires afin de maximiser la production d'hydrogène (Aceves-Lara *et al.*, 2008b ; Argun *et al.*, 2008 ; Karadag & Puhakka, 2010b ; Lin *et al.*, 2011b ; de Amorim *et al.*, 2012). Dans certains cas, cette stratégie peut s'avérer efficace. Dans notre étude, la levée de la limitation en sulfate de fer a permis de diminuer l'abondance de *Sporolactobacillus laevolacticus* dans F2. Or cette bactérie productrice de lactate est une compétitrice vis-à-vis du glucose des bactéries productrices d'hydrogène et la diminution de son abondance à entraîner une augmentation du rendement en hydrogène de F2. De la même manière, l'augmentation de la concentration en glucose a permis de diminuer l'activité homoacétogène des deux écosystèmes sélectionnés. Cependant, malgré que nos deux populations initiales soient proches, le changement de conditions opératoires a conduit à deux comportements totalement différents tant au niveau populationnel que fonctionnel. Ceci peut conduire à des situations semblables à ce qui a été observé lors de la levée de la limitation en sulfate de fer où dans un cas (F1) l'augmentation de la concentration en sulfate de fer a engendré une diminution des performances de production d'hydrogène et dans un autre cas (F2) c'est le phénomène inverse qui se produit. L'effet des paramètres opératoires sur production d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte est donc totalement dépendant de la structure des communautés microbiennes présentes. Ceci peut expliquer l'absence de consensus quand il s'agit de déterminer l'optimum de certains paramètres comme la concentration en fer ou en substrat du milieu (Wang & Wan, 2009a).

Enfin, les résultats de cette étude, ajoutés à ceux de l'étude précédente, suggèrent que la carence en microéléments (le sulfate de fer dans notre cas) influence plus les bactéries minoritaires ; alors que la carence en glucose influence plus les populations majoritaires en entraînant des changements rapides des bactéries dominantes.

SOMMAIRE DU CHAPITRE

Chapitre V. La perturbation biotique comme facteur de contrôle des cultures mixtes productrices d'hydrogène	173
V.1 Problématique de l'étude	173
V.2 Objectif de l'étude	173
V.3 Hypothèses et postulats	174
V.4 Déroulement de l'étude	174
V.5 Introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène (Eco A) placée dans un milieu non-optimisée (carence en sulfate de fer)	176
V.5.1 Caractérisation des souches pures et du consortium Eco A	178
V.5.2 Impact de l'ajout d'une souche pure sur la culture mixte productrice d'hydrogène Eco A	186
V.5.3 Discussion	195
V.5.4 Conclusion de l'étude	204
V.6 Introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène simplifiée (Eco B) placée dans un milieu optimisée (supplémenté en sulfate de fer)	206
V.6.1 Caractérisation des souches pures et du consortium Eco B	207
V.6.2 Impact de l'ajout d'une souche pure dans la culture mixte productrice d'hydrogène Eco B	215
V.6.3 Discussion	220
V.6.4 Conclusion de l'étude	226
V.7 Introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène diverse (Eco C) placée dans un milieu optimisée (supplémenté en sulfate de fer)	228
V.7.1 Caractérisation du consortium Eco C	228
V.7.2 Impact de l'ajout d'une souche pure dans la culture mixte productrice d'hydrogène Eco C	237
V.7.3 Discussion	252
V.7.4 Conclusion de l'étude	261

V.8 Introduction d'<i>Escherichia coli</i> dans une culture mixte productrice d'hydrogène en réacteur continu.....	263
V.8.1 Ensemencement d' <i>Escherichia coli</i> à 2% d'abondance relative.....	264
V.8.2 Ensemencement d' <i>Escherichia coli</i> à 15% d'abondance relative.....	270
V.8.3 Discussion.....	275
V.8.4 Conclusion de l'étude.....	278
V.9 Conclusion sur la perturbation biotique des cultures mixtes productrices d'hydrogène.....	279

CHAPITRE V. LA PERTURBATION BIOTIQUE COMME FACTEUR DE CONTROLE DES CULTURES MIXTES PRODUCTRICES D'HYDROGENE

V.1 PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

Les études précédentes ont permis de montrer l'importance de la structure des communautés microbiennes sur les performances de production d'hydrogène par voie fermentaire. Au sein de ces communautés productrices d'hydrogène, il a été montré que les bactéries en proportion minoritaire jouaient un rôle clé en orientant le métabolisme global de l'écosystème. La possibilité d'utiliser ces espèces minoritaires comme facteur biotique afin de modifier la structure même de l'écosystème microbien, et par conséquent les performances de production d'hydrogène, a donc été soulevée.

Au cours de ce chapitre, nous allons sortir de notre rôle de spectateur pour devenir acteur et agir directement sur l'écosystème. En effet, au cours de cette étude, la structure d'une communauté microbienne productrice d'hydrogène sera modifiée artificiellement. Pour cela, des souches bactériennes exogènes à l'écosystème modèle, et aux fonctions redondantes et/ou complémentaires des souches indigènes, vont être introduites dans un consortium producteur d'hydrogène. L'influence de ces souches exogènes sur la structure des communautés microbiennes, sur le métabolisme de l'écosystème et sur ses performances de production d'hydrogène va être étudiée.

V.2 OBJECTIF DE L'ETUDE

Cette étude a pour ambition d'évaluer l'effet de l'introduction d'un facteur biotique sur le métabolisme global d'un écosystème producteur d'hydrogène. Plus précisément, il s'agit de déterminer si la production d'hydrogène via une culture mixte peut être contrôlée grâce à l'introduction de souches exogènes à l'écosystème, l'important étant de déterminer si les nouvelles espèces introduites peuvent interagir dans de tels écosystèmes. Et si oui, quelles conséquences, positives ou négatives, aura l'introduction de ces espèces sur le fonctionnement global de l'écosystème ?

V.3 HYPOTHESES ET POSTULATS

Cette étude va permettre de confirmer ou d'infirmer certaines hypothèses. (i) L'introduction d'espèces exogènes influence d'une manière ou d'une autre le métabolisme global de l'écosystème. (ii) Les interactions entre les différentes espèces ne sont pas obligatoirement trophiques. (iii) Certaines espèces peuvent être utilisées comme facteurs biotiques pour stabiliser et/ou améliorer les performances de production d'hydrogène d'une culture mixte.

Cette étude s'appuie sur les postulats suivants: (i) Pour les essais en réacteur batch, les conditions opératoires (pH initial, concentration en substrat et température) sont identiques d'un essai à l'autre et sont considérées comme optimales pour la production d'hydrogène (Quéméneur *et al.*, 2010 ; Quéméneur *et al.*, 2011b). (ii) Pour les essais en continu les conditions opératoires (T, pH, TSH, agitation...) sont fixes, régulées et considérées également comme optimales pour la production d'hydrogène (Aceves, 2007).

V.4 DEROULEMENT DE L'ETUDE

Cette étude s'est déroulée en plusieurs étapes :

La première étape s'est déroulée en réacteur batch, et a permis de tester l'influence de neuf espèces bactériennes différentes sur des écosystèmes modèles en croissance et producteurs d'hydrogène (Figure V-1). Lors de ces expérimentations, trois écosystèmes complexes ont été sélectionnés comme inoculum de départ : Le premier (Eco A) était issu d'une sortie de digesteur anaérobie traitant des vinasses et mise en œuvre au laboratoire. Eco A a été préalablement prétraité à 90°C pendant 10 minutes. Le second (Eco B) provenait des repiquages successifs d'Eco A dans le milieu de culture A (carencé en sulfate de fer) puis dans le milieu B (non carencé en FeSO₄) (Cf. paragraphe II.2.2 de la partie « Matériel et Méthodes » pour la composition des milieux). Enfin, le troisième écosystème (Eco C) a été isolé d'une sortie de digesteur anaérobie traitant des effluents de sucrerie. Eco C a également été prétraité thermiquement à 90°C pendant 10 minutes.

Les souches exogènes sélectionnées présentaient des capacités métaboliques différentes et appartenaient à divers genres bactériens représentatif de la phylogénie et dont le métabolisme est en lien ou non avec l'hydrogène (Cf. Tableau II-1 page 81 de la partie « Matériel et Méthodes »). La croissance, le métabolisme et les performances de production d'hydrogène

des neuf souches ont été caractérisés séparément avant de les inoculer dans les différents écosystèmes. Le milieu de culture A a été utilisé pour effectuer la série d'expérimentation avec Eco A, et le milieu de culture B a été utilisé avec Eco B et Eco C. Toutes les expérimentations en batch ont été réalisées à un pH initial de 6, une température de 37°C et en triplicat.

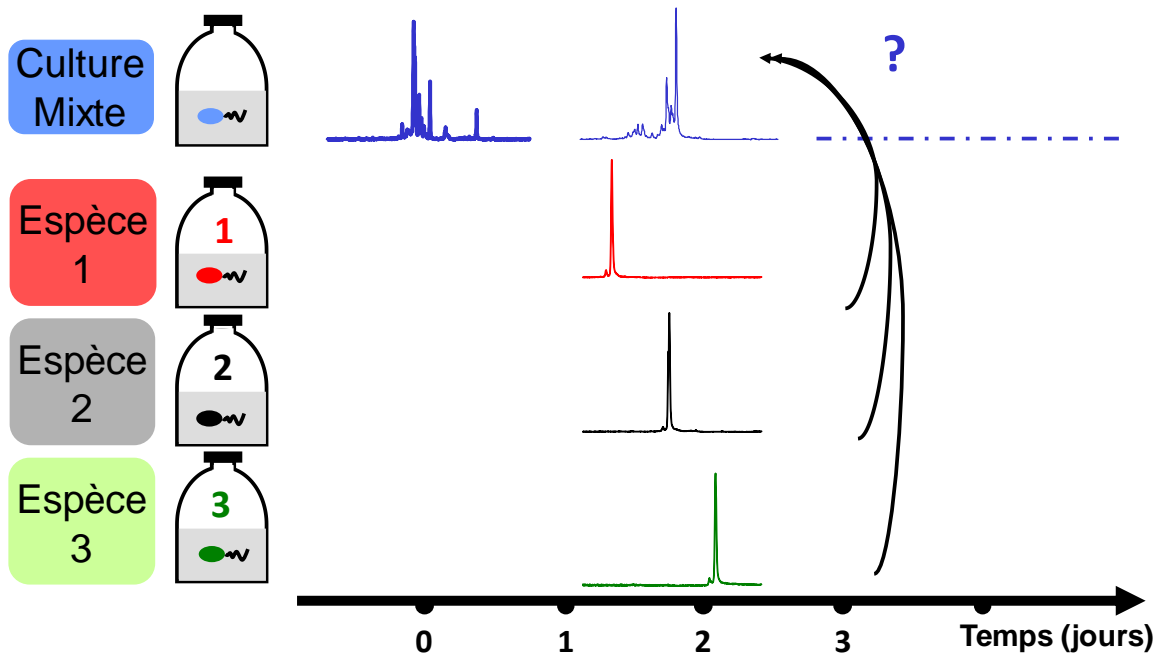


Figure V-1 : Approche expérimentale développée dans le cadre de l'introduction de facteurs biotiques dans une culture mixte productrice d'hydrogène en batch

La seconde phase de cette étude a consisté à introduire une souche bactérienne (facteur biotique) dans une culture mixte productrice d'hydrogène en réacteur continu (Figure V-2). Pour tester la répétabilité de cette expérimentation, deux réacteurs ont été conduits en parallèle. Dans un premier temps, les réacteurs ont été inoculés avec le même inoculum initial : les boues granulaires issues d'un digesteur anaérobie traitant les effluents de la sucrerie Saint Louis à Marseille, préalablement prétraitées thermiquement à 90°C pendant 10 minutes. Il s'agit du même inoculum que celui utilisé dans le chapitre IV. Pour les deux réacteurs, lorsque la production d'hydrogène était stable et que le réacteur était considéré à l'équilibre, la souche bactérienne sélectionnée (*Escherichia coli* K12) a été introduit une première fois à 3,5% d'abondance puis une deuxième fois à une dose plus importante (15% d'abondance relative) lorsque le système était à nouveau à l'équilibre. L'influence de ce

facteur biotique a été évaluée aussi bien au niveau de la production d'hydrogène, des métabolites produits que sur la structure des communautés microbiennes. Les conditions opératoires étaient strictement identiques pour les deux réacteurs, et peuvent être considérées comme optimales pour la production d'hydrogène (pH 5,5 ; 37°C ; TSH 6h) (Aceves-Lara *et al.*, 2008b). Le protocole détaillé de la mise en place et du suivi d'un réacteur continu a été défini dans la partie « Matériel et Méthodes ».

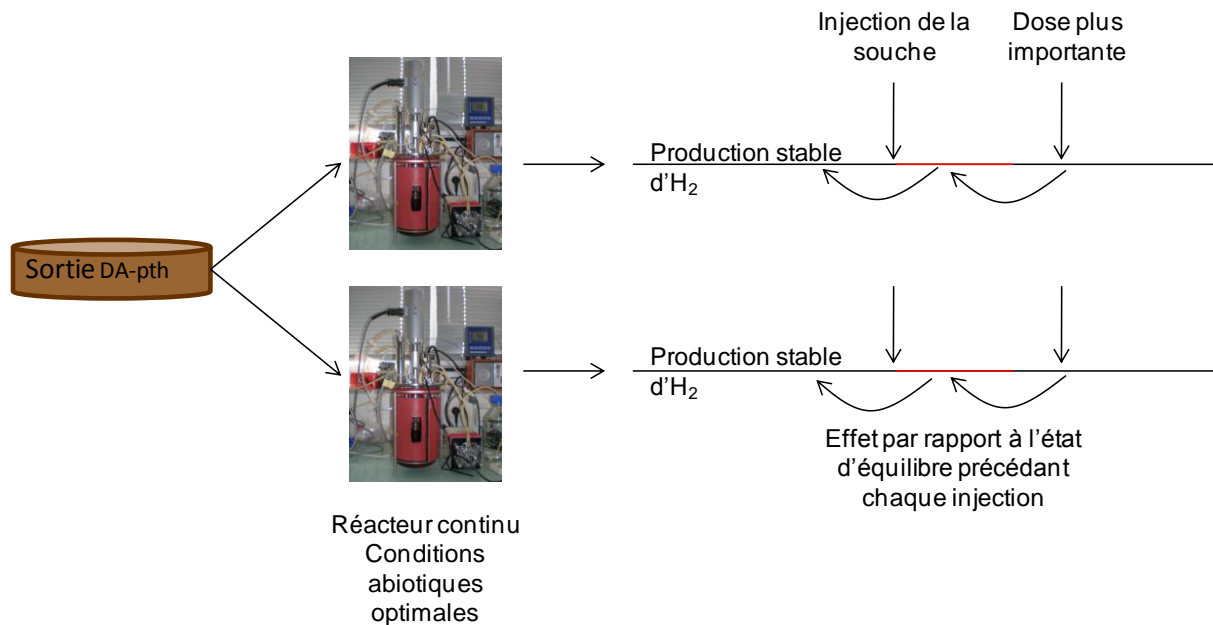


Figure V-2 : Approche expérimentale développée dans le cadre de l'introduction d'un facteur biotique dans une culture mixte productrice d'hydrogène en réacteurs continus.

V.5 INTRODUCTION DE FACTEURS BIOTIQUES DANS UNE CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE (ECO A) PLACEE DANS UN MILIEU NON-OPTIMISEE (CARENCE EN SULFATE DE FER)

Cette première étude en batch a permis d'évaluer l'effet de l'ajout de six souches pures sur la croissance bactérienne, la production d'hydrogène et le métabolisme d'un écosystème modèle (Eco A). Les six souches sélectionnées appartenaient aux espèces : *Clostridium pasteurianum* (DSM525^T), *Enterobacter cloacae* La 1313 (NEU1027), *Escherichia coli* (NEU1007), *Enterococcus casseliflavus* Bet 1 (NEU110), *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895 (DSM50090) et *Ralstonia eutropha* (NEU2114).

Clostridium pasteurianum, *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli* sont trois souches connues comme étant capable de produire de l'hydrogène par voie fermentaire.

Clostridium pasteurianum est anaérobie stricte et produit de l'hydrogène via les voies acétate et butyrate.

Enterobacter cloaca est anaérobie facultative et peut produire de l'hydrogène par la voie formiate en plus des voies acétate et butyrate.

Escherichia coli est également une bactérie anaérobie facultative mais ne peut produire de l'hydrogène que par la voie formiate.

Enterococcus casseliflavus et *Pseudomonas fluorescens* ne sont ni producteurs, ni consommateur d'hydrogène.

Enterococcus casseliflavus est une bactérie homolactique, c'est-à-dire qu'elle ne produit que du lactate à partir du glucose. Elle ne produit pas d'hydrogène mais peut être une excellente compétitrice des bactéries productrices d'hydrogène sur sucres simples. En effet, sa production d'acide lactique permet de réduire rapidement le pH du milieu ; elle rentre en compétition avec les autres bactéries pour les nutriments du milieu et est capable de produire des bactériocines (Sabia *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2011b)

Pseudomonas fluorescens est une bactérie du sol et des milieux aquatique, aérobie strict mais qui est capable d'utiliser le nitrate à la place de l'oxygène comme accepteur final d'électron. Elle n'a pas de lien connus avec la consommation ou la production d'hydrogène mais en cas de limitation en fer elle est capable de produire et d'excréter des molécules appelées sidérophores et qui vont former un complexe avec le Fer (III) et ainsi permettre d'internaliser le fer nécessaire au fonctionnement de la cellule (Cornelis & Matthijs, 2002).

Ralstonia eutropha est une bactérie lithoautotrophe au métabolisme versatile capable d'utiliser, l'hydrogène et le CO₂ comme seul source d'énergie et de carbone. Bactérie ubiquitaire, habitante du sol et des biotopes aquatiques, elle est capable de s'adapter à des habitats soumis à une anoxie transitoire (Pohlmann *et al.*, 2006).

Cette première expérimentation s'est déroulée dans des fioles de 120 mL avec 50 mL de volume utile. Le milieu A (carencé en fer) a été utilisé comme milieu de culture (Cf. paragraphe II.2.2 de la partie « Matériel et Méthodes » pour la composition du milieu).

Avant d'effectuer les mélanges « souche pure/Eco A », des expériences ont été menées pour caractériser les cinétiques de croissance et de production d'hydrogène des souches pures et

d'Eco A. Cela a permis de synchroniser les cultures et d'ajouter les souches au consortium Eco A, alors que les cultures étaient en phase exponentielle de croissance.

V.5.1 CARACTERISATION DES SOUCHES PURES ET DU CONSORTIUM ECO A

V.5.1.1 CARACTERISATION DE LA CONCENTRATION MAXIMALE DE BIOMASSE DANS UN MILIEU CARENCE EN SULFATE DE FER

Les valeurs de $D.O_{600nm}$ maximales obtenues en fin de phase exponentielle ont permis de caractériser la concentration en biomasse maximale de chaque souche pure et du consortium Eco A placés dans un milieu carencé en sulfate de fer (Figure V-3).

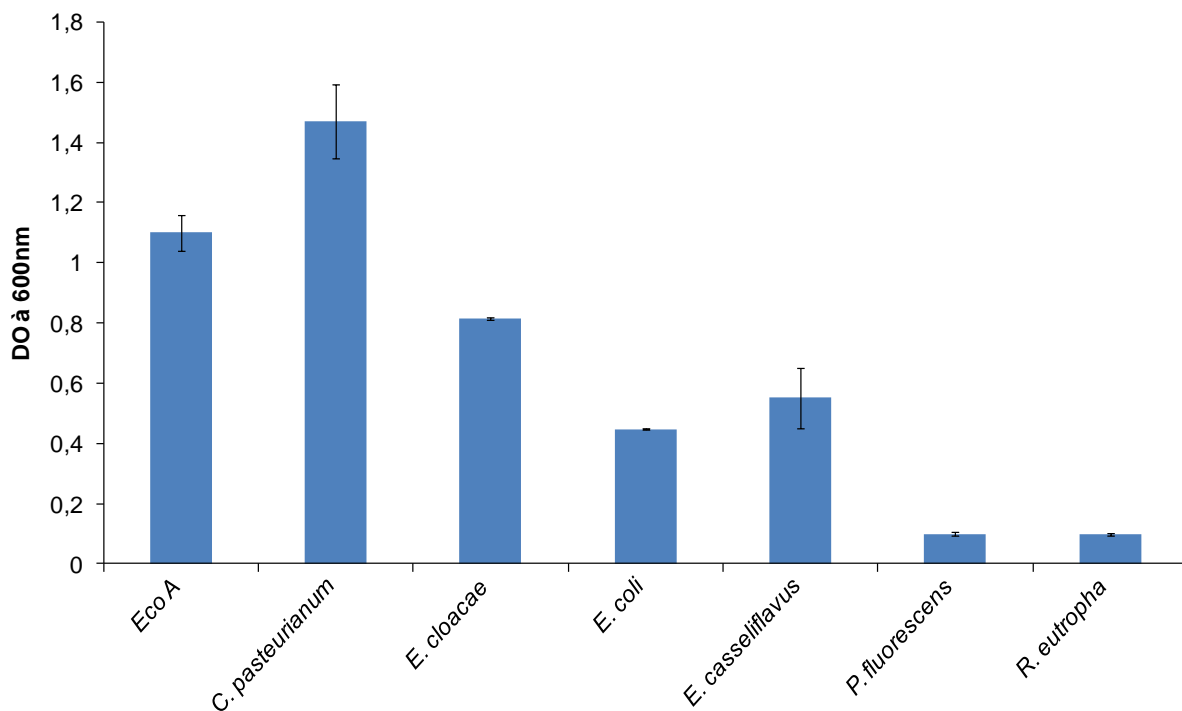


Figure V-3 : Concentration maximal en biomasse des souches pures et du consortium Eco A sur le milieu de culture A. La croissance de chaque culture est représentée par la moyenne des D.O maximales à 600 nm à laquelle a été retranché la D.O du milieu seul.

Les résultats montrent que toutes les souches bactériennes ainsi que le consortium Eco A sélectionnés peuvent croître dans les conditions opératoires appliquées, avec cependant une $D.O_{600nm}$ maximale différente d'une culture à l'autre. En fonction des D.O maximales ainsi obtenues, les cultures peuvent se répartir en trois groupes : Le premier groupe, composé du consortium Eco A et de *Clostridium pasteurianum*, présente des D.O maximales

significativement supérieures à celles observées pour les autres souches avec des D.O respectives de 1,1 et 1,5. Le deuxième groupe, contenant *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Enterococcus casseliflavus*, possède des D.O intermédiaires comprises entre 0,5 et 0,8. Enfin, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha* présentent un rendement en biomasse inférieur aux autres souches avec des D.O de l'ordre de 0,1.

V.5.1.2 CARACTERISATION PAR CE-SSCP DES SOUCHES PURES ET DE LA CULTURE ECO A

La caractérisation par typage moléculaire des souches pures et du consortium bactérien a permis de comparer les profils de CE-SSCP des différents écosystèmes suivis lors de cette étude. De plus, dans le cas des souches pures, les profils obtenus permettent de vérifier si les souches cultivées n'ont pas subi de contamination externe lors des repiquages successifs. Enfin, l'analyse des profils permet de déterminer les distances de migration spécifiques à chacune des souches pures, ce qui permettra d'identifier facilement leur présence ou, à l'inverse, leur absence à la fin de leur confrontation avec le consortium.

Un profil caractéristique de chaque souche est présenté Figure V-4. La distance de migration varie d'une souche à une autre mais reste spécifique de chaque espèce étudiée. Hormis pour *Enterococcus casseliflavus*, l'ensemble des souches présentent des profils de CE-SSCP comportant un pic majoritaire précédé d'un petit pic correspondant à un isomère de conformation de l'ADNr 16S. Ce genre de profil indique la présence d'une seule espèce au sein de la culture étudiée et confirme que cette dernière n'a pas été contaminée lors des différents repiquages qui précèdent son mélange avec le consortium. Le double pic de la souche d'*Enterococcus casseliflavus* est caractéristique de la souche pure et intrinsèque à la conformation secondaire de son ADNr 16S, mais qui n'est pas lié à une contamination externe de la culture.

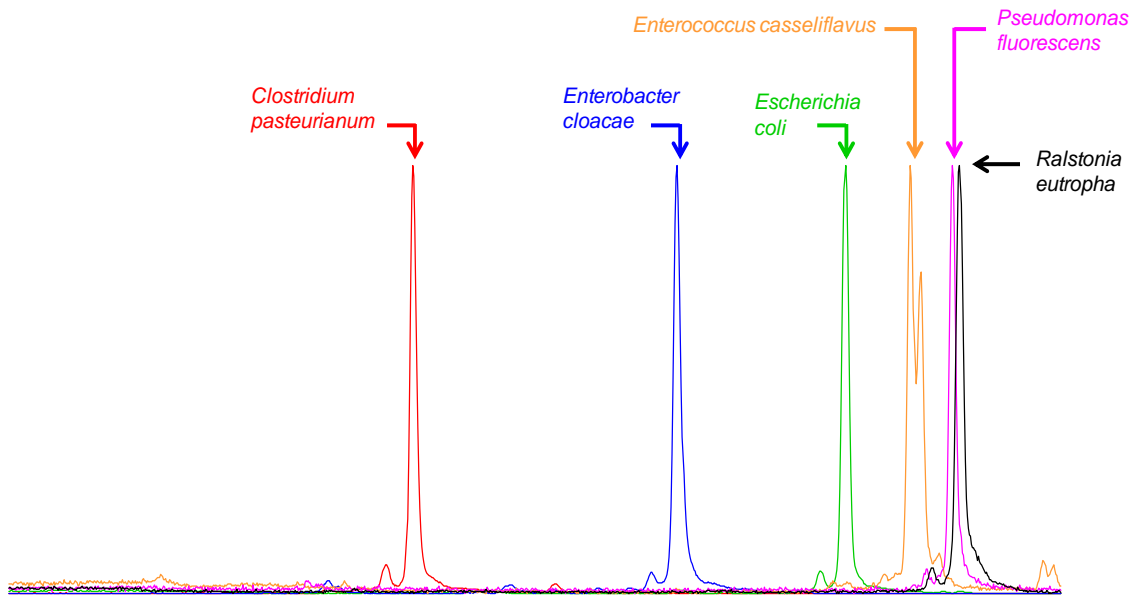


Figure V-4 : Profils de CE-SSCP des souches pures ajoutées au consortium Eco A. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

Le profil de CE-SSCP du consortium Eco A est présenté Figure V-5. Le profil obtenu présente un pic majoritaire et plusieurs pics minoritaires ce qui représente une diversité, selon l'indice de Simpson, de 2,75. Cette structure de communauté est caractéristique d'un écosystème microbien après un traitement thermique à 90°C pendant 10 minutes. En effet, ce prétraitement a pour but d'enrichir l'inoculum en bactéries du genre *Clostridium*. Or la comparaison des distances de migration de *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium butyricum* avec les distances de migration des espèces majoritaires d'Eco A montre que ces dernières migrent à la même distance que les bactéries du genre *Clostridium*. Les espèces majoritaires d'Eco A ont donc de fortes chances d'être des clostridies.

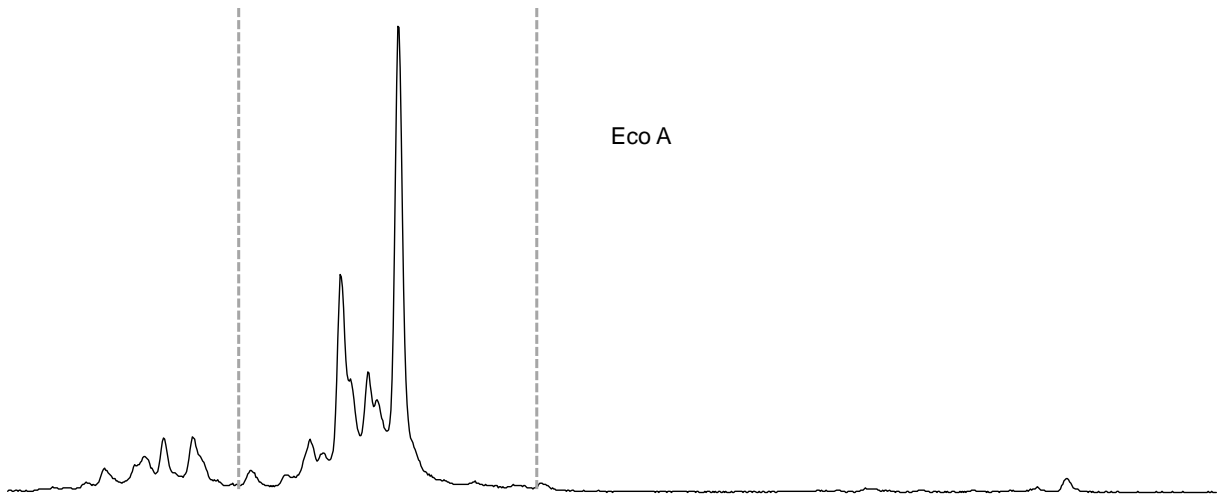


Figure V-5 : Profil de CE-SSCP du consortium Eco A. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics. La zone située entre les deux lignes en pointillé correspond à la zone de migration habituellement observée pour les clostridies.

V.5.1.3 CARACTERISATION DES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE DES DIFFERENTES SOUCHES ET D'ECO A

Le volume d'hydrogène produit au cours du temps a été mesuré individuellement pour chaque souche pure et pour le consortium Eco A (mesures réalisées en duplicat). Les courbes ainsi obtenues présentent toutes une allure en trois phases, typique d'une croissance microbienne et de la production d'un métabolite en batch (Figure V-6).

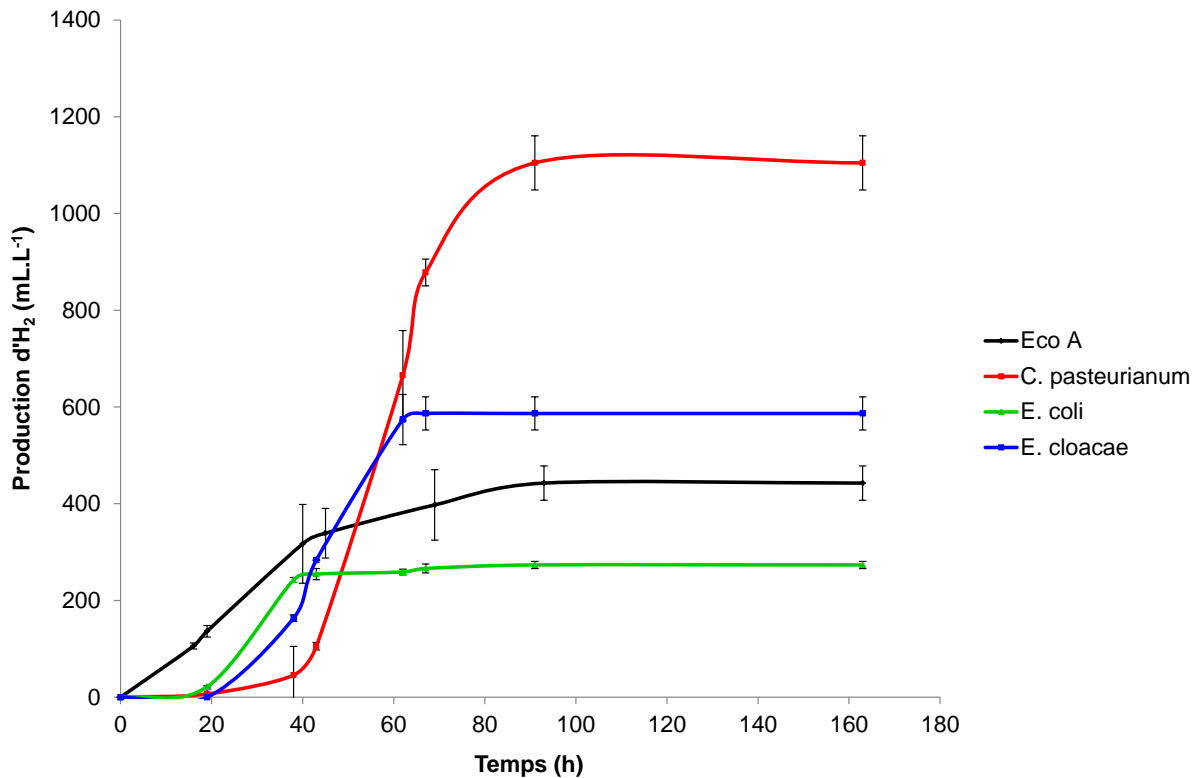


Figure V-6 : Volume d'hydrogène produit par les souches pures et le consortium Eco A. Chaque courbe correspond à la moyenne de tests réalisés en duplicat, en batch, à 37°C et avec une concentration en glucose de 10 g.L⁻¹.

La première phase dite de latence correspond à la phase d'adaptation et de croissance de la biomasse. Pendant cette première phase, la production d'hydrogène est faible voire nulle. Pendant la deuxième phase, le volume d'hydrogène augmente rapidement et les vitesses de production sont maximales (phase exponentielle). Enfin la production d'hydrogène diminue jusqu'à l'obtention d'un plateau ce qui signifie que la réaction de fermentation est terminée soit à cause de l'épuisement du substrat, soit à cause d'une inhibition de la réaction par ses propres produits.

Les résultats de cinétique de production d'hydrogène ont été modélisés grâce à la courbe d'ajustement de Gompertz afin d'en déterminer la productivité maximale d'hydrogène (P_{max}), la quantité maximale d'hydrogène produite (H_{max}) et le temps de latence de chaque culture (Tableau V-1). Afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux de la littérature, les rendements exprimés en mole d'H₂ par mole de glucose ajoutée ont également été calculés.

Tableau V-1 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène des souches pures et du consortium. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d'hydrogène.

Culture	P_{\max}		H_{\max}		Rendement	
	(mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		(mL H ₂ .L ⁻¹)		(mol H ₂ .mol ⁻¹ hexose)	
Eco A	9,9	±3,6	441,5	±35,4	0,31	±0,025
<i>Clostridium pasteurianum</i>	37,1	±2,1	1 126,2	±63,9	0,79	±0,045
<i>Enterobacter cloacæ</i>	18,9	±0,4	612,4	±38,2	0,43	±0,027
<i>Escherichia coli</i>	14,8	±0,5	270,9	±2,7	0,19	±0,002
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-
<i>Ralstonia eutropha</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-

Clostridium pasteurianum présente les performances de production d'hydrogène les plus élevées avec une productivité maximale de 37 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹ et une quantité d'hydrogène maximale produite de 1 126 mL H₂.L⁻¹, ce qui correspond à un rendement de 0,79 mol H₂.mol⁻¹hexose. *Enterobacter cloacæ* et *Escherichia coli* produisent respectivement 612 et 270 mL H₂.L⁻¹, soit des rendements de 0,43 et 0,19 mol H₂.mol⁻¹hexose. Leur productivité est proche entre 15 et 19 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹.

L'écosystème de référence Eco A est également producteur d'hydrogène avec une H_{\max} de 442 mL H₂.L⁻¹ (soit 0,31 mol H₂.mol⁻¹hexose) et une P_{\max} faible par rapport à celle des souches pures productrices d'hydrogène (9,9 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹).

Enfin comme attendu, les souches *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha* ne sont pas productrices d'hydrogène.

V.5.1.4 CARACTERISATION DU RESEAU METABOLIQUE DES DIFFERENTES SOUCHES PURES ET D'ECO A

Le métabolisme des souches pures et du consortium lors de cette phase de production d'hydrogène a été également caractérisée par le suivi des métabolites produits lors de la fermentation du substrat. En effet, les voies métaboliques empruntées par les

microorganismes fermentaires influent directement sur la production d'hydrogène et ne peuvent donc en être dissociées.

La Figure V-7 présente les quantités d'hydrogène et les différents métabolites produits au cours de la fermentation du glucose par les souches pures et le consortium Eco A. L'échelle de l'axe secondaire du graphique, représentant la quantité maximale d'hydrogène produite, a été multipliée par deux par rapport à celle représentant la quantité de matière des métabolites, et ce afin de pouvoir comparer la valeur théorique de production d'hydrogène à celle réellement mesurée. En effet, si l'hydrogène avait uniquement été produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en hydrogène aurait été égale à deux fois la quantité d'acétate et de butyrate produite (en nombres de moles).

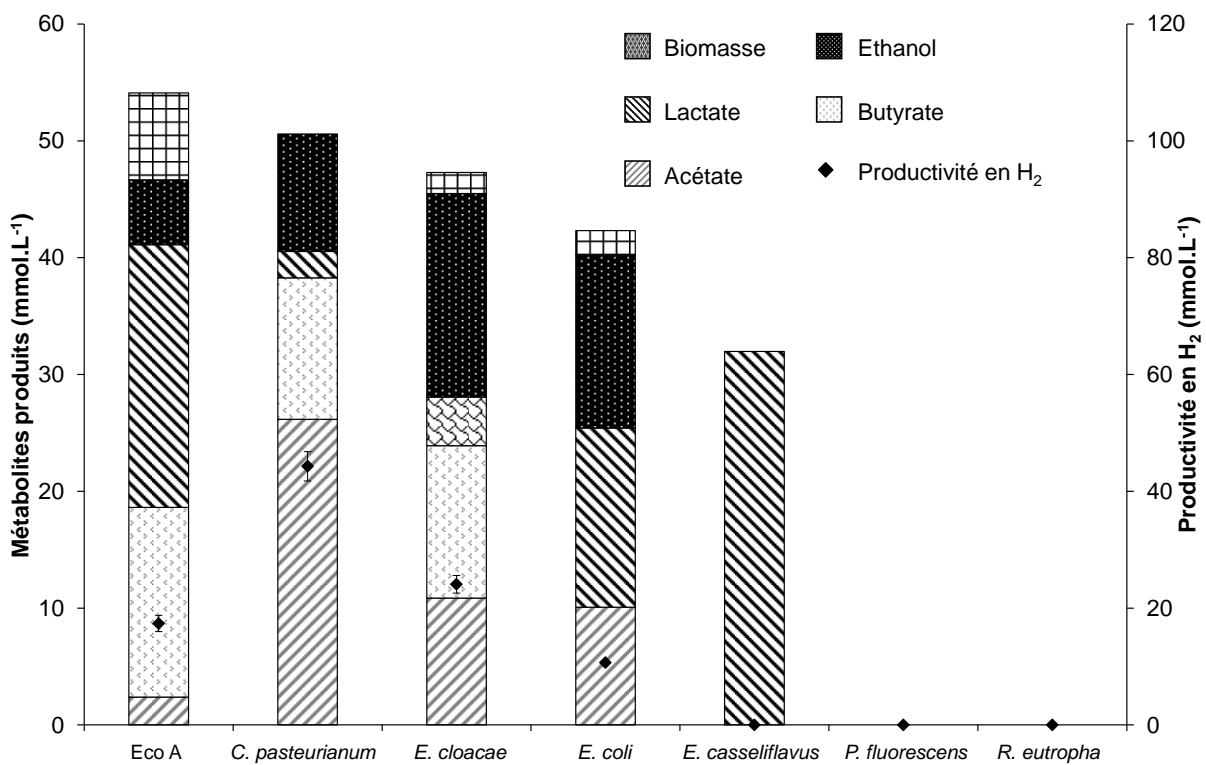


Figure V-7 : Hydrogène et métabolites produits par les différentes souches pures et l'écosystème de référence Eco A. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Une importante production d'acétate et de butyrate a été observée chez *Clostridium pasteurianum* avec 26,2 mmol.L⁻¹ d'acétate et 12,11 mmol.L⁻¹ de butyrate. De l'éthanol et du lactate sont également produit avec, respectivement, 2,3 et 10 mmol.L⁻¹.

Chez *Enterobacter cloacae* la production d'acétate et de butyrate (10,9 et 13,1 mmol.L⁻¹) est accompagnée par la production de formiate, d'éthanol et de succinate. Dans ce cas, aucune production de lactate n'a pu être mesurée.

Même si elle n'utilise pas la voie butyrate, *Escherichia coli* possède un réseau métabolique mixte et produit de l'acétate, du lactate et de l'éthanol dans des proportions proches allant de 11 à 15 mmol.L⁻¹. Une production de succinate est également observée dans des proportions moindres (2,1 mmol.L⁻¹).

Par ailleurs, Eco A présente une grande variété de métabolites allant de l'acétate au succinate en passant par du butyrate, de l'éthanol et du lactate. Ce dernier étant le métabolite majoritaire retrouvé en fin de fermentation avec 22,5 mmol.L⁻¹.

Pour toutes ces cultures, la production d'hydrogène mesurée est très significativement inférieure (d'au moins 45%) à la production d'hydrogène théorique si tout l'hydrogène était produit uniquement par les voies acétate et butyrate.

Deux comportements distincts ont été observés pour les souches ne produisant pas d'hydrogène : d'une part *Enterococcus casseliflavus* réalise une fermentation homolactique c'est-à-dire qu'elle ne produit que du lactate à partir du glucose sans production de gaz associée. D'autre part, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha* semblent seulement survivre dans le milieu (sans croissance, ni lyse) et ne produisent aucun métabolite.

En conclusion, cette première partie de l'étude a permis de caractériser les souches pures et le consortium de manière individuelle. Les résultats obtenus ont ainsi servi de base de comparaison avec les données obtenues lors du mélange des souches pures avec l'écosystème Eco A.

V.5.2 IMPACT DE L'AJOUT D'UNE SOUCHE PURE SUR LA CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE ECO A

V.5.2.1 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES SUR LA CONCENTRATION MAXIMALE EN BIOMASSE DE L'ECOSYSTEME

Tout comme pour les souches pures, la mesure de la $D.O_{600nm}$ maximale a permis de déterminer la concentration maximale en biomasse du consortium Eco A et des différents mélanges (Figure V-8).

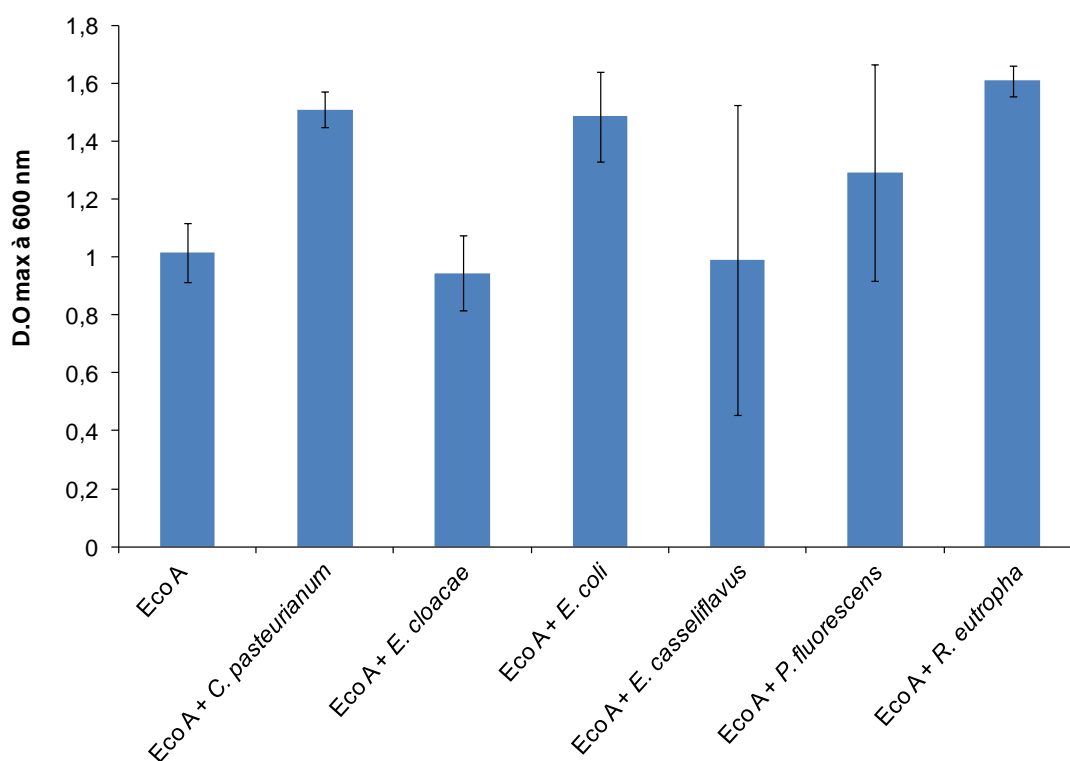


Figure V-8 : Concentration maximale en biomasses du consortium Eco A et des mélanges entre les différentes souches pures et Eco A. La croissance de chaque culture est représentée par la moyenne des D.O maximales à 600 nm.

Les résultats montrent que l'ajout de *Clostridium pasteurianum*, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* a conduit à une augmentation significative ($p < 0,05$, ANOVA) de la concentration en biomasse du consortium avec une D.O maximale passant de 1 à environ 1,5 selon les mélanges.

A l'inverse, l'ajout d'*Enterococcus casseliflavus*, *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas fluorescens* n'a pas augmenté la concentration en biomasse d'Eco A de manière significative. Cependant, dans le cas d'*Enterococcus casseliflavus* et *Pseudomonas fluorescens* cette conclusion est due à un écart-type important entre les expérimentations (reproductibilité faible).

V.5.2.2 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES SUR LES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE DU CONSORTIUM ECO A

L'addition des souches pures en cours de culture d'Eco A, de manière synchrone a permis d'établir de nouvelles cinétiques de production d'hydrogène. Le modèle de Gompertz a pu être utilisé sur ces cinétiques afin d'établir, pour tous les mélanges, les H_{max} , les P_{max} et les rendements exprimés en mole d'hexose par mole d'hexose introduit (Tableau V-2). L'ensemble des cinétiques de production d'hydrogène lors des différentes confrontations est présenté en Annexe II.

Tableau V-2 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco A et des différents mélanges souche pure/consortium. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz 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).

Mélange	P_{max}		H_{max}		Rendement	
	(mLH ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		(mLH ₂ .L ⁻¹)		(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

Dans un premier temps, les résultats indiquent que la productivité maximale en hydrogène (P_{\max}) du consortium Eco A n'est pas affectée de manière significative ($p > 0,05$; ANOVA) par l'ajout des souches *Enterobacter Cloacae*, *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Pseudomonas fluorescens*. Pour les trois derniers mélanges, cette non significativité des résultats par rapport à Eco A seul est due aux forts écarts types observés.

Par contre, la P_{\max} de l'écosystème est augmentée significativement par l'ajout des espèces *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha*.

La production maximale d'hydrogène (H_{\max}) et par conséquent le rendement en hydrogène d'Eco A augmente également de manière significative après l'introduction des espèces *Enterobacter Cloacae*, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha*. Ces trois espèces multiplient respectivement la production d'hydrogène de l'écosystème par un facteur 1,5 ; 2,5 et 3,5.

Aucun effet significatif sur la production maximale d'hydrogène du consortium Eco A n'a été observé lors de l'ajout de *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* ou *Pseudomonas fluorescens*. Cependant, les forts écarts types calculés incitent à traiter les triplicats séparément pour tenter d'expliquer d'où viennent de tels écarts, liés à une forte variabilité des tests.

V.5.2.3 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES SUR LE METABOLISME GLOBAL DE L'ECOSYSTEME ECO A

Afin de mesurer l'influence des souches pures sur le réseau métabolique du consortium Eco A, la distribution des métabolites produits en fin de fermentation a été déterminée pour chaque mélange, puis comparée à celle d'Eco A seul (Figure V-9)

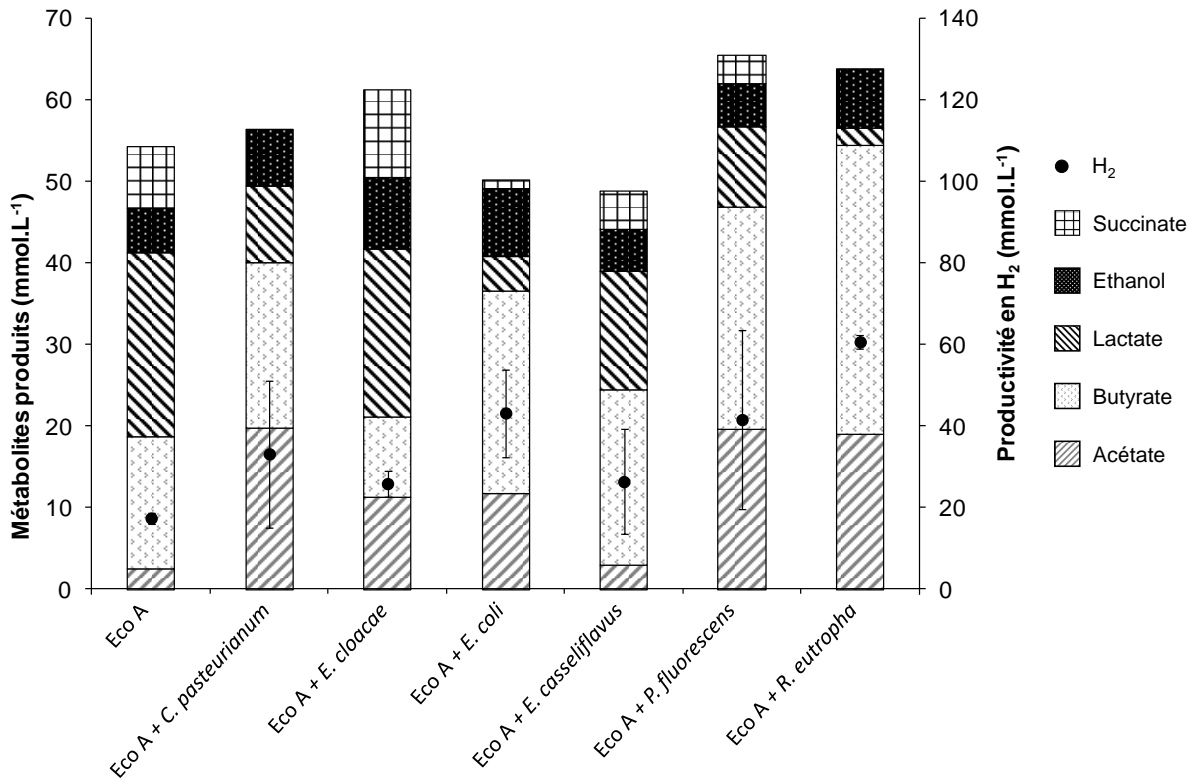


Figure V-9 : Hydrogène et métabolites produits par le consortium Eco A et les différents mélanges souche pure / Eco A. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Hormis pour *Enterococcus casseliflavus*, l'ajout des différentes souches pures au sein du consortium Eco A a modifié significativement le métabolisme global de l'écosystème.

Ainsi, l'ajout de *Clostridium pasteurianum* a augmenté les quantités d'acétate et de butyrate produit (respectivement 19,6 et 20,4 mmol.L⁻¹ pour le mélange Eco A / *C. pasteurianum* contre 2,4 et 16,2 mmol.L⁻¹ pour Eco A) tout en diminuant la production de lactate et en évitant la formation de succinate. Un phénomène similaire a été observé dans le cas de l'ajout de *Ralstonia eutropha*, sauf que la concentration finale en butyrate était plus encore élevée avec 35,5 mmol.L⁻¹ et que la production de lactate était minimale avec seulement 2,2 mmol.L⁻¹.

De la même manière, les quantités d'acétate et de butyrate produites ont augmenté après l'ajout d'*Escherichia coli* ou de *Pseudomonas fluorescens* dans le consortium. Parallèlement, la production de lactate et de succinate a diminué de façon significative.

L'ajout d'*Enterobacter cloacae* a conduit le consortium à sur-exprimer la voie acétate au dépend de la voie butyrate. Les concentrations en éthanol et en succinate ont également augmenté.

V.5.2.4 RESEAU METABOLIQUE ET PRODUCTION D'HYDROGENE DES MELANGES POSSEDANT UNE FORTE VARIABILITE DE RESULTAT ENTRE TRIPLICATS

Les résultats exposés dans le paragraphe V.5.2.2 montrent que les performances des mélanges d'Eco A avec les souches de *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* ou *Pseudomonas fluorescens* sont très variables. Pour tenter d'expliquer cette grande variabilité des résultats, les cultures présentant la plus grande et la plus faible productivité en H₂ ont été analysées séparément pour chaque mélange. Ainsi, la Figure V-10 présente le réseau métabolique et la production d'hydrogène des différentes cultures prises individuellement.

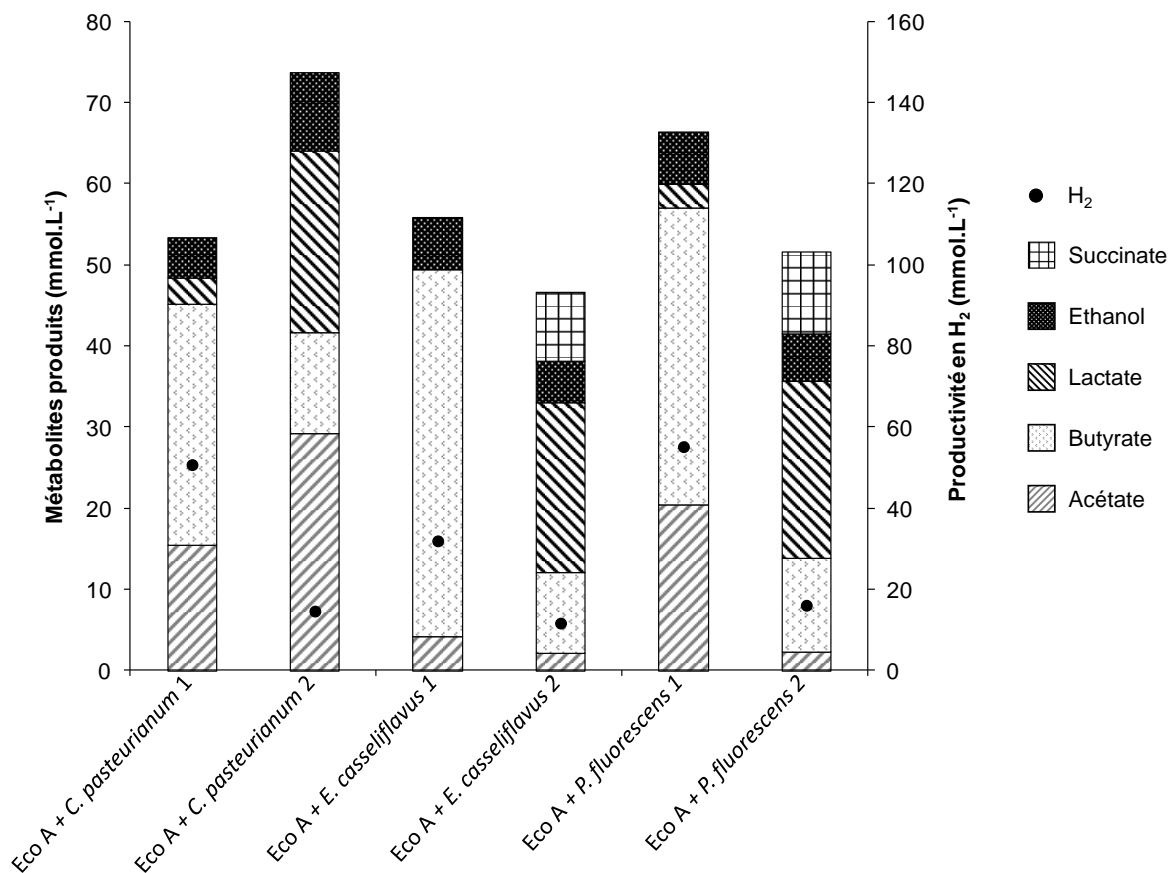


Figure V-10 : Production individuelle d'hydrogène et de métabolites des réplicats des mélanges Eco A / souche pure ayant une forte variabilité de résultat. Pour chaque triplicat, les cultures présentant la plus grande et la plus faible productivité en H₂ sont représentées. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Dans le cas des mélanges Eco A / *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* ou *Pseudomonas fluorescens*, de grandes différences en terme de métabolisme global de la culture peuvent être observées au sein d'un même réplikat. Ainsi, le mélange Eco A / *Clostridium pasteurianum* 1 produit deux fois plus de butyrate que le mélange Eco A / *Clostridium pasteurianum* 2 (29,7 contre 12,4 mmol.L⁻¹). Parallèlement les productions d'acétate et d'éthanol sont deux fois moins importantes et la production de lactate a été divisée par sept.

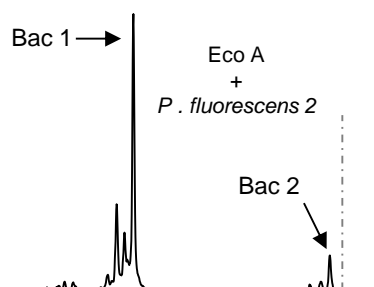
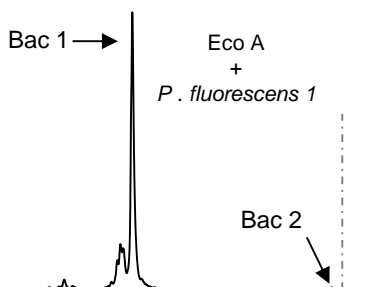
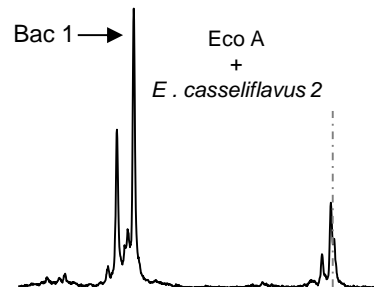
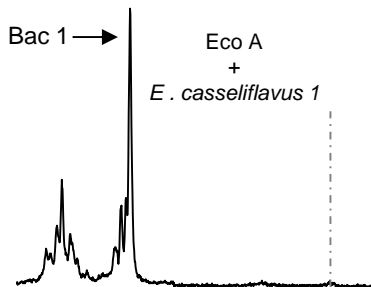
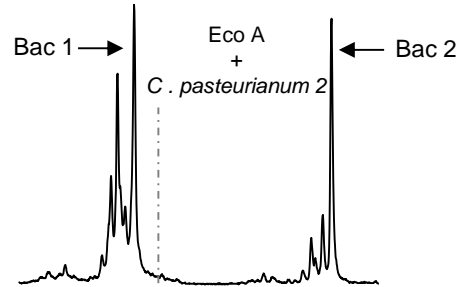
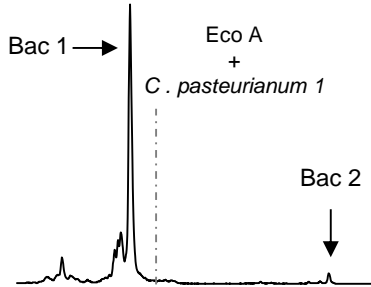
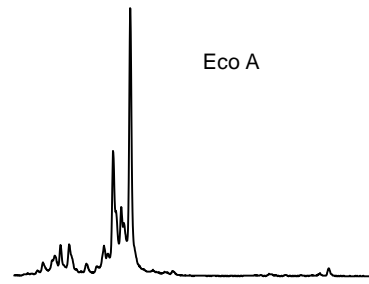
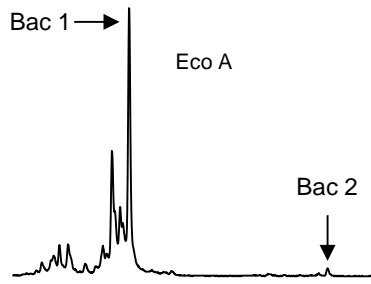
De la même manière, dans le cas de l'ajout d'*Enterococcus casseliflavus* ou de *Pseudomonas fluorescens*, une forte production d'hydrogène est accompagnée d'une forte concentration finale en butyrate. En fonction de la souche, cette dernière est multipliée par un facteur 3 ou 5 d'un réplikat à l'autre. *A contrario*, les productions de lactate et de succinate sont maximales lorsque la production d'hydrogène est minimale.

V.5.2.5 CARACTERISATION PAR CE-SSCP DES COMMUNAUTES MICROBIENNES PRESENTES DANS LES DIFFERENTS MELANGES

Pour chaque mélange entre l'écosystème de référence Eco A et une des souches pures sélectionnées, les profils de CE-SSCP de deux des trois réplikats ont été réalisés à partir des prélèvements effectués en fin de fermentation (Figure V-11). Pour chaque profil, la position de migration de la souche introduite dans le mélange est indiquée par un trait en pointillé

Pour tous les mélanges, le réplikat noté « 1 » correspond à la culture dont la production d'hydrogène est la plus forte et le réplikat « 2 » correspond à la culture dont la production d'hydrogène est la plus faible.

Cette différenciation des profils de CE-SSCP pour chaque mélange a permis de vérifier les hypothèses suivantes : (i) Les différences observées de performances et de métabolismes après l'ajout de *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* ou *Pseudomonas fluorescens* à Eco A sont dues à des divergences de communautés microbiennes au sein du triplicat. (ii) A l'inverse, des performances répétables dans un triplicat sont due à des communautés microbiennes identiques.



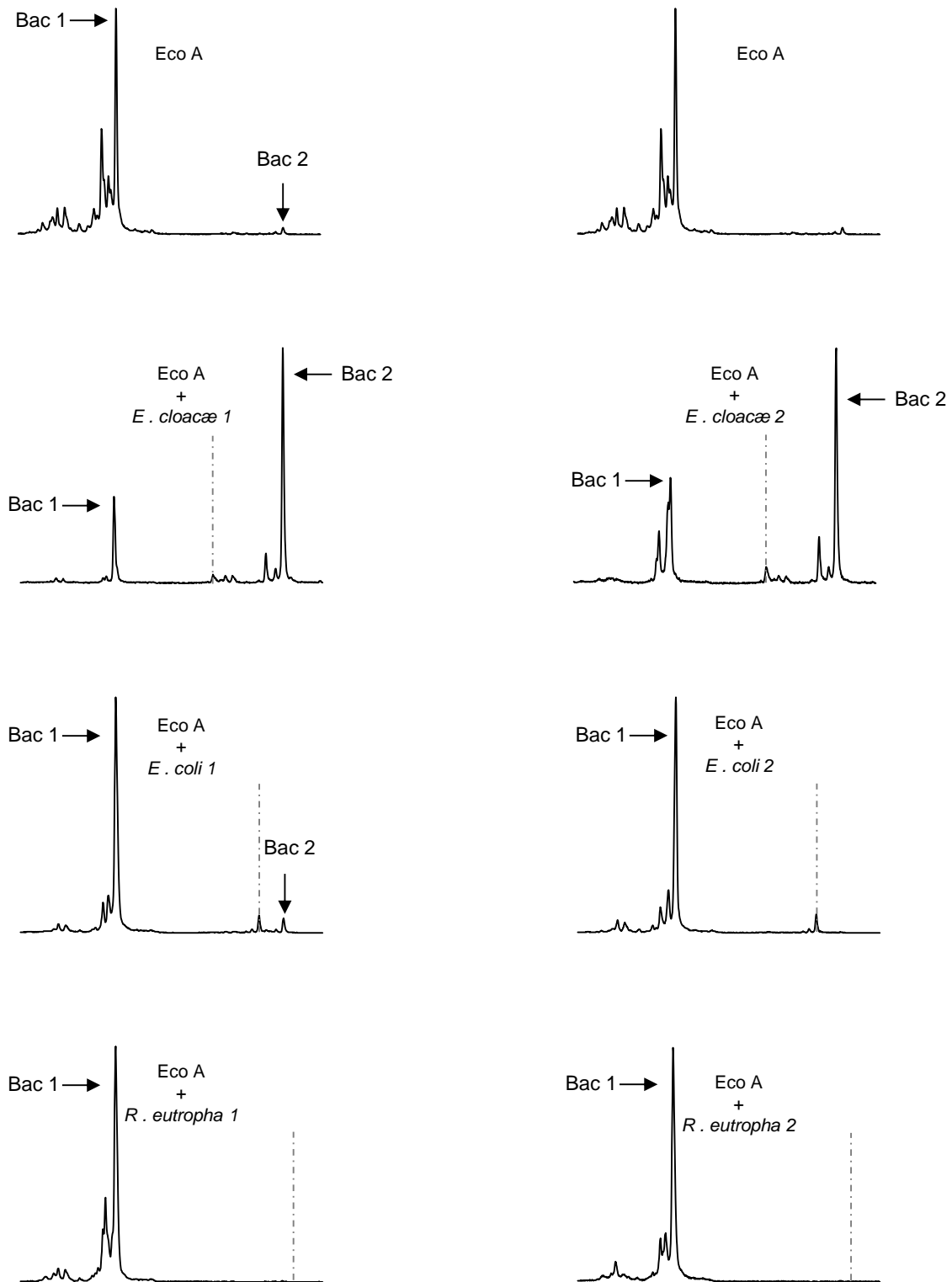


Figure V-11 : Structure des communautés microbiennes des différents mélanges Eco A / souche pure en fin de batch. Pour chaque mélange, les profils de CE-SSCP de deux des trois triplicats sont représentés. La communauté présentant la plus forte production d'hydrogène est en première position, et celle avec la plus faible production d'hydrogène en deuxième. Pour chaque profil, le trait en pointillé indique la position de migration de la souche introduite dans le mélange. 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.

De manière générale, l'ensemble des cultures présente une structure de communauté microbienne simple avec une ou deux espèces majoritaires et quelques pics minoritaires. Bac 1 est retrouvé comme espèce majoritaire dans les différents écosystèmes sauf pour les mélanges Eco A / *Enterobacter cloacae* et le mélange Eco A / *Clostridium pasteurianum* 2 qui sont dominés par Bac 2. La distance de migration de Bac 1 est proche de celle habituellement observée pour les espèces du genre *Clostridium sp.* De même la distance de migration de Bac 2 correspond à celle habituellement observée pour les bactéries lactiques non productrices d'hydrogène (la distance de migration de Bac 2 est équivalente à celle d'*Enterococcus casseliflavus*).

L'ajout de *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Pseudomonas fluorescens* engendre une hétérogénéité de la structure de la communauté microbienne finale au sein d'un même triplicat. Ainsi, l'abondance relative des bactéries lactiques (Bac 2 ou *Enterococcus casseliflavus*) est plus importante pour les réplicats présentant la moins bonne production d'hydrogène (colonne de droite) que pour les réplicats ayant une bonne production d'hydrogène (de 7 à 20 % pour les réplicats « 2 » contre 1 à 2 % pour les réplicats « 1 »). Cependant, aucune corrélation directe n'a pu être établie entre l'abondance de Bac 2 et les performances de production d'hydrogène. Pour ces trois espèces, seule *Enterococcus* est retrouvé en fin de fermentation dans des proportions suffisantes pour être détectée par SSCP.

Les profils des mélanges entre Eco A et *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* montrent des profils de communautés microbiennes répétables entre les réplicats.

L'ajout d'*Enterobacter cloacae* semble favoriser la croissance de Bac 2 de façon à ce qu'elle devienne systématiquement l'espèce majoritaire du système. *Escherichia coli* et *Ralstonia* ne modifie pas de façon drastique la structure d'Eco A.

Parmi ces trois espèces seules *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli* sont retrouvées en fin de fermentation.

V.5.3 DISCUSSION

V.5.3.1 SOUCHES PURES, TROIS NIVEAUX DE PRODUCTION D'HYDROGENE

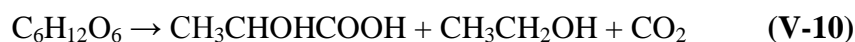
Même si l'ensemble des souches peuvent croître ou tout du moins survivre dans les conditions expérimentales choisies, les souches pures utilisées n'ont pas toutes les mêmes performances de production d'hydrogène. Trois groupes se distinguent :

- *Clostridium pasteurianum* producteur d'hydrogène :

La forte concentration en biomasse et la forte production d'hydrogène de *C. pasteurianum* montrent que le milieu sélectionné ainsi que les conditions de culture (anaérobie, pH 6, 37°C) favorisent particulièrement les bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium*. Le milieu de culture était carencé en sulfate de fer, aussi ces résultats renforcent ceux des chapitres III et IV qui montrent que *C. pasteurianum* possède une forte affinité pour le fer et pousse très bien dans ces milieux.

D'un point de vue métabolique, la forte production d'hydrogène mesurée est reliée à la production d'acétate et de butyrate (Equations V-1 et V-2). Cependant, la différence entre la production d'hydrogène mesurée et la production d'hydrogène théorique (si tout l'acétate et le butyrate produits avaient été accompagnés par une production d'hydrogène dans des conditions stœchiométriques) semble indiquer qu'une partie de l'hydrogène est reconsommée par homoacétogénèse. Des voies disséminatrices du potentiel hydrogène ont également été observées avec la production de lactate et d'éthanol (Equation V-3, V-4 et V-5). Or la production de ces composés est étroitement liée au phénomène de stress cellulaire observé chez *Clostridium* sp. comme lors d'une baisse brutale du pH (observée généralement en fin de batch) ou une carence en carbone, en azote, en phosphore ou en fer (Khanal *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2011a). Ceci peut laisser présager que le milieu utilisé a permis certes une bonne croissance de *C. pasteurianum*, mais n'est pas réellement optimisé pour la production d'hydrogène.

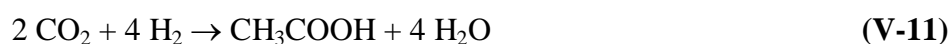




- *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli* produisent moins d'hydrogène que *Clostridium* sp. :

Les productions d'hydrogène observées pour *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli* sont plus faibles que celle observée pour *Clostridium pasteurianum*. Ces résultats sont en relation avec les mesures de D.O des différentes cultures et confirment que le milieu et les conditions opératoires favorisent la croissance et la production d'hydrogène des espèces du genre *Clostridium* sp. Les résultats métaboliques sont en adéquation avec ce qui est classiquement observé pour ces deux espèces lorsqu'elles sont placées en anaérobioses (Kumar & Das, 2000 ; Seppälä *et al.*, 2011). Leur métabolisme ne semble donc pas modifié par la carence en fer.

Chez *Enterobacter cloacae*, tout comme chez *Clostridium* sp., l'hydrogène est essentiellement produit par les voies acétate et butyrate, alors que la formation d'autres sous-produits métaboliques, comme l'éthanol ou le succinate, détourne le potentiel hydrogène (Mandal *et al.*, 2006). Aussi, la différence entre la production d'hydrogène mesurée et la production d'hydrogène théorique semble indiquer qu'une partie de l'hydrogène est reconsommée par homoacétogénèse ou lors de la production de succinate (Equations V-6 et V-7).



Quant à *Escherichia coli*, elle peut détourner une partie de son métabolisme pour produire de l'hydrogène *via* la voie formiate (Equation V-8). Le formiate étant alors un intermédiaire réactionnel, il n'est pas retrouvé en fin de fermentation. Les autres métabolites produits, notamment l'acétate, ne sont donc pas liés à la production d'hydrogène (Neidhardt, 1996). Il est également intéressant de noter qu'*Escherichia coli* ne produit pas de butyrate en culture pure.



- *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralsonia eutropha* ne produisent pas d'hydrogène:

Trois des six souches sélectionnées pour cette étude ne produisent pas d'hydrogène mais présentent des comportements différents : *Enterococcus casseliflavus* est un organisme anaérobie facultatif capable de croître en absence d'oxygène même si sa croissance reste moins importante qu'en aérobiose. Ceci explique les D.O intermédiaires observées pour cette culture. D'un point de vu métabolique elle ne produit que du lactate sans production de gaz associée.

Pseudomonas fluorescens et *Ralsonia eutropha* ne poussent quasiment pas et n'ont pas d'activité métabolique mesurable dans les conditions fixées pour cette étude. En effet, la température optimale de croissance de *P. fluorescens* est comprise entre 25 et 30°C. C'est une espèce aérobie stricte mais reste capable d'utiliser le nitrate à la place de l'oxygène comme accepteur final d'électron (Bergey *et al.*, 1984). Ceci explique sa faible activité lorsqu'elle est placée à 37°C en anaérobiose.

De même *R. eutropha* n'a pas été placé dans les conditions optimales pouvant favoriser sa croissance. En effet, *R. eutropha* est anaérobie facultative mais doit transformer le nitrate ou le nitrite en azote pour pouvoir croître en conditions anaérobies (Cramm, 2009). Sa température optimale de croissance se situe alors aux alentours de 30°C (Bergey *et al.*, 1984). De manière intéressante, *R. eutropha* possède trois hydrogénases à site [Ni-Fe] différentes qui lui permettent d'utiliser l'hydrogène comme seule source d'énergie lorsqu'elle croît dans des conditions autotrophes (Burgdorf *et al.*, 2005).

En conclusion, l'étude des souches pures n'a pas fourni de surprises particulières, les résultats étant consistants avec la littérature.

V.5.3.2 ECO A, UN CONSORTIUM PLACE DANS DES CONDITIONS NON OPTIMALES

L'écosystème Eco A s'adapte correctement aux conditions et au milieu de culture de cette étude en présentant une bonne croissance. Ceci s'explique notamment par le fait que le prétraitement thermique (90°C, 10 minutes) réalisé sur l'inoculum initial, avait pour but d'enrichir ce dernier en espèces du genre *Clostridium* en se basant sur leur faculté à sporuler. Les distances relatives de migration des espèces majoritaires d'Eco A, observées sur le profil

SSCP de la Figure V-5, tendent d'ailleurs à montrer que ce dernier a bien été enrichi en clostridies.

Cependant, les performances de production d'hydrogène restent faibles : en effet, le rendement maximal d'hydrogène d'Eco A ne dépasse pas $0,31 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucose introduit alors que dans des études similaires Wang et Wan (2008a) et Baghchehsaraee *et al.* (2008) ont respectivement mesuré des rendements maximaux de 1,8 et 2,3 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucose introduit.

Les faibles productions d'hydrogène d'Eco A paraissent donc directement liées au métabolisme global de l'écosystème. En effet, Eco A a produit relativement peu d'acétate et de butyrate qui sont les deux métabolites directement liés à la production d'hydrogène (Equation V-1 et V-2). La majorité des métabolites produits (lactate et éthanol) dissipe le potentiel hydrogène de la culture (Equation V-3, V-4 et V-5) et la production de succinate est associée à une consommation d'hydrogène (Equation V-7). La production de succinate explique notamment pourquoi la production d'hydrogène mesurée était différente de la production d'hydrogène théorique. La piste de l'homoacétogénèse (Equation V-6) peut également être envisagée mais étant donné les faibles productions d'acétate mesurées, cette hypothèse reste peu probable. La présence de ces voies métaboliques concurrentes peut être due non seulement à la présence d'espèces minoritaires présentes au sein de l'écosystème, ou à des phénomènes de stress cellulaire chez *Clostridium* qui auraient dévié son métabolisme vers des voies non productrices d'hydrogènes, comme suggéré précédemment pour la souche pure de *C. pasteurianum*.

V.5.3.3 IMPACT DES BACTERIES EXOGENES SUR LE METABOLISME ET LA PRODUCTION D'HYDROGENE DU CONSORTIUM ECO A

- *Clostridium pasteurianum* sans effet significatif sur la production d'hydrogène :

Clostridium pasteurianum est souvent retrouvée dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène (Quéméneur *et al.*, 2010 ; Hung *et al.*, 2011b). De plus les résultats du chapitre III ont montré qu'elle est capable de dominer l'écosystème de façon quasi systématique lorsque les concentrations en fer du milieu sont faibles comme c'est le cas pour cette étude. Les résultats en culture pure ont d'ailleurs confirmé qu'elle était bien adaptée aux conditions opératoires de l'étude. Il s'agit donc d'une bactérie potentiellement compétitrice pour les

souches initialement présentes dans Eco A. Néanmoins, lorsque *C. pasteurianum* est ajoutée à l'écosystème, elle perd la compétition et n'est jamais retrouvée en fin de fermentation.

La compétition entre les populations de l'écosystème va engendrer une divergence des communautés microbiennes sélectionnées. Cette divergence entraîne des comportements métaboliques divers qui sont à l'origine des résultats non significatifs observés pour la production d'hydrogène.

- L'ajout d'*Enterococcus casseliflavus* n'a pas d'effet significatif sur Eco A :

A première vue, *E. casseliflavus* n'a pas d'effet significatif sur le réseau métabolique et la production d'hydrogène d'Eco A. Cependant, les résultats montrent que lorsqu'elle s'implante et qu'elle croît au sein de la culture elle possède un effet négatif sur la production d'hydrogène (H_{\max} diminuée de 33% dans le cas du réplicat 2). Cet effet inhibiteur sur la production d'hydrogène a déjà été montré par Noike *et al.* (2002). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la diminution des performances engendrée par *Enterococcus casseliflavus*.

(i) Comme le montre les résultats en culture pure, *E. casseliflavus* est une bactérie homolactique qui détourne le potentiel hydrogène de la culture en ne produisant que du lactate à partir du glucose sans production de gaz (Equation V-3).

(ii) L'accumulation d'acide lactique dans la culture fait rapidement baisser le pH de cette dernière. Or à un pH inférieur à 4,8 la production d'hydrogène est fortement ralentie (Khanal *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2011a).

(iii) *E. casseliflavus* est capable de produire des bactériocines qui vont inhiber la croissance des autres espèces de l'écosystème et notamment des bactéries productrices d'hydrogène (Sabia *et al.*, 2003 ; Sabia *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2011b).

- L'ajout de *Pseudomonas fluorescens* n'a pas d'effet significatif sur Eco A :

A cause d'un écart type important, il est impossible de conclure que l'ajout de *Pseudomonas fluorescens* influence de manière positive la production d'hydrogène d'Eco A. Néanmoins, pour deux des trois réplicats, la production d'hydrogène a été multipliée d'un facteur supérieur à 3, et ce même si *P. fluorescens* n'est pas retrouvée sur les profils SSCP en fin de fermentation.

P. fluorescens est rarement étudié en anaérobiose et à notre connaissance elle n'a jamais été utilisée dans des systèmes fermentaires. Ces résultats suggèrent cependant que *P. fluorescens* peut interagir avec les bactéries productrices d'hydrogène. Les hypothèses suivantes peuvent alors être avancées :

(i) *P. fluorescens* peut sécréter une substance, non identifiée, mais qui pourrait s'apparenter aux sidérophores qu'elle est capable d'excréter en cas de limitation en fer (Cornelis & Matthijs, 2002). Ces molécules permettent aux microorganismes d'internaliser le fer nécessaire au fonctionnement de la cellule. Or certains microorganismes possèdent des systèmes de transport leur permettant d'incorporer des sidérophores produits par d'autres bactéries ou champignons (Crowley *et al.*, 1991). Ce mécanisme pourrait permettre aux bactéries productrices d'hydrogène de s'affranchir de la limitation en fer et d'augmenter leur métabolisme lié au fer comme la production d'hydrogène via les hydrogénases. Dans ce cas, puisque *P. fluorescens* n'est pas détecté en fin de fermentation soit le phénomène est rémanent, soit elle est ultra minoritaire en nombre mais exerce un rôle essentiel dans la communauté.

(ii) *P. fluorescens* peut également interagir directement avec *Clostridium* en formant des nanotubes, ou autres systèmes de transfert de matériel cellulaire, et favorisant ainsi la production d'hydrogène comme l'ont montré Benomar *et al.* (en cours de soumission) lors de leurs travaux sur la co-culture, *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH) / *Clostridium acetobutylicum ATTC824* (Cab). Dans ce cas, les auteurs ont montré qu'une interaction physique et directe entre DvH et Cab permettait de réorienter le métabolisme de Cab vers les voies liées à la production d'hydrogène (acétate & butyrate) tout en diminuant le flux métabolique de la voie lactate. Les auteurs suggèrent que ce phénomène n'est pas unique dans la nature. Il est donc envisageable qu'une interaction de ce type se crée entre *P. fluorescens* et les clostridies d'Eco A. Mais dans ce cas *P. fluorescens* devrait être retrouvé en fin de batch sur les profils de CE-SSCP. Sauf si *P. fluorescens* est bien présente dans le milieu mais en quantité trop faible pour pouvoir être détectée en CE-SSCP. Son effet serait alors nettement supérieur à son abondance ce qui la définirait comme une espèce-clé de l'écosystème selon Zengler & Palsson (2012).

- *Enterobacter cloacae* modifie significativement les performances de production d'hydrogène d'Eco A :

La production maximale d'hydrogène est significativement plus élevée après l'ajout d'*E. cloacae* dans la culture que pour le consortium seul (657 contre 441 mL H₂.L⁻¹ ; p=0,04 ; ANOVA). L'ajout d'*Enterobacter cloacae* a donc eu un effet positif sur la production d'hydrogène du mélange. Cet effet positif d'*Enterobacter* sp. a déjà été observée par Yokoi *et al.* (1998 ; 2002). Dans leurs études, les auteurs utilisent une co-culture d'*Enterobacter aerogenes* et de *Clostridium butyricum* pour produire de l'hydrogène à partir de pulpe de manioc. Ils associent l'augmentation d'hydrogène observée pour le mélange à la capacité d'*Enterobacter aerogenes* à éliminer les traces d'oxygène présentes dans le milieu et ainsi favoriser le travail des hydrogénases [Fe-Fe] qui sont particulièrement sensibles à l'oxygène. Il est possible que le même phénomène survienne dans notre étude même si toutes les précautions ont été prises pour éviter les traces d'oxygène dans le milieu.

D'un point de vue métabolique, l'augmentation de la quantité maximale d'hydrogène produite n'est pas due qu'aux voies acétate et butyrate. En effet, le mélange Eco A / *E. cloacae* produit moins de butyrate, plus d'éthanol et de succinate et autant de lactate qu'Eco A seul. L'augmentation significative de production d'hydrogène peut donc s'expliquer soit par la plus forte production d'acétate soit par l'utilisation par *Enterobacter cloacae* de la voie formiate (Equation V-8). Dans ce cas le formiate est un intermédiaire de la réaction totalement dégradé qui peut donc ne pas être détecté dans le milieu. Ceci pourrait ainsi expliquer pourquoi, contrairement à ce qui est observé en culture pure, aucune trace de formiate ne soit retrouvée dans le mélange Eco A / *E. cloacae*.

Cette hypothèse est d'autant plus probable qu'*E. cloacae* est retrouvé dans l'écosystème en fin de fermentation (Figure V-11).

- *Escherichia coli* a un effet significatif sur la production d'hydrogène d'Eco A :

Lorsqu'elle est seule et dans les conditions de l'étude, *Escherichia coli* présente une croissance et une production d'hydrogène modérées. Or l'ajout de cette souche à l'écosystème Eco A augmente la concentration maximale de la culture de 30%. L'ajout d'*Escherichia coli* présente donc un effet positif sur la croissance d'Eco A.

Cette augmentation de la croissance du mélange est accompagnée d'une augmentation significative ($p=0,049$) de la production maximale d'hydrogène. Cela indique que l'ajout *Escherichia coli* présente également un effet positif sur la production d'hydrogène de l'écosystème sélectionné. Cette augmentation de la quantité maximale d'hydrogène produite résulte d'une utilisation plus efficace du glucose vers la production d'hydrogène. En effet, non seulement le mélange produit moins de lactate et de succinate que le consortium seul, mais il produit plus d'acétate et de butyrate. La plus forte concentration en acétate est certainement due à l'acétate produit par *E. coli* qui vient s'accumuler à celui produit par le consortium. La plus grande production de butyrate est quant à elle due à l'augmentation en butyrate produit par les souches de type *Clostridium* sp. présentes initialement dans Eco A. En effet, *E. coli* ne produit pas de butyrate en culture pure. Cette surexpression de la voie butyrate chez *Clostridium* sp. peut être due à une plus grande production d'acétate engendrée par *E. coli* comme le suggère Colin *et al.* (2001). En effet, ces derniers ont montré que l'ajout d'acétate dans une culture de *C. butyricum* poussant sur du glycérol augmentait significativement sa concentration en biomasse et sa production en butyrate. Des observations similaires ont été rapportées par Seppälä *et al.* (2011) lors d'une étude sur la production d'hydrogène par voie fermentaire par une co-culture d'*E. coli* et de *C. butyricum*.

D'un autre côté, comme pour *Enterobacter cloacae*, l'augmentation de la production maximale d'hydrogène de l'écosystème peut être due à la capacité d'*E. coli* à éliminer les traces d'oxygène présentes dans le milieu ou à une combinaison des deux phénomènes décrits. Enfin, *E. coli* peut produire de l'hydrogène *via* la voie formiate. Ce dernier peut alors s'ajouter à l'hydrogène produit par le consortium.

Les hypothèses précédentes sur les différentes interactions entre *E. coli* et le reste de l'écosystème sont renforcées par le fait que les profils CE-SSCP du mélange confirment sa présence au sein du consortium en fin de fermentation.

- *Ralstonia eutropha* a un effet significatif sur la croissance et la production d'hydrogène d'Eco A :

Même si en culture pure *Ralstonia eutropha* montre une croissance faible, voire nulle, et une production d'hydrogène nulle, l'ajout de cette dernière dans le consortium Eco A a permis d'augmenter la croissance du mélange de manière significative. La D.O maximale du mélange

a atteint une valeur de 1,6 alors que celle d'Eco A n'a jamais dépassé 1. *Ralstonia eutropha* a donc eu un effet significativement positif sur la croissance de l'écosystème.

Cet effet sur la croissance du mélange a été accompagné par un effet significativement positif sur la production d'hydrogène qui a été multipliée par un facteur de près de 3,5. Ceci est à rapprocher avec un réseau métabolique global de l'écosystème orienté principalement vers la production d'acétate et de butyrate, la production de lactate et d'éthanol étant dans ce cas minimales. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que les profils de CE-SSCP des mélanges n'indiquent pas la présence de *Ralstonia eutropha* dans l'écosystème en fin de fermentation. Ainsi plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'augmentation des performances engendrées par *R. eutropha*

(i) L'augmentation de la quantité maximale d'hydrogène produit par le mélange peut être due à la sécrétion dans le milieu, par *Ralstonia eutropha*, d'une substance (non identifiée) favorisant la croissance et la production d'hydrogène des clostridies d'Eco A. Ainsi *R. eutropha* ne se maintient pas dans le milieu mais l'effet qu'elle a pu avoir en tout début de croissance de la culture serait rémanent et répétable entre les différents réplicats.

(ii) Une autre hypothèse peut être avancée en se basant sur les travaux du BIP de Marseille (partenaire du projet InGEcoH) sur l'étude de la co-culture, *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH) / *Clostridium acetobutylicum* ATTC824 (Cab). En effet, tout comme DvH, *Ralstonia eutropha* est connue pour consommer l'hydrogène du milieu lorsqu'elle est placée dans des conditions bien particulières. De plus, la structure des hydrogénases à [Ni-Fe] de *R. eutropha* et de *Desulfovibrio vulgaris* sont quasiment similaires (Burgdorf *et al.*, 2005 ; Volbeda *et al.*, 1996). Il est alors possible d'envisager que tout comme DvH, *Ralstonia eutropha* soit capable d'interagir directement avec une espèce du genre *Clostridium* (Bac 1) et ainsi orienter le flux métabolique de *Clostridium* vers les voies liées à la production d'hydrogène (acétate & butyrate) tout en diminuant le flux métabolique de la voie lactate. En effet, dans le cas du mélange entre Eco C et *Ralstonia eutropha* la production de lactate a été diminuée d'un facteur 10 par rapport à Eco C seul.

Ralstonia eutropha n'étant pas détectée en SSCP, pour que cette hypothèse soit vraie il faut que l'effet de *R. eutropha* soit nettement supérieur à son abondance ce qui la définirait également comme une espèce-clé de l'écosystème selon Smea (2010).

A ce stade, une analyse par pyroséquençage des échantillons d'ADN pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer ces différentes hypothèses en donnant une profondeur plus importante d'analyse de la communauté microbienne.

V.5.4 CONCLUSION DE L'ETUDE

Cette étude a permis d'évaluer si l'introduction de souches bactériennes exogènes aux fonctions redondantes et/ou complémentaires des souches indigènes d'un consortium permettrait d'améliorer ses performances de production d'hydrogène. Nos résultats ont montré que l'ajout des souches d'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* ont significativement amélioré la croissance et la production d'hydrogène du consortium « boues ». Par contre, aucun effet significatif de l'ajout des souches de *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Pseudomonas fluorescens* n'a pu être mis en évidence, même si un effet négatif est suspecté pour *Enterococcus casseliflavus* à partir du moment où il croît dans la culture. Un effet positif est également suspecté dans le cas de *Pseudomonas fluorescens*.

La possibilité d'utiliser des espèces exogènes à un écosystème comme Ingénieurs Ecologiques des Ecosystèmes Microbiens (IEEM), et ceci afin d'améliorer les performances de l'écosystème initial a donc été montrée.

En fonction des souches, plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette amélioration de performances. Les deux souches anaérobies facultatives, *E. cloacae* et *E. coli*, se sont maintenues dans l'écosystème et ont ainsi pu interagir avec leur environnement. Ces interactions peuvent être du type commensalisme. En effet, ces deux organismes sont capables d'épuiser les traces d'oxygène éventuellement présentes dans le milieu et ainsi favoriser la production d'hydrogène par les espèces du genre *Clostridium*. La production de substances tel que l'acétate par ces deux espèces peut aussi augmenter la croissance et la production d'hydrogène des espèces du genre *Clostridium*. Une relation de compétition pour le substrat peut également s'installer et dans ce cas *E. cloacae* et *E. coli* sont capable d'utiliser le glucose pour produire directement de l'hydrogène. Le volume d'hydrogène produit s'ajoute alors au volume produit par le consortium. Une combinaison de ces phénomènes constitue une hypothèse intermédiaire non négligeable.

Dans le cas de l'ajout de *Ralstonia eutropha*, l'augmentation de la croissance et de la production d'hydrogène du consortium peut être rémanente et due à la sécrétion initiale dans le milieu d'une substance non encore identifiée qui ne permet cependant pas son maintien dans le milieu. Une autre hypothèse pourrait être que *Ralstonia eutropha* interagisse physiquement avec les espèces *Clostridium* de l'écosystème et oriente leur métabolisme vers la production d'acétate et de butyrate qui sont les deux voies liées à la production d'hydrogène.

Dans tous les cas, une identification plus précise des souches présentes dans les différents écosystèmes sélectionnés, par une approche de pyroséquençage, pourrait être envisagée pour décrire de façon plus détaillée les interactions établies lors des différents mélanges.

Ces interactions sont-elles répétables quelles que soient les conditions de culture (notamment en cas de supplémentation du milieu en fer) et quel que soit l'écosystème dans lequel les souches sont implantées (plus ou moins divers) ? Les prochaines études vont nous permettre d'apporter des éléments de réponse à ces deux questions.

V.6 INTRODUCTION DE FACTEURS BIOTIQUES DANS UNE CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE SIMPLIFIEE (ECO B) PLACEE DANS UN MILIEU OPTIMISEE (SUPPLEMENTE EN SULFATE DE FER)

Pour cette deuxième série de batch, l'effet de l'ajout de huit souches pures sur la production d'hydrogène et sur le métabolisme d'un écosystème modèle (Eco B) a été évalué.

L'écosystème Eco B est issu de repiquages successifs d'Eco A dans le milieu de culture A (carence en FeSO₄) puis dans le milieu B (supplémenté en FeSO₄) (Cf. la partie II.2.2 du « Matériel et Méthodes » pour la composition des milieux). Ces repiquages successifs avaient pour but d'éliminer les espèces minoritaires de l'écosystème. Cette étude permettra donc de vérifier : (i) L'influence des espèces minoritaires, déjà présente dans l'inoculum initial, sur l'implantation des espèces ajoutées. (ii) L'influence du sulfate de fer sur les interactions microbiennes.

Cinq des huit souches testées lors de cette deuxième série de batch ont déjà été utilisées lors de l'expérimentation précédente. Il s'agissait des espèces : *Clostridium pasteurianum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha*. Seule *Enterobacter cloacae* n'a pu être testée lors de cette étude.

Néanmoins, trois nouvelles souches ont été testées : *Clostridium acetobutylicum*, deuxième souche de *Clostridium*, également connue pour produire de l'hydrogène et éventuellement compétitrice des souches déjà présentes dans l'écosystème modèle. L'ajout de cette souche permettra de tester si deux souches métaboliquement proches (*C. pasteurianum* et *C. acetobutylicum*) se comportent de la même façon lorsqu'elles sont introduites dans une culture mixte productrice d'hydrogène.

Lactobacillus bulgaris, bactérie homolactique du genre *Lactobacillus*, est une bactérie potentiellement compétitrice des productrices d'hydrogène vis-à-vis du glucose. De plus, les résultats du chapitre III ont montré que les souches du genre *Lactobacillus* sont fréquemment retrouvées dans les cultures mixtes qui produisent de l'hydrogène. Enfin ces souches sont connues pour leur capacité à inhiber la croissance d'autres bactéries en excréant dans le milieu de culture des substances inhibitrices de type bactériocines. Il est donc intéressant de tester l'influence d'une telle souche sur un écosystème producteur d'hydrogène.

Enfin, *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH) est connue pour consommer l'hydrogène en présence de sulfate et de lactate. De plus, des résultats intéressants ont déjà été obtenus en co-culture par Benomar *et al.* (en cours de soumission) qui ont montré que DvH pouvait agir sur le métabolisme de *Clostridium acetobutylicum* par l'intermédiaire d'une interaction physique et ainsi augmenter sa production d'hydrogène. Il est donc intéressant de voir si les mêmes phénomènes peuvent être observés en culture mixte.

A la différence de la première série de batch, cette série s'est déroulée dans des fioles de 600 mL avec 200 mL de volume utile. Le milieu de culture a été optimisé, notamment au niveau de la concentration en FeSO_4 qui a été revue à la hausse pour optimiser la production d'hydrogène des différentes cultures (Cf. composition du milieu B dans la partie II.2.2 du « Matériel et Méthodes »). De plus, l'utilisation de la micro-GC multiplexée, lors de cette série de batch, a permis de mesurer la concentration et le volume d'hydrogène de façon automatique et donc plus fréquemment.

Tout comme précédemment, des expériences ont été menées pour caractériser les cinétiques de croissance et de production d'hydrogène des souches pures et d'Eco B avant d'effectuer les mélanges « souche pure / Eco B », Cela a permis d'ajouter les souches au consortium Eco B, alors que les deux cultures étaient en phase exponentielle de croissance.

V.6.1 CARACTERISATION DES SOUCHES PURES ET DU CONSORTIUM ECO B

V.6.1.1 CARACTERISATION DE LA CONCENTRATION MAXIMAL DE BIOMASSE DANS UN MILIEU SUPPLEMENTE EN SULFATE DE FER

Les valeurs de $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ maximales obtenues en fin de phase exponentielle ont été utilisées afin de caractériser la concentration maximale en biomasse de chaque souche pure et du consortium Eco B dans le milieu B (supplémenté en sulfate de fer) (Figure V-12).

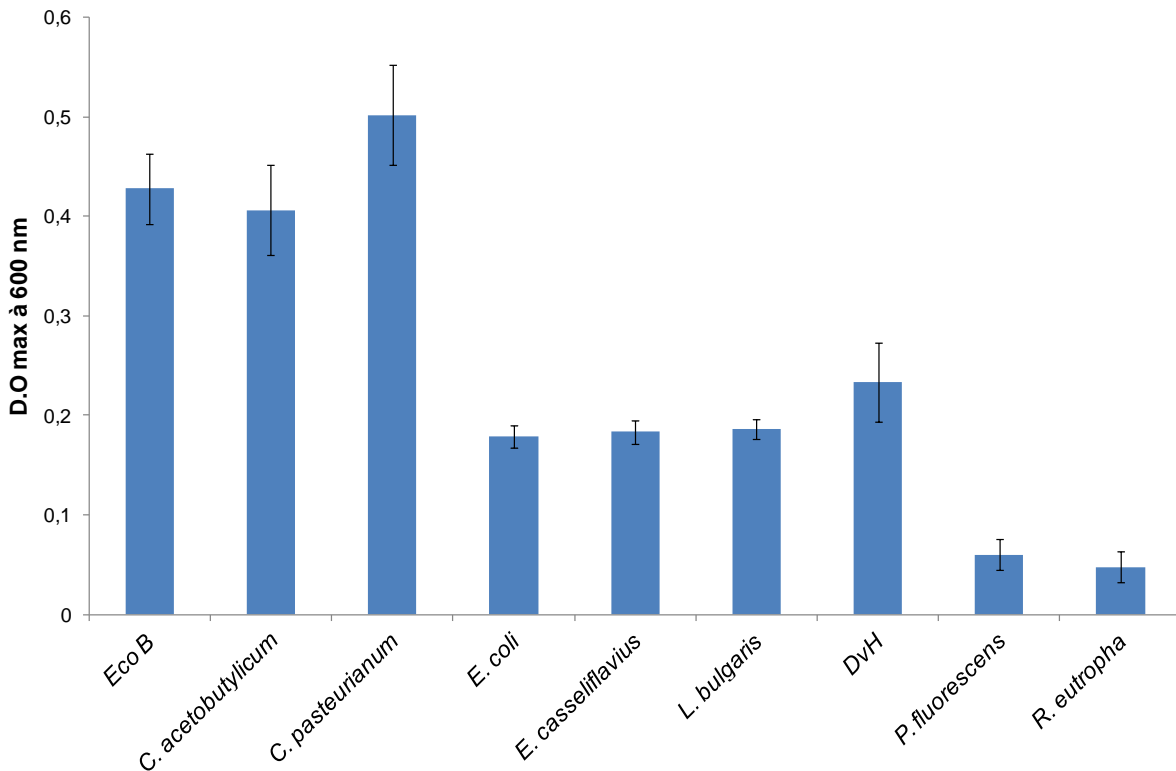


Figure V-12 : Concentration maximale des souches pures et du consortium Eco B sur le milieu de culture B. La concentration maximale en biomasse de chaque culture est représentée par la moyenne des D.O maximales à 600 nm à laquelle a été retranché la D.O du milieu seul.

La Figure V-12 indique que les souches pures et le consortium se sont adaptés différemment aux conditions et au milieu de culture. Trois principaux groupes se sont distingués : Le premier groupe, composé du consortium Eco B et des clostridies, présente des D.O maximales significativement supérieures (entre 0,43 et 0,50) à celles observées pour les autres souches pures. Le second contenant *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaris*, *Enterococcus casseliflavus* et *Desulfovibrio vulgaris* possèdent des D.O intermédiaires comprises entre 0,19 et 0,26. Enfin, *Ralstonia eutropha* se développait difficilement sur le milieu et présente une D.O inférieures à 0,10.

La comparaison de ces résultats avec ceux de l'étude précédente montre que l'augmentation de la concentration en sulfate de fer a divisé par deux les D.O maximales de la culture mixte et des souches de *Clostridium pasteurianum*, *Escherichia coli* et *Enterococcus casseliflavus*. De son côté, la D.O de *Ralstonia eutropha* n'a pas évoluée. Ceci est en désaccord avec les observations précédentes effectuées lors de l'augmentation de la concentration en sulfate de fer en réacteur continu dans le chapitre IV. Or le fer est indispensable à la croissance

bactérienne. Il est donc possible qu'un autre composé ait limité la croissance des bactéries qui poussent dans le milieu B (supplémenté en fer).

V.6.1.2 CARACTERISATION DU TEMPS DE LATENCE DES SOUCHES PURES ET DE ECO B

Le temps de latence, correspondant à la durée au bout de laquelle les souches entrent en phase exponentielle, constitue un bon indicateur de la capacité des souches à s'adapter à leurs conditions de culture. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau V-3.

Tableau V-3 : Caractérisation des temps de latence des souches pures et du consortium Eco B.

Inocula	Temps de latence (h)
Eco B	8
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	8
<i>Clostridium pasteurianum</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	15
<i>Lactobacillus bulgaris</i>	15
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
<i>Ralstonia eutropha</i>	20

Tout comme pour les résultats des D.O maximales obtenues en fin de phase exponentielle, les temps de latence observés permettent de séparer les différentes cultures en trois groupes : Le premier groupe, constitué du consortium Eco B et des deux souches de *Clostridium*, présentait des temps de latence minimaux de 8 heures. Les souches aérobies (*Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha*) ainsi que *Desulfovibrio vulgaris* ont eu les temps de latence les plus élevés (20 h) ce qui est en accord avec les résultats précédents. Enfin, des temps de latence intermédiaires ont été observés pour les souches anaérobies facultatives comme *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus* ou *Lactobacillus bulgaris*.

Ces variations des valeurs des temps de latence ont été prises en compte lors de l'ensemencement des souches pures et du consortium afin qu'ils soient tous deux en début de phase exponentielle de croissance lors du mélange.

V.6.1.3 CARACTERISATION PAR CE-SSCP DES SOUCHES PURES ET DE LA CULTURE ECO B

Comme précédemment, les différentes souches pures utilisées ainsi que le consortium Eco B ont été analysés par CE-SSCP (Figure V-13).

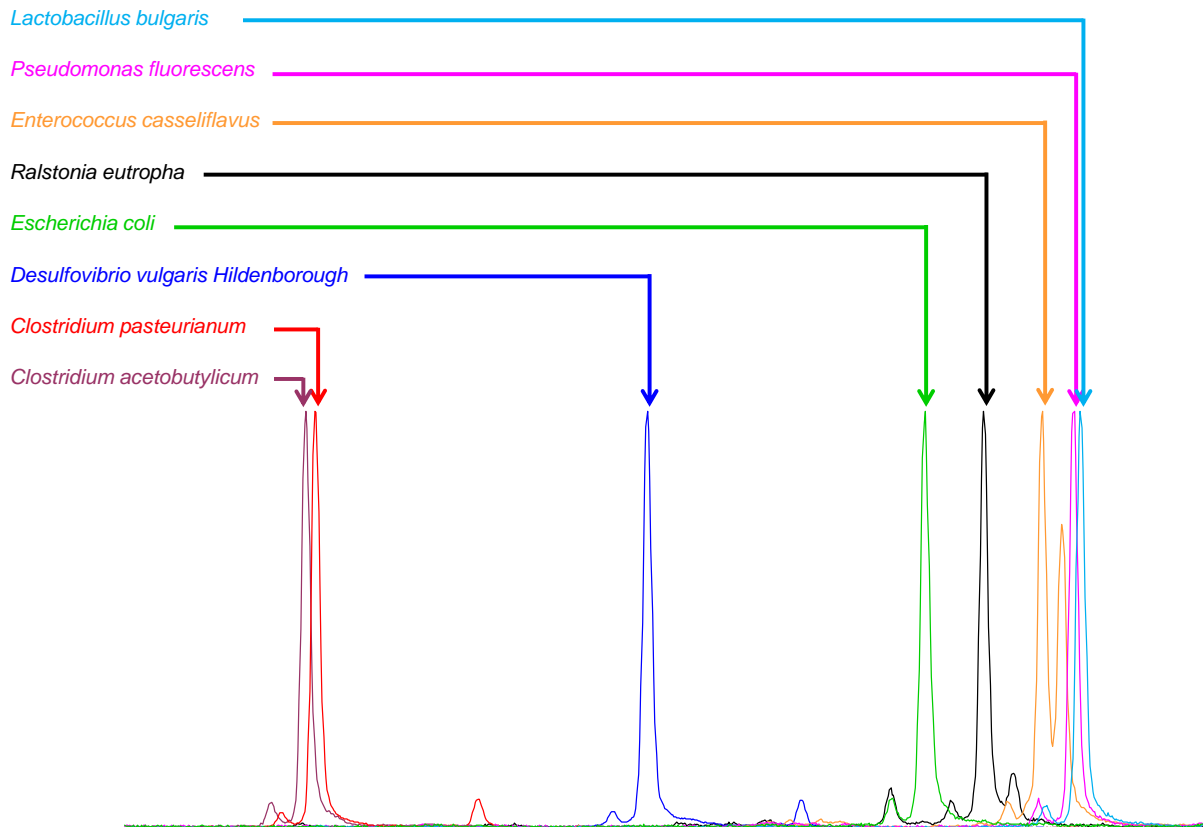


Figure V-13 : Profils de CE-SSCP des souches pures ajoutées au consortium Eco B. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

Hormis *Enterococcus casseliflavus*, l'ensemble des souches pures étudiées présentent des profils de CE-SSCP caractéristiques d'une souche pure avec un pic majoritaire précédé d'un petit pic correspondant à un isomère d'ADN. Le double pic d'*Enterococcus casseliflavus* est caractéristique de cette espèce et a déjà été observé lors de l'étude précédente. Les distances de migration observées sont spécifiques à chaque souche étudiée ce qui a permis de les identifier lors des tests de mélange avec le consortium Eco B.

La structure de la communauté microbienne du consortium Eco B a également été analysée par CE-SSCP (Figure V-14). Le profil ainsi obtenu n'est composé que d'un seul pic

majoritaire et présente un indice de Simpson de 1,02 ce qui montre que l'écosystème a été fortement simplifié. Ainsi, à force de repiquages successifs, l'écosystème Eco B n'était plus constitué que d'une seule espèce ou tout du moins la quantité d'ADN des autres communautés microbiennes potentiellement présentes au sein de l'écosystème était inférieure au seuil de détection.

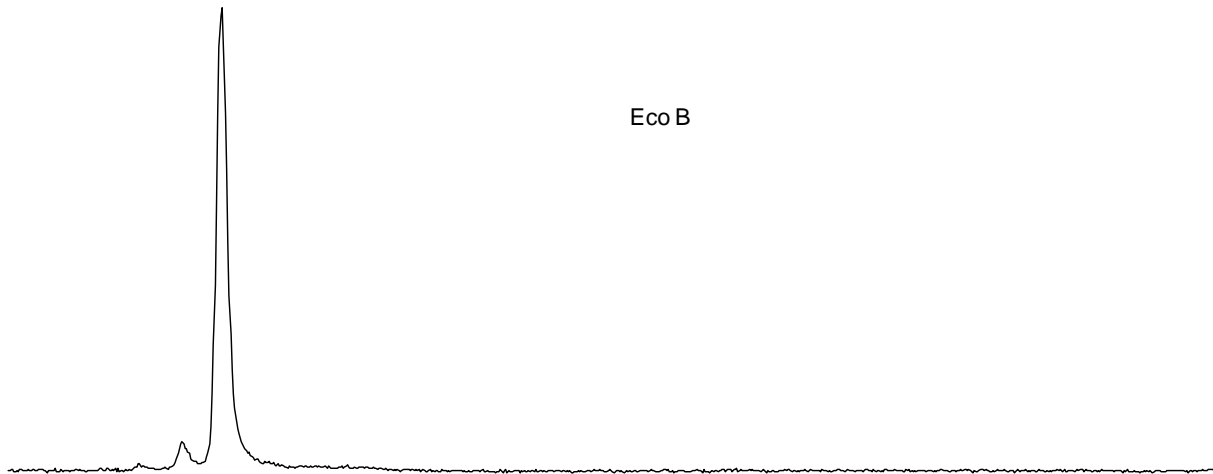


Figure V-14 : Profil de CE-SSCP du consortium Eco B. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

V.6.1.4 CARACTERISATION DES PERFORMANCES INDIVIDUELLES DE PRODUCTION D'HYDROGENE DES DIFFERENTES SOUCHES ET D'ECO B

Le suivi de la production d'hydrogène par les souches pures et le consortium Eco B cultivés individuellement a permis d'en déterminer les cinétiques de production d'hydrogène dont les résultats modélisés grâce à la courbe d'ajustement de Gompertz sont présentés dans le Tableau V-4. Ces résultats ont permis de caractériser les capacités des souches pures et du consortium Eco B à produire ou non de l'hydrogène et ont ainsi pu servir de comparatif pour évaluer l'impact de l'ajout des souches pures lors de leurs confrontations avec le consortium.

Tableau V-4 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène des souches pures et du consortium Eco B. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d'hydrogène.

Culture	P _{max}		H _{max}		Rendement	
	(mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		(mL H ₂ .L ⁻¹)		(mol H ₂ .mol ⁻¹ glc consommé)	
Eco B	80,6	±12,8	2 439,2	±50,0	1,73	±0,04
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	247,7	±15,4	2 310,7	±133,0	1,94	±0,22
<i>Clostridium pasteurianum</i>	77,5	±7,0	2 572,7	±160,0	2,02	±0,04
<i>Escherichia coli</i>	18,3	±0,7	269,9	±38,5	0,90	±0,12
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-
<i>Lactobacillus bulgaris</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-
<i>Ralstonia eutropha</i>	0,0	-	0,0	-	0,00	-

En fonction de leurs performances de production d'hydrogène, les souches pures et le consortium ont pu être classés en trois groupes. Le premier groupe, constitué d'Eco B, de *Clostridium acetobutylicum* et de *Clostridium pasteurianum*, présente les meilleures performances. La quantité maximale d'hydrogène produite (H_{max}) par ces trois cultures était proche avec plus de 2 300 mL H₂.L⁻¹. Les rendements en hydrogène obtenus pour *Clostridium acetobutylicum* et de *Clostridium pasteurianum* ont également été proches avec respectivement 1,94 et 2,02 mol H₂.mol⁻¹glc consommé. Le rendement d'Eco B a été plus faible, avec en moyenne, 1,73 mol H₂.mol⁻¹glc consommé. Des différences significatives ont aussi été observées au niveau des productivités maximales en hydrogène (P_{max}). *Clostridium acetobutylicum* possède la productivité la plus élevée avec 247,7 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹. Il est suivi par Eco B et *Clostridium pasteurianum* qui ont présenté des productivités trois fois moins importantes avec respectivement 80,6 et 77,5 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹.

Le deuxième groupe n'est constitué que d'*Escherichia coli* qui produit de l'hydrogène mais avec des performances significativement moins importantes que celles du premier groupe. En effet, *E. coli* a produit environ dix fois moins d'hydrogène que les cultures du premier groupe avec en moyenne 269,9 mL H₂.L⁻¹. La productivité maximale d'hydrogène était alors de 18,3 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹ avec un rendement de 0,9 mol H₂.mol⁻¹glc consommé.

Enfin, le dernier groupe est constitué d'*Enterococcus casseliflavus*, de *Lactobacillus bulgaris*, de *Pseudomonas fluorescens*, de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha*, qui n'ont pas produit d'hydrogène.

V.6.1.5 CARACTERISATION DU RESEAU METABOLIQUE DES DIFFERENTES SOUCHES PURES ET D'ECO B

La production d'hydrogène par les souches pures et le consortium peut être caractérisée plus finement par le suivi des métabolites produits lors de la fermentation du substrat. En effet, le choix des voies métaboliques empruntées par les microorganismes fermentaires influe directement sur la production d'hydrogène.

Le métabolisme d'Eco B et des différentes souches pures ont été caractérisés en analysant les métabolites produits en fin de fermentation (Figure V-15). La production d'hydrogène exprimée en millimole par litre de milieu a également été reportée sur le graphique. Comme précédemment, l'échelle de l'axe secondaire du graphique représentant la quantité maximale d'hydrogène produite a été multipliée par deux par rapport à celle représentant la quantité de matière des métabolites afin de pouvoir comparer la valeur théorique de production d'hydrogène à celle mesurée. En effet, si l'hydrogène était uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en hydrogène égalait deux fois la quantité d'acétate et de butyrate produite.

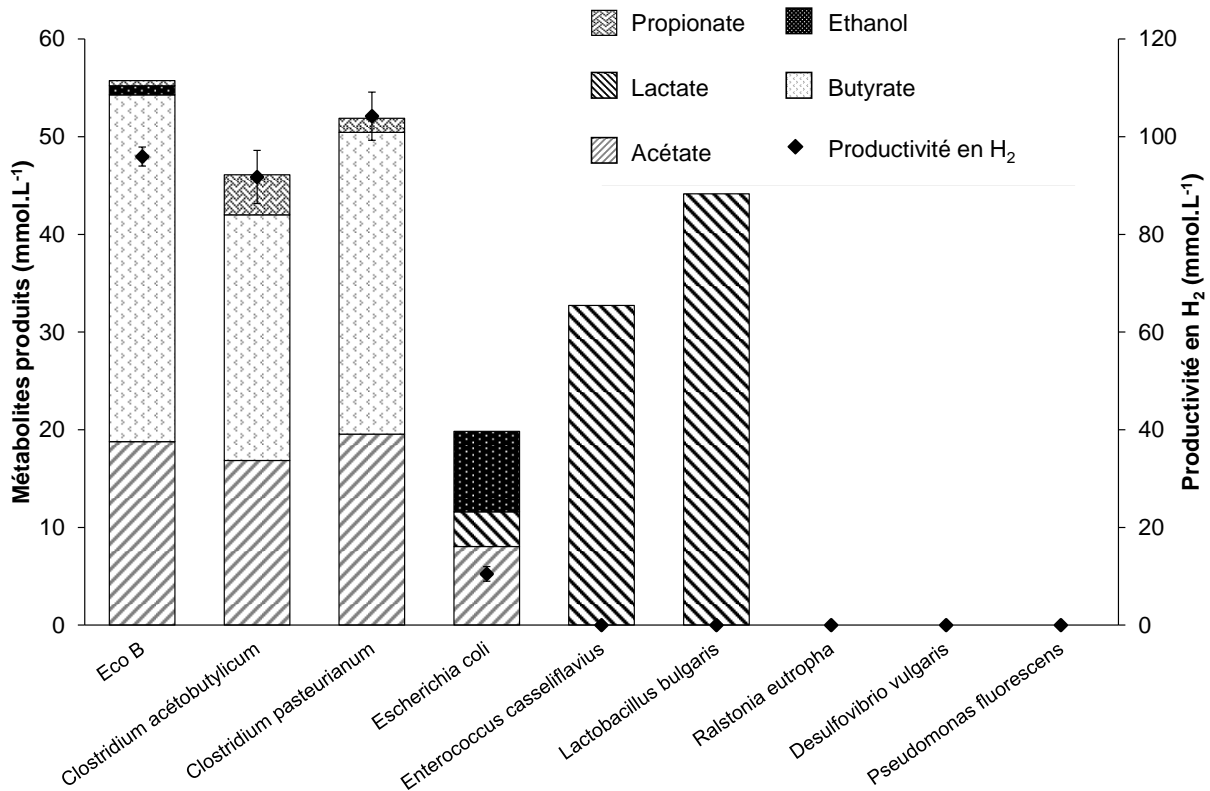


Figure V-15 : Hydrogène et métabolites produits par les différentes souches pures et l'écosystème de référence Eco B. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Les résultats présentés sur la Figure V-15 indiquent clairement qu'Eco B, *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium pasteurianum* utilisent préférentiellement les voies acétate et butyrate. Pour ces trois cultures, ces deux métabolites représentent entre 91 et 97 % de l'ensemble des métabolites produits. Néanmoins, de faibles quantités de propionate, comprises entre 0,5 et 4 mmol.L⁻¹, ont été détectées pour ces trois cultures avec en plus 0,9 mmol.L⁻¹ d'éthanol pour Eco B. Pour les deux cultures de *Clostridium*, la production d'hydrogène mesurée est du même ordre que la production d'hydrogène théorique si tout l'hydrogène était produit par les voies acétate et butyrate. Dans le cas d'Eco B la production d'hydrogène mesurée est inférieure à la production théorique avec un ratio H₂ produit / 2(Acétate+Butyrate) de 0,88 ; indiquant ainsi une possible reconsommation de l'hydrogène par homoacétogénèse.

D'autre part, *Escherichia coli* possède un métabolisme mixte et a produit de l'acétate, du lactate et de l'éthanol avec respectivement 8; 3,5 et 8,2 mmol.L⁻¹.

Par ailleurs, *Enterococcus casseliflavus* et *Lactobacillus bulgaris* n'ont produit que du lactate à partir de la fermentation du glucose sans production de gaz associée (fermentation homolactique).

Enfin, comme avec le milieu A, aucune production de métabolite n'a été détectée pour *Desulfovibrio vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha* lorsqu'elles ont été mises en culture dans le milieu B.

V.6.2 IMPACT DE L'AJOUT D'UNE SOUCHE PURE DANS LA CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE ECO B

V.6.2.1 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES SUR LES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE DU CONSORTIUM ECO B

De nouvelles cinétiques de production d'hydrogène ont été établies lors du mélange des souches pures avec le consortium Eco B. Le modèle de Gompertz a pu être utilisé sur ces cinétiques afin d'établir les H_{\max} , les P_{\max} et les rendements de production des différents mélanges (Tableau V-5). L'ensemble des cinétiques de production d'hydrogène lors des différentes confrontations est présenté en Annexe III.

Tableau V-5 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco B et des différents mélanges souche pure / consortium. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d'hydrogène. La significativité statistique des résultats des différents mélanges souche pure/consortium par rapport à Eco B seul est indiqué par les symboles « ns » pour non significatif et * pour statistiquement significatif ($p < 0,05$; ANOVA).

Mélange	P _{max} (mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		H _{max} (mL H ₂ .L ⁻¹)		Rendement (mol H ₂ .mol ⁻¹ glc _{cons})	
Eco B	80,6	±12,8	2 439,2	±50,0	1,73	±0,04
Eco B + <i>Clostridium acetobutylicum</i>	112,8 ^{ns}	±36,3	1 913,0 ^{ns}	±557,4	1,35 ^{ns}	±0,39
Eco B + <i>Clostridium pasteurianum</i>	83,2 ^{ns}	±52,0	1 987,2 ^{ns}	±574,8	1,41 ^{ns}	±0,41
Eco B + <i>Escherichia coli</i>	76,2 ^{ns}	±9,7	2 234,3 ^{ns}	±417,6	1,58 ^{ns}	±0,30
Eco B + <i>Enterococcus casseliflavus</i>	85,5 ^{ns}	±26,3	2 648,7 ^{ns}	±259,5	1,87 ^{ns}	±0,18
Eco B + <i>Lactobacillus bulgaris</i>	63,2 ^{ns}	±5,5	2 468,6 ^{ns}	±201,5	1,75 ^{ns}	±0,14
Eco B + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	91,7 ^{ns}	±15,9	2 799,2 [*]	±127,4	1,98 [*]	±0,09
Eco B + <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	70,0 ^{ns}	±10,0	2 622,8 ^{ns}	±132,7	1,86 ^{ns}	±0,09
Eco B + <i>Ralstonia eutropha</i>	81,9 ^{ns}	±3,4	2 435,6 ^{ns}	±162,8	1,72 ^{ns}	±0,12

Les résultats indiquent qu'hormis *Pseudomonas fluorescens* aucune souche rajoutée à l'écosystème n'a eu d'effets significatifs sur les performances de production d'hydrogène. Ainsi en moyenne la productivité maximale d'Eco B et des différents mélanges a été de 90,9 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹. De même la quantité maximale moyenne d'hydrogène produit par Eco B et les différents mélanges a été de 2343 mL H₂.L⁻¹.

Pseudomonas fluorescens n'a pas eu d'effet significatif sur la productivité maximale en hydrogène mais l'ajout de cette souche a permis d'augmenter de 15% la quantité maximale d'hydrogène produite ($p < 0,05$; ANOVA). Parallèlement à la production d'hydrogène, le rendement a également été augmenté de manière significative.

V.6.2.2 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES SUR LE METABOLISME GLOBAL DE L'ECOSYSTEME ECO B

Afin de mesurer l'influence des souches pures sur le réseau métabolique du consortium Eco B, la distribution des métabolites produits en fin de fermentation a été effectuée pour chaque mélange puis a été comparée à celle d'Eco B seul (Figure V-16).

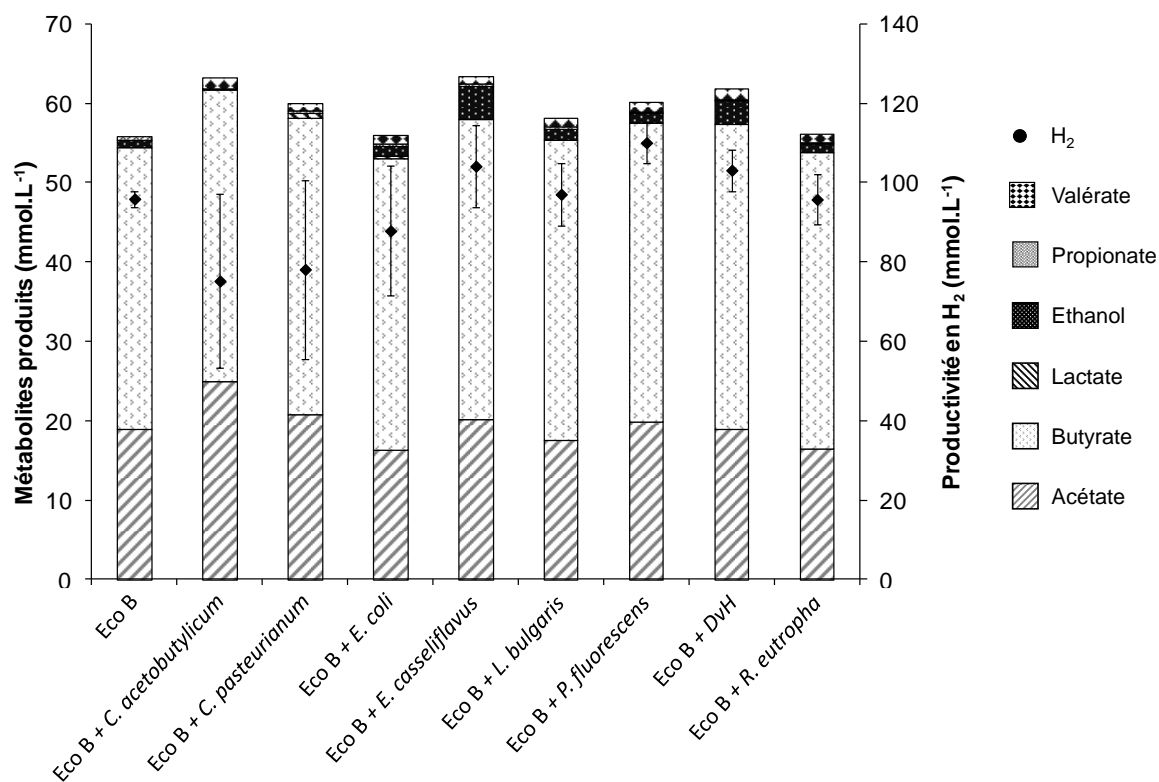


Figure V-16 : Hydrogène et métabolites produits par le consortium Eco B et les différents mélanges souche pure / Eco B. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

L'ajout d'une souche pure au sein du consortium Eco B ne semble pas avoir eu d'effets significatifs sur le métabolisme globale de l'écosystème, et ce quelle que soit la souche. Comme pour Eco B, l'acétate et le butyrate ont été les métabolites les plus abondants de tous les mélanges en fin de fermentation. En effet, ces deux métabolites représentent au minimum 91% des métabolites produits par le mélange Eco B / *E. casseliflavus*. Ce pourcentage peut atteindre 97% pour Eco B ou pour le mélange Eco B / *C. acetobutylicum*.

Néanmoins, une différence a pu être observée pour les autres métabolites qui ne représentent que quelques pourcents des métabolites totaux. Ainsi une faible production de valérate a été observée pour tous les mélanges alors qu'il n'est pas produit par Eco B seul. De même, une faible proportion de lactate a été mesurée pour les mélanges entre Eco B et *C. pasteurianum* ou *E. coli*. La production d'éthanol a varié également d'une culture à l'autre mais dans tous les cas, elle ne dépasse pas 6,7 % de la production totale de métabolites.

D'autre part, pour tous les mélanges, sauf pour Eco B / *P. fluorescens*, la production d'hydrogène mesurée a toujours été inférieure à la production d'hydrogène théorique si tout l'hydrogène avait été produit par les voies acétate et butyrate.

V.6.2.3 CARACTERISATION PAR CE-SSCP DES COMMUNAUTES MICROBIENNES PRESENTES DANS LES DIFFERENTS MELANGES

Les profils de CE-SSCP ont été réalisés pour chaque mélange entre le consortium Eco B et une des souches pures sélectionnées. La structure de la communauté microbienne finale étant similaire d'un réplikat à l'autre, un seul profil, représentatif de chaque mélange, est présenté Figure V-17.

D'après les profils de CE-SSCP ci-dessous, aucune souche introduite dans l'écosystème Eco B, hormis *Lactobacillus bulgaris*, n'a eu de croissance suffisante pour être détectée en fin de fermentation. Cependant, les distances de migration de Bac 1, espèce majoritaire initialement présente chez Eco B, et de *Clostridium pasteurianum* étant similaire, il est difficile de savoir si le pic observé correspond à Bac 1, à l'espèce introduite ou encore à un mélange des deux.

D'autre part, quel que soit le mélange, une même majoritaire (Bac 1) semble dominer les écosystèmes sélectionnés. Cette espèce est retrouvée initialement comme unique majoritaire chez Eco B. Alors que la plupart des écosystèmes finaux présente des profils de CE-SSCP ressemblant à des profils de souche pure, une nouvelle espèce (Bac 3) a fait son apparition après l'ajout de *Ralstonia eutropha* et de *Pseudomonas fluorescens*. Pour ces deux mélanges, Bac 3 est présente de manière minoritaire avec environ 5% d'abondance relative. De même, *Lactobacillus bulgaris* se maintient de façon minoritaire dans l'écosystème et ne représente que 3% d'abondance relative.

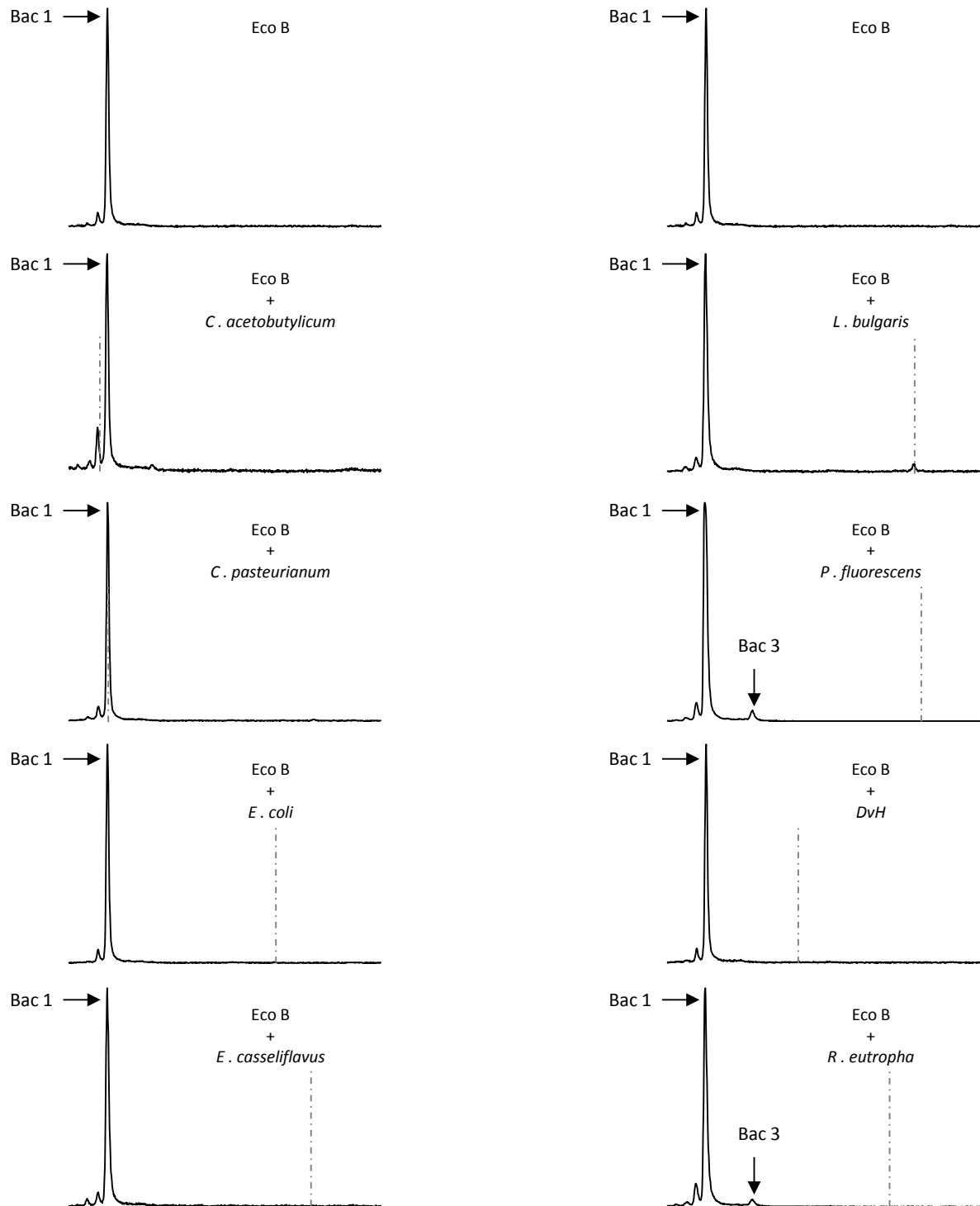


Figure V-17 : Structure des communautés microbiennes des différents mélanges Eco B / souche pure en fin de batch. Pour chaque profil, le trait en pointillé indique la position de migration de la souche introduite dans le mélange. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

V.6.3 DISCUSSION

V.6.3.1 SOUCHES PURES, TROIS NIVEAUX DE PRODUCTION D'HYDROGENE

La croissance et les performances de production d'hydrogène diffèrent d'une souche à l'autre. Trois groupes se distinguent :

- *Clostridium* sp. producteur d'hydrogène :

Tout comme précédemment, le milieu de culture utilisé, et surtout les conditions opératoires sélectionnées, semblent favoriser la croissance des bactéries du genre *Clostridium*. En effet, *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium pasteurianum*, qui possèdent un métabolisme anaérobie strict, se sont mieux développées que les autres souches et ont présenté des D.O maximales élevées (Figure V-12) avec des temps de latence minimaux de 8 heures. Cette forte croissance s'est accompagnée de performances élevées de production d'hydrogène (Tableau V-4). Individuellement, ces deux espèces ont présenté des productivités en hydrogène les plus élevées et les quantités d'hydrogène produites ont été plus de deux fois plus importantes que dans l'étude précédente. Cette production d'hydrogène était directement corrélée aux voies métaboliques empruntées par les microorganismes. Or *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium pasteurianum* ont fermenté le glucose pour ne produire presque exclusivement de l'acétate et du butyrate avec un ratio $H_2/[2 \times (Bu+Ac)]$ très proche de un, ce qui signifie que l'hydrogène n'a pas été reconstitué par homoacétogénèse. D'ailleurs, les rendements en hydrogène observés de 1,94 et de 2,02 mol $H_2 \cdot mol^{-1} glc_{consommé}$ font partie des hauts rendements observés dans la littérature pour ces deux espèces (Wang & Wan, 2009a). Par rapport à la première série de batch, les espèces du genre *Clostridium* semblent ici utiliser le glucose de façon plus efficace pour la production d'hydrogène en produisant moins de métabolites liés au détournement du potentiel hydrogène. Ceci peut être expliqué, notamment par la supplémentation en fer du milieu B, diminuant ainsi le stress cellulaire chez *Clostridium* sp.

- *Escherichia coli* producteur d'hydrogène mais en quantité moins importante que *Clostridium* sp. :

Escherichia coli produit le même mélange de métabolites que lors des premières expérimentations en batch avec un milieu carencé en sulfate de fer. Cependant, du fait d'une quantité de biomasse qui a été divisé par deux, les quantités de métabolites produites sont deux fois moins importantes. Un autre composé du milieu doit limiter la croissance d'*E. coli*. Cette hypothèse est d'autant plus vraie que contrairement aux cultures de *Clostridium*, du glucose a été retrouvé en fin de batch pour les cultures d'*E. coli*.

Par contre la production maximale d'hydrogène d'*E. coli* est identique pour les deux études. Son rendement de production d'hydrogène de $0,9 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glc}_{\text{ consommé}}$ correspond, d'ailleurs, aux valeurs référencées dans la littérature (Podestá *et al.*, 1997). La voie formiate de production d'hydrogène par *E. coli* n'est donc pas altérée par l'augmentation de la concentration en fer du milieu.

- *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralsonia eutropha*, *Lactobacillus bulgaris* et *Desulfovibrio vulgaris* ne produisent pas d'hydrogène:

Enterococcus casseliflavus et *Lactobacillus bulgaris* sont deux bactéries anaérobies facultatives, homolactiques qui ne produisent pas d'hydrogène à partir du glucose et dont la croissance, dans les conditions de cette étude, reste modérée mais similaire aux résultats de la littérature (Sabia *et al.*, 2004 ; Burgos-Rubio *et al.*, 2008 ; Mende *et al.*, 2012).

Pseudomonas fluorescens et *Ralsonia eutropha* ne poussent quasiment pas et n'ont pas d'activité métabolique mesurable dans les conditions fixées pour cette étude. En effet, la température optimale de croissance de *P. fluorescens* est comprise entre 25 et 30°C. C'est une espèce aérobie stricte mais qui est capable d'utiliser le nitrate à la place de l'oxygène comme accepteur final d'électron (Bergey *et al.*, 1984). Ceci explique sa faible activité lorsqu'elle est placée à 37°C en anaérobiose. Cependant, Givskov *et al.* (1994) ont montré que des cultures de *Pseudomonas* pouvaient survivre plus d'un mois lorsqu'elles étaient placées dans des conditions défavorables.

De même, *R. eutropha* n'a pas été placé dans des conditions optimales pouvant favoriser sa croissance. En effet, *R. eutropha* est anaérobie facultative mais doit transformer le nitrate ou

le nitrite en azote pour pouvoir croître en conditions anaérobies (Cramm, 2009). Sa température optimale de croissance se situe alors aux alentours de 30°C (Bergey *et al.*, 1984). L'absence de croissance chez *R. eutropha* en cas de raréfaction de l'oxygène a déjà été observé dans la littérature (Friedrich *et al.*, 1979). Cependant, en cas de stress *R. eutropha* est capable de sécréter du poly- β -hydroxybutyrate (PHB), molécule qui s'accumule dans la cellule, lui servant de source d'énergie et lui permettant de survivre lorsqu'elle est placée dans des conditions défavorables (Müller *et al.*, 1999). De plus, *R. eutropha* possède trois hydrogénases à site [Ni-Fe] différentes qui lui permettent d'utiliser l'hydrogène comme seule source d'énergie lorsqu'elle croît dans des conditions autotrophes aérobies (Burgdorf *et al.*, 2005).

Desulfovibrio vulgaris est une bactérie sulfato-réductrice, anaérobie stricte, mésophile et mobile. Dans le milieu naturel, elle est capable de consommer l'hydrogène par réduction des sulfates présent dans le milieu. Dans notre étude, l'absence d'hydrogène et les faibles concentrations de sulfate présentes dans le milieu de culture ne permettent pas à DvH de développer une activité métabolique détectable, lorsqu'elle est cultivée seule.

V.6.3.2 ECO B, UN ECOSYSTEME SIMPLIFIE ET PLACE DANS UN MILIEU OPTIMISE POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE

Après de nombreux repiquages successifs, Eco A a évolué en se simplifiant pour donner Eco B. Ceci est confirmé par l'évolution de l'indice de Simpson qui passe de 2,75 à 1,03. Au final, Eco B ne comprend plus qu'une seule espèce, ou tout du moins la quantité d'ADN des autres communautés microbiennes potentiellement présentes au sein de l'écosystème est inférieure au seuil de détection de la CE-SSCP.

De plus, tous les indicateurs mesurés au cours de cette étude (la croissance microbienne, la distance de migration du pic sur le profil de CE-SSCP, le métabolisme mise en jeu et les performances de production d'hydrogène) semblent indiquer que la souche présente chez Eco B fait partie du genre *Clostridium* et est vraisemblablement l'espèce *pasteurianum*. En effet, les profils de CE-SSCP de ces deux espèces se superposent parfaitement, leur croissance est identique dans le milieu et leurs caractéristiques de production d'hydrogène (P_{max} , H_{max} , voie métabolique et rendement) sont similaires.

Par ailleurs, la comparaison des performances entre Eco A et Eco B montre que la production d'hydrogène de ce dernier a été maximisée et multipliée par un facteur 5 (Figure V-18).

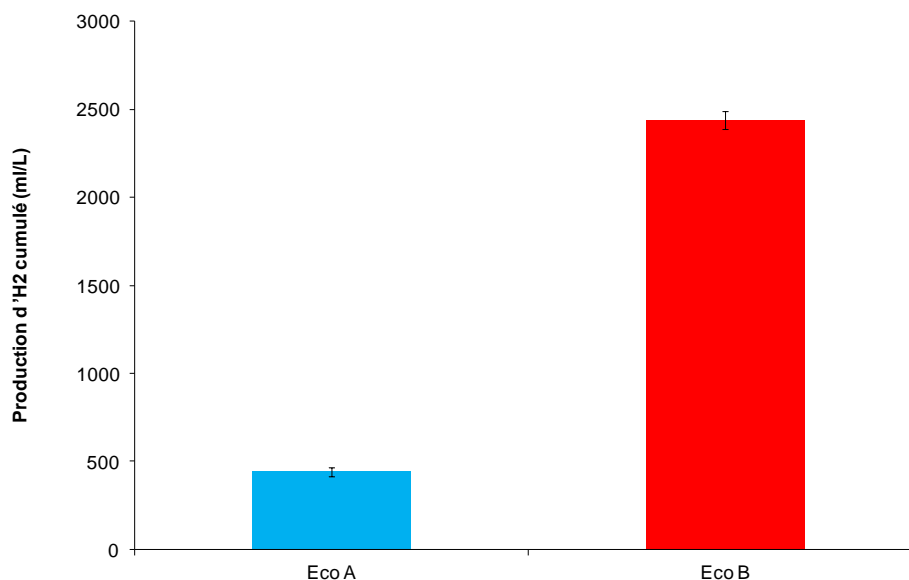


Figure V-18 : Comparaison de la production d'hydrogène cumulée d'Eco A et d'Eco B

Deux paramètres peuvent expliquer l'amélioration des performances de production d'hydrogène d'Eco B. (i) L'optimisation du milieu de culture, et notamment de la concentration en fer, a vraisemblablement permis d'augmenter l'activité de production d'hydrogène des hydrogénases [Fe-Fe]. En effet, le fer est un constituant essentiel du site actif de ces dernières. De nombreuses études ont montrées qu'une augmentation de la concentration en fer du milieu provoquait une augmentation de la production d'hydrogène (Wang & Wan, 2008b ; Wang & Wan, 2009a ; Karadag & Puhakka, 2010b). Lee *et al.* (2001) ont également montré que l'augmentation de la concentration en fer favorisait la production d'acétate et de butyrate au détriment des métabolites non associé à la production d'hydrogène comme l'éthanol ou le butanol. Or Eco A produit $22,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de lactate et $5,54 \text{ mmol.L}^{-1}$ d'éthanol alors qu'Eco B ne produit pas de lactate et seulement $0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ d'éthanol.

(ii) La simplification de l'écosystème (Figure V-19) a pu entrainer la disparition de bactéries minoritaires qui orientaient une partie du métabolisme globale d'Eco A vers des voies consommatrices du potentiel hydrogène. En effet, les résultats du chapitre III ont montré que les bactéries minoritaires avaient un rôle important sur le métabolisme et les performances de production d'hydrogène d'une culture mixte. Les bactéries lactiques sont notamment capables de diminuer le rendement et la productivité d'une culture de façon substantielle. La présence

de ces bactéries peut expliquer la forte concentration de lactate observé chez Eco A et du coup son faible rendement en hydrogène.

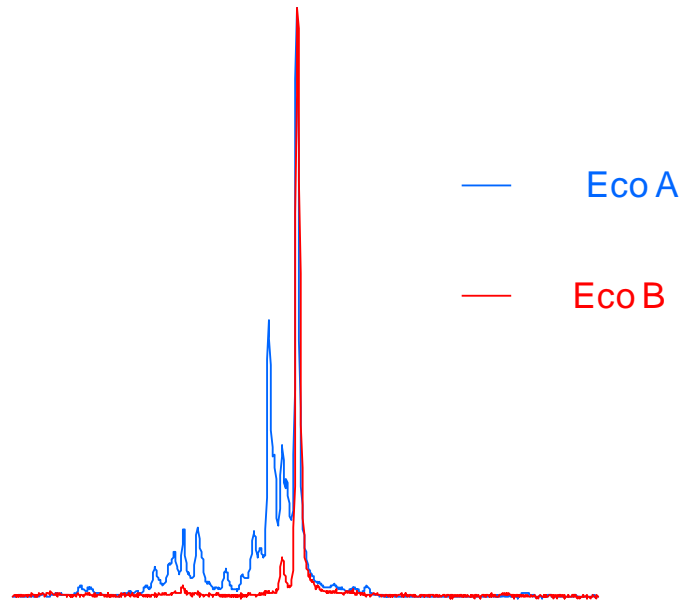


Figure V-19 : Comparaison de la structure des communautés microbiennes d'Eco A et d'Eco B. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance de migration et l'abondance relative des pics.

V.6.3.3 IMPACT DES BACTERIES EXOGENES SUR LE METABOLISME ET LA PRODUCTION D'HYDROGENE DU CONSORTIUM ECO B

- *Pseudomonas fluorescens* : seule souche ayant un impact sur la production d'hydrogène de l'écosystème :

En culture pure, il a été montré que la croissance de *Pseudomonas fluorescens* est faible et sa production de métabolites et d'hydrogène est nulle. Cependant, d'après les résultats du Tableau V-5, *P. fluorescens* est la seule souche dont l'ajout ait eu un impact significatif sur les performances de production d'hydrogène d'Eco B. En effet, malgré le fait que le réseau métabolique de l'écosystème n'ait pas été modifié de manière significative, sa production d'hydrogène a augmenté de 15 %. Cette augmentation de productivité peut être expliquée en partie en calculant le ratio $H_2 / [2 (Ac + Bu)]$. Il est de 0,88 pour Eco B et de 0,96 pour le mélange *P. fluorescens* / Eco B. Dans ce cas, la reconsommation de l'hydrogène via l'homoacétogénèse ou la voie propionique est donc limitée.

Peu d'études ont porté sur l'utilisation de *P. fluorescens* en anaérobiose et en culture mixte. Cependant en se basant sur ce qui a déjà été observé dans les études précédentes, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'augmentation de production d'hydrogène observée : (i) La limitation de la reconsommation d'hydrogène n'est pas due à *Pseudomonas* mais à l'espèce Bac 3 qui a été retrouvée en proportion minoritaire dans les trois mélanges entre Eco B et *P. fluorescens*. Cependant, la même structure de communauté est obtenue après l'ajout de *Ralstonia Eutropha* au sein d'Eco B et aucune différence significative de production d'hydrogène n'a pu être observée. L'influence de Bac 3 semble donc être limitée et l'effet observé sur la production d'hydrogène est vraisemblablement lié à *P. fluorescens*. Dans ce cas, les hypothèses suivantes peuvent être émises :

(ii) Soit *P. fluorescens* sécrète une substance (pas encore identifiée) qui limite la reconsommation d'hydrogène par l'espèce de *Clostridium* dans Eco B ; ce phénomène étant alors rémanent puisque *P. fluorescens* n'est pas détecté en fin de fermentation. (iii) Soit *P. fluorescens* interagit directement avec *Clostridium* en formant des nanotubes, ou autres systèmes de transfert de matériel cellulaire, et favorisant ainsi la production d'hydrogène comme dans l'hypothèse formulée dans l'étude précédente pour *Ralstonia eutropha*. Mais dans ce cas elle devrait être retrouvée en fin de batch sur les profils de CE-SSCP. Sauf si *P. fluorescens* est belle et bien présente dans le milieu mais en quantité bien trop faible pour pouvoir être détecté en CE-SSCP. Son effet serait alors nettement supérieur à son abondance ce qui la définirait comme une espèce clé de l'écosystème selon Smee (2010).

- Influence non significative des autres espèces

Pour l'ensemble des autres espèces introduites, aucun effet significatif n'a pu être observé que ce soit sur les performances de production d'hydrogène ou sur le métabolisme de l'écosystème. Cependant l'ajout d'un compétiteur du genre *Clostridium* engendre des écarts types important. Ces espèces semblent déstabiliser l'écosystème en favorisant le phénomène d'homoacétogénèse au sein de l'écosystème. En effet dans le cas de l'ajout de *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium pasteurianum* les ratios moyens $H_2 / [2 (Ac + Bu)]$ sont respectivement de 0,61 et 0,67 indiquant une surproduction d'acétate et/ou une consommation d'hydrogène. Ce phénomène peut être lié à la compétition entre les différentes espèces de *Clostridium* qui rend les conditions dans le milieu plus défavorables, ce qui a pour effet de

réorienter le métabolisme des clostridies vers des voies qui leur sont plus favorables comme l'homoacétogénèse (Khanal *et al.*, 2004).

Lactobacillus bulgaris est la seule espèce à s'être implantée dans l'écosystème, néanmoins aucun effet n'est observé sur les paramètres macroscopiques de la culture. Aucune production de lactate n'a d'ailleurs été observée dans aucun des triplicats. Sachant qu'en culture pure *L. bulgaris* ne produit que du lactate, il est possible de se demander comment elle arrive à se maintenir dans l'écosystème. Une des hypothèses possibles s'appuie sur la capacité de certaines lactobacilles à produire des EPS pour former des biofilms ou des flocons dans le milieu. Il est alors possible que *Lactobacillus* interagisse avec *Clostridium* en formant des nanotubes et échange des métabolites, des électrons ou des intermédiaires énergétiques pour pouvoir survivre.

V.6.4 CONCLUSION DE L'ETUDE

Cette étude a permis d'analyser les conséquences de l'introduction d'espèces exogènes sur le fonctionnement d'un écosystème simplifié (Eco B) et dans un milieu de culture supplémenté en sulfate de fer. Les résultats obtenus ont montré que seul l'ajout de *Pseudomonas fluorescens* avait un effet significatif sur la production d'hydrogène d'Eco B avec une augmentation de 15% de la productivité.

Lors de l'étude précédente, cette influence positive de *P. fluorescens* avait déjà été suspectée mais des écarts de résultats trop importants au sein d'un même triplicats nous avaient empêchés de conclure que cet effet était significatif. Cette étude permet donc de confirmer que *P. fluorescens* peut être utilisé de manière positive comme facteur biotique pour orienter le réseau métabolique de l'écosystème.

Par contre, dans le cas de l'ajout d'*Escherichia coli* et de *Ralstonia eutropha*, les résultats de cette étude vont à l'encontre de ceux obtenus précédemment. En effet, lors de l'étude précédente, ces deux espèces avaient engendré des augmentations respectives de 250 et 350 % de la production d'hydrogène par rapport au consortium seul alors que, dans cette étude, aucun effet significatif n'a été observé après l'ajout de ces deux espèces. Or deux paramètres ont changés entre la première et la deuxième étude : le milieu de culture qui a été supplémenté en fer et le consortium de départ qui n'est constitué que d'une espèce majoritaire.

Un milieu carencé en nutriment peut être un facteur de stress chez les bactéries (Touati, 2000 ; McDougald *et al.*, 2002). Un grand nombre d'entre elles a développé des processus de réorganisation intracellulaires sophistiqués pour faire face à ce stress. En règle générale, ces processus sont caractérisés par une série de changements physiologiques et génétiques qui facilitent le développement de cellules multi-résistantes au stress capables de survivre à long terme ainsi que de récupérer une croissance immédiate au moment où les conditions redeviennent favorables. Ce type de processus a déjà été observé chez de nombreuses espèces bactériennes comme entre autres, *Vibrio* sp. (McDougald *et al.*, 2002), *E. coli* (Ferenci, 2001 ; Beloin *et al.*, 2004), *Ralstonia* sp. (Müller *et al.*, 1999), *Pseudomonas* sp. (Givskov *et al.*, 1994 ; Jørgensen *et al.*, 1994) ou encore *Clostridium* sp. (Varga, 2006). De plus, McDougald *et al.* (2002) ont suggéré que ces changements intracellulaires sont accompagnés chez certaines espèces par la sécrétion dans le milieu de molécules signal qui peuvent servir de médiateurs de communication entre espèces pour permettre d'améliorer la survie et la résistance au stress des cellules voisines. Ainsi, la carence en fer du milieu A peut induire une sorte d'appel à l'aide qui engendre en réponse des interactions intra-spécifiques dont le type dépend des bactéries impliqués (Benomar *et al.*, en cours de soumission). Lorsque le milieu n'est pas limité en sulfate de fer (milieu B), les conditions de croissance sont optimales pour *Clostridium* sp. qui ne cherche donc pas à interagir avec les espèces exogènes introduites dans la culture.

Par ailleurs, hormis *Lactobacillus bulgaris*, aucune des souches utilisées pour cette étude n'a pu se maintenir dans l'écosystème, montrant ainsi la difficulté pour une souche exogène de s'implanter dans un consortium optimisé pour les conditions opératoires sélectionnées. En effet, la souche présente dans Eco B a été sélectionnée au cours des repiquages successifs de l'écosystème, c'est donc la plus performante avec un milieu qui lui est favorable. Ainsi, non seulement elle n'interagit pas de manière non trophique avec *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha*, mais lorsqu'elle rentre en compétition pour le substrat avec d'autres espèces du genre *Clostridium* sp. ou *Enterococcus casseliflavus*, elle la remporte de façon systématique. Un écosystème plus varié avec une souche moins adaptée pourrait éventuellement permettre l'établissement d'interactions entre les souches ajoutées, les espèces majoritaire et/ou les espèces minoritaires, qui selon les résultats du chapitre III, jouent un rôle important sur le métabolisme global de l'écosystème. Pour vérifier cette hypothèse, une dernière série de batch a été lancée en repartant d'un consortium initial plus divers et moins adapté aux conditions opératoires sélectionnées.

V.7 INTRODUCTION DE FACTEURS BIOTIQUES DANS UNE CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE DIVERSE (ECO C) PLACEE DANS UN MILIEU OPTIMISEE (SUPPLEMENTE EN SULFATE DE FER)

Lors de cette série d'expérimentation en batch, l'impact de l'ajout de sept souches pures sur la production d'hydrogène et le métabolisme d'un écosystème modèle (Eco C) a été évalué.

L'écosystème Eco C était issu d'un digesteur anaérobie mis en œuvre au laboratoire et avait été traité thermiquement 90°C pendant 10 minutes avant d'êtreensemencé dans les différents batch. Ceci permet de repartir d'un inoculum plus divers qu'Eco B et qui n'a pas pu s'adapter au milieu de culture, n'ayant jamais été cultivé avec. L'hypothèse était de vérifier si l'historique et la diversité de l'inoculum jouaient un rôle sur l'établissement éventuel d'interactions entre les souches introduites et les espèces indigènes de l'écosystème.

Toutes les souches pures sélectionnées lors de l'étude précédente ont été réutilisées pour cette étude sauf *Pseudomonas fluorescens* (contamination). Le milieu de culture étant également identique. Les souches ne seront donc pas caractérisées de manière détaillée dans cette étude.

Expérimentalement, cette dernière série s'est déroulée de la même manière que la précédente avec le même milieu de culture (milieu B).

V.7.1 CARACTERISATION DU CONSORTIUM ECO C

V.7.1.1 CARACTERISATION DE LA CONCENTRATION MAXIMALE DE BIOMASSE D'ECO C DANS UN MILIEU SUPPLEMENTE EN SULFATE DE FER

La croissance microbienne du consortium Eco C a été caractérisée en mesurant la D.O à 600 nm. La valeur maximale obtenue en fin de phase exponentielle permet de visualiser l'adaptation du consortium aux conditions opératoires et au milieu de culture. La Figure V-20 compare la moyenne des D.O._{600nm} maximales d'Eco C avec celles des souches pures obtenues lors de l'étude précédente.

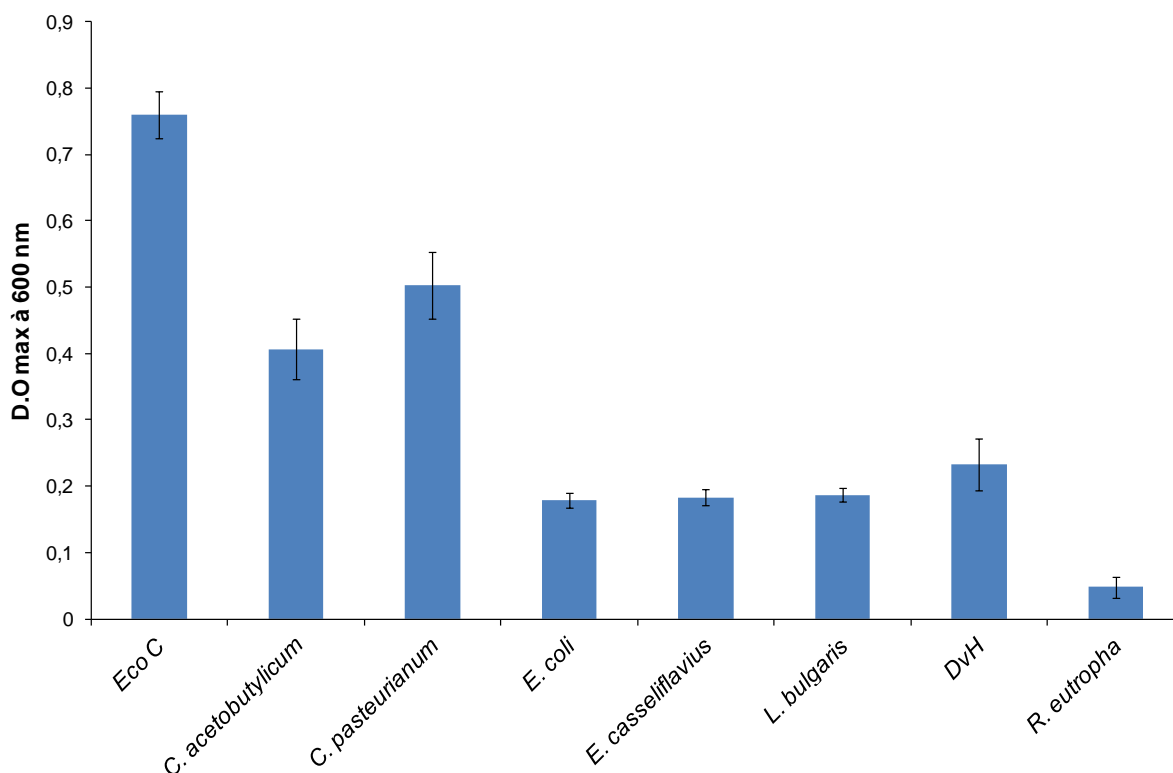


Figure V-20 : Concentration maximale en biomasse d'Eco C et des souches pures sur le milieu de culture B. La concentration maximale en biomasse de chaque culture est représentée par la moyenne des D.O maximales à 600 nm.

Les résultats montrent qu'Eco C présente une croissance maximale significativement supérieure à celle de toutes les autres cultures avec une valeur moyenne de D.O_{600nm} maximale de 0,75 contre 0,05 à 0,5 pour les autres souches.

V.7.1.2 CARACTERISATION DE LA STRUCTURE DE LA COMMUNAUTE MICROBIENNE D'ECO C PAR CE-SSCP

La structure de la communauté microbienne du consortium Eco C a été analysée par CE-SSCP (Figure V-21). Pour un écosystème producteur d'hydrogène, Eco C présente une importante diversité. Le profil de CE-SSCP montre la présence d'une espèce majoritaire qui migre dans la même région que les espèces du genre *Clostridium*, accompagnée de nombreux pics minoritaires (indice de Simpson = 3,58).

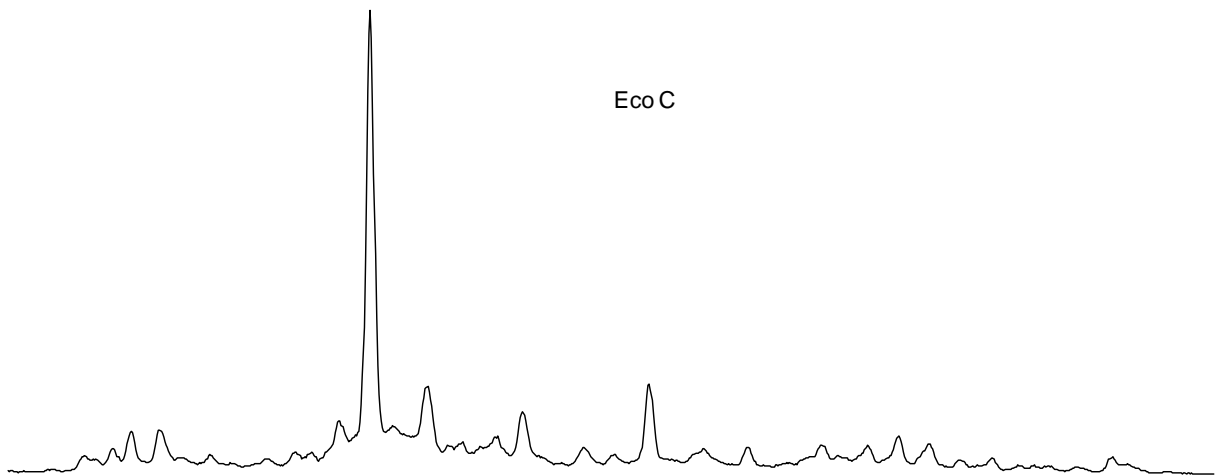


Figure V-21 : Structure de la communauté microbienne composant Eco C. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

V.7.1.3 CARACTERISATION DES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE D'ECO C

Le suivi de la production d'hydrogène du consortium Eco C a permis l'élaboration de cinétiques de production pour chaque réplicat (Figure V-22).

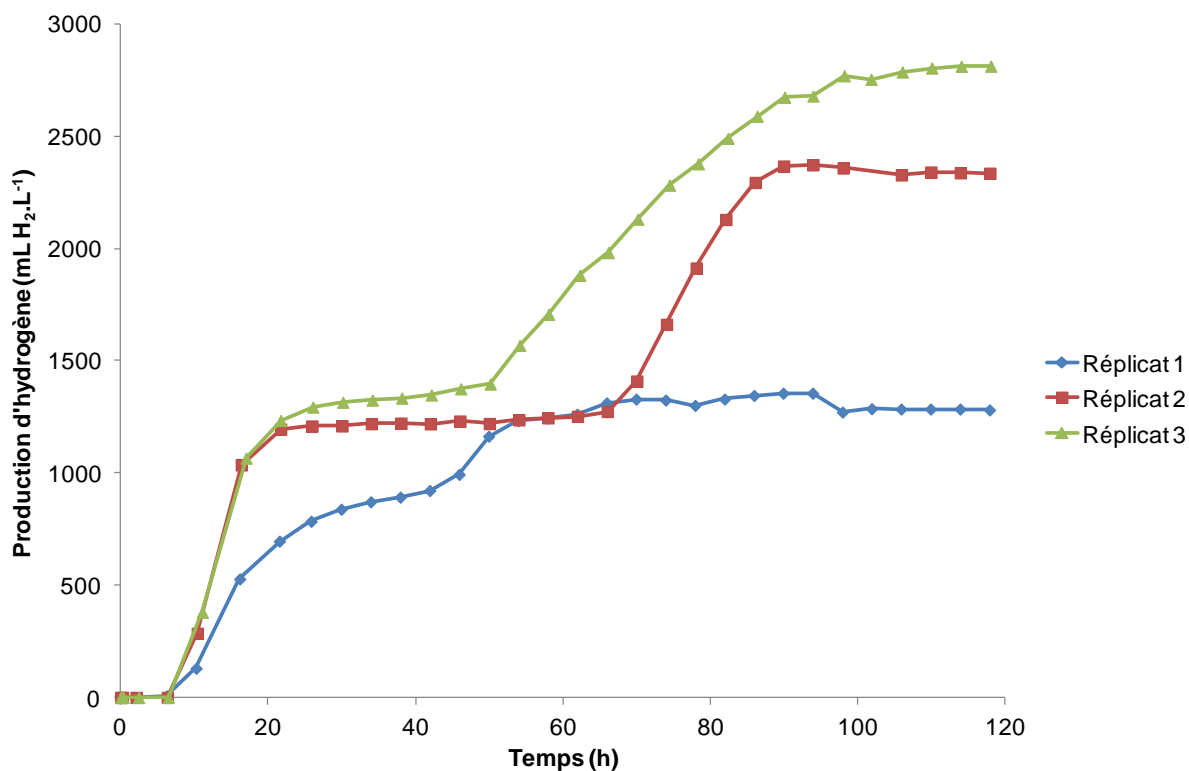


Figure V-22 : Cinétiques de production d’hydrogène des trois réplicats du consortium Eco C.

L’ajustement de ces cinétiques à l’aide du modèle de Gompertz permet de caractériser la production d’hydrogène de l’écosystème en calculant la productivité maximale d’hydrogène (P_{max}), la quantité maximale d’hydrogène produite (H_{max}) et le rendement d’hydrogène produit par moles de glucose consommées (Tableau V-6).

Etonnamment, lors de la production d’hydrogène par le consortium Eco C, deux phases de productions ont été observées et ont donc été retranscrites séparément dans le Tableau V-6 .

Tableau V-6 : Paramètres cinétiques de la production d’hydrogène du consortium Eco C. Valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d’hydrogène.

		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 C	Plateau n°1	126,8	±52,6	1 163,6	±218,7	1,95	±0,41
	Plateau n°2	49,5	±23,8	993,3	±566,9	1,66	±0,50
	Total	-	-	2 156,9	±785,6	1,67	±0,72

Les valeurs issues de la modélisation par Gompertz des cinétiques de production d'hydrogène du consortium Eco C présentées dans le Tableau V-6 montre en moyenne une quantité maximale d'hydrogène produite élevée de 2 157 mL H₂.L⁻¹ et un rendement moyen de 1,67 mol H₂.mol⁻¹ glucose consommé. Cependant, les résultats obtenus sont très divergents d'un réplikat à l'autre. Cette grande variabilité entre les trois réplikats d'Eco C est visible sur la Figure V-22

En effet, les cinétiques de production d'hydrogène d'Eco C (Figure V-22) montrent qu'après un temps de latence de 6 h, se déroule une première phase de production d'hydrogène. Celle-ci dure selon les réplikats entre 15 et 20 h et se termine par une phase plateau dont la durée est elle aussi variable d'un réplikat à l'autre. En effet, la durée de cette première phase plateau s'échelonne de 4 h pour le réplikat n°1, à 20 h pour le réplikat n°3 et jusqu'à 50 h pour le réplikat n°2. Les productions d'hydrogène constatées alors sont comprises entre 920 et 1 350 mL.L⁻¹. A la suite de cette première phase plateau intervient une seconde phase de production d'hydrogène. Cette dernière est plus ou moins longue selon les réplikats (de 20 h pour le réplikat n°1 à 50 h pour le réplikat n°3). Les productions d'hydrogène sont également très variables d'un réplikat à l'autre allant de 365 à 1 495 mL.L⁻¹.

V.7.1.4 CARACTERISATION DES VOIES METABOLIQUES D'ECO C

Comme l'indique la Figure V-22, les cinétiques de production d'hydrogène du consortium Eco C se présentent sous la forme de deux phases de production d'hydrogène. La forte variabilité observée au sein du triplicat a nécessité la distinction des résultats obtenus pour les trois réplikats. De plus, la présence de deux phases de production d'hydrogène a également nécessité la distinction des résultats pour la caractérisation des voies métaboliques empruntées lors de ces deux phases. Les résultats sont présentés sur la Figure V-23.

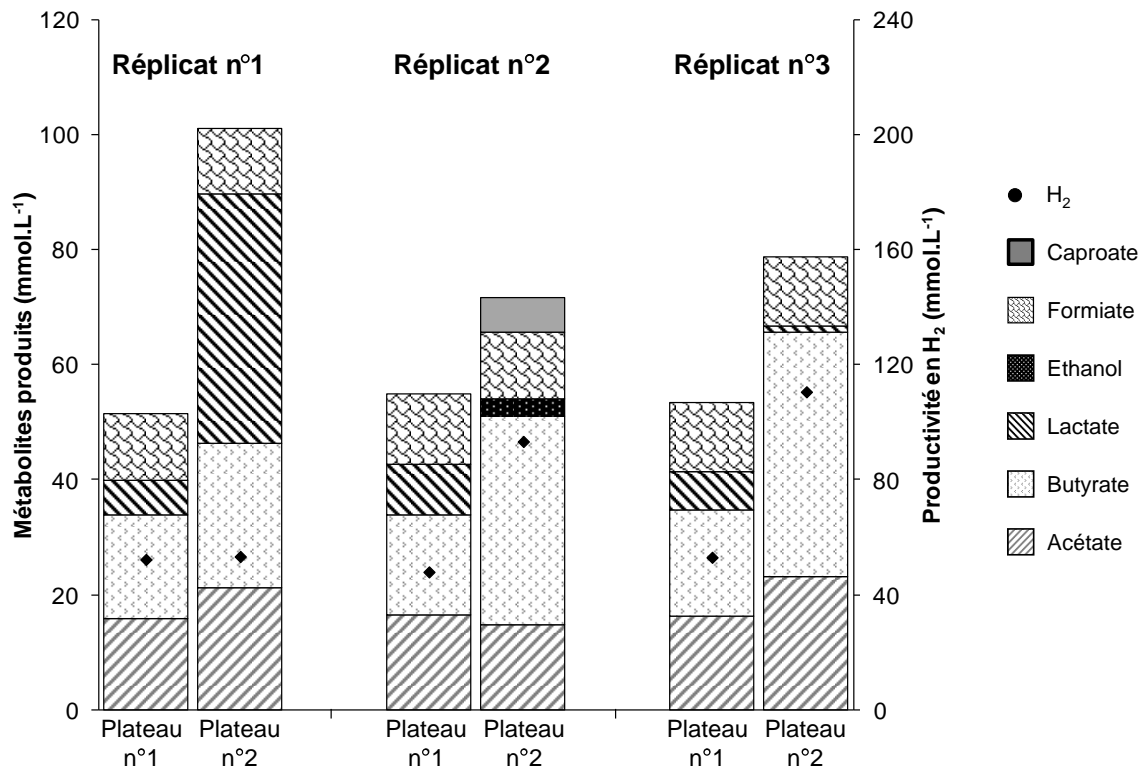


Figure V-23 : Hydrogène et métabolites produits par les différents répliquats du consortium Eco C. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Les résultats présentés dans la Figure V-23 indiquent que lors du premier plateau, correspondant à la fin de la première phase de production d'hydrogène, les trois répliquats du consortium Eco C ont produit quatre métabolites (acétate, butyrate, formiate et lactate) de façon reproductible entre les répliquats. L'écosystème a produit alors autant d'acétate que de butyrate soit environ 16 mmol.L⁻¹. Les quantités d'éthanol produites ont varié de 6 à 9 mmol.L⁻¹ alors que la quantité de formiate est restée constante avec 12 mmol.L⁻¹. De même, comme il a été constaté dans le Tableau V-6, les quantités d'hydrogène produites étaient reproductibles entre les répliquats.

Lors du deuxième plateau, correspondant à la fin de la seconde phase de production, les productions de métabolites et d'hydrogène n'étaient plus reproductibles entre les répliquats, même si les concentrations finales de formiate étaient proches d'un répliquat à l'autre et identiques aux concentrations retrouvées à la fin du premier plateau avec plus ou moins 12 mmol.L⁻¹. Ainsi, la concentration de lactate était maximale dans le répliquat n°1 avec

43,3 mmol.L⁻¹. Parallèlement une production d'acétate et de butyrate, dans des proportions assez similaires, a été mesurée avec respectivement 21 et 25,2 mmol.L⁻¹.

Quant au réplikat n°2, il a produit une faible quantité d'éthanol et de caproate mais la concentration de lactate détectée en fin de fermentation était nulle, indiquant une consommation du lactate entre le plateau 1 et le plateau 2. Dans le même temps la quantité de butyrate a été multipliée par deux entre le premier et le deuxième plateau alors que la quantité d'acétate a légèrement diminuée passant de 16,3 à 14,6 mmol.L⁻¹.

Enfin, le réplikat n°3 a vu ses quantités d'acétate et de butyrate produites, entre le premier et le deuxième plateau, être multipliées respectivement par 1,5 et 3,5. La concentration de lactate quant à elle, est passée de 6,8 à 1 mmol.L⁻¹. Ceci indique comme pour le réplikat n°2 que le lactate a été reconsommé entre les deux phases de production d'hydrogène.

V.7.1.5 CARACTERISATION DE L'EVOLUTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES AU SEIN DU CONSORTIUM ECO C

La variabilité des résultats relatifs à la production d'hydrogène (Tableau V-6) et des métabolites (Figure V-23) du consortium Eco C a généré de nouvelles interrogations quant à l'évolution des communautés microbiennes présentes au sein de l'écosystème au cours de la production d'hydrogène. Les populations microbiennes ont donc été caractérisées par typage moléculaire lors des différentes phases de production d'hydrogène. En effet, lors de la culture d'Eco C, deux phases de production d'hydrogène entrecoupées d'une phase de latence plus ou moins longue ont été observées. C'est pourquoi, deux prélèvements ont été réalisés, un à la fin de la première phase de croissance, puis un à l'issue de la seconde phase de croissance, après consommation de la totalité du substrat.

- Première phase plateau

Les profils SSCP des trois réplicats du consortium Eco C après la première phase de croissance sont présentés Figure V-24 .

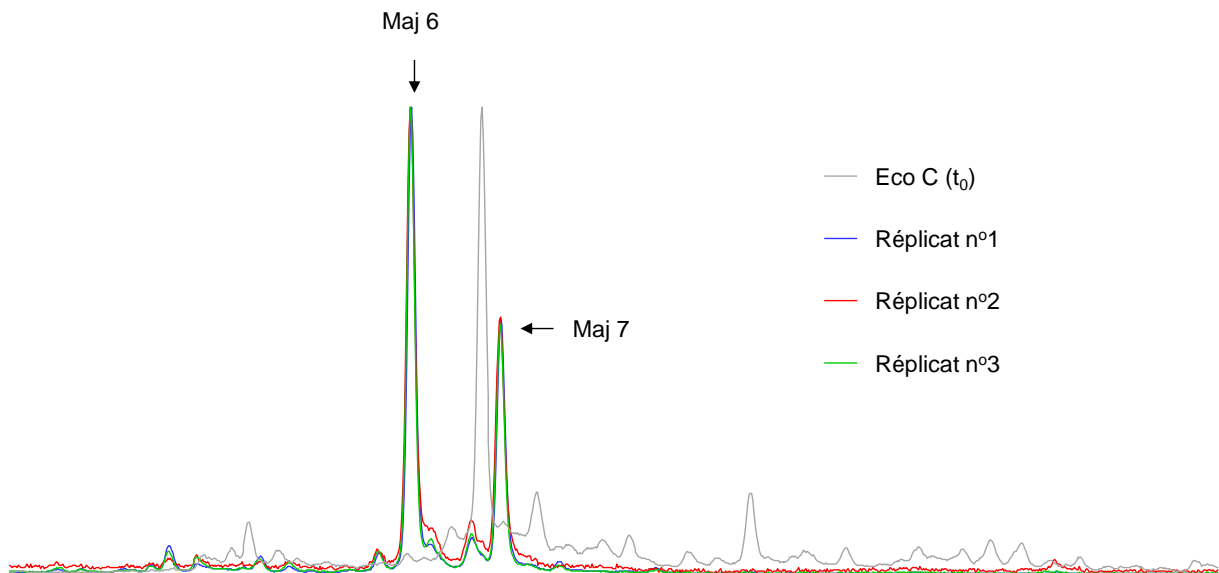


Figure V-24 : Evolution de la structure de la communauté microbienne de chaque répliquat d'Eco C après inoculation (t_0) et après 40 heures d'incubation à 37°C. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

L'observation des profils des trois répliquats prélevés lors de ce premier plateau montre que les populations bactériennes ont évolué de manière similaire entre les répliquats. En effet, deux espèces majoritaires, ont émergé au sein du consortium. Ces dernières sont d'ailleurs différentes de celles présentes initialement. Lors de son ensemencement, le consortium est composé d'une espèce majoritaire (Bac 1) dont la distance relative de migration est différente des deux espèces majoritaires de l'écosystème après 40 heures d'incubation : Bac 4 et Bac 5.

Les communautés bactériennes présentes au sein d'Eco C ont donc évolué au cours du temps et ont favorisé, après une première phase de croissance, l'émergence de deux espèces majoritaires au détriment de l'espèce majoritaire initialement présente dans l'inoculum. Par ailleurs, cette variation au sein des populations bactériennes a été fortement répétable entre les répliquats. Enfin, la diversité des communautés bactériennes présentes au sein d'Eco C a diminué significativement après 40 h d'incubation, l'indice de Simpson passant 3,58 à 1,93.

- Seconde phase plateau

La Figure V-25 présente l'évolution des communautés bactériennes des trois réplicats d'Eco C au cours du temps.

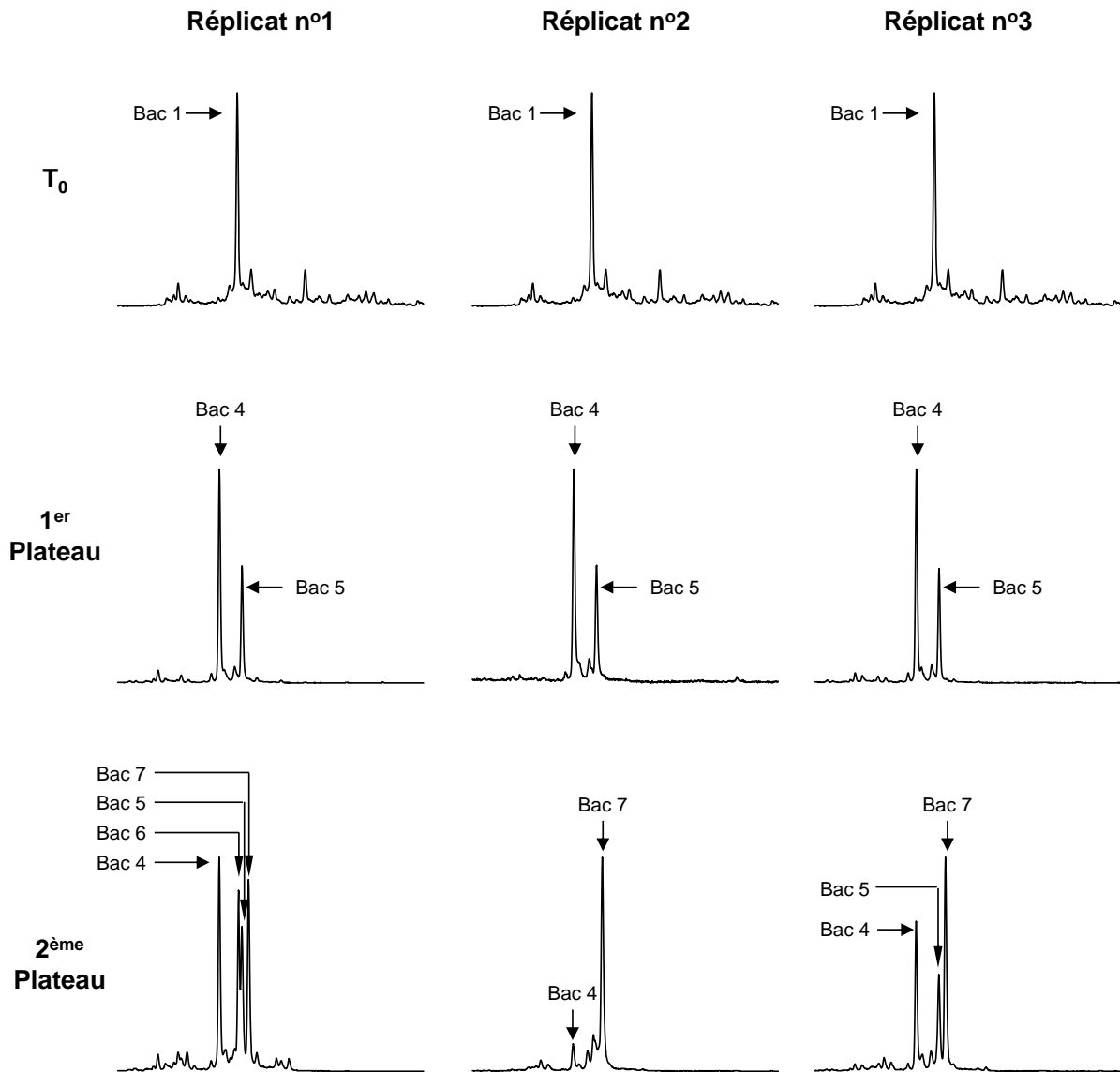


Figure V-25 : Evolution des communautés bactériennes des trois réplicats d'Eco C au cours des différentes phases de production d'hydrogène. T_0 correspond à la structure de l'inoculum après inoculation. La première phase plateau intervient après 40 heures d'incubation à 37°C. Le prélèvement de la seconde phase plateau intervient après 7 jours d'incubation. 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.

La fin de la seconde phase de croissance du consortium est intervenue après 7 jours de culture, lorsque le substrat a été complètement épuisé. L'observation des profils de CE-SSCP indique que les populations présentes lors de cette phase étaient très différentes de celles observées sur la Figure V-24. De même, les profils de CE-SSCP mettent en avant une grande variabilité entre les réplicats comme ce qui a déjà été observé précédemment pour les voies métaboliques.

Le réplicat n°1 montre qu'il y a eu croissance des deux espèces majoritaires Bac 4 et Bac 5 au sein de l'écosystème lors de la seconde phase de production d'hydrogène, et que deux autres espèces Bac 6 et Bac 7 ont émergé et sont devenues également majoritaires. Par ailleurs, après la seconde phase de production d'hydrogène, le réplicat n°2 ne comporte qu'une seule espèce majoritaire Bac 7, Bac 4 est devenue minoritaire et Bac 5 n'est plus retrouvée sur le profil SSCP. En ce qui concerne le réplicat n°3, il y a également eu croissance de Bac 4 et Bac 5 mais Bac 6 n'a pas émergé au contraire de Bac 7 qui est devenue l'espèce la plus représentée au sein de l'écosystème.

V.7.2 IMPACT DE L'AJOUT D'UNE SOUCHE PURE DANS LA CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE ECO C

V.7.2.1 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES SUR LA CINÉTIQUE DE PRODUCTION D'HYDROGENE DU CONSORTIUM ECO C

La confrontation des souches pures avec le consortium Eco C a permis l'établissement de nouvelles cinétiques de production d'hydrogène (Annexe IV). Ces dernières ont ainsi pu être comparées à celles obtenues lors du suivi du consortium seul.

Deux groupes se détachent en fonction de l'allure des courbes obtenues. En effet, l'ajout des souches de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* et *Lactobacillus bulgaris* a généré la disparition de la deuxième phase plateau (Figure V-26).

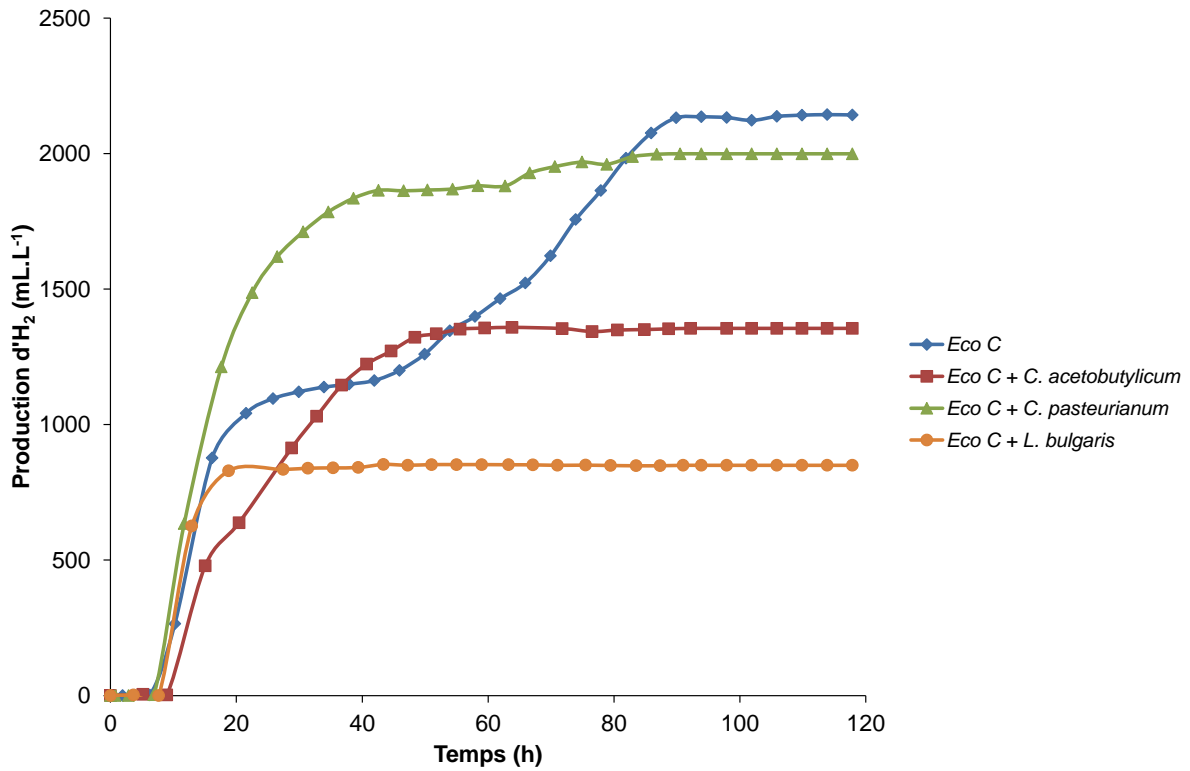


Figure V-26 : Cinétique moyenne de production d'hydrogène d'Eco C et des mélanges présentant une seule phase plateau. Pour des raisons de lisibilité, les écarts types n'ont pas été représentés sur la figure mais dans le Tableau V-7 et le Tableau V-8 .

Les cinétiques obtenues après ajout des souches *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* et *Lactobacillus bulgaris* présentent une allure plus classique et identique à celle des études précédentes. A l'inverse, l'ajout des autres souches pures n'a pas influé sur l'allure générale de la cinétique d'Eco C avec une cinétique qui reste en deux phases (Figure V-27).

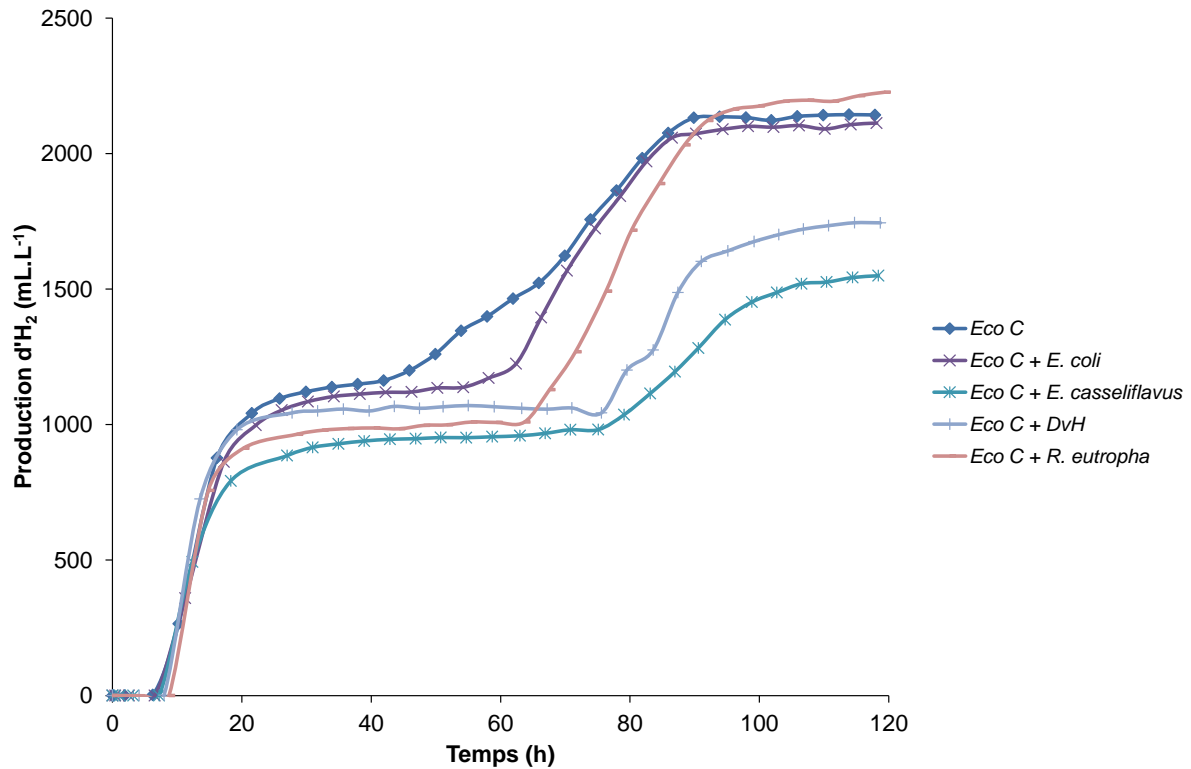


Figure V-27 : Cinétique moyenne de production d'hydrogène d'Eco C et des mélanges présentant une production d'hydrogène à deux phases. Pour des raisons de lisibilité, les écarts types n'ont pas été représentés sur la figure mais dans le Tableau V-7 et le Tableau V-8.

En moyenne, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, DvH et *Ralstonia eutropha* ont présenté des cinétiques de production d'hydrogène en deux phases proches de celle d'Eco C.

Pour la suite de l'étude, les résultats du groupe ayant un effet sur l'allure de la cinétique du consortium et les résultats des autres espèces seront présentés séparément. Ainsi seront présentés d'une part les résultats du **Groupe 1** constitué des mélanges entre Eco C et *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* et *Lactobacillus bulgaris*. Dans un deuxième temps seront présentés les résultats du **Groupe 2** constitué des mélanges entre Eco C et *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha*, DvH et *Enterococcus casseliflavus*.

V.7.2.2 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES IMPACTANT LA CINÉTIQUE DE PRODUCTION D'HYDROGÈNE D'ECO C SUR LES PERFORMANCES DU CONSORTIUM

Le modèle de Gompertz a pu être utilisé sur les cinétiques obtenues afin d'établir les quantités maximales d'hydrogène produite (H_{max}), les productivités maximales (Pmax) et les rendements des mélanges ayant un impact sur la production d'hydrogène (Groupe 1). Les résultats sont présentés dans le Tableau V-7

Tableau V-7: Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco C et des différents mélanges souche pure / consortium impactant la cinétique d'Eco C. 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).

Mélanges		Pmax (mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		H _{max} (mL H ₂ .L ⁻¹)		Rendement (mol H ₂ .mol ⁻¹ _{glc consommé})	
Eco C	Plateau n°1	126,8	±52,6	1 163,6	±218,7	1,95	±0,41
	Plateau n°2	49,5	±23,8	993,3	±566,9	1,66	±0,50
	Total	-	-	2 156,9	±785,6	1,71	±0,72
Eco C + <i>C. acetobutylicum</i>		50,1*	±3,5	1 372,8 ^{ns}	±216,7	1,18 ^{ns}	±0,18
Eco C + <i>C. pasteurianum</i>		165,2 ^{ns}	±47,8	1 999,2 ^{ns}	±471,4	1,66 ^{ns}	±0,4
Eco C + <i>L. bulgaris</i>		107,6 ^{ns}	±58,5	866,0*	±193,1	1,23 ^{ns}	±0,25

Les résultats obtenus lors de l'ajout d'espèces appartenant au genre *Clostridium* indiquent que *Clostridium acetobutylicum* et de *Clostridium pasteurianum* ont eu le même impact sur les cinétiques de production d'hydrogène d'Eco C. En effet, l'ajout de ces deux souches a entraîné la disparition du second plateau de production d'hydrogène. La totalité du substrat a d'ailleurs été consommée après 60 heures d'incubation ce qui implique que l'ajout de clostridies ait augmenté la vitesse globale de consommation du substrat. Cependant, aucun effet significatif n'a été constaté sur la productivité et les rendements de conversion du substrat en hydrogène lors de l'ajout de ces souches de *Clostridium* ($p > 0,05$; ANOVA). Un impact significatif a tout de même été observé sur la productivité maximale d'hydrogène avec *C. acetobutylicum*. En effet, l'ajout de ce dernier a eu tendance à faire diminuer la productivité d'hydrogène de l'écosystème d'un facteur 2,5.

De plus, l'ajout de *Lactobacillus bulgaris* au sein du consortium a engendré une diminution significative ($p = 0,042$; ANOVA) de la production d'hydrogène qui est passée de 2 156 mL H₂.L⁻¹ pour Eco C seul à 866 mL H₂.L⁻¹ après l'ajout de *Lactobacillus*.

V.7.2.3 INFLUENCE DE L'AJOUT DES SOUCHES PURES IMPACTANT LA CINÉTIQUE DE PRODUCTION D'HYDROGÈNE D'Eco C SUR LES PERFORMANCES DU CONSORTIUM

Les cinétiques de production d'hydrogène observées lors de l'ajout d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus casseliflavus*, de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha* (Figure V-26) ont montré que la présence de ces souches exogènes ne semblait pas modifier l'allure générale de la cinétique obtenue lors de la culture du consortium Eco C seul.

Le Tableau V-8 donne les performances finales de production d'hydrogène d'Eco C et des cultures du Groupe 2.

Tableau V-8 : Paramètres cinétiques de la production d'hydrogène du consortium Eco C et des différents mélanges souche pure / consortium non impactant la cinétique d'Eco C. 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).

Mélanges		Pmax (mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		H _{max} (mL H ₂ .L ⁻¹)		Rendement (mol H ₂ .mol ⁻¹ glc consommé)	
Eco C	Total	126,8	±52,6	2 156,9	±785,6	1,71	±0,72
Eco C + <i>E. coli</i>		112,0 ^{ns}	±3,5	2 157,7 ^{ns}	±269,7	1,80 ^{ns}	±0,26
Eco C + <i>E. casseliflavus</i>		106,3 ^{ns}	±23,9	1 551,2 ^{ns}	±537,5	1,24 ^{ns}	±0,42
Eco C + <i>DvH</i>		159,5 ^{ns}	±48,5	1 752,9 ^{ns}	±692,6	1,36 ^{ns}	±0,52
Eco C + <i>R. eutropha</i>		154,0 ^{ns}	±26,3	2 228,1 ^{ns}	±399,3	1,75 ^{ns}	±0,31

Les résultats obtenus semblent indiquer qu'aucune de ces souches pures n'aurait induit d'effet significatif sur les paramètres régissant les cinétiques de production d'hydrogène. En effet, les différences de productivités maximales d'hydrogène observées lors des confrontations étudiées dans le Tableau V-8 ne sont pas statistiquement significatives ($p < 0,05$; ANOVA). Il en est de même pour les rendements et les quantités maximales d'hydrogène produit.

V.7.2.4 CARACTERISATION DES VOIES METABOLIQUES EMPRUNTEES PAR L'ECOSYSTEME LORS DE L'AJOUT DE CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM, DE CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM ET DE LACTOBACILLUS BULGARIS

La Figure V-28 présente la production de métabolites et d'hydrogène de *Clostridium acetobutylicum*, de *Clostridium pasteurianum* et de *Lactobacillus bulgaris* après consommation totale du substrat.

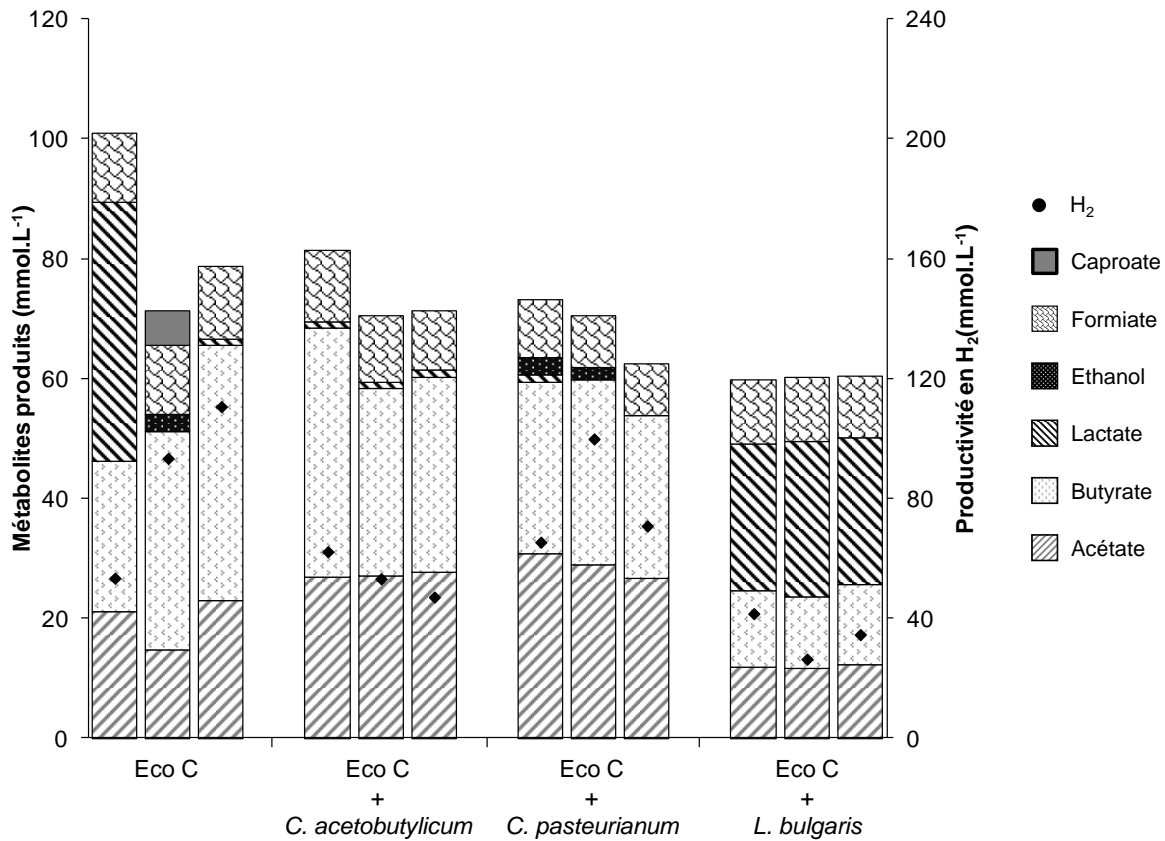


Figure V-28 : Impact de l'ajout de *Clostridium acetobutylicum*, de *Clostridium pasteurianum* et de *Lactobacillus bulgaris* sur le réseau métabolique d'Eco C. Pour chaque culture, les métabolites et l'hydrogène produits par l'ensemble des répliquats est représenté. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Les résultats présentés dans la Figure V-28 montrent que lors de l'ajout de *Clostridium acetobutylicum*, les métabolites synthétisés par les trois répliquats étaient semblables à ceux produits par le troisième répliquat d'Eco C et ce, de manière reproductible. En moyenne, la quantité d'acétate produite après ajout de *C. acetobutylicum* a été significativement plus importante ($p < 0,05$; ANOVA) que celle d'Eco C seul avec respectivement 27,14 contre 19,53 mmol.L⁻¹. Par contre les voies butyrate et formiate n'ont pas été influencées de manière significative (avec respectivement 35,17 contre 34,75 mmol.L⁻¹ et 11,72 contre 11,01 mmol.L⁻¹). Une faible quantité de lactate a été retrouvée dans les trois répliquats (1,08 mmol.L⁻¹). D'autre part le calcul du ratio H₂ produit / [2 (Ac + Bu)] a significativement diminué après ajout de *C. acetobutylicum* (0,43 contre 0,77) ce qui signifie que l'ajout de *C. acetobutylicum* a favorisé les voies de consommation d'hydrogène telle que l'homoacétogénèse.

L'ajout de *Clostridium pasteurianum* a également favorisé significativement la production d'acétate avec en moyenne 28,8 mmol.L⁻¹. La voie butyrate et la voie formiate n'ont pas été influencée de manière significative ($p > 0,05$; ANOVA). Cependant, la présence d'éthanol et parfois même de lactate dans certains réplicats pourrait indiquer qu'une certaine instabilité métabolique ait perduré au sein de l'écosystème. Malgré tout, la reproductibilité des résultats obtenus pour l'acétate, le butyrate ainsi que pour le formiate semble indiquer que l'ajout de cette souche a eu tendance à réduire la variabilité observée chez Eco C seul. Le ratio H₂ produit / [2 (Ac + Bu)] n'a pas été influencé de manière significative par l'ajout de *C. pasteurianum*.

L'ajout de *Lactobacillus bulgaris*, quant à lui, a stabilisé le réseau métabolique de l'écosystème. Cependant les deux voies de production d'hydrogène (la voie acétate et la voie butyrate) ont significativement diminuées avec respectivement 11,84 et 12,73 mmol.L⁻¹ contre 19,53 et 34,75 mmol.L⁻¹. Par contre la voie lactate n'a pas été influencée de manière significative ($p = 0,51$, ANOVA). *Lactobacillus bulgaris* a favorisé de manière systématique la synthèse de lactate au dépend des voies acétate et butyrate. Le ratio H₂ produit / [2 (Ac + Bu)] étant inférieur à 1 (0,65), il n'a pas été observé de différence significative par rapport à Eco C seul.

V.7.2.5 CARACTERISATION DES VOIES METABOLIQUES EMPRUNTEES PAR L'ECOSYSTEME LORS DE L'AJOUT D'ESCHERICHIA COLI, D'ENTEROCOCCUS CASSELI FLAVUS, DE DESULFOVIBRIO VULGARIS ET DE RALSTONIA EUTROPHA

Les souches présentées au sein de ce paragraphe n'ont pas eu d'impact sur l'allure générale de la courbe de production d'hydrogène du consortium. Ainsi, la présence de deux plateaux au sein de cette cinétique sera étudiée au travers de l'impact de ces souches au niveau de la production de métabolites lors de ces deux phases.

- Métabolites produit lors de la première phase plateau

La Figure V-29 représente la distribution des métabolites produits lors de la première phase plateau de la cinétique de production d'hydrogène du Groupe 2.

La répétabilité des résultats de production de métabolites et d'hydrogène d'Eco C seul et des mélanges avec ces souches exogènes, lors de la première phase, a permis de présenter les moyennes de résultats obtenus pour les trois répliquats.

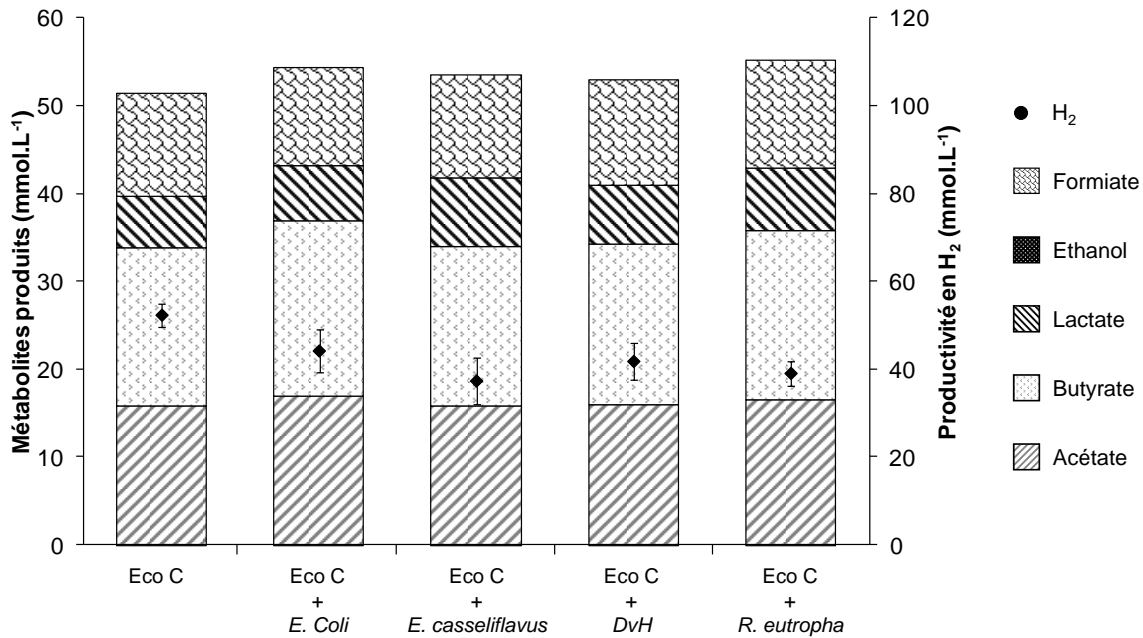


Figure V-29 : Impact de l'ajout d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus casseliflavus*, de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha* sur les voies métaboliques d'Eco C lors de la première phase plateau. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

La Figure V-29 indique que les quatre métabolites synthétisés lors de la première phase de production d'hydrogène d'Eco C seul (acétate, butyrate, lactate et formiate), sont identiques à ceux rencontrés lors de l'ajout d'*Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Desulfovibrio vulgaris* et *Ralstonia eutropha*. Les quantités obtenues sont d'ailleurs répétables entre les cultures ce qui indique que ces souches exogènes n'ont eu aucun impact significatif sur le métabolisme de l'écosystème durant la première phase de croissance. Ainsi, en moyenne les quantités d'acétate, de butyrate, de lactate et de formiate produites sont respectivement de 16,19 ; 18,72 ; 6,75 et 11,81 mmol.L⁻¹.

• Métabolites produits lors de la deuxième phase plateau

La Figure V-30 expose les résultats des productions de métabolites et d'hydrogène obtenus après consommation totale du substrat, c'est à dire après la seconde phase de production d'hydrogène. Pour chaque culture, l'ensemble des réplicats est présenté pour mettre en évidence l'hétérogénéité des résultats obtenus.

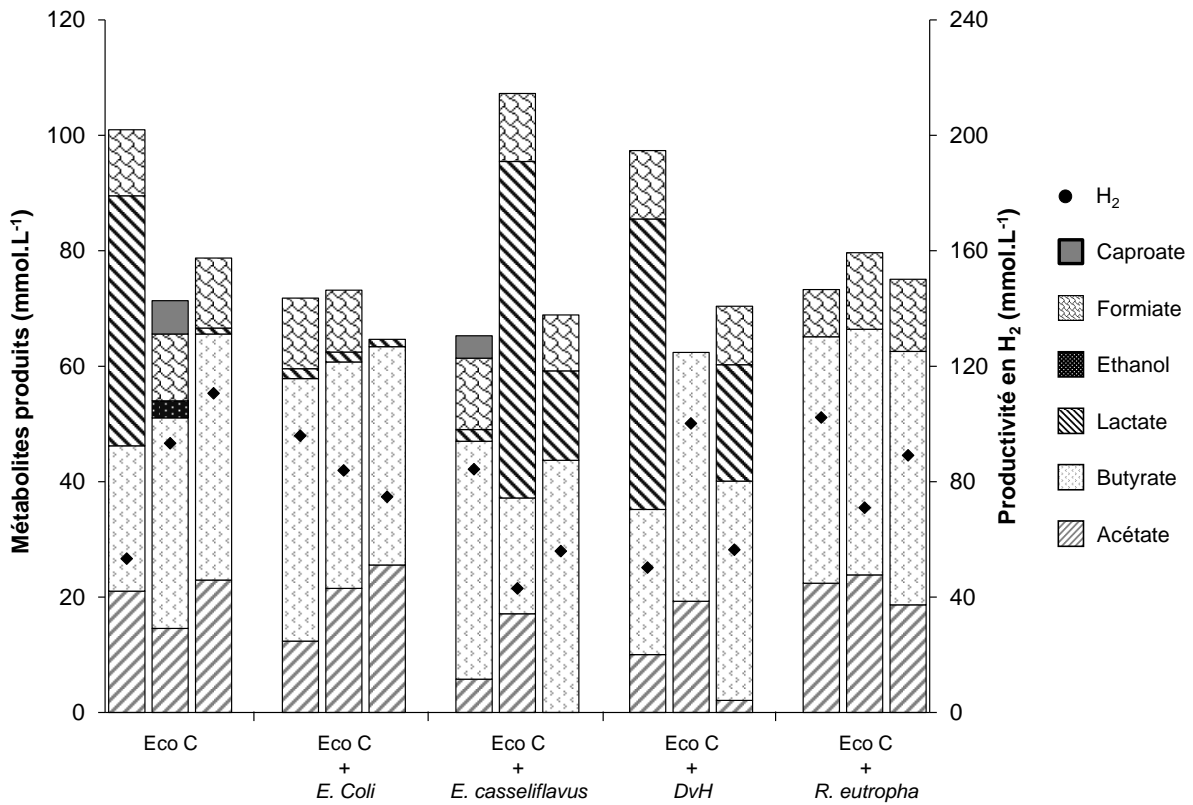


Figure V-30 : Impact de l'ajout d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus casseliflavus*, de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha* sur les voies métaboliques d'Eco C lors de la deuxième phase plateau. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

A partir de la Figure V-30 deux groupes se distinguent : En effet, la non répétabilité métabolique obtenue pour le consortium seul semble être à nouveau présente lors de l'ajout de *Enterococcus casseliflavus* et de *Desulfovibrio vulgaris*. Ces dernières, n'ont pas induit d'effet particulier sur l'instabilité du métabolisme du consortium. Le caractère stochastique de la production de métabolites du consortium a été à nouveau observé lors de l'ajout de ces deux souches.

A contrario, l'ajout d'*Escherichia coli* et de *Ralstonia Eutropha* semble avoir éliminé l'instabilité du métabolisme d'Eco C. En effet, pour *R. eutropha*, les trois réplicats font état de la production des trois mêmes métabolites en proportion et en concentration semblables, à savoir l'acétate, le butyrate et le formiate avec respectivement 16,45 ; 19,34 ; 7,05 et 12,38 mmol.L⁻¹. De plus, le mélange Eco C / *E. coli* a consommé le lactate produit lors de la première phase de manière répétable. Les concentrations en acétate et en butyrate finales sont alors proches d'un réplicat à l'autre. Cependant, un des trois réplicats semble également avoir consommé le formiate présent après la première phase plateau.

V.7.2.6 CARACTERISATION PAR CE-SSCP DES COMMUNAUTES PRESENTES DANS LES MELANGES AYANT EU UN IMPACT SUR LES CINETIQUES DE PRODUCTION D'HYDROGENE D'ECO C

Comme pour les résultats précédents, les caractérisations des communautés microbiennes concernant l'ajout de souches semblant avoir eu un impact sur l'allure des cinétique de production (*Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* et *Lactobacillus bulgaris*) ont été traitées séparément des autres mélanges. Les résultats des trois réplicats réalisés au cours de cette étude sont présentés distinctement à cause de la variabilité des résultats obtenus lors du suivi des cinétiques de production d'hydrogène (Figure V-31).

D'après les profils de CE-SSCP présentés sur la Figure V-31, toutes les souches ayant eu un impact sur la cinétique de production d'hydrogène ont réussi à s'implanter et à se maintenir dans l'écosystème. Cependant, la structure finale de l'écosystème est différente en fonction des souches ajoutées.

Clostridium acetobutylicum s'est maintenue dans l'écosystème et est systématiquement devenu majoritaire au point d'apparaître comme la seule espèce visible du profil dans deux cas sur trois.

Clostridium pasteurianum a également été retrouvée en fin de fermentation. Elle co-domine l'écosystème avec les deux espèces Bac 4 et Bac 5 qui étaient déjà co-dominantes d'Eco C au moment du premier plateau.

Lactobacillus bulgaris a également été retrouvée dans l'écosystème en fin de batch avec une abondance relative qui varie entre 15% et 35% selon les réplicats. Elle co-domine l'écosystème avec Bac 4 et Bac 5 de façon systématique.

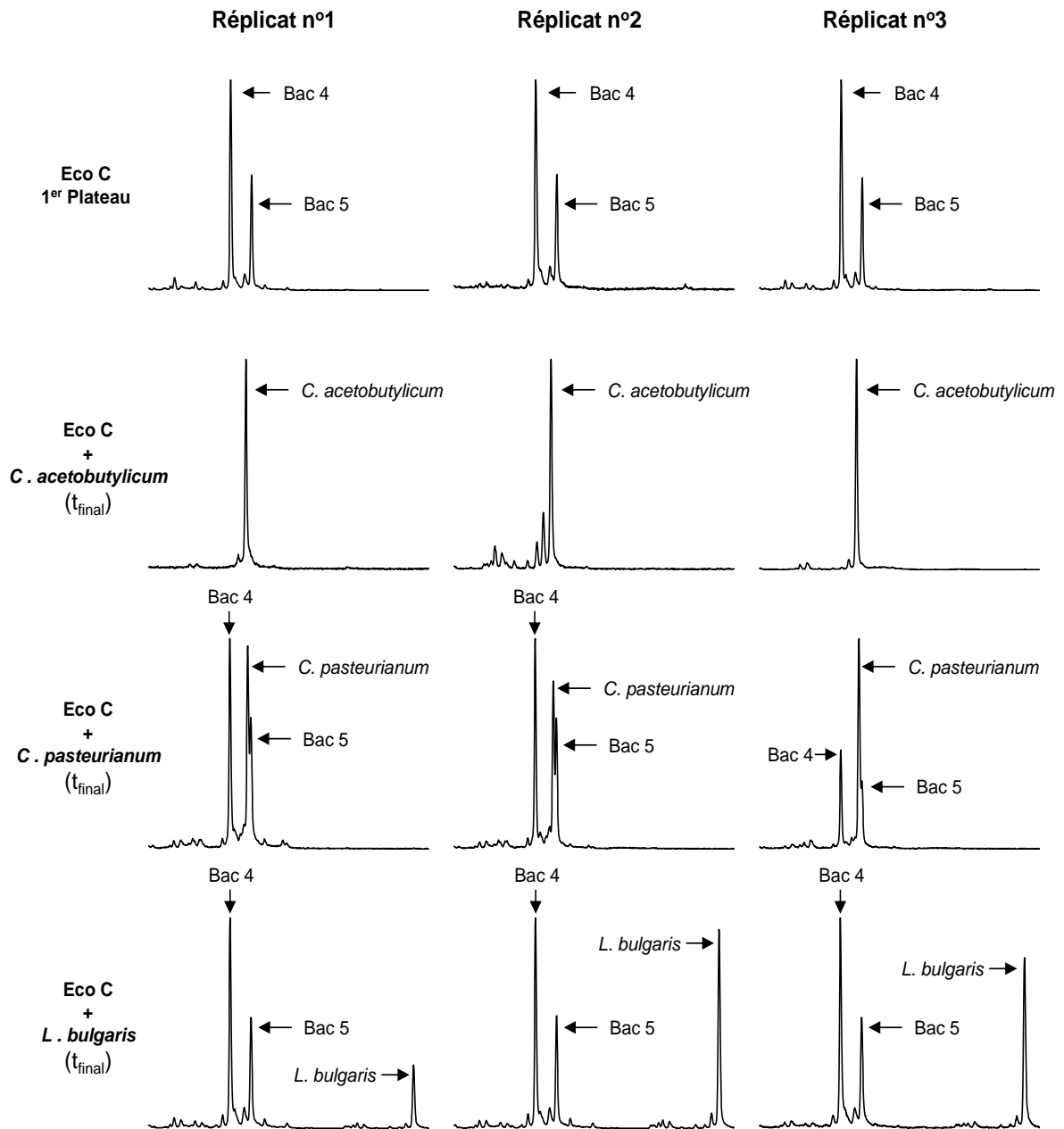


Figure V-31 : Structure des communautés microbiennes d'Eco C au premier plateau et des mélanges entre Eco C et *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* et *Lactobacillus bulgaris* après consommation total du substrat (t_{final}). Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

V.7.2.7 CARACTERISATION PAR CE-SSCP DES COMMUNAUTES PRESENTES DANS LES MELANGES N'AYANT PAS EU UN IMPACT SUR LES CINETIQUES DE PRODUCTION D'HYDROGENE D'ECO C

L'ajout des souches présentées ci-dessous n'a pas eu d'impact sur l'allure générale de la courbe de production d'hydrogène du consortium. La présence de deux plateaux au sein de cette cinétique contraint d'étudier l'évolution des communautés microbiennes au sein de chacune de ces deux phases.

- Communauté microbienne présente à la fin de la première phase plateau

La Figure V-32 présente les profils de CE-SSCP obtenus après la première phase de production d'hydrogène lors des confrontations d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus casseliflavus*, de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha* avec Eco C.

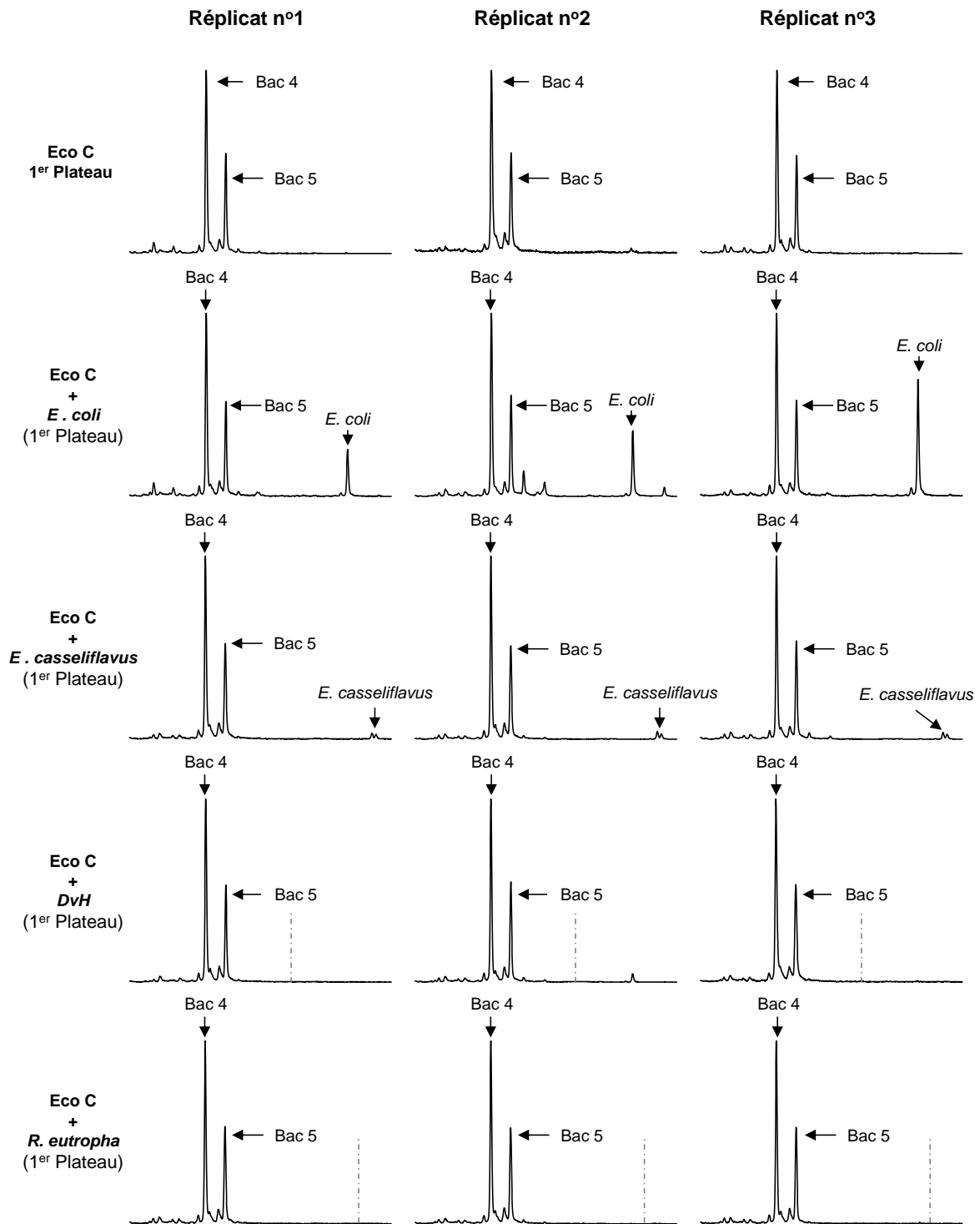


Figure V-32 : Structure des communautés microbiennes, après la première phase de production d'hydrogène, d'Eco C et des confrontations entre Eco C et *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Desulfovibrio vulgaris* et *Ralstonia eutropha*. Pour chaque profil, le trait en pointillé indique la position de migration de la souche introduite mais qui ne s'est pas maintenue dans le mélange. 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.

Quelles que soient les confrontations, la structure des écosystèmes lors de la première phase plateau est stable et reste identique à celle d'Eco C avec Bac 4 et Bac 5 qui dominent systématiquement l'écosystème. Seul le maintien ou non de la souche ajoutée va différer d'un mélange à l'autre. Ainsi, deux comportements distincts au sein de l'écosystème ont été observés. D'une part, *Escherichia coli* et *Enterococcus casseliflavus* ont été retrouvés dans l'écosystème après la première phase de production dans des proportions allant de 7% à 17% pour *E. coli* et 2% à 3 % pour *E. casseliflavus*. D'autre part, *Desulfovibrio vulgaris* et *Ralstonia eutropha* n'ont pas été retrouvées en abondance suffisante dans l'écosystème pour être détectées par CE-SSCP au moment de la première phase plateau.

- Communauté microbienne présente à la fin de la deuxième phase plateau

La Figure V-33 présente les profils de CE-SSCP obtenus après la deuxième phase de production d'hydrogène lors de l'ajout d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus casseliflavus*, de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha* dans Eco C.

Comme pour la première phase plateau, *Escherichia coli* et *Enterococcus casseliflavus* ont été retrouvés dans l'écosystème à la fin de la fermentation lorsque tout le substrat a été consommé. Cependant, alors qu'*E. casseliflavus* s'est maintenu dans les mêmes proportions (2% à 3%) dans deux des trois réplicats. Dans le troisième réplicat, *E. casseliflavus* a gagné en abondance entre la première et deuxième phase plateau passant de 3% à 15% d'abondance relative. *E. coli* a vu son abondance relative diminuée de façon systématique entre la première phase plateau et la seconde passant en moyenne de 12% à 2% d'abondance relative. Tout comme précédemment, *Desulfovibrio vulgaris* et de *Ralstonia eutropha* ne sont pas apparus sur les profils de CE-SSCP des mélanges en fin de fermentation.

D'un point de vue général, l'instabilité populationnelle observée chez Eco C entre le premier et le deuxième plateau n'a pas été supprimée après l'ajout d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus casseliflavus* et de *Desulfovibrio vulgaris* à l'écosystème Eco C. En effet, le caractère stochastique de l'émergence des espèces Bac 4, Bac 5, Bac 6 et Bac 7 au sein d'un même triplicat a été conservé après l'ajout de ces quatre espèces. Une nouvelle espèce (Bac 8) a même fait son apparition dans les réplicats n°3 des mélanges Eco C / *E. casseliflavus* et Eco C / DvH. Ce dernier a vu d'ailleurs émerger une autre espèce Bac 9 dont la distance de migration est proche de celle de *Lactobacillus bulgaris*.

L'ajout de *Ralstonia eutropha* a permis de voir émerger les trois mêmes espèces (Bac 4, Bac 5 et Bac 7) de façon systématique dans les trois triplicats. Néanmoins, l'abondance relative de ces trois espèces a varié d'un réplicat à l'autre.

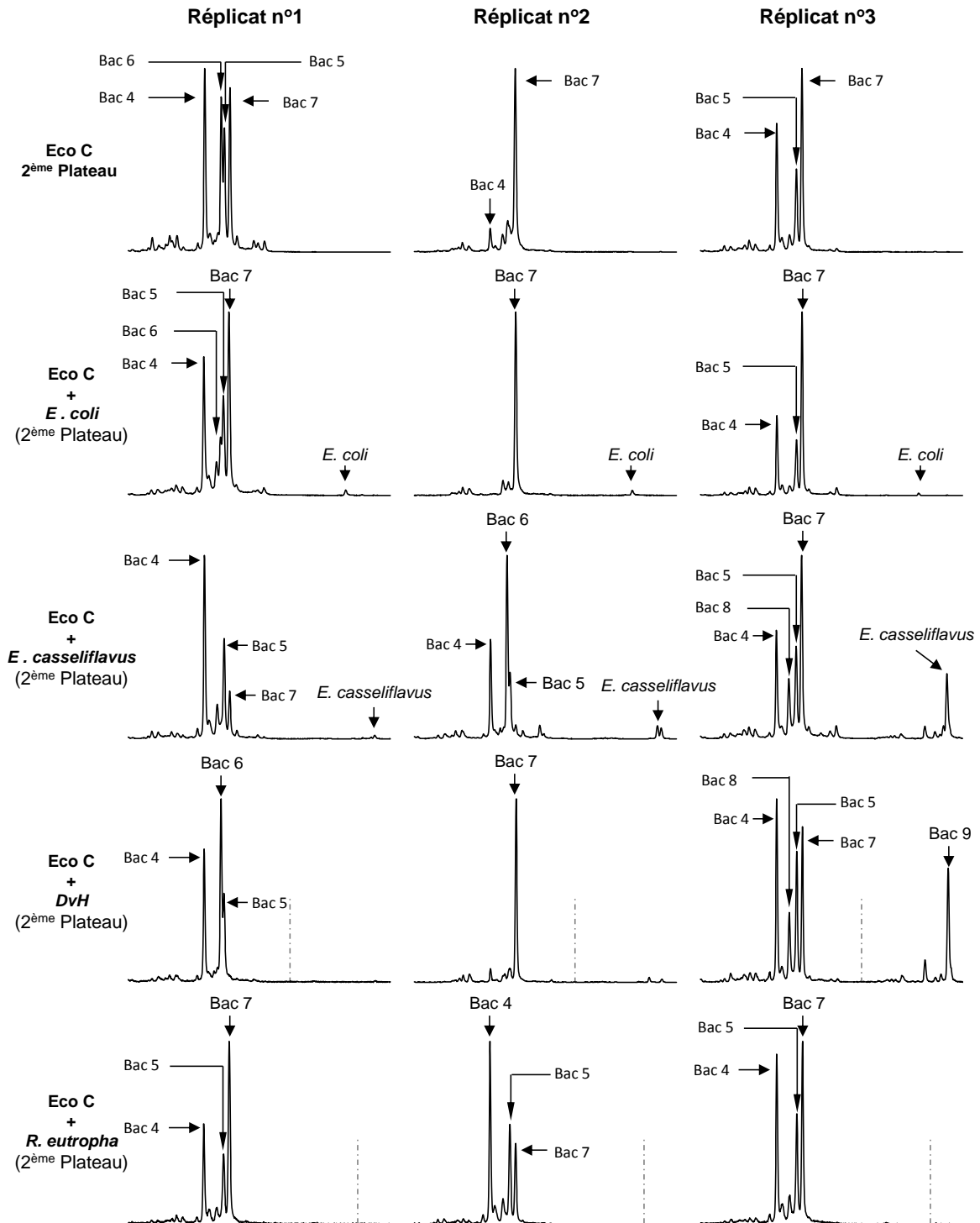


Figure V-33 : Structure des communautés microbiennes, après la deuxième phase de production d'hydrogène, d'Eco C et des confrontations entre Eco C et *E. coli*, *E. casseliflavus*, *DvH* et *R. eutropha*. Pour chaque profil, le trait en pointillé indique la position de migration de la souche introduite mais qui ne s'est pas maintenue dans le mélange. 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.

V.7.3 DISCUSSION

Les performances des souches pures seules ayant déjà fait l'objet d'une discussion dans la partie V.6.1, elles ne seront pas redétaillées dans cette partie.

V.7.3.1 ECO C, UN ECOSYSTEME AUX PERFORMANCES VARIABLES

Le fait de partir d'un inoculum complexe (boue de digesteur anaérobie prétraité thermiquement) et ne pas avoir repiqué successivement Eco C dans le milieu de culture fait que, d'un point de vue microbiologique, ce dernier est beaucoup plus divers que les écosystèmes précédents (Figure V-34).

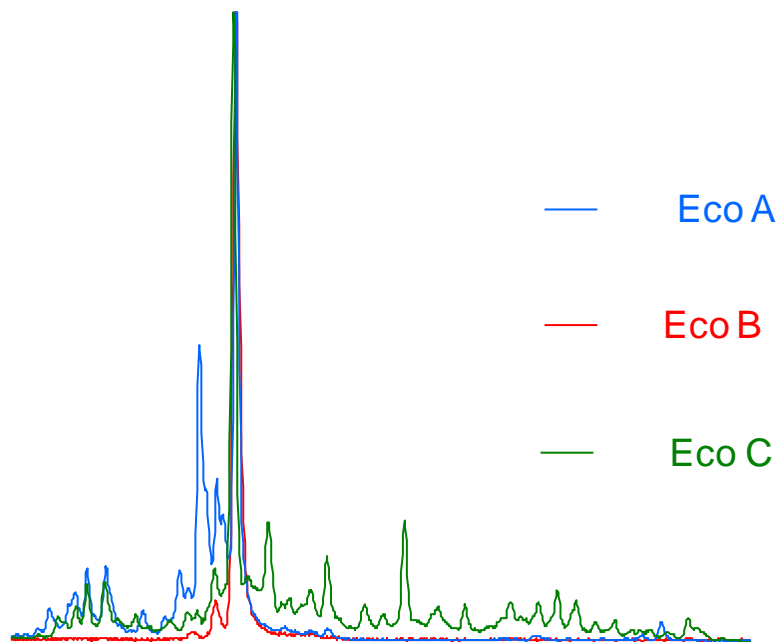


Figure V-34 : Comparaison de la structure des communautés microbiennes d'Eco A, d'Eco B et d'Eco C. Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

Cette diversité microbienne est probablement à l'origine de la grande variabilité des résultats en termes de performances de production d'hydrogène et de métabolisme de l'écosystème. En effet, les écarts mesurés sur la quantité maximale d'hydrogène produite par l'ensemble des réplicats d'Eco C ont été nettement plus importants que ceux des autres consortia (Figure V-35). Cependant, la production moyenne d'hydrogène d'Eco C est restée élevée et du même

ordre de grandeur qu'Eco B. Les rendements de production d'hydrogène de ces deux écosystèmes ($1,67$ et $1,73 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glucose consommé) font d'ailleurs parti de la moyenne haute des rendements observées dans la littérature (Wang & Wan, 2008a ; Wang & Wan, 2009a ; Karadag & Puhakka, 2010b).

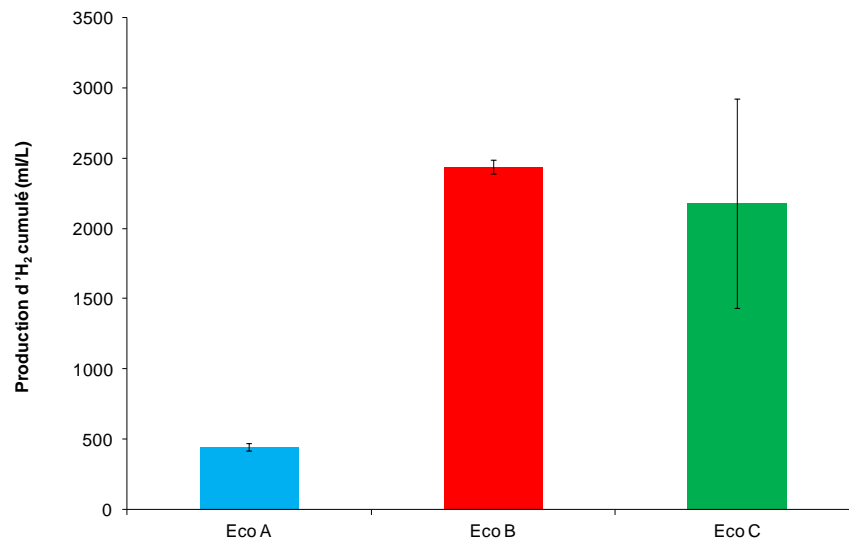


Figure V-35 : Comparaison de la production d'hydrogène cumulée d'Eco A, d'Eco B et d'Eco C

Contrairement aux deux premier consortia, les cinétiques de production d'hydrogène d'Eco C étaient biphasiques. Or les divergences observées entre les réplicats, au niveau du métabolisme et donc de la production d'hydrogène, sont survenu pour l'essentiel au moment de la deuxième phase de production d'hydrogène.

- Une première phase reproductible au niveau métabolique et populationnel

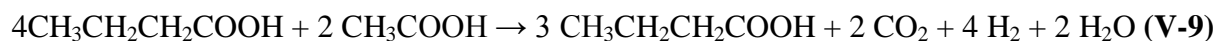
En effet, lors de la première phase, le métabolisme et la production d'hydrogène des différents réplicats est répétable. Cette faible variabilité est directement liée à la stabilité des communautés microbiennes présentes au sein du consortium Eco C durant cette première phase avec deux espèces bactériennes Bac 4 et Bac 5 qui co-dominent l'écosystème. D'après leur distance de migration, les espèces Bac 4 et Bac 5 ont de fortes chances d'appartenir au genre *Clostridium*. Ces populations produisent de l'hydrogène principalement par les voies acétate et butyrate (Lay *et al.*, 2010b ; Hung *et al.*, 2011b). Les clostridies peuvent également

être à l'origine du lactate retrouvé à la fin de la première phase plateau (Rodriguez *et al.*, 2006). Cependant, la présence de bactéries lactiques parmi les bactéries minoritaires de l'écosystème pourrait également expliquer la présence systématique de lactate dans les cultures. De fait, Kawagoshi *et al.* (2005) ont relevé la présence de microorganismes appartenant au genre *Lactobacillus* dans des réacteurs de digestion anaérobie. Certaines espèces de *Lactobacillus* sont d'ailleurs connues pour avoir des facultés de sporulation susceptibles de leur permettre de résister au prétraitement thermique subi par Eco C (Casadei *et al.*, 2001). Ces dernières détournent donc une partie du potentiel hydrogène vers des voies concurrentes. Par ailleurs, les ratios $H_{2\text{ produit}} / [2 (\text{Ac} + \text{Bu})]$ des trois réplicats sont significativement inférieurs à 1 (0,77 en moyenne) ce qui implique qu'une partie de l'hydrogène produit par les voies acétate et butyrate est reconsommée par homoacétogénèse. La présence de lactate pourrait également être expliquée par l'apparition de conditions défavorables pour les espèces productrices d'hydrogène engendrant un détournement des voies métaboliques vers les voies de la solvantogénèse. En effet, Liu *et al.* (2011a) ont montré lors d'une étude sur différentes souches pures de *Clostridium* que dans certains cas, notamment en cas de stress pH, ces dernières peuvent détourner leur métabolisme pour produire du propionate, du butanol du lactate ou de l'éthanol. Enfin, la présence de formiate indique que certaines espèces sont capables de produire ce métabolite pendant la première phase de croissance. Cependant, la stabilité de sa concentration entre les deux plateaux laisse à penser que l'écosystème ne possède pas de formiate déshydrogénase. En effet, cette enzyme, présente notamment chez les bactéries du genre *Enterobacter* sp. ou *E. coli*, permet de transformer le formiate en hydrogène et CO₂ (Kim *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2009b ; Zhu *et al.*, 2011).

- Une deuxième phase aléatoire

Lors de la deuxième phase de production d'hydrogène, les productions de métabolite et d'hydrogène n'étaient plus reproductibles entre réplicats. Ainsi, le réplicat n°1 a présenté une deuxième phase de production d'hydrogène quasiment inexistante (Figure V-22 page 231). Cette faible production d'hydrogène constatée lors de la seconde phase de croissance a pu être corrélée à la forte production de lactate (43,3 mmol.L⁻¹) et à une faible augmentation des teneurs en acétate et en butyrate.

Pour les deux autres réplicats (n°2 et n°3) la deuxième phase de production d'hydrogène a été plus prononcée. Pour ces deux réplicats, l'augmentation significative de la quantité d'hydrogène produite après le premier plateau était directement corrélée aux changements métaboliques observés. En effet pour ces deux cultures le lactate présent à la fin du premier plateau a été totalement consommé lors de la seconde phase de production d'hydrogène. Cette disparition du lactate a été accompagnée d'une augmentation de la production de butyrate par des facteurs allant de 2 à 3,5 en fonction des réplicats. Or, la fermentation du lactate et de l'acétate en butyrate et en hydrogène par la flore intestinale est un phénomène connu (Duncan *et al.*, 2004 ; Bourriaud *et al.*, 2005 ; Muñoz-Tamayo *et al.*, 2011). Certaines bactéries du genre *Desulfovibrio* et *Clostridium* sont d'ailleurs capables d'utiliser le lactate comme source de carbone lorsque le glucose devient limitant selon la voie métabolique suivante (Equation V-9). Parmi les espèces retrouvées dans les réplicats n°2 et n°3 et émergentes entre les plateaux 1 et 2, certaines sont donc susceptibles de dégrader le lactate synthétisé par d'autres communautés afin de produire de l'hydrogène. Un commensalisme trophique serait donc potentiellement en place au sein de deux des réplicats d'Eco C.



Effectivement, la caractérisation microbiologique d'Eco C indique que les communautés bactériennes présentes initialement au sein de cet écosystème sont susceptibles d'évoluer au cours du temps. Ces changements de population au cours du temps ont déjà été observés dans la littérature (Fang *et al.*, 2006 ; Quéméneur *et al.*, 2011b). Mais alors que cette évolution est répétable lors de la première phase de production d'hydrogène, les communautés bactériennes n'ont pas évolué de la même manière d'un répliat à l'autre lors de la seconde phase. C'est ce qui a engendré la forte variabilité observée dans la synthèse des métabolites et donc dans la quantité d'hydrogène produite. Aussi, lors de la seconde phase de croissance, une nouvelle espèce commune à tous les réplicats, semble avoir émergé (Bac 7). Cependant, le maintien des autres espèces majoritaires (Bac 4 et Bac 5) n'était pas répétable au sein des réplicats. De plus, l'émergence d'une nouvelle espèce Bac 6 n'a été observée que pour le répliat n°1. Cette forte variabilité microbiologique peut vraisemblablement expliquer l'instabilité constatée lors de la production d'hydrogène et des métabolites, notamment, au sein des réplicats n°2 et n°3 qui possèdent tous deux une seconde phase de production d'hydrogène nettement supérieure à celle du répliat n°1 : l'espèce Bac 7 était majoritaire avec respectivement 50% et 33% d'abondance relative, alors qu'elle était moins représentée

au sein du réplikat n°1 avec seulement 20% d'abondance relative. De même, l'espèce Bac 6 n'a pas émergé dans les réplicats n°2 et n°3 à l'inverse du réplikat n°1. Aussi l'apparition ou non de la deuxième phase de production d'hydrogène n'a pas pu être corrélée à la simple émergence d'une espèce unique mais plutôt à un jeu d'interactions entre plusieurs espèces de l'écosystème. L'hypothèse suivante a été formulée pour tenter d'expliquer ce phénomène en fonction de la communauté microbienne des écosystèmes :

La comparaison de la production de métabolites de ces réplicats, permet de constater que, dans les réplicats n°2 et n°3, lors de la seconde phase de production d'hydrogène, la majorité du lactate a été consommée alors que la production de butyrate a été favorisée. L'espèce Bac 7 semblerait donc être à l'origine de ces fluctuations et pourrait posséder dans son métabolisme une voie de conversion du lactate en butyrate. L'espèce Bac 6 pourrait également être à l'origine de l'inhibition de l'espèce Bac 7 au sein du réplikat n°1 dans lequel cette voie métabolique ne semble pas avoir été active. Ces hypothèses demandent néanmoins à être confirmées éventuellement lors de l'étude des résultats des confrontations avec les souches pures mais nécessiteraient dans tous les cas des analyses approfondies comme par exemple une identification des espèces présentes par pyroséquençage.

V.7.3.2 IMPACT DES BACTERIES EXOGENES SUR LE CONSORTIUM ECO C

- *Lactobacillus bulgaris* : bactérie compétitrice ou amensale ?

Parmi l'ensemble des espèces introduites au sein d'Eco C, *Lactobacillus bulgaris* est la seule à avoir eu un effet significatif sur la quantité maximale d'hydrogène produite. En effet, l'ajout de *L. bulgaris* a conduit de façon systématique à une diminution de la production d'hydrogène du consortium Eco C. Cette diminution des performances de production d'hydrogène est directement liée à l'importante concentration de lactate retrouvée dans les cultures en fin de fermentation. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour expliquer cette forte production de lactate dans le milieu. Le premier est directement dû à la présence de *L. bulgaris* dans l'écosystème dans des proportions significatives (entre 11 et 26%). En effet, *L. bulgaris* est une bactérie homolactique qui ne produit que du lactate à partir du glucose, sans production de gaz associée (Burgos-Rubio *et al.*, 2008). Elle rentre donc directement en compétition avec les bactéries productrices d'hydrogène pour le glucose. Sans compter que la sécrétion de lactate dans le milieu engendre une forte diminution du pH qui va orienter les

voies métaboliques des espèces productrices d'hydrogène présentes au sein du consortium vers des voies concurrentes, voire consommatrices d'hydrogène, ce qui expliquerait les plus faibles quantités d'acétate et de butyrate produite lors de l'ajout de *L. bulgaris* (Noike *et al.*, 2002 ; Kawagoshi *et al.*, 2005). Enfin, la présence de *Lactobacillus* peut, par l'intermédiaire d'une relation amensaliste, inhiber la croissance des populations productrices d'hydrogène, notamment par la sécrétion de bactériocines, comme l'ont montré Casla *et al.* (1996). D'ailleurs, il est intéressant de noter que, contrairement à Eco C seul ou après l'ajout de plusieurs autres souches, le lactate produit lors de l'ajout de *L. bulgaris* n'a jamais été reconsumé. *L. bulgaris* pourrait en effet avoir inhibé la croissance de(s) population(s) bactérienne(s) dégradant le lactate et l'acétate en hydrogène et butyrate.

- *Clostridium acetobutylicum* remporte la compétition et stabilise le métabolisme d'Eco C.

En culture pure, *Clostridium acetobutylicum* a présenté une croissance et une production d'hydrogène élevées avec des rendements de conversion du glucose en hydrogène de $1,94 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glc}_{\text{consommé}}$. Lorsque cette souche a été ajoutée au consortium Eco C, elle est rentrée en compétition pour le substrat avec les autres espèces présentes dans l'écosystème. L'observation des profils SSCP des différents réplicats du mélange Eco C / *C. acetobutylicum*, indique que cette dernière est alors devenue majoritaire au sein de l'écosystème et a donc remporté la compétition de façon systématique. Ceci s'est traduit d'un point de vue macroscopique par l'élimination de la deuxième phase de production d'hydrogène observée pour le consortium seul et par la stabilisation du métabolisme de l'écosystème. Néanmoins, la réduction du côté aléatoire des résultats inhérent à Eco C n'a pas été accompagnée d'un effet significatif sur la production d'hydrogène. En comparaison avec la culture pure, la compétition entre *Clostridium acetobutylicum* et les autres espèces lors du mélange semble même avoir détourné le métabolisme de l'écosystème vers des voies de consommation d'hydrogène comme l'homoacétogénèse. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été observé dans le Chapitre IV où l'augmentation de la charge avait engendré l'émergence de plusieurs clostridies qui étaient rentrées en compétition dérivant ainsi le métabolisme de l'écosystème vers l'homoacétogénèse. Dans le cas présent, les concentrations finales de lactate et d'éthanol étaient faibles voire nulles, et les ratios $\text{H}_2_{\text{produit}} / [2 (\text{Ac} + \text{Bu})]$ étaient nettement inférieurs à 1 (0,43). Seule la présence de voies d'homoacétogénèse permet

d'expliquer ce résultat, ou éventuellement la présence d'une voie de transformation du lactate et de l'acétate en butyrate et en hydrogène. Cependant, l'absence de deuxième phase de production d'hydrogène rend cette dernière hypothèse peu probable.

- *Clostridium pasteurianum* un compétiteur qui co-domine l'écosystème avec les clostridies d'Eco C.

Tout comme *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* est une bactérie anaérobie stricte connue pour produire de l'hydrogène via les voies acétate et butyrate (Cornish *et al.*, 2011 ; Hung *et al.*, 2011b). Les résultats en culture pure le confirment avec une production d'hydrogène élevée (plus de 2500 mL.L⁻¹ en moyenne) et un rendement de conversion du glucose en hydrogène de 2,02 mol H₂.mol⁻¹ glucose consommé.

Lorsqu'elle est ajoutée au consortium Eco C, *C. pasteurianum* est entrée en compétition pour le substrat avec les autres espèces présentes dans l'écosystème. Cependant, l'observation de la structure finale des communautés des mélanges montre que *C. pasteurianum* ne dominait pas l'écosystème de façon systématique. Elle a co-évolué avec Bac 4 et Bac 5, les deux espèces qui dominent Eco C lors de la première phase plateau. La structure de la communauté microbienne, avec les trois clostridies qui co-dominent l'écosystème, a entraîné la disparition de la deuxième phase de production d'hydrogène et la stabilisation du métabolisme globale de l'écosystème qui est alors devenu répétable d'un répliat à l'autre. Néanmoins, de la même manière que pour l'ajout de *Clostridium acetobutylicum*, la compétition entre *Clostridium pasteurianum*, Bac 4 et Bac 5 ont entraîné des phénomènes de consommation d'hydrogène (ratios H₂ produit / [2 (Ac+ Bu)] = 0,73). Malgré tout, aucun effet significatif sur la quantité maximale d'hydrogène produite n'a pu être constaté après l'ajout de *C. pasteurianum* dans l'écosystème Eco C.

- *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* favorisent la deuxième phase de production d'hydrogène.

En culture pure *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* n'ont pas eu le même comportement. En effet, lorsqu'elle était seule et dans les conditions de l'étude, *Escherichia coli* a présenté une croissance et une production d'hydrogène modérées (270 mL.L⁻¹ en moyenne) tout en produisant de l'acétate, du lactate et de l'éthanol. A l'inverse, *Ralstonia eutropha* a montré une croissance faible avec une production nulle d'hydrogène et de métabolite. Lors des mélanges, aucun effet significatif sur la production d'hydrogène n'a pu être observé après l'ajout de ces deux souches au sein de l'écosystème Eco C.

Cependant, lorsque ces souches sont ajoutées au consortium Eco C, le métabolisme des cultures est devenu répétable entre les réplicats et l'apparition de la deuxième phase de production d'hydrogène a été favorisée. Dans les six cultures (2 x 3 réplicats), l'apparition de la deuxième phase de production d'hydrogène était corrélée avec l'émergence, de façon systématique, de Bac 7 dans l'écosystème entre les deux plateaux. Ces observations suggèrent que ces deux souches puissent interagir directement sur l'émergence de Bac 7 qui a alors consommé le lactate produit lors de la première phase de production d'hydrogène et a engendré l'apparition de la deuxième phase de production.

Néanmoins, les profils de CE-SSCP (Figure V-32 et Figure V-33) semblent indiquer que les mécanismes d'interactions mis en jeu par ces deux espèces sont différents. En effet, alors qu'*E. coli* était présente dans l'écosystème tout au long de l'expérimentation, *R. eutropha* n'a plus été retrouvé dans l'écosystème dès la fin du premier plateau de production d'hydrogène. L'effet d'*E. coli* serait donc de nature plus directe alors que l'effet de *R. eutropha* serait rémanent comme suspecté lors des études précédentes.

- *Enterococcus casseliflavus* et *Desulfovibrio vulgaris*, sans effet significatifs sur Eco C.

Tout comme *Lactobacillus bulgaris*, *Enterococcus casseliflavus* est une bactérie homolactique capable de produire des bactériocines en cas de compétition avec d'autres espèces (Sabia *et al.*, 2003 ; Sabia *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2011b). Les profils SSCP indique que la souche a pu s'implanter dans l'écosystème et qu'il y aurait même eu croissance entre les deux phases de productions d'hydrogène. Aussi, des effets négatifs, semblables à ceux

observés après l'ajout de *Lactobacillus bulgaris* étaient attendus. Noike *et al.* (2002) ont d'ailleurs montré que les espèces du genre *Enterococcus* sp. ont un effet inhibiteur sur la production d'hydrogène par voie fermentaire. Or les résultats de cette étude indiquent qu'*Enterococcus casseliflavus* ne présente pas d'effet significatif ni sur la production d'hydrogène, ni sur le métabolisme de l'écosystème.

De la même manière, *Desulfovibrio vulgaris* n'a pas eu d'effets significatifs sur la production d'hydrogène ou sur le métabolisme de l'écosystème. Or des résultats probants avaient été obtenus dans le cadre du projet InGEcoh à partir d'une co-culture de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH) et de *Clostridium acetobutylicum* (Cab) (Benomar *et al.*, en cours de soumission). Les auteurs ont prouvé que la présence de (DvH) était susceptible de multiplier la productivité en hydrogène de (Cab) par 2,5 lors de leur co-culture. Cette augmentation de performance est due à une interaction directe entre *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* et *Clostridium acetobutylicum*. DvH est donc susceptible d'interagir avec les espèces du genre *Clostridium* sp. Néanmoins, l'étude de Benomar *et al.* s'est déroulée avec de faibles concentrations en sulfate de fer (7mg.L^{-1}) ce qui a pu engendrer un stress chez Cab et être à l'origine de l'interaction observée. Or lors de notre étude précédente, il a été suggéré que lorsque les clostridies sont placées dans des conditions idéales (sans carence en nutriments) elles ne cherchent pas à interagir avec les espèces voisines. Ceci peut expliquer l'absence de résultats significatifs après l'ajout de DvH dans la culture.

Il est également possible que DvH ait été inhibée dès son injection par la présence de composés inhibiteurs (comme des bactériocines) sécrétés par les autres espèces de la communauté telle que des *Lactobacillus*. En effet la présence, dans un des réplicats, de Bac 9 qui migre à une distance proche de celle des bactéries lactiques, rend cette hypothèse probable.

- *Bac 7, espèce responsable de la transformation du lactate en hydrogène ?*

L'observation de l'ensemble des profils de CE-SSCP des cultures et des cinétiques correspondantes semble indiquer que l'apparition de la deuxième phase de production d'hydrogène ait été systématiquement corrélée à l'émergence de Bac 7 dans l'écosystème. A l'inverse, lorsque cette espèce n'était pas présente dans l'écosystème, la cinétique de production d'hydrogène présentait une allure classique avec une seule phase de production.

C'est par exemple le cas des mélanges entre Eco C et *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* ou *Lactobacillus bulgaris* pour qui aucune croissance de Bac 7 n'a été observée même si le milieu contient du lactate et de l'acétate comme avec *Lactobacillus bulgaris*.

De même le réplikat n°2 du mélange Eco C / *E. casseliflavus* et le réplikat n°1 du mélange Eco C / DvH ont présenté une cinétique de production d'hydrogène en une seule phase or l'écosystème de ces deux cultures était dominé par Bac 6. Bac 7 n'a pas réussi à émerger dans les deux cas. L'ensemble de ces résultats vient renforcer les hypothèses déjà posées lors de l'explication des performances variables d'Eco C. Il serait donc potentiellement intéressant d'identifier ces deux espèces par pyroséquençage ou clonage-séquençage pour étudier plus en détail leur rôle possible au sein de l'écosystème et éventuellement pouvoir étudier l'effet de l'introduction de ces souches dans d'autres écosystèmes.

V.7.4 CONCLUSION DE L'ETUDE

Au cours de cette étude, l'impact de l'ajout d'espèces exogènes sur le fonctionnement d'un écosystème producteur d'hydrogène (Eco C) a été testé. Cette écosystème, cultivé dans un milieu supplémenté en fer, était plus divers que les deux utilisés pour les études précédentes (indice de Simpson respectif de Eco A, Eco B et Eco C : 2,75 ; 1,02 et 3,58). Dans ces conditions, Eco C a produit une quantité importante d'hydrogène mais une grande variabilité métabolique entre les réplicats a été observée.

Les résultats ont montré que seul *Lactobacillus bulgaris* a présenté un effet significatif sur la production d'hydrogène. L'ajout de *L. bulgaris* a diminué la quantité maximale d'hydrogène produite par l'intermédiaire de phénomènes de compétition (vis-à-vis du substrat carboné) ou d'amensalisme (diminution du pH en sécrétant du lactate ou sécrétion de bactériocines dans le milieu). Cependant, cette diminution de la productivité en hydrogène a été accompagnée d'une réduction de l'instabilité métabolique inhérente à l'écosystème. Les effets négatifs des bactéries du genre *Lactobacillus* ont déjà été observés en chémostat lors de la première étude sur le rôle des bactéries minoritaires ces résultats viennent donc renforcer ces premières constatations.

Les autres espèces introduites n'ont pas eu d'impacts significatifs sur la quantité maximale d'hydrogène produite. Néanmoins, l'ajout de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium*

pasteurianum, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* semblent avoir supprimé le caractère aléatoire de l'évolution du métabolisme d'Eco C mais par des mécanismes complètement différents. Les deux espèces de *Clostridium* sont rentrées en compétition avec les autres espèces de l'écosystème ce qui a eu pour effet de stabiliser l'évolution des communautés de ce dernier et d'éliminer la deuxième phase de production d'hydrogène observée chez Eco C seul. A contrario, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* semblent avoir favorisé l'apparition de cette deuxième phase de production d'hydrogène en favorisant l'émergence de l'espèce qui en était vraisemblablement responsable : Bac 7.

Ainsi, contrairement aux résultats observés avec Eco A et à ce qui a été observé par Benomar *et al.* (en cours de soumission), l'ajout de *Escherichia coli*, de *Ralstonia eutropha* et de DvH n'a pas eu d'effets significatifs sur la production d'hydrogène. Ceci est probablement dû, comme pour l'étude avec Eco B, au fait que le milieu ait été supplémenté en fer. Dans ces conditions, les espèces du genre *Clostridium* dispose des conditions nécessaires pour subvenir à leurs propres besoins et ne cherche pas à interagir avec les autres espèces de l'écosystème autrement qu'en étant des compétiteurs pour le glucose. Néanmoins, *Escherichia coli* et *Ralstonia eutropha* semble tout de même avoir interagit avec une autre espèce de l'écosystème pour qui les conditions initiales n'étaient pas favorables (Bac 7).

Outre les conditions opératoires, l'historique et la diversité de l'écosystème apparaissent comme étant des paramètres importants. En effet, dans l'étude précédente, les repiquages successifs de l'écosystème sur le milieu de culture supplémenté en fer avait abouti à la sélection d'une espèce hyper performante qui remportait systématiquement la compétition contre les souches exogènes. L'utilisation d'un inoculum divers et non adapté au milieu de culture a permis l'établissement d'une compétition entre les clostridies d'Eco C et les souches exogènes ajoutées telles que *Lactobacillus bulgaris*, *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium pasteurianum*.

V.8 INTRODUCTION D'*ESCHERICHIA COLI* DANS UNE CULTURE MIXTE PRODUCTRICE D'HYDROGENE EN REACTEUR CONTINU

Les études précédentes ont démontré le potentiel d'*Escherichia coli* à être utilisée comme ingénieur écologique des écosystèmes microbiens. Les premières études en chémostat ont permis d'identifier *E. Coli* comme pouvant avoir un effet positif sur la production d'hydrogène en orientant le réseau métabolique global de l'écosystème vers la voie acétate et en augmentant ainsi le rendement en hydrogène. Les expérimentations en batch ont montré qu'*E. coli*, pouvait être introduite artificiellement dans un écosystème producteur d'hydrogène et s'y maintenir. *E. coli* a ainsi permis d'augmenter les performances de production d'hydrogène alors que le milieu était carencé en sulfate de fer et dans des conditions opératoires plus favorables (concentration en FeSO_4 plus élevée), l'insertion de de la souche a permis de stabiliser le métabolisme de l'écosystème microbien sans pour autant en affecter favorablement la production d'hydrogène.

E. coli a donc logiquement été sélectionnée pour la dernière étape de cette étude qui consiste à introduire un ingénieur écologique des écosystèmes microbiens dans une culture mixte productrice d'hydrogène en réacteur continu.

Les objectifs de cette partie de l'étude sont multiples. L'objectif principal est de perturber la structure de la communauté microbienne existante par l'intermédiaire d'un facteur biotique et de mesurer les effets de cette perturbation sur le métabolisme et les performances de production d'hydrogène de l'écosystème. Dans une moindre mesure un autre objectif est de vérifier s'il est possible d'implanter de façon durable *E. coli* dans un système continu de production d'hydrogène afin de confirmer les résultats obtenues dans le chapitre III et dans les études en batch de ce chapitre V.

Deux fermenteurs continus (F1 et F2) ont été opérés en parallèle. *E. coli* a été injecté par deux fois dans chaque réacteur et à deux doses différentes (2% et 15% d'abondance relative). Dans tous les cas l'injection de la souche dans l'écosystème a été effectuée lorsque la production d'hydrogène était stable pendant plus de 20 temps de séjours, le réacteur ayant été alors considéré à l'équilibre.

V.8.1 ENSEMENCEMENT D'ESCHERICHIA COLI A 2% D'ABONDANCE RELATIVE

V.8.1.1 PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

Les performances de production d'hydrogène ont été mesurées pour les deux fermenteurs F1 et F2, aussi bien en termes de productivité que de rendement (Y), sur différentes périodes.

Les performances d'*E. coli* (t-1) correspond aux performances moyennes des fermenteurs à l'équilibre sur 20 temps de séjours avant ensemencement d'*E. coli*. *E. coli* (t+6) et *E. coli* (t+24) correspondent respectivement aux performances moyennes des fermenteurs pendant les 6 et 24 premières heures qui suivent l'injection de la souche soit pendant 1 et 4 temps de séjours hydrauliques (Tableau V-9).

Tableau V-9 : Performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d'Escherichia coli à 2% d'abondance relative. ns correspond à des différences de performances non significatives par rapport aux performances avant injection de la souche (ANOVA, $p > 0,05$)

	F1			F2		
	<i>E. coli</i> (t-1)	<i>E. coli</i> (t+6)	<i>E. coli</i> (t+24)	<i>E. coli</i> (t-1)	<i>E. coli</i> (t+6)	<i>E. coli</i> (t+24)
Productivité (mmol H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	8,67	8,99 ^{ns}	8,63 ^{ns}	9,32	9,77 ^{ns}	9,57 ^{ns}
Y (mol H ₂ . mol ⁻¹ Glc _{consommé})	1,38	1,42 ^{ns}	1,37 ^{ns}	1,27	1,34 ^{ns}	1,30 ^{ns}

A l'équilibre et avant l'injection d'*E. coli* les performances des deux réacteurs étaient proches. Avant introduction, les productivités en hydrogène moyennes de F1 et F2 étaient respectivement de 8,67 et 9,32 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ et les rendements de 1,38 et 1,27 mol H₂. mol⁻¹ glucose_{consommé}.

Les performances de production d'hydrogène des deux fermenteurs ne différaient pas de façon significative ($p > 0,05$; ANOVA) après l'introduction d'*E. coli* à 2% d'abondance relative et ce que ce soit après 1 ou 4 temps de séjours hydrauliques. La productivité de F1 était restée en moyenne à 8,76 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ et le rendement à 1,39 mol H₂. mol⁻¹ glucose_{consommé}. Pour F2 la productivité moyenne était de 9,55 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ et le rendement moyen de 1,30 mol H₂. mol⁻¹ glucose_{consommé}.

V.8.1.2 METABOLISME DES DEUX ECOSYSTEMES F1 ET F2 AVANT ET APRES L'INTRODUCTION D'*ESCHERICHIA COLI*

Afin de mesurer l'influence de la première injection d'*Escherichia coli* sur le réseau métabolique des deux écosystèmes, la distribution des métabolites produits, a été effectuée pour les deux fermenteurs avant ensemencement, 6 heures puis 24 heures après. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure V-36.

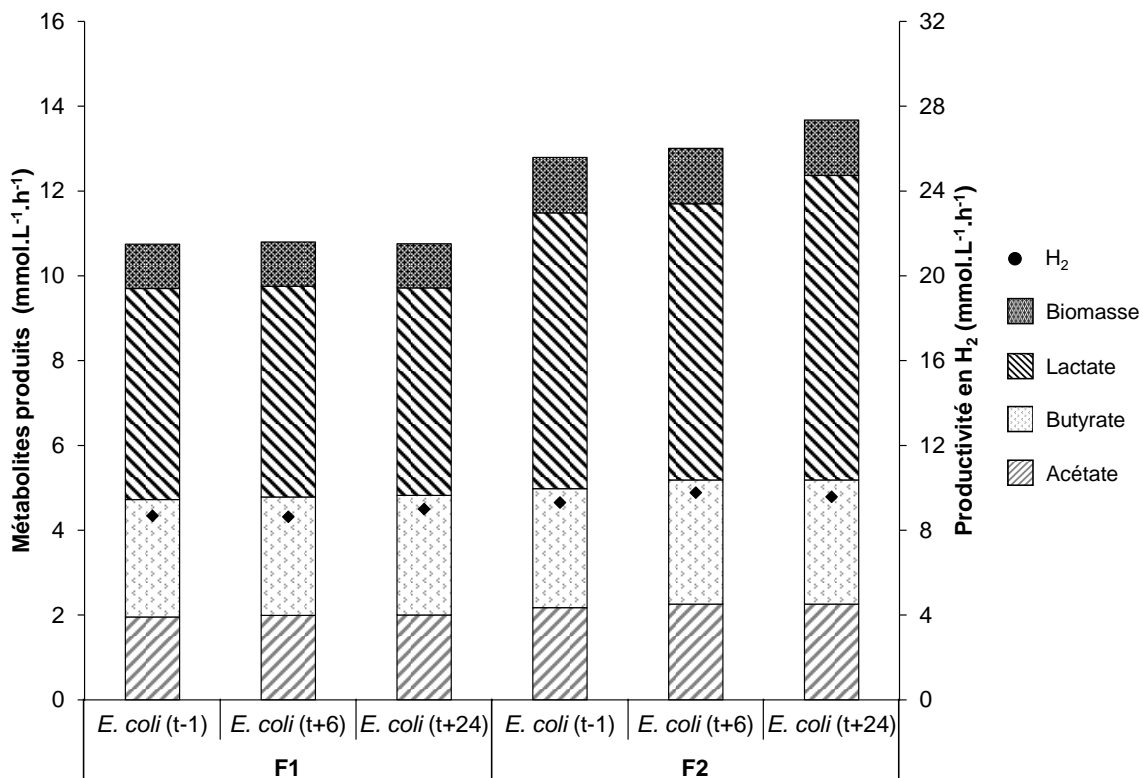


Figure V-36 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d'*Escherichia coli* à 2% d'abondance relative. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

A l'équilibre avant l'introduction d'*E. coli*, les cultures F1 et de F2 produisaient les trois mêmes métabolites : l'acétate, le butyrate et le lactate. Les productions d'acétate et de butyrate ont été similaires pour les deux fermenteurs avec une concentration de 2 mmol.L⁻¹.h⁻¹ pour l'acétate et de 2,8 mmol.L⁻¹.h⁻¹ pour le butyrate. Néanmoins, F2 a produit plus de lactate que F1 avec en moyenne 6,50 mmol.L⁻¹.h⁻¹ de lactate pour F2 contre 4,98 mmol.L⁻¹.h⁻¹ pour

F1. La biomasse produite par le fermenteur F2 a également été plus importante que celle de F1 avec respectivement 1,31 contre 1,04 mmol.L⁻¹.h⁻¹.

Aucun effet significatif sur le métabolisme des deux écosystèmes n'a été observé après l'introduction d'*E. coli* à 2% d'abondance relative et ceci aussi bien à 6 et 24 heures après l'ensemencement. Quel que soit le fermenteur, les concentrations en acétate, butyrate, lactate et en biomasse mesurées après injection de la souche étaient identiques à celles mesurées avant son ajout.

V.8.1.3 IMPLANTATION DE LA SOUCHE D'*ESCHERICHIA COLI* DANS LA CULTURE MIXTE

Afin de visualiser l'influence de l'injection d'*Escherichia coli* à 2% d'abondance relative sur la structure des communautés microbiennes de F1 et F2, des profils de CE-SSCP ont été effectués avant et après l'injection de la souche dans chaque fermenteur (Figure V-37).

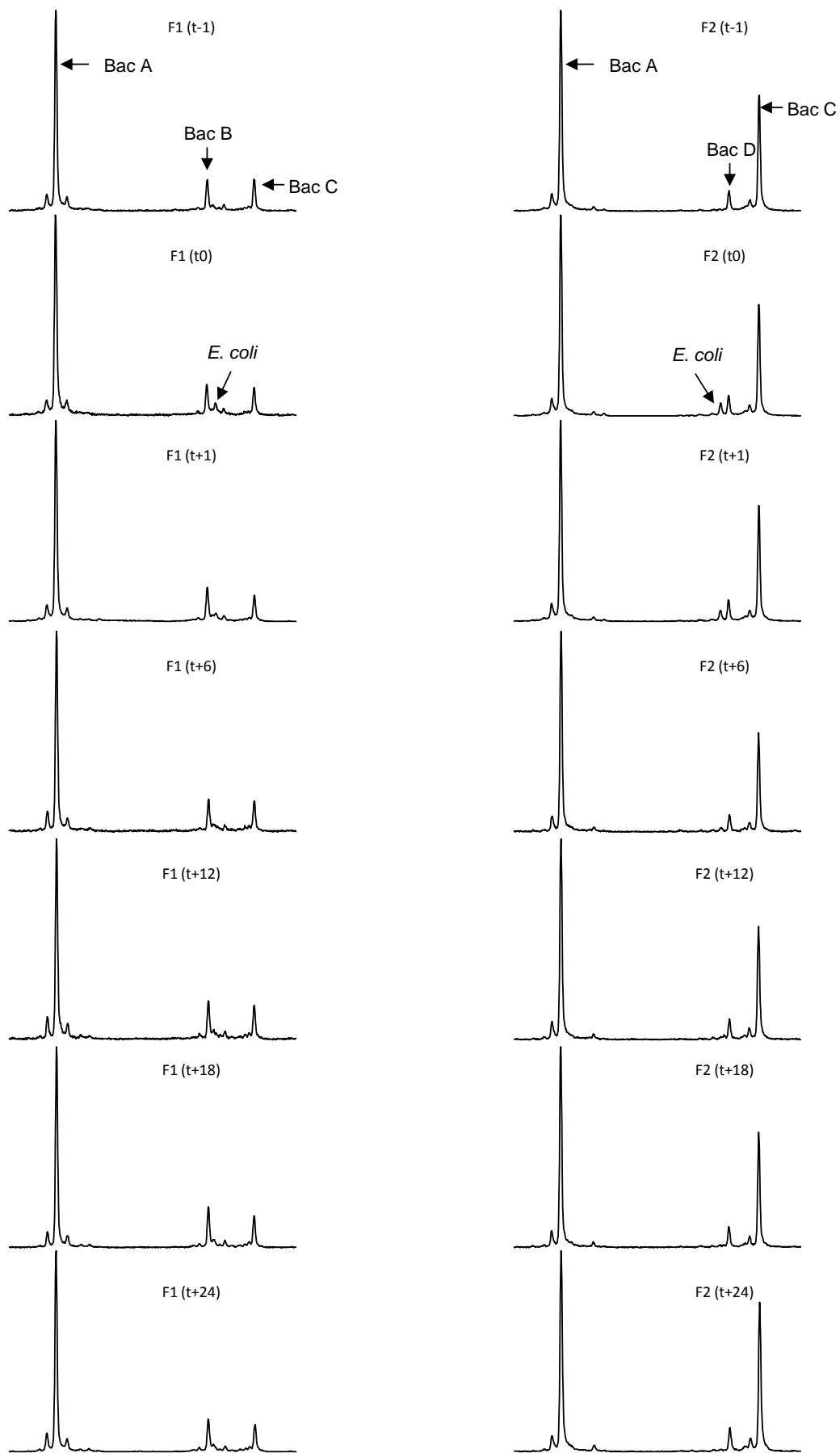


Figure V-37 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 juste avant l'injection d'*E. coli* à 2 % d'abondance relative (t-1), juste après (t0) puis une heure après (t+1) jusqu'à 24 heures après (t+24). Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

L'analyse des profils de CE-SSCP indique qu'à l'équilibre, et avant l'injection d'*E. coli*, les deux écosystèmes étaient constitués d'une espèce majoritaire et de deux espèces minoritaires. Dans les deux cas l'espèce majoritaire sélectionnée migre à une distance identique indiquant la présence d'une même espèce (Bac A). Les deux écosystèmes présentaient également une espèce minoritaire (Bac C) en commun dont l'abondance relative diffère entre F1 et F2. Bac C représentait 9,8 % de l'abondance relative de F1 contre 26,6 % pour F2. Les autres espèces minoritaires, Bac B pour F1 et Bac D pour F2, représentaient respectivement 9,8 % et 4,7 % de la communauté bactérienne des deux écosystèmes.

Des analyses supplémentaires effectuées par pyroséquençage ont montré que Bac A appartenait au genre *Clostridium*, Bac B et Bac D au genre *Bacillus* et Bac C au genre *Sporolactobacillus*. Enfin, les différentes analyses effectuées indiquent que la souche d'*E. coli* utilisée pour cette étude n'était présente dans aucun des écosystèmes avant son injection.

Au moment de l'injection (t_0) un pic, dont la distance de migration est identique que celui de la souche d'*E. coli* utilisé, est apparu sur les profils de CE-SSCP de F1 et de F2. A t_0 , ce pic représentait environ 2 % de l'écosystème en abondance relative. Ensuite *E. coli* ne s'est pas maintenu dans l'écosystème, et au bout de 24 heures il n'était plus retrouvé dans l'écosystème.

La Figure V-38 présente à la fois les abondances relatives du pic correspondant à *E. coli* mesurées au cours du temps et la cinétique théorique de disparition de ce micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance, selon l'équation :

$$C_S = C_{S0} e^{(-t/\tau)} \quad (\text{V-10})$$

Avec :

C_S : concentration du micro-organisme en sortie

C_{S0} : concentration initiale du micro-organisme

t : le temps en heure

τ : temps de séjour hydraulique

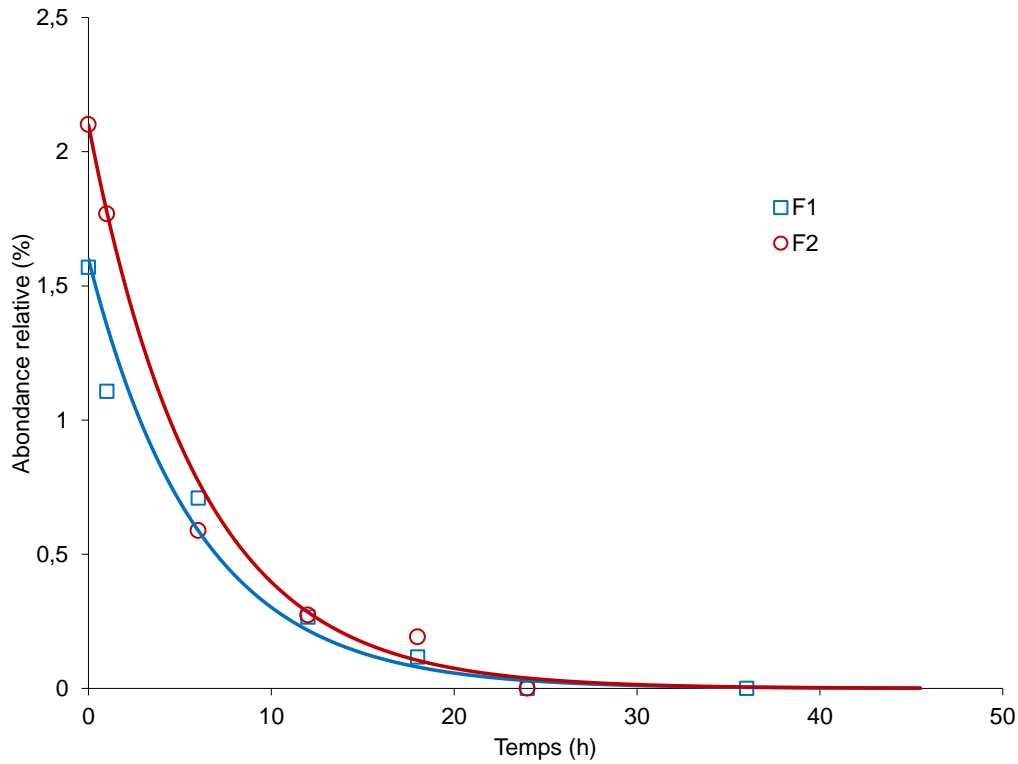


Figure V-38 : Abondance relative du pic d'*E. coli* en fonction du temps comparé à la cinétique de concentration d'un micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance.

Les résultats de la Figure V-38 montrent que les points expérimentaux mesurant l'abondance d'*E. coli* dans les fermenteurs en fonction du temps suivent la même cinétique que ce même micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance. Ceci montre qu'après son injection dans les fermenteurs, *E. coli* non seulement ne s'est pas maintenu dans l'écosystème mais qu'elle n'a pas eu de croissance non plus.

Afin de vérifier que les résultats obtenus ne sont pas dus à un effet dose, une deuxième injection d'*E. coli* à 15 % d'abondance relative a été effectuée après obtention d'un nouvel état d'équilibre pour chacun des fermenteurs.

V.8.2 ENSEMENCEMENT D'ESCHERICHIA COLI A 15% D'ABONDANCE RELATIVE

V.8.2.1 PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

De la même façon que précédemment, les performances de production d'hydrogène ont été mesurées pour les deux fermenteurs F1 et F2, aussi bien en termes de productivités que de rendements (Y), sur différentes périodes (Tableau V-10).

Les performances moyennes des fermenteurs à l'équilibre sur 20 temps de séjour avant le deuxième ensemencement d'*Escherichia coli* ont été calculées et correspondent à la colonne *E. coli* (t-1) du Tableau V-7. *E. coli* (t+6) et *E. coli* (t+24) correspondent respectivement aux performances moyennes des fermenteurs pendant les 6 et 24 premières heures qui suivent l'injection de la souche soit pendant 1 et 4 temps de séjour hydrauliques.

Tableau V-10 : Performances de production des deux fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d'*Escherichia coli* à 15% d'abondance relative. ns correspond à des différences de performances non significatives par rapport aux performances avant injection de la souche (ANOVA, $p > 0,05$)

	F1			F2		
	<i>E. coli</i> (t-1)	<i>E. coli</i> (t+6)	<i>E. coli</i> (t+24)	<i>E. coli</i> (t-1)	<i>E. coli</i> (t+6)	<i>E. coli</i> (t+24)
Productivité (mmol H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	8,98	9,44 ^{ns}	9,09 ^{ns}	8,65	9,70 ^{ns}	9,01 ^{ns}
Y (mol H ₂ . mol ⁻¹ Glc _{consommé})	1,51	1,54 ^{ns}	1,46 ^{ns}	1,20	1,21 ^{ns}	1,16 ^{ns}

Comme précédemment, les performances des deux fermenteurs à l'équilibre avant la deuxième injection d'*E. coli* étaient du même ordre de grandeur. Ainsi, les productivités moyennes en hydrogène de F1 et F2 étaient respectivement de 8,98 et 8,65 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ et les rendements de 1,51 et 1,20 mol H₂. mol⁻¹glucose_{consommé}.

Comme à 2 %, l'injection d'*E. coli* à 15 % d'abondance relative n'a pas eu d'effet significatif sur les performances de production d'hydrogène aussi bien en termes de productivité que de rendement et ceci aussi bien après 6 heures que 24 heures.

V.8.2.2 METABOLISME DES DEUX ECOSYSTEMES

Afin de mesurer l'influence de la deuxième injection d'*Escherichia coli* sur le réseau métabolique des deux écosystèmes, la distribution des métabolites produits, a été déterminée pour les deux fermenteurs avant ensemencement puis 6 heures et 24 heures après l'injection (Figure V-39).

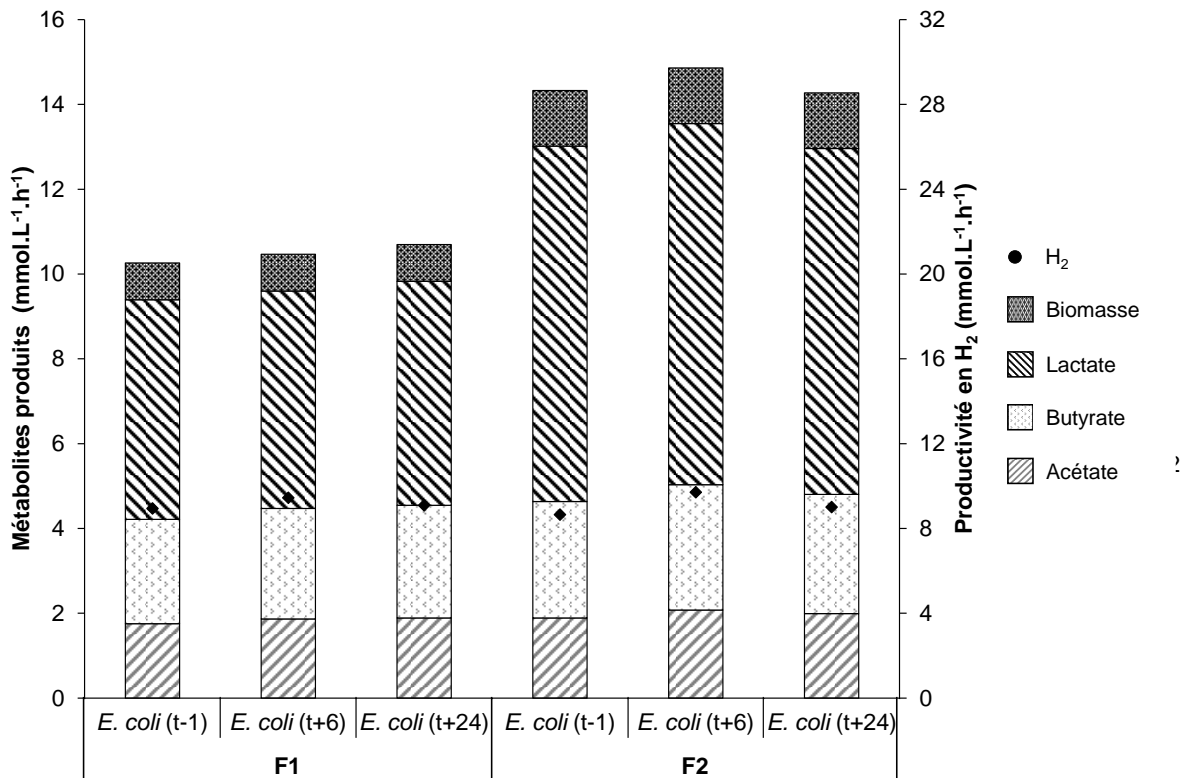


Figure V-39 : Hydrogène et métabolites produits par les fermenteurs F1 et F2 avant et après injection d'*Escherichia coli* à 15% d'abondance relative. Les échelles des axes des Y ont été fixées de façon à représenter la différence entre la productivité en hydrogène et les métabolites associés (théoriquement, si l'hydrogène est uniquement produit par les voies acétate et butyrate, la productivité en H₂ = 2 (Ac + Bu)).

Aucun effet significatif sur le métabolisme global des deux écosystèmes n'a pu être observé après l'injection dans les fermenteurs d'*E. coli* à 15% d'abondance relative. Comme précédemment, à l'équilibre et avant l'injection d'*E. coli*, les deux fermenteurs ont produit de l'acétate, du butyrate et du lactate. Alors que les quantités d'acétate et de butyrate produites dans les deux réacteurs étaient proches (1,8 mmol.L⁻¹.h⁻¹ d'acétate et 2,6 mmol.L⁻¹.h⁻¹ de butyrate), la quantité de lactate a varié d'un réacteur à l'autre : F1 a produit 5,18 mmol.L⁻¹.h⁻¹ de lactate alors que F2 en a produit 8,38 mmol.L⁻¹.h⁻¹.

V.8.2.3 IMPLANTATION DE LA SOUCHE DANS LA CULTURE MIXTE

Afin de visualiser l'influence de l'injection d'*Escherichia coli* à 15% d'abondance relative sur la structure des communautés microbiennes de F1 et F2, des profils de CE-SSCP ont été effectués avant et après l'injection de la souche dans chaque fermenteur (Figure V-40).

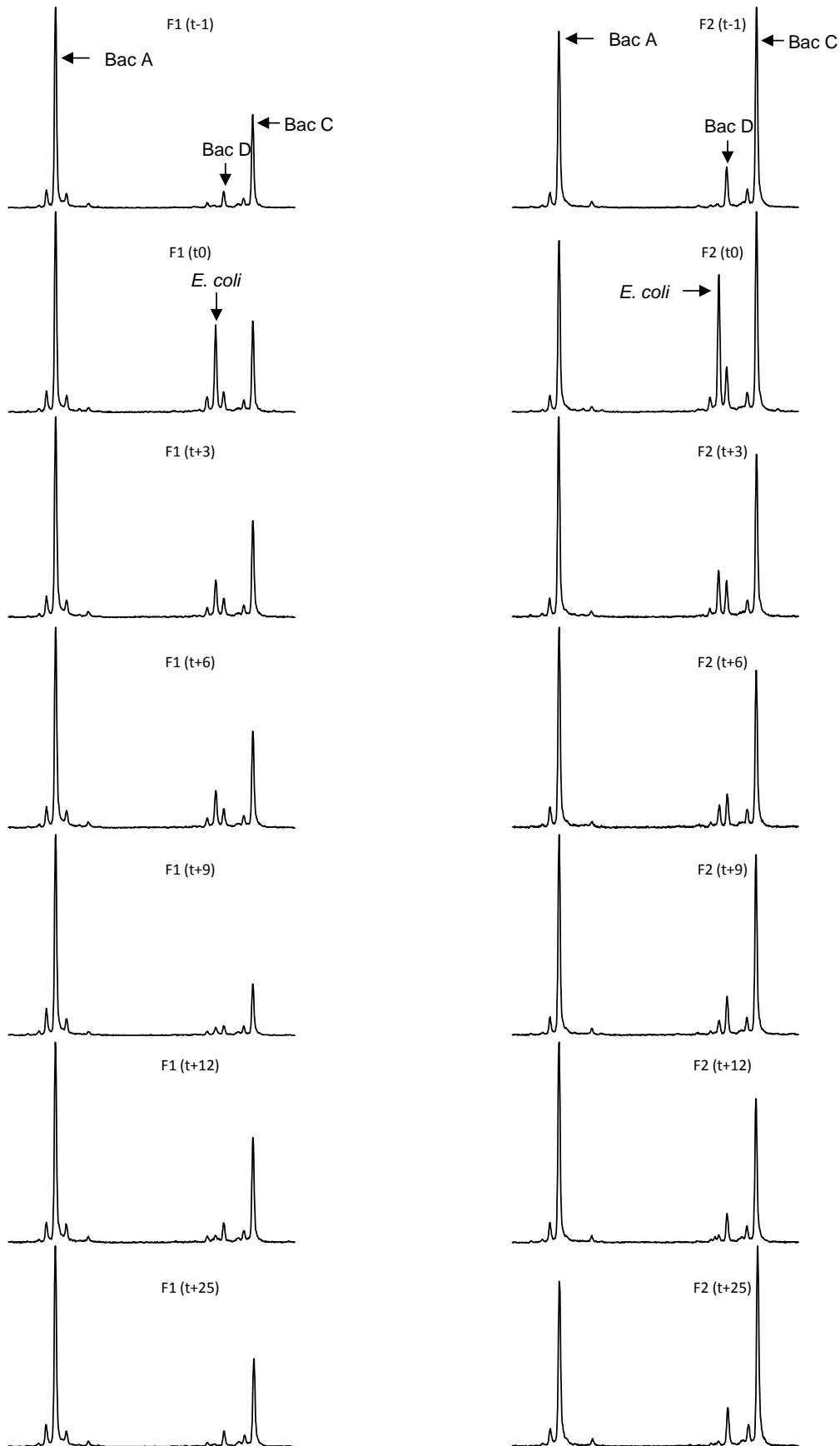


Figure V-40 : Structure des communautés microbiennes de F1 et F2 juste avant l'injection d'*E. coli* à 15 % d'abondance relative (t-1), juste après (t0) puis une heure après (t+1) jusqu'à 24 heures après (t+24). Les profils de CE-SSCP ont été alignés à l'aide d'un standard interne commun : le ROX. Les axes des X et des Y représentent respectivement la distance relative de migration et l'abondance relative des pics.

Les profils de CE-SSCP de la Figure V-40 montrent qu'avant la deuxième injection d'*E. coli*, les espèces présentes dans les deux fermenteurs étaient identiques, mais l'abondance relative de ces dernières différait d'un écosystème à l'autre. Ainsi Bac A, Bac C et Bac D étaient retrouvées dans les deux cultures mais Bac A et Bac C co-donnaient l'écosystème de F2 alors que F1 n'était dominé que par Bac A ; Bac C et Bac D étant retrouvées en proportions minoritaires.

E. coli était absent des deux écosystèmes avant son injection. Juste après son ensemencement (t_0) un pic, dont la distance de migration est identique que celui de la souche d'*E. coli* utilisé, est apparu sur les profils de CE-SSCP de F1 et de F2. Ce pic représentait environ 15 % d'abondance relative de l'écosystème à t_0 . Ensuite *E. coli* ne s'est pas maintenu dans l'écosystème et au bout de 25 heures, elle n'était plus retrouvée dans l'écosystème.

Comme précédemment, sa disparition de l'écosystème a été comparée à celle de ce même micro-organisme incorporée à la même concentration initiale et dans le cas où il serait lessivé sans croissance et sans interaction vis-à-vis de son environnement (Figure V-41).

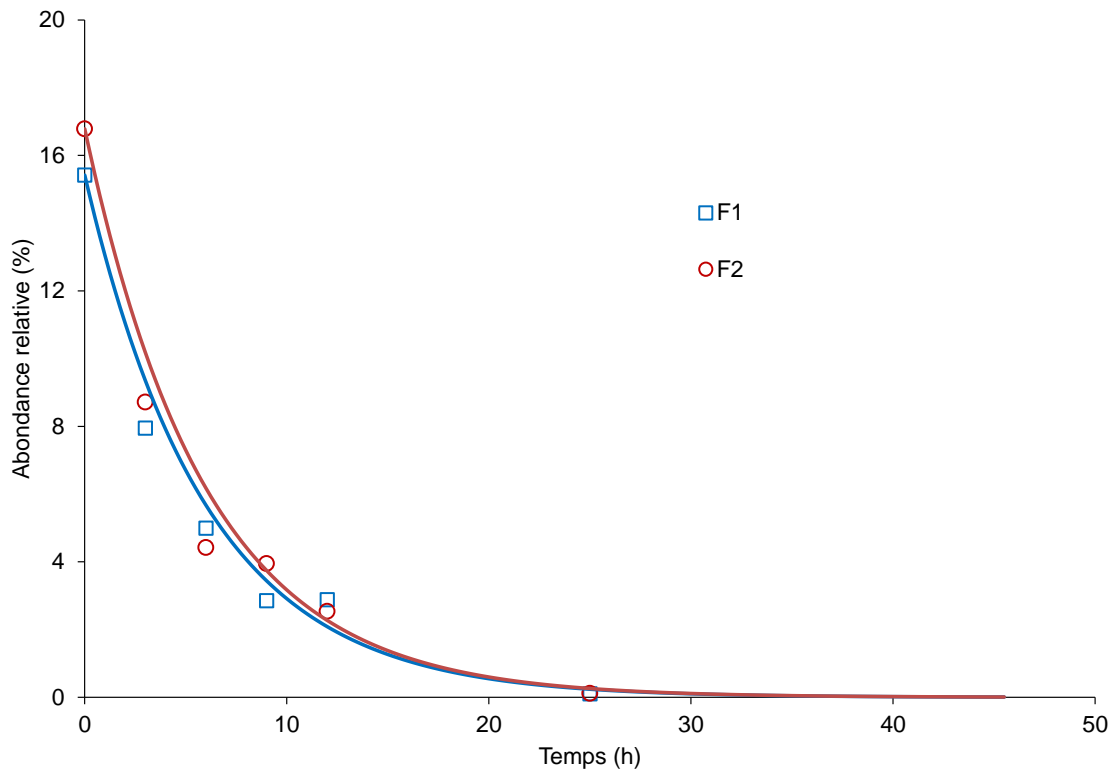


Figure V-41 : Abondance relative du pic d'*E. coli* en fonction du temps comparé à la cinétique de concentration de ce même micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance.

Les résultats de la Figure V-41 montrent que les points expérimentaux mesurant l'abondance d'*E. coli* dans les fermenteurs en fonction du temps, suivent la même cinétique que ce même micro-organisme dans le cas où il serait lessivé sans croissance. Ceci montre qu'après son injection dans les fermenteurs, la croissance d'*E. coli* était nulle et elle ne s'est pas maintenue dans l'écosystème.

V.8.3 DISCUSSION

Les résultats montrent qu'à l'équilibre et avant l'injection d'*E. coli* les deux réacteurs possédaient des performances de production d'hydrogène proches avec des productivités du même ordre de grandeur que celles habituellement observées dans la littérature (Wang & Wan, 2009a). Dans les deux cas, les rendements obtenus sont similaires à ceux mesurés dans l'étude du chapitre III sur les boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement (BDA^{pth}). Ces rendements en hydrogène correspondent à la fourchette basse de ceux trouvés dans des études similaires, c'est-à-dire en réacteur continu, sur glucose (Hawkes *et al.*, 2007). Ces faibles rendements s'expliquent notamment par la forte concentration en lactate retrouvée dans les deux fermenteurs et spécialement dans F2. Comme pour les résultats des chapitres précédents, ces performances de production d'hydrogène sont directement liées aux communautés microbiennes présentes dans les deux fermenteurs. En effet, que ce soit avant la première ou avant la deuxième injection d'*E. coli*, les espèces Bac B, Bac C et Bac D appartenant au genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* sont retrouvées sur les profils de CE-SSCP de F1 et F2. Ces espèces sont vraisemblablement responsables en grande partie des concentrations élevées de lactate retrouvées dans les deux fermenteurs. En effet, à l'équilibre et avant l'introduction d'*E. coli*, la concentration en lactate des deux fermenteurs est directement proportionnelle à l'abondance relative de ces espèces dans les deux écosystèmes (Figure V-42).

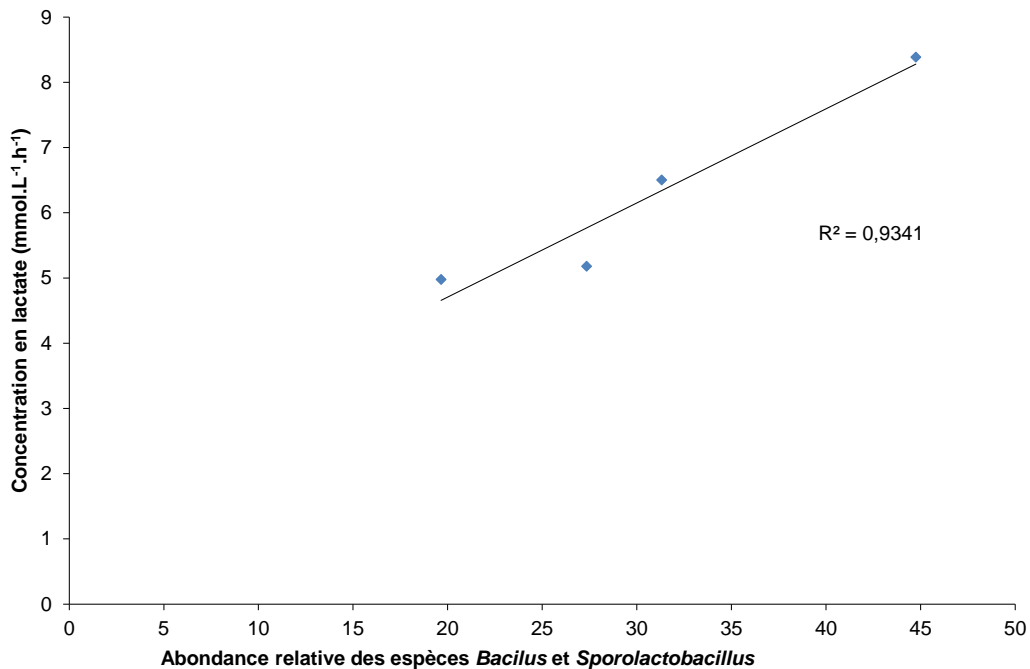


Figure V-42 : Proportionnalité entre la concentration en lactate des deux fermenteurs et l'abondance relative des espèces *Bacillus* et *Sporolactobacillus* des deux écosystèmes

Au vu des faibles performances observées et sachant qu'*E. coli* n'est pas retrouvée initialement dans les écosystèmes, l'introduction de cette dernière pourrait potentiellement améliorer les performances des deux écosystèmes. Les rendements en hydrogène pourraient être améliorés comme ce qui a déjà été observé lors de notre étude antérieure sur le rôle clé des bactéries minoritaires dans laquelle *E. coli* a été identifiée comme pouvant orienter le réseau métabolique de *Clostridium* vers la production d'acétate et ainsi augmenter le rendement de production d'hydrogène (Chapitre III). De plus, lors de la première étude en batch de ce chapitre, il a été montré qu'*E. coli* était capable d'augmenter la productivité en hydrogène d'un écosystème évoluant dans un milieu carencé en fer comme c'est le cas dans cette étude. Enfin, *E. coli* est capable de produire de l'hydrogène directement à partir du glucose via la voie formiate et ainsi augmenter la productivité en hydrogène (Zhu *et al.*, 2011). *E. coli* étaient donc potentiellement susceptible d'influer sur la structure microbienne et les performances de production d'hydrogène de F1 et F2. Or pour les deux réacteurs, et quelle que soit la dose d'*E. coli* injectée (2 ou 15 %), aucun effet significatif ni sur les performances de production d'hydrogène ni sur le métabolisme globale de l'écosystème n'a pu être mis en évidence. La raison principale étant qu'*E. coli* ne parvient pas à s'implanter dans l'écosystème et que la souche est lessivée dès son ensemencement sans aucun signe d'interaction ni même de croissance.

Plusieurs hypothèses sont susceptibles d'expliquer ces observations : La première est qu'*E. coli* n'est pas parvenu à s'adapter au milieu et aux conditions opératoires des réacteurs continus. Cependant, avant d'être injectée dans les deux fermenteurs, la souche a été cultivée en batch sur le même milieu de culture que celui utilisé pour alimenter les réacteurs et en anaérobiose. Dans ces conditions, *E. coli* croît et produit de la biomasse. Elle est donc capable de pousser dans le milieu Starkey modifié, utilisé pour alimenter les fermenteurs en continu.

De plus, par rapport au batch, le réacteur continu permet de sélectionner les espèces microbiennes en fonction de leur taux de croissance en fixant le temps de séjour hydraulique. Si le temps de séjour hydraulique est trop court, la souche n'a pas le temps de croître et est lessivée, à moins qu'elle n'arrive à interagir avec d'autres microorganismes pour former des floccs ou un biofilm lui permettant de se maintenir dans le réacteur. Or les résultats de cette étude montrent qu'il n'y a aucune croissance ou aucune forme d'interaction de la part d'*E. coli* à partir du moment où elle est injectée dans les fermenteurs. Néanmoins lors des études précédentes (chapitre III), *E. coli* a déjà été retrouvée dans un écosystème en continu après plus de 40 temps de séjours : c'est donc qu'elle est potentiellement capable de se maintenir et d'interagir avec son environnement. De même, lors d'une étude récente, Bakonyi *et al.* (2012) ont montré qu'une souche pure d'*E. coli* était capable de se maintenir dans un fermenteur anaérobie avec un temps de séjours de 5 h et de produire de l'hydrogène par la même occasion.

Une autre hypothèse serait liée à la structure de l'écosystème présent dans le fermenteur et aux interactions existantes entre les espèces indigènes qui seraient trop fortes pour permettre à *E. coli* de s'implanter dans la culture surtout en étant injecté dans un système fonctionnant en mode continu. En effet, Burmølle *et al.* (2006) ont montré qu'une culture mixte en biofilm pouvait générer des interactions synergiques capables d'augmenter la résistance de la culture à une invasion par d'autres espèces. Ce type d'interactions pourraient survenir entre les espèces présentes dans nos écosystème. En effet, Fang *et al.* (2002) ont montré que des espèces appartenant au genre *Sporolactobacillus* pouvaient synthétiser des exopolysaccharides à l'origine de la formation de granules composés de *Clostridium* et de *Sporolactobacillus* dans les fermenteurs producteurs d'hydrogène. Les interactions étant déjà effective, *E. Coli* n'aurait pas la place ni le temps de créer son propre réseau d'interactions qui lui permettraient de se maintenir dans la culture.

La dernière hypothèse permettant d'expliquer le lessivage d'*E. coli* au sein du réacteur s'appuie sur la considération des possibles activités antimicrobiennes de certaines espèces naturellement présentes dans la culture mixte notamment les espèces appartenant au genre *Sporolactobacillus*. En effet, ces espèces sont connues pour produire des bactériocines capables d'empêcher l'implantation d'*E. coli* dans des écosystèmes naturels tel que le tractus digestif humain (Savino *et al.*, 2011). De la même manière les lactobacilles présents dans les deux fermenteurs pourraient empêcher l'implantation d'*E. coli* dans ce genre d'écosystème.

V.8.4 CONCLUSION DE L'ETUDE

Les études précédentes ont permis d'identifier *Escherichia coli* comme une espèce minoritaire clé pouvant influencer sur une culture mixte productrice d'hydrogène. Néanmoins, aucun effet significatif sur les performances de production d'hydrogène ou sur le métabolisme global des écosystèmes F1 et F2. Cette absence d'effet est principalement dû au fait que la souche n'ait pas réussi à s'implanter et à croître au sein des écosystèmes. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, et notamment l'incapacité de la souche à s'adapter aux conditions opératoires, ou à défaut d'interagir avec les autres espèces de l'écosystème pour s'y maintenir. La sécrétion de bactériocines par certaines espèces présentes dans l'écosystème de départ, notamment les bactéries lactiques, et qui empêcheraient l'implantation d'*E. coli* dans la culture, est une autre hypothèse qui a également été avancée. Des expérimentations supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer ces différentes hypothèses. Aussi, peut-être faudrait-il tester d'autres systèmes d'ensemencement comme incorporer la souche dans la culture avant même de commencer le mode continu et débiter par une période de batch pour qu'*E. coli* ait le temps d'interagir avec les espèces indigènes avant d'être lessivé. Une autre façon de l'ensemencer serait d'incorporer la souche en continu avec l'alimentation du réacteur.

Une autre expérimentation basée sur l'élimination spécifique des bactéries lactiques présentes dans l'écosystème pourrait également être envisagée. *E. coli* pourrait alors être injectée dans l'écosystème modifié afin de vérifier si la souche se maintient et interagit avec l'écosystème. Une des possibilités envisagées serait d'utiliser des phages spécifiques aux bactéries lactiques présentes dans le milieu avant d'injecter *E. coli*. Dans tous les cas, cette expérimentation apporterait des informations intéressantes sur le rôle des bactéries lactiques dans les cultures mixtes productrices d'hydrogène.

V.9 CONCLUSION SUR LA PERTURBATION BIOTIQUE DES CULTURES MIXTES PRODUCTRICES D'HYDROGENE

Les différentes études de ce chapitre ont permis d'évaluer l'effet de l'introduction d'un facteur biotique sur le métabolisme de plusieurs écosystèmes et avec des conditions opératoires différentes.

Les résultats en réacteur batch ont montré qu'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha* et *Pseudomonas fluorescens* sont capables d'interagir avec les microorganismes indigènes pour modifier le métabolisme global de l'écosystème et améliorer les performances de production d'hydrogène d'un facteur allant de 1,5 à 3,5. Les hypothèses permettant d'expliquer ces améliorations de performances varient en fonction des souches étudiées.

E. cloacae et *E. coli* sont deux souches anaérobies facultatives capables de produire de l'hydrogène à partir du glucose présent dans le milieu. Le volume d'hydrogène produit s'ajoute alors au volume produit par les bactéries productrices d'hydrogènes déjà présentes dans l'écosystème. De plus, ces deux organismes sont capables d'épuiser les traces d'oxygène éventuellement présentes dans le milieu et ainsi favoriser la production d'hydrogène par les espèces du genre *Clostridium*, particulièrement sensibles à la présence d'oxygène.

Dans le cas de l'ajout de *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia eutropha*, l'augmentation de la croissance et de la production d'hydrogène du consortium peut être rémanente et due à la sécrétion initiale dans le milieu d'une substance non encore identifiée qui ne permet cependant pas son maintien dans le milieu. Une autre hypothèse pourrait être que ces deux souches interagissent physiquement avec les espèces *Clostridium* de l'écosystème et orientent leur métabolisme vers la production d'acétate et de butyrate qui sont les deux voies liées à la production d'hydrogène.

Les résultats en batch ont également permis d'identifier *Enterococcus casseliflavus* et *Lactobacillus bulgaris* comme pouvant interagir avec l'écosystème. Néanmoins, l'ajout de ces deux espèces induit une diminution de la quantité maximale d'hydrogène produit. Cet effet négatif sur la production d'hydrogène est vraisemblablement lié à des phénomènes de compétition vis-à-vis du substrat ou d'amensalisme (diminution du pH en sécrétant du lactate ou sécrétion de bactériocines dans le milieu).

Dans tous les cas, l'établissement de telles interactions est fortement lié à des notions de carences en nutriments, avec la mise en valeur du rôle fondamental de la concentration en sulfate de fer. La limitation en sulfate de fer est suspectée comme étant le facteur déclenchant de l'ensemble des mécanismes menant aux différentes interactions de coopération entre microorganismes. La diversité de l'écosystème semble également influencer sur la nature des interactions observées. Un écosystème plus divers et placé dans des conditions favorables (supplémentation en fer) permet l'établissement d'interactions compétitives qui ne sont pas favorables à la production d'hydrogène. Ce phénomène n'est pas observé pour un écosystème plus simple placé dans les mêmes conditions.

L'ensemble des résultats en batch et ceux des premières études en chémostat ont permis d'identifier *E. Coli* comme une espèce minoritaire clé pouvant avoir un effet bénéfique sur la production d'hydrogène en mode continu. Néanmoins les essais d'injection de cette souche en chémostat n'ont pas été concluants ; la souche étant lessivée sans interagir avec l'écosystème. Ces essais ont permis cependant de montrer que le mode d'implantation des souches peut être un facteur primordial pour l'utilisation de facteur biotique en continue et devrait faire l'objet de futures recherches.

En conclusion, la nature exacte des interactions entre les divers microorganismes reste à être déterminée ainsi que les conditions qui favorisent ou non l'installation de telles interactions.

CHAPITRE VI. CONCLUSION – PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier le lien existant, au sein des écosystèmes microbiens fermentaires, entre la structure d'une communauté microbienne, les individus qui la composent et les fonctions macroscopiques qui leur sont associées.

Dans un premier temps, l'influence des communautés microbiennes sur les performances de production d'hydrogène par voie fermentaire a été étudiée. Pour ce faire, sept inocula ont été cultivés, dans les mêmes conditions opératoires, en mode continu à l'aide de chémostats. Ce mode de fonctionnement a permis de contrôler strictement le taux de croissance par le taux de dilution des microorganismes, et ainsi de simuler la survie d'une population bactérienne dans des conditions limitantes en nutriments (le sulfate de fer dans notre cas). Ainsi, à l'équilibre, sept écosystèmes producteurs d'hydrogène différents ont été obtenus. Les résultats ont montré que, quel que soit l'inoculum initial, et en dépit du principe d'exclusion compétitive, les communautés microbiennes obtenues à l'état d'équilibre ont été simplifiées et stabilisées de façon à obtenir une espèce bactérienne majoritaire et quelques minoritaires (au maximum quatre). De façon remarquable, *Clostridium pasteurianum* a été retrouvé comme espèce dominante de l'écosystème six fois sur sept. Seules la nature et la diversité des espèces minoritaires variaient d'un écosystème à l'autre. Parallèlement, les rendements de production d'hydrogène différaient de manière significative entre 1,3 and 2,3 mol H₂.mol⁻¹ glucose consommé, en relation avec la présence de ces bactéries de faible abondance. Alors que les espèces du genre *Bacillus* sp. et *Lactobacillus* sp. ont montré un effet négatif sur les rendements en hydrogène en détournant une part du potentiel hydrogène vers la production de lactate, la présence d'*Escherichia coli* tend à accroître le rendement en hydrogène en réorientant le réseau métabolique de l'écosystème vers la production d'acétate et de butyrate. Ces résultats ont permis de montrer que la production d'H₂ par voie fermentaire est clairement influencée par la composition de la communauté bactérienne. Parmi ces communautés microbiennes, les bactéries minoritaires agissent comme de véritables espèces-clés qui, malgré leur faible abondance, contrôlent le réseau métabolique global de l'écosystème.

Dans la seconde partie de ce travail, la structure des communautés microbiennes a été modifiée au cours du temps en modifiant les conditions opératoires, i.e. d'éléments limitant soit en sulfate de fer, soit en glucose. Cette étude a été réalisée à l'aide de deux chémostats

(F1 et F2) inoculés avec la même sortie de digesteur anaérobie et suivis en parallèles. Ce dispositif a permis d'obtenir à l'équilibre deux écosystèmes producteurs d'hydrogène avec une structure de communauté microbienne proche mais dont l'abondance relative des espèces constituant la communauté variait. Les résultats ont montré un effet important des concentrations en sulfate de fer et en glucose sur la structure des communautés des deux fermenteurs que ce soit aussi bien en termes de nature des espèces sélectionnées qu'en termes d'abondance relative de ces espèces dans les écosystèmes. De manière intéressante, malgré que les deux populations initiales étaient proches, les changements de conditions opératoires ont conduit à deux comportements totalement différents tant au niveau populationnel que fonctionnel. Ceci peut conduire à des situations semblables à ce qui a été observé lors de la levée de la limitation en sulfate de fer où dans un cas (F1) l'augmentation de la concentration en sulfate de fer a engendré une diminution des performances de production d'hydrogène et dans un autre cas (F2) c'est le phénomène inverse qui a été observé. La structure des communautés microbiennes présentes a donc une influence majeure sur l'effet des paramètres opératoires sur production d'hydrogène par voie fermentaire. Ceci peut expliquer l'absence de consensus quand il s'agit de déterminer l'optimum de certains paramètres comme la concentration en fer ou en substrat du milieu. De plus, les résultats de cette étude, ajoutés à ceux de l'étude précédente, suggèrent que la carence en microéléments (le sulfate de fer dans notre cas) influence plus les bactéries minoritaires ; alors que la carence en glucose influence plus les populations majoritaires en entraînant des changements rapides des bactéries dominantes.

La dernière étape de ce travail a mis en avant une phase proactive de modification de la structure d'une communauté microbienne productrice d'hydrogène à l'aide de certaines espèces exogènes afin de modifier la structure et les performances d'écosystèmes producteurs d'hydrogène. Les premières études se sont déroulées en mode batch et ont permis tester différentes espèces représentatives de la phylogénie et dont le métabolisme était en lien ou non avec l'hydrogène. Les résultats ont alors montré que plusieurs souches sont capables d'influer sur le métabolisme d'un écosystème fermentaire. Ainsi, l'ajout des souches *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha* et *Pseudomonas fluorescens* a eu un effet positif sur la production d'hydrogène en augmentant cette dernière d'un facteur compris entre 1,5 et 3,5. Dans l'ensemble, ces résultats ne peuvent pas être expliqués par de simples interactions trophiques et suggèrent la présence de mécanismes d'interactions de coopération entre microorganismes. Même si les expérimentations menées dans le cadre de

cette thèse ne permettent pas d'identifier de manière précise les mécanismes mis en jeu, plusieurs hypothèses, en fonction des bactéries impliquées, ont été avancées pour tenter d'expliquer l'amélioration des performances de production d'hydrogène.

E. cloaca et *E. coli* sont deux souches capables de produire de l'hydrogène par une voie métabolique que ne possèdent pas les bactéries du genre *Clostridium* : la voie formiate. Le volume d'hydrogène ainsi produit a pu s'ajouter au volume produit par les clostridies déjà présentes dans l'écosystème. De plus, ces deux souches sont anaérobies facultatives et possèdent un pouvoir réducteur leur permettant d'éliminer les traces d'oxygène du milieu ce qui bénéficiera aux *Clostridium* anaérobies strictes.

Pseudomonas fluorescens et *Ralstonia eutropha* ne sont pas retrouvées en concentrations suffisantes en fin de fermentation pour être retrouvées en CE-SSCP. L'augmentation de la production d'hydrogène du consortium peut alors être rémanente et due à la sécrétion initiale dans le milieu d'une substance non encore identifiée. Une autre hypothèse basée sur les travaux de Benomar *et al.* (en cours de soumission) pourrait être que *Ralstonia eutropha* et/ou *Pseudomonas fluorescens* interagissent physiquement avec les espèces *Clostridium* de l'écosystème et oriente leur métabolisme vers la production d'acétate et de butyrate qui sont les deux voies liées à la production d'hydrogène.

Deux espèces ayant une influence négative sur les performances de production d'hydrogène ont également pu être identifiées. *Enterococcus casseliflavus* et *Lactobacillus bulgaris* sont alors suspectées d'être des compétitrices des bactéries productrices d'hydrogène vis-à-vis du substrat. Elles peuvent également être amensales des clostridies en provoquant une diminution du pH par la sécrétion d'acide lactique ou directement en sécrétant des bactériocines dans le milieu.

La limitation en sulfate a été suspectée comme étant le facteur déclenchant de l'ensemble des mécanismes menant aux différentes interactions de coopération entre microorganismes. La diversité de l'écosystème semble également influencer sur la nature des interactions observées. En effet, un écosystème plus divers et placé dans des conditions favorables (supplémentation en fer) a permis l'établissement d'interactions compétitives qui ne sont finalement pas favorables à la production d'hydrogène. Ce phénomène n'a pas été observé pour un écosystème plus simple placé dans les mêmes conditions.

Les résultats des premières études en chémostats ajoutés à l'ensemble des résultats en batch ont permis d'identifier *E. Coli* comme une espèce minoritaire clé pouvant avoir un effet

bénéfique sur la production d'hydrogène en mode continu. Néanmoins les essais d'injection de cette souche en chémostats n'ont pas été concluants, la souche étant lessivée sans interagir avec l'écosystème. Ces essais suggèrent cependant que le mode d'implantation des souches peut être un facteur primordial pour l'utilisation de facteur biotique en réacteur continu.

L'ensemble des expérimentations de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence le lien entre la structure des communautés microbiennes et les fonctions macroscopiques associées dans le cadre des écosystèmes microbiens fermentaires. Ces conclusions vont à l'encontre de ce qui est habituellement observé en digestion anaérobie où la structure des communautés bactériennes change énormément sans que les performances ne soient radicalement modifiées (Fernández *et al.*, 1999 ; Zumstein *et al.*, 2000). Ceci peut notamment être expliqué par la différence de diversité entre les deux écosystèmes comme suggéré par Nielsen *et al.* (2011) lors d'une review sur le lien entre la biodiversité des sols et la fonction de recyclage du carbone. Les auteurs constatent que plus l'écosystème est divers et moins la fonction de recyclage du carbone est influencée par les perturbations extérieures (perturbations biotiques dans ce cas) et inversement.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, les principales perspectives de recherches qui pourraient être mises en œuvre à ce stade sont de plusieurs ordres.

- A court terme, des études devront être menées sur les conditions qui favorisent ou non l'établissement de ce type d'interaction en balayant différentes conditions opératoires. Le rôle de la carence en nutriments est une piste intéressante qui a été soulevée aux cours de cette thèse et qui devra faire l'objet d'une attention toute particulière.

- Le mode d'implantation des souches peut être un facteur primordial pour l'utilisation de facteur biotique en continue et devrait faire l'objet de futur recherches. Aussi, peut-être faudrait-il tester d'autres systèmes d'ensemencement comme incorporer la souche dans la culture en mode batch avant de commencer le mode continu. Une autre façon de l'ensemencer serait d'incorporer la souche en continu avec l'alimentation du réacteur.

- De nature relativement complexe, la nature exacte des différentes interactions mises en évidence lors de ce travail reste à être déterminée avec comme objectif ultime de définir une fonction métabolique à chaque organisme de la communauté. En toute vraisemblance, ceci

devra passer par deux types d'approche : (i) une approche ciblant la communauté dans son ensemble et utilisant des outils comme le bilan de matière, la thermodynamique, la métagénomique, la métatranscriptomique et la métaprotéomique. (ii) Cette approche globale devra être mêlée à une approche plus individuelle ciblant les microorganismes de manière spécifique à l'aide d'outils tels que l'isolement des souches et la caractérisation de leur métabolisme.

- L'accroissement des connaissances fondamentales devra nécessairement être couplé à l'élaboration de modèles théoriques du comportement d'une culture mixte productrice d'hydrogène. Ces modèles devront intégrer les modèles de réseaux d'interactions métaboliques et les modèles déterministes basées sur le bilan matière. De tels modèles intégratifs devraient permettre de simuler, de prévoir et de prédire le comportement des communautés microbiennes d'une culture mixte dans des milieux divers.

Le but ultime de cette démarche serait de mieux comprendre le fonctionnement d'une partie non négligeable de notre environnement, afin de mieux le contrôler et/ou le préserver.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd-Alla, M. H., Morsy, F. M., & El-Enany, A.-W. E. (2011) Hydrogen production from rotten dates by sequential three stages fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 13518–13527.
- Abo-Hashesh, M., Ghosh, D., Tourigny, A., Taous, A., & Hallenbeck, P. C. (2011) Single stage photofermentative hydrogen production from glucose: An attractive alternative to two stage photofermentation or co-culture approaches. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 13889–13895.
- Aceves, C. (2007) Modélisation, estimation et commande de procédés de digestion anaérobie en vue de l'optimisation de la production de biohydrogène.
- Aceves-Lara, C. A., Trably, E., Bastidas-Oyenadel, J.-R., Ramirez, I., Latrille, E., & Steyer, J.-P. (2008a) Bioenergy production from waste: examples of biomethane and biohydrogen. *Journal De La Société De Biologie*, **202**(3), 177–189.
- Aceves-Lara, C., Latrille, E., Buffiere, P., Bernet, N., & Steyer, J. (2008b) Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chemical Engineering And Processing*, **47**(11), 1968–1975.
- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., & Wijffels, R. H. (2002) Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11–12), 1195–1208.
- Akutsu, Y., Li, Y.-Y., Harada, H., & Yu, H.-Q. (2009) Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(6), 2558–2566.
- Amin, A. M., Croiset, E., & Epling, W. (2011) Review of methane catalytic cracking for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(4), 2904–2935.
- de Amorim, E., Sader, L., & Silva, E. (2012) Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**(5), 1248–1263.
- Andersch, I., Pianka, S., Fritze, D., & Claus, D. (1994) Description of *Bacillus Laevolacticus* (ex Nakayama and Yanoshi 1967) Sp. Nov., Nom. Rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**(4), 659–664.
- Andersch, W., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1983) Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium-acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **18**(6), 327–332.
- Angert, E. R. (2005) Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **3**(3), 214–224.

APHA, AWWA, & WPCF (1995) Standard Methods for the examination of water and wastewater. Trussell eds, Washington DC, USA, 19th edition.

Archer, D. & Kirsop, B. (1990) The microbiology and control of anaerobic digestion. *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*. Elsevier Science Publishing Ltd., London, England, 43–89.

Argun, H. & Kargi, F. (2011) Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(13), 7443–7459.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., & Oztekin, R. (2008) Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(7), 1813–1819.

Association Française de l'Hydrogène [online] <http://www.afh2.org/f/index.php> (Accessed April 24, 2012).

Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M. K., Bajpai, R., & Stahl, U. (2010) Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, **109**(2), 371–387.

Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., & Reid, G. (2008) The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(15), 4064–4073.

Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Ramirez, J., Ruiz-Filippi, G., & Bélafi-Bakó, K. (2012) *Escherichia coli* (XL1-BLUE) for continuous fermentation of bioH₂ and its separation by polyimide membrane. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(7), 5623–5630.

Ball, P. (2007) Bacteria may be wiring up the soil. *Nature*, **449**(7161), 388–388.

Barbarossa, V., Brutti, S., Diamanti, M., Sau, S., & De Maria, G. (2006) Catalytic thermal decomposition of sulphuric acid in sulphur-iodine cycle for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(7), 883–890.

Barros, A. R., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K., Maintinguer, S. I., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2011) Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, **102**(4), 3840–3847.

Bartacek, J., Zabranska, J., & Lens, P. N. L. (2007) Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **1**(3), 201–214.

Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., & Ghigo, J.-M. (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, **51**(3), 659–674.

Benomar, S., Cardenas, M. L., Trably, E., Rafrafi, Y., Hamelin, J., Steyer, J.-P., & Giudici-Ortoni, M.-T. (en cours de soumission) Improved hydrogen production by metabolic coupling in anaerobic mixed bacterial culture through cell-cell interaction. *PNAS*.

- Bergey, D. H., Holt, J. G., & Krieg, N. R. (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins.
- Bisaillon, A., Turcot, J., & Hallenbeck, P. C. (2006) The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(11), 1504–1508.
- Boke, H., Aslim, B., & Alp, G. (2010) The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Archives of Biological Sciences*, **62**(2), 323–328.
- Bonchosmolovskaya, E. & Stetter, K. (1991) Interspecies hydrogen transfer in cocultures of thermophilic archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, **14**(3), 205–208.
- Borrero, J., Jiméñez, J. J., Góñez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2011) Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, **156**(1), 76–86.
- Boudellal, M. (2007) *La pile à combustible : Structure, fonctionnement, applications*, Dunod.
- Bourriaud, C., Robins, R. J., Martin, L., Kozłowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C., & Michel, C. (2005) Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *Journal of Applied Microbiology*, **99**(1), 201–212.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P. J., & Friedrich, B. (2005) [NiFe]-Hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular Enzymes for Oxygen-Tolerant Biological Hydrogen Oxidation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **10**(2-4), 181–196.
- Burgos-Rubio, C. N., Okos, M. R., & Wankat, P. C. (2008) Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, **16**(3), 305–314.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006) Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(6), 3916–3923.
- Cai, G., Jin, B., Saint, C., & Monis, P. (2010a) Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(13), 6681–6690.
- Cai, G., Jin, B., Saint, C., & Monis, P. (2010b) Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(13), 6681–6690.
- Carere, C., Kalia, V., Sparling, R., Cicek, N., & Levin, D. (2008) Pyruvate catabolism and hydrogen synthesis pathway genes of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *INDIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*, **48**(2), 252–266.

- Carlozzi, P., Buccioni, A., Minieri, S., Pushparaj, B., Piccardi, R., Ena, A., & Pintucci, C. (2010) Production of bio-fuels (hydrogen and lipids) through a photofermentation process. *Bioresource Technology*, **101**(9), 3115–3120.
- Casadei, M. ., Ingram, R., Hitchings, E., Archer, J., & Gaze, J. . (2001) Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, **63**(1–2), 125–134.
- Casla, D., Requena, T., & Gomez, R. (1996) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: Characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**(1), 35–41.
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2009) Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(14), 5674–5682.
- Chader, S., Hacene, H., Belhamel, M., & Agathos, S. (2007) Etudes des procédés de production biologiques de l'hydrogène. *Revue des Energies Renouvelables*, **10**(4), 497–505.
- Chandra, R. & Mohan, S. V. (2011) Microalgal community and their growth conditions influence biohydrogen production during integration of dark-fermentation and photo-fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(19), 12211–12219.
- Chen, C. C. & Lin, C. Y. (2003) Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*, **7**(3), 695–699.
- Chen, C.-C., Lin, C.-Y., & Chang, J.-S. (2001) Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**(1-2), 56–64.
- Chen, S.-D., Lee, K.-S., Lo, Y.-C., Chen, W.-M., Wu, J.-F., Lin, C.-Y., & Chang, J.-S. (2008) Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(7), 1803–1812.
- Chen, W.-M., Tseng, Z.-J., Lee, K.-S., & Chang, J.-S. (2005) Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, **30**(10), 1063–1070.
- Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., & Zhang, D. (2006) Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(4), 539–549.
- Cheng, C.-H., Hung, C.-H., Lee, K.-S., Liao, P.-Y., Liang, C.-M., Yang, L.-H., Lin, P.-J., & Lin, C.-Y. (2008) Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(19), 5242–5249.
- Chowdhury, S. R., Basak, R. K., Sen, R., & Adhikari, B. (2011) Optimization, dynamics, and enhanced production of a free radical scavenging extracellular polysaccharide (EPS) from hydrodynamic sediment attached *Bacillus megaterium* RB-05. *Carbohydrate Polymers*, **86**(3), 1327–1335.

- Colin, T., Bories, A., Lavigne, C., & Moulin, G. (2001) Effects of Acetate and Butyrate During Glycerol Fermentation by *Clostridium butyricum*. *Current Microbiology*, **43**(4), 238–243.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J.-P., & Péringer, P. (2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(14), 1479–1485.
- Collet, C., Gaudard, O., Péringer, P., & Schwitzguébel, J.-P. (2005) Acetate production from lactose by *Clostridium thermolacticum* and hydrogen-scavenging microorganisms in continuous culture—Effect of hydrogen partial pressure. *Journal of Biotechnology*, **118**(3), 328–338.
- Cornelis, P. & Matthijs, S. (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology*, **4**(12), 787–798.
- Cornish, A. J., Gärtner, K., Yang, H., Peters, J. W., & Hegg, E. L. (2011) Mechanism of Proton Transfer in [FeFe]-Hydrogenase from *Clostridium Pasteurianum*. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(44), 38341–38347.
- Corrieu, G. & Luquet, F.-M. (2007) *Bactéries lactiques : De la génétique aux ferments*, Tec & Doc Lavoisier.
- Cramm, R. (2009) Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **16**(1-2), 38–52.
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P. P., & Szanislo, P. J. (1991) Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*, **130**(1), 179–198.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000) Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. *Journal of Bacteriology*, **182**(12), 3593–3596.
- Das, D. (2009) Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7349–7357.
- Das, D. & Veziroglu, T. N. (2008) Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(21), 6046–6057.
- Degeest, B., Janssens, B., & De Vuyst, L. (2001) Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0–1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology*, **91**(3), 470–477.
- Delbes, C., Moletta, R., & Godon, J. (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *Fems Microbiology Ecology*, **35**(1), 19–26.
- Demirbas, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, **33**(1), 1–18.

- Desai, R. P., Nielsen, L. K., & Papoutsakis, E. T. (1999) Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology*, **71**(1-3), 191–205.
- Dinamarca, C. & Bakke, R. (2012) Simultaneous hydrogen production and consumption in Anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Energy and Environment*, **3**(3), 323–332.
- Doi, T., Matsumoto, H., Abe, J., & Morita, S. (2009) Feasibility study on the application of rhizosphere microflora of rice for the biohydrogen production from wasted bread. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(4), 1735–1743.
- Dowaki, K., Ohta, T., Kasahara, Y., Kameyama, M., Sakawaki, K., & Mori, S. (2007) An economic and energy analysis on bio-hydrogen fuel using a gasification process. *Renewable Energy*, **32**(1), 80–94.
- Dubey, G. P. & Ben-Yehuda, S. (2011) Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. *Cell*, **144**(4), 590–600.
- Dumont, M. (2008) Apports de la modélisation des interactions pour une compréhension fonctionnelle d'un écosystème : application à des bactéries nitrifiantes en chémostat. [online] <http://www.sudoc.fr/132145375> (Accessed April 27, 2012).
- Dumont, M., Harmand, J., Rapaport, A., & Godon, J. (2009) Towards functional molecular fingerprints. *Environmental Microbiology*, **11**(7), 1717–1727.
- Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2004) Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(10), 5810–5817.
- Elsas, J. D., Jansson, J. K., & Trevors, J. T. (2006) *Modern soil microbiology*, CRC Press / Thomson Publishing.
- Epiney, A. S. (2010) Improvement of the decay heat removal characteristics of the generation iv gas-cooled fast reactor.
- Eriksen, N., Nielsen, T., & Iversen, N. (2008) Hydrogen production in anaerobic and microaerobic *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology Letters*, **30**(1), 103–109.
- Eroglu, E. & Melis, A. (2011) Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8403–8413.
- Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2001) Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**(4), 339–343.
- Evvyernie, D., Yamazaki, S., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2000) Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89**(6), 596–601.

- Fabiano, B. & Perego, P. (2002) Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(2), 149–156.
- Fang, H. H. P., Li, C., & Zhang, T. (2006) Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(6), 683–692.
- Fang, H. H. P. & Liu, H. (2002) Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, **82**(1), 87–93.
- Fang, H. H. P., Liu, H., & Zhang, T. (2002) Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, **78**(1), 44–52.
- Ferenci, T. (2001) Hungry bacteria – definition and properties of a nutritional state. *Environmental Microbiology*, **3**(10), 605–611.
- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., & Tiedje, J. (1999) How Stable Is Stable? Function Versus Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(8), 3697–3704.
- Fredrickson, A. G. (1977) Behavior of mixed cultures of microorganisms. *Annual Reviews in Microbiology*, **31**(1), 63–88.
- Friedrich, C. G., Bowien, B., & Friedrich, B. (1979) Formate and Oxalate Metabolism in *Alcaligenes Eutrophus*. *Journal of General Microbiology*, **115**(1), 185–192.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., & Nagai, S. (1990) Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(3), 719–723.
- Gadhamshetty, V., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., & Johnson, D. C. (2010) Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(2), 479–490.
- Gause, G. F. (1934) *The struggle for existence*, by G. F. Gause., Baltimore., The Williams & Wilkins company., [online] <http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/4489>.
- Gee, C. S., Pfeffer, J. T., & Suidan, M. T. (1990) Nitrosomonas and Nitrobacter Interactions in Biological Nitrification. *Journal of Environmental Engineering*, **116**(1), 4.
- 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*. *Bioresource Technology*, **101**(11), 4029–4033.
- George, H. A. & Chen, J.-S. (1983) Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*). *Applied and Environmental Microbiology*, **46**(2), 321–327.
- Giaconia, A., Grena, R., Lanchi, M., Liberatore, R., & Tarquini, P. (2007) Hydrogen/methanol production by sulfur-iodine thermochemical cycle powered by combined solar/fossil energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(4), 469–481.

- Giddings, T. & Staehlin, L. (1981) Observation of microplasmodesmata in both heterocyst-forming and non-heterocyst forming filamentous cyanobacteria by freeze-fracture electron-microscopy. *Archives of Microbiology*, **129**(4), 295–298.
- Ginkel, S. V., Sung, S., & Lay, J.-J. (2001) Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. *Environmental Science & Technology*, **35**(24), 4726–4730.
- Van Ginkel, S. & Logan, B. E. (2005a) Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. *Environmental Science & Technology*, **39**(23), 9351–9356.
- Van Ginkel, S. W. & Logan, B. (2005b) Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, **39**(16), 3819–3826.
- Giraffa, G., Bossi, M. G., & Fornasari, E. (1989) Bacteriocin production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, **7**(2).
- Givskov, M., Eberl, L., Møller, S., Poulsen, L. K., & Molin, S. (1994) Responses to Nutrient Starvation in *Pseudomonas Putida* KT2442: Analysis of General Cross-Protection, Cell Shape, and Macromolecular Content. *Journal of Bacteriology*, **176**(1), 7–14.
- Goh, E.-B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M. G., & Davies, J. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(26), 17025–17030.
- Golden, J. W. & Yoon, H.-S. (2003) Heterocyst development in *Anabaena*. *Current Opinion in Microbiology*, **6**(6), 557–563.
- Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M. E., Escapa, A., & Morán, A. (2011) Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8621–8627.
- Gordon, D. M. & O'Brien, C. L. (2006) Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* RID C-9298-2009. *Microbiology-Sgm*, **152**, 3239–3244.
- Gossner, A., Devereux, R., Ohnemüller, N., Acker, G., Stackebrandt, E., & Drake, H. (1999) *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., Isolated from Oxidic Soil, a Fermentative Microaerophile That Grows Commensally with the Thermophilic Acetogen *Moorella thermoacetica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(11), 5124–5133.
- Gossner, A., Kusel, K., Schulz, D., Trenz, S., Acker, G., Lovell, C., & Drake, H. (2006) Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Juncus roemerianus*. *Microbiology-Sgm*, **152**, 1209–1219.
- Gottschalk, G. (1985) *Bacterial Metabolism*, Springer.
- de Graaf, F. K., Tieze, G. A., Wendelaar Bonga, S., & Stouthamer, A. H. (1968) Purification and genetic determination of bacteriocin production in *Enterobacter cloacae*. *Journal of bacteriology*, **95**(2).

- Guo, L., Li, X.-M., Bo, X., Yang, Q., Zeng, G.-M., Liao, D., & Liu, J.-J. (2008) Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource Technology*, **99**(9), 3651–3658.
- Guo, X. M., Latrille, E., Trably, E., Carrere, H., & Steyer, J.-P. (en cours de soumission) Substrate mapping by PLS regression analysis and prediction of biological hydrogen potential tests from solid organic waste. *Waste Management*.
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J.-P. (2010) Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10660–10673.
- Habouzit, F. (2010) Rôle des matériaux-supports sur la mise en place du biofilm : application au démarrage d'un procédé de méthanisation. [online] <http://www.theses.fr/2010MON20234> (Accessed May 9, 2012).
- Hall, T. A. (1999) "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" in *Nucleic acids symposium series.*, 95–98.
- Hallenbeck, P. C. & Benemann, J. R. (2002) Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1185–1193.
- Hansen, S. & Hubbell, S. (1980) Single-nutrient microbial competition: qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes. *Science*, **207**(4438), 1491–1493.
- Hatayama, K., Shoun, H., Ueda, Y., & Nakamura, A. (2006) *Tuberibacillus Calidus* Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated from a Compost Pile and Reclassification of *Bacillus Naganoensis* Tomimura Et Al. 1990 as *Pullulanibacillus Naganoensis* Gen. Nov., Comb. Nov. and *Bacillus Laevolacticus* Andersch Et Al. 1994 as *Sporolactobacillus Laevolacticus* Comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(11), 2545–2551.
- Hattori, S. (2008) Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*, **23**(2), 118–127.
- Hawkes, F., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007) Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(2), 172–184.
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002) Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1339–1347.
- Hetland, J. & Mulder, G. (2007) In search of a sustainable hydrogen economy: How a large-scale transition to hydrogen may affect the primary energy demand and greenhouse gas emissions. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(6), 736–747.
- Hiligsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., Beckers, L., & Thonart, P. (2011) Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, **102**(4), 3810–3818.

- Hung, C.-H., Chang, Y.-T., & Chang, Y.-J. (2011a) Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8437–8444.
- Hung, C.-H., Cheng, C.-H., Guan, D.-W., Wang, S.-T., Hsu, S.-C., Liang, C.-M., & Lin, C.-Y. (2011b) Interactions between Clostridium sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8704–8711.
- Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., & Kim, I. S. (2004) Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, **111**(3), 297–309.
- Ionesco, H. & Bouanchaud, D. H. (1973) Bacteriocin production linked to the presence of a plasmid, in Clostridium perfringens, type A. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, **276**(20).
- Ishikawa, M., Yamamura, S., Takamura, Y., Sode, K., Tamiya, E., & Tomiyama, M. (2006) Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(11), 1484–1489.
- Islam, R., Cicek, N., Sparling, R., & Levin, D. (2006) Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by Clostridium thermocellum 27405. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**(3), 576–583.
- Jain, M. K. & Zeikus, J. G. (1988) Taxonomic Distinction of Two New Protein Specific, Hydrolytic Anaerobes: Isolation and Characterization of Clostridium proteolyticum sp. nov. and Clostridium collagenovorans sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **10**(2), 134–141.
- Ji, C., Wang, S., & Zhang, B. (2010) Effect of spark timing on the performance of a hybrid hydrogen-gasoline engine at lean conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(5), 2203–2212.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., Choe, W.-S., & Park, J. M. (2008a) Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by Enterobacter aerogenes using statistical methods. *Bioresource Technology*, **99**(6), 2061–2066.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008b) Biological hydrogen production by immobilized cells of Clostridium tyrobutyricum JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, **99**(14), 6666–6672.
- Johnson, M. R., Connors, S. B., Montero, C. I., Chou, C. J., Shockley, K. R., & Kelly, R. M. (2006) The Thermotoga maritima Phenotype Is Impacted by Syntrophic Interaction with Methanococcus jannaschii in Hyperthermophilic Coculture. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(1), 811–818.
- Joint, I., Tait, K., Callow, M. E., Callow, J. A., Milton, D., Williams, P., & Cámara, M. (2002) Cell-to-Cell Communication Across the Prokaryote-Eukaryote Boundary. *Science*, **298**(5596), 1207.

- Jørgensen, F., Nybroe, O., & Knøchel, S. (1994) Effects of starvation and osmotic stress on viability and heat resistance of *Pseudomonas fluorescens* AH9. *Journal of Applied Microbiology*, **77**(3), 340–347.
- Juhas, M., Van Der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**(2), 376–393.
- Kalia, V. & Purohit, H. (2008) Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**(5), 403–419.
- Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Omori, Y., Fukui, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2005) Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biotechnology*, **116**(3), 271–282.
- Kapdan, I. K. & Kargi, F. (2006) Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**(5), 569–582.
- Karadag, D. & Puhakka, J. A. (2010a) Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(20), 10954–10959.
- Karadag, D. & Puhakka, J. A. (2010b) Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(16), 8554–8560.
- Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., & Furukawa, K. (2005) Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**(5), 524–530.
- Khanal, S. K., Chen, W.-H. W.-H., Li, L., & Sung, S. (2004) Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(11), 1123–1131.
- Kim, D.-H., Han, S.-K., Kim, S.-H., & Shin, H.-S. (2006a) Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(15), 2158–2169.
- Kim, I. S., Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H. S. H., & Lee, S. T. (2004) Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(11), 1133–1140.
- Kim, S., Seol, E., Oh, Y.-K., Wang, G. Y., & Park, S. (2009) Hydrogen production and metabolic flux analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7417–7427.
- Kim, S.-H., Han, S.-K., & Shin, H.-S. (2006b) Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, **41**(1), 199–207.

- Kim, S.-H. & Shin, H.-S. (2008) Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(19), 5266–5274.
- Koskinen, P. E. P., Lay, C., Puhakka, J. A., Lin, P., Wu, S., Örlygsson, J., & Lin, C. (2008) High-efficiency hydrogen production by an anaerobic, thermophilic enrichment culture from an Icelandic hot spring. *Biotechnology and Bioengineering*, **101**(4), 665–678.
- Kouakou, P., Dortu, C., Dubois-Dauphin, R., Vandenberg, M., & Thonart, P. (2010) Plasmid-associated bacteriocin production by *Lactobacillus* LMG21688 suppresses *Listeria monocytogenes* growth rebound in a food system. *FEMS Microbiology Letters*, **306**(1), 37–44.
- Kuhner, C. H., Matthies, C., Acker, G., Schmittroth, M., Gvdssner, A. S., & Drake, H. L. (2000) *Clostridium Akagii* Sp. Nov. and *Clostridium Acidisoli* Sp. Nov.: Acid-Tolerant, N₂-Fixing Clostridia Isolated from Acidic Forest Soil and Litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**(2), 873–881.
- Kumar, N. & Das, D. (2001) Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme and Microbial Technology*, **29**(4-5), 280–287.
- Kumar, N. & Das, D. (2000) Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, **35**(6), 589–593.
- Lang, Y., Arnepalli, R. R., & Tiwari, A. (2012) A Review on Hydrogen Production: Methods, Materials and Nanotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **11**(5), 3719–3739.
- Latrille, E., Trably, E., & Larroche, C. (2011) Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. *Techniques de l'Ingénieur*.
- Lay, C. H., Chen, C. C., Lin, H. C., Lin, C. Y., Lee, C. W., & Lin, C. Y. (2010a) Optimal pH and substrate concentration for fermentative hydrogen production from preserved fruits soaking solution. *Journal of Environmental Engineering and Management*, **20**(1), 35–41.
- Lay, C.-H., Wu, J.-H., Hsiao, C.-L., Chang, J.-J., Chen, C.-C., & Lin, C.-Y. (2010b) Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(24), 13445–13451.
- Lay, J. J. (2000) Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(3), 269–78.
- Lay, J.-J., Fan, K.-S., Chang, J.-J., & Ku, C.-H. (2003) Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, **28**(12), 1361–1367.
- Lee, K.-S., Hsu, Y.-F., Lo, Y.-C., Lin, P.-J., Lin, C.-Y., & Chang, J.-S. (2008) Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1565–1572.

- Lee, S.-H. A., Zhao, Y., Hernandez-Pagan, E. A., Blasdel, L., Youngblood, W. J., & Mallouk, T. E. (2012) Electron transfer kinetics in water splitting dye-sensitized solar cells based on core-shell oxide electrodes. *Faraday Discussions*, **155**, 165.
- Lee, Y. J., Miyahara, T., & Noike, T. (2001) Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, **80**(3), 227–231.
- Lessing, P. A. (2007) Materials for hydrogen generation via water electrolysis. *Journal of Materials Science*, **42**(10), 3477–3487.
- Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., & Sparling, R. (2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(11), 1496–1503.
- Levin, D., Lawrence, P., & Murray, L. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(2), 173–185.
- Li, C. & Fang, H. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, **37**(1), 1–39.
- Li, J., Ren, N., Li, B., Qin, Z., & He, J. (2008) Anaerobic biohydrogen production from monosaccharides by a mixed microbial community culture. *Bioresource Technology*, **99**(14), 6528–6537.
- Liang, T.-M., Cheng, S.-S., & Wu, K.-L. (2002) Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1157–1165.
- Lin, C. . & Lay, C. . (2004a) Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(1), 41–45.
- Lin, C. & Lay, C. (2004b) Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY*, **29**(3), 275–281.
- Lin, C. Y. & Lay, C. H. (2005) A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **30**(3), 285–292.
- Lin, C.-Y. & Chang, R.-C. (2004) Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**(7), 715–720.
- Lin, C.-Y. & Chang, R.-C. (1999) Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **74**(6), 498–500.
- Lin, C.-Y., Lay, C.-H., Sen, B., Chu, C.-Y., Kumar, G., Chen, C.-C., & Chang, J.-S. (2012) Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, (0). [online] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319912004363> (Accessed May 8, 2012).

- Lin, C.-Y., Wu, S.-Y., Lin, P.-J., Chang, J.-S., Hung, C.-H., Lee, K.-S., Lay, C.-H., Chu, C.-Y., Cheng, C.-H., Chang, A. C., Wu, J.-H., Chang, F.-Y., Yang, L.-H., Lee, C.-W., & Lin, Y.-C. (2011a) A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8758–8764.
- Lin, P.-J., Chang, J.-S., Yang, L.-H., Lin, C.-Y., Wu, S.-Y., & Lee, K.-S. (2011b) Enhancing the performance of pilot-scale fermentative hydrogen production by proper combinations of HRT and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 14289–14294.
- Liu, D., Liu, D., Zeng, R. J., & Angelidaki, I. (2006) Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research*, **40**(11), 2230–2236.
- Liu, I.-C., Whang, L.-M., Ren, W.-J., & Lin, P.-Y. (2011a) The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(1), 439–449.
- Liu, X., Gong, C., & Jiang, X. (2011b) Inhibitory effects of enterococci on the production of hydrogen sulfide by hydrogen sulfide-producing bacteria in raw meat. *Journal of Applied Microbiology*, **111**(1), 83–92.
- Liu, Y., Yu, P., Song, X., & Qu, Y. (2008) Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(12), 2927–2933.
- Lo, Y.-C., Chen, C.-Y., Lee, C.-M., & Chang, J.-S. (2011) Photo fermentative hydrogen production using dominant components (acetate, lactate, and butyrate) in dark fermentation effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 14059–14068.
- Lo, Y.-C., Chen, W.-M., Hung, C.-H., Chen, S.-D., & Chang, J.-S. (2008) Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*, **42**(4-5), 827–842.
- Lu, Y., Lai, Q., Zhang, C., Zhao, H., Ma, K., Zhao, X., Chen, H., Liu, D., & Xing, X.-H. (2009a) Characteristics of hydrogen and methane production from cornstalks by an augmented two- or three-stage anaerobic fermentation process. *Bioresource Technology*, **100**(12), 2889–2895.
- Lu, Y., Zhao, H., Zhang, C., Lai, Q., & Xing, X.-H. (2009b) Perturbation of formate pathway for hydrogen production by expressions of formate hydrogen lyase and its transcriptional activator in wild *Enterobacter aerogenes* and its mutants. *International Journal of Hydrogen Energy*. [online] <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V3F-4W84GRN-3/2/6b479d37c7eac64c91eb7daee3726e56> (Accessed May 18, 2009).
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., & Zhou, Q. (2010) Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource Technology*, **101**(3), 959–964.

- Luo, Y., Zhang, H., Salerno, M., Logan, B. E., & Bruns, M. A. (2008) Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(22), 6566–6576.
- M.S. Casper (Ed) (1978) *Hydrogen Manufacture by Electrolysis, Thermal Decomposition and Unusual Techniques*, Knowledge Pubns.
- Maddy, J., Cherryman, S., Hawkes, F., Hawkes, D., Dinsdale, R., Guwy, A., Premier, G., & Cole, S. (2003) Hydrogen 2003 Report number 1 : ERDF part-funded project entitled: “A sustainable energy supply for Wales: towards the hydrogen economy.” *University of Glamorgan*.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009) *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson/Benjamin Cummings.
- Maintinguer, S. I., Fernandes, B. S., Duarte, I. C. S., Saavedra, N. K., Adorno, M. A. T., & Varesche, M. B. (2008) Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(16), 4309–4317.
- Mandal, B., Nath, K., & Das, D. (2006) Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, **28**(11), 831–835.
- Manish, S. & Banerjee, R. (2008) Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(1), 279–286.
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., & Steinmetz, H. (2011) Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(17), 10690–10700.
- Mariakakis, I., Krampe, J., & Steinmetz, H. (2012) Effect of pH control strategies and substrate concentration on the hydrogen yield from fermentative hydrogen production in large laboratory-scale. *Water Science & Technology*, **65**(2), 262.
- Marvasi, M., Visscher, P. T., & Casillas Martinez, L. (2010) Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis* : polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, **313**(1), 1–9.
- McDougald, D., Gong, L., Srinivasan, S., Hild, E., Thompson, L., Takayama, K., Rice, S., & Kjelleberg, S. (2002) Defences against oxidative stress during starvation in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**(1), 3–13.
- Melis, A. & Melnicki, M. R. (2006) Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(11), 1563–1573.
- Mende, S., Krzyzanowski, L., Weber, J., Jaros, D., & Rohm, H. (2012) Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**(2), 185–191.

- Miambi, E., Guyot, J.-P., & Ampe, F. (2003) Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, **82**(2), 111–120.
- Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-lamothe, L., & Cauquil, L. (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*, **9**(5), 1359–1363.
- Midilli, A., Dogru, M., Akay, G., & Howarth, C. (2002) Hydrogen production from sewage sludge via a fixed bed gasifier product gas. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(10), 1035–1041.
- Mohammadi, P., Ibrahim, S., Annuar, M. S. M., Ghafari, S., Vikineswary, S., & Zinatizadeh, A. A. (2011) Influences of environmental and operational factors on dark fermentative hydrogen production from wastes: a review. *World Applied Sciences Journal*, **13**(2), 188–199.
- Moletta, R. (2008) *La méthanisation*, Tec & Doc Lavoisier.
- Mondragón-Bernal, O., Horita, J., Costa, F., & Maugeri, F. (2007) Lactobacillus rhamnosus exopolysaccharides (EPS) production and growth in soybeans water extract synbiotic beverage. *Journal of Biotechnology*, **131**(2, Supplement), S180–S181.
- Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., & Wright, G. D. (2012) Mechanism and Diversity of the Erythromycin Esterase Family of Enzymes. *Biochemistry*, **51**(8), 1740–1751.
- Mu, Y., Zheng, X.-J., & Yu, H.-Q. (2009) Determining optimum conditions for hydrogen production from glucose by an anaerobic culture using response surface methodology (RSM). *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(19), 7959–7963.
- Mu, Y., Zheng, X.-J., Yu, H.-Q., & Zhu, R.-F. (2006) Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(6), 780–785.
- Müller, S., Bley, T., & Babel, W. (1999) Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. *Journal of Biotechnology*, **75**(2–3), 81–97.
- Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nennering, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E., & Adams, D. G. (2008) Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *EMBO J*, **27**(9), 1299–1308.
- Muñoz-Tamayo, R., Laroche, B., Walter, É., Doré, J., Duncan, S. H., Flint, H. J., & Leclerc, M. (2011) Kinetic modelling of lactate utilization and butyrate production by key human colonic bacterial species. *FEMS Microbiology Ecology*, **76**(3), 615–624.
- Muralidharan, V., Rinker, K. D., Hirsh, I. S., Bouwer, E. J., & Kelly, R. M. (1997) Hydrogen transfer between methanogens and fermentative heterotrophs in hyperthermophilic cocultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**(3), 268–278.

- Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., & Nishio, N. (2002) Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1399–1405.
- Nandi, R. & Sengupta, S. (1998) Microbial production of hydrogen: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*, **24**(1), 61–84.
- Neidhardt, F. C. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM Press.
- Nicolet, Y., Cavazza, C., & Fontecilla-Camps, J. C. (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **91**(1), 1–8.
- van Niel, E. W. J., Budde, M. A. W., de Haas, G. G., van der Wal, F. J., Claassen, P. A. ., & Stams, A. J. M. (2002) Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1391–1398.
- Nielsen, L. P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P. B., & Sayama, M. (2010) Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature*, **463**(7284), 1071–1074.
- Nielsen, U. N., Ayres, E., Wall, D. H., & Bardgett, R. D. (2011) Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships. *European Journal of Soil Science*, **62**(1), 105–116.
- Nissilä, M. E., Tähti, H. P., Rintala, J. A., & Puhakka, J. A. (2011) Effects of heat treatment on hydrogen production potential and microbial community of thermophilic compost enrichment cultures. *Bioresource Technology*, **102**(6), 4501–4506.
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002) Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1367–1371.
- Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008) Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(4), 1153–1163.
- O'Brien, J. E., McKellar, M. G., Harvego, E. A., & Stoots, C. M. (2010) High-temperature electrolysis for large-scale hydrogen and syngas production from nuclear energy - summary of system simulation and economic analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(10), 4808–4819.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, **54**(1), 49–79.
- Odum, E. (1953) *Fundamentals of ecology.*, Philadelphia, Saunders.
- Oh, Y.-K., Kim, H.-J., Park, S., Kim, M.-S., & Ryu, D. D. Y. (2008) Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1471–1482.

- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2008) Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(4), 1204–1214.
- Pan, C. M., Fan, Y. T., Xing, Y., Hou, H. W., & Zhang, M. L. (2008a) Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. *Fanp2. Bioresource Technology*, **99**(8), 3146–3154.
- Pan, C.-M., Fan, Y.-T., Zhao, P., & Hou, H.-W. (2008b) Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5383–5391.
- Patel, S. K. S., Purohit, H. J., & Kalia, V. C. (2010) Dark fermentative hydrogen production by defined mixed microbial cultures immobilized on ligno-cellulosic waste materials. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(19), 10674–10681.
- Podestá, J. J., Gutiérrez-Navarro, A. M., Estrella, C. N., & Estes, M. A. (1997) Electrochemical measurement of trace concentrations of biological hydrogen produced by Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, **148**(1), 87–93.
- Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., Purohit, H. J., Sharma, R., Singh Patel, S. K., & Kalia, V. C. (2008) Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, **99**(13), 5444–5451.
- Prasertsan, P., O-Thong, S., & Birkeland, N.-K. (2009) Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(17), 7448–7459.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Benomar, S., Guidici-Ortoni, M.-T., Latrille, E., Steyer, J.-P., & Trably, E. (2011a) Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-culture dark fermentation of mono-, di- and tri-saccharides. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(18), 11654–11665.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.-P., & Trably, E. (2010) Development and application of a functional CE-SSCP fingerprinting method based on [Fe-Fe]-hydrogenase genes for monitoring hydrogen-producing *Clostridium* in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(24), 13158–13167.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.-P., & Trably, E. (2011b) Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(6), 3870–3879.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.*

- Rachman, M. A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., & Nishio, N. (1997) Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **83**(4), 358–363.
- Rapport enea consulting (2011) *Application des systèmes hydrogène pour les besoins du développement à horizon 2020-2025*,
- Reiss, J., Bridle, J. R., Montoya, J. M., & Woodward, G. (2009) Emerging horizons in biodiversity and ecosystem functioning research. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**(9), 505–514.
- Ren, N. Q., Chua, H., Chan, S. Y., Tsang, Y. F., Wang, Y. J., & Sin, N. (2007a) Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Technology*, **98**(9), 1774–1780.
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B. E., Zhao, L., Xie, T., & Zhao, X. (2007b) Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, **9**(5), 1112–1125.
- Ren, N.-Q., Guo, W.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Liu, B.-F., Wang, X.-Z., Ding, J., & Chen, Z.-B. (2008) Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(16), 4318–4324.
- Riis, T., Hagen, E., Vie, P. J. S., & Ulleberg, U. (2006) Hydrogen Production—Gaps and Priorities. *IEA Hydrogen Implementing Agreement (IEA, Paris, 2005)*.
- Rodriguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J., & van Loosdrecht, M. (2006) Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, **93**(3), 592–606.
- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011) Antibiotics as Signal Molecules. *Chem. Rev.*, **111**(9), 5492–5505.
- Sabia, C., Messi, P., De Niederhäusern, S., Manicardi, G., & Bondi, M. (2004) Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Ent. faecalis*. *Letters in Applied Microbiology*, **38**(2), 99–105.
- Sabia, C., de Niederhäusern, S., Messi, P., Manicardi, G., & Bondi, M. (2003) Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (“cacciatore”). *International Journal of Food Microbiology*, **87**(1–2), 173–179.
- Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K., & Soucaille, P. (2001) Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures. *Journal of Bacteriology*, **183**(5), 1748–1754.
- Saraphirom, P. & Reungsang, A. (2011) Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(14), 8765–8773.

- Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Locatelli, E., Di Gioia, D., Oggero, R., & Matteuzzi, D. (2011) Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *Bmc Microbiology*, **11**.
- Selim, S., Martin-Laurent, F., Rouard, N., Gianinazzi, S., & van Tuinen, D. (2007) Impact of a new biopesticide produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 on the genetic structure and density of soil bacterial communities. *Pest Management Science*, **63**(3), 269–275.
- Seppälä, J. J., Puhakka, J. A., Yli-Harja, O., Karp, M. T., & Santala, V. (2011) Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(17), 10701–10708.
- Shin, J.-H., Hyun Yoon, J., Eun Kyoung Ahn, Kim, M.-S., Jun Sim, S., & Park, T. H. (2007) Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(2), 192–199.
- Simpson, E. H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, **163**(4148), 688–688.
- Smee, D. (2010) Species with a Large Impact on Community Structure. *Nature Education Knowledge*, **1**(8), 18.
- Sockett, R. E. & Lambert, C. (2004) *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology*, **2**(8), 669–675.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., & Reeves, P. R. (1996) Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology*, **178**(16), 4885–4893.
- Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2010) Direct Exchange of Electrons Within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria. *Science*, **330**(6009), 1413–1415.
- Sun, Q., Xiao, W., Xi, D., Shi, J., Yan, X., & Zhou, Z. (2010) Statistical optimization of biohydrogen production from sucrose by a co-culture of *Clostridium acidisoli* and *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(9), 4076–4084.
- Taguchi, F., Yamada, K., Hasegawa, K., Taki-Saito, T., & Hara, K. (1996) Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**(1), 80–83.
- Tancredi, C. (1992) Role of human microflora in health and disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **11**(11), 1012–1015.
- Tanisho, S. & Ishiwata, Y. (1995) Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *International Journal of Hydrogen Energy*, **20**(7), 541–545.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, **22**(22), 4673.

- Touati, D. (2000) Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **373**(1), 1–6.
- Turcot, J., Bisailon, A., & Hallenbeck, P. C. (2008) Hydrogen production by continuous cultures of *Escherchia coli* under different nutrient regimes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1465–1470.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2001) Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**(4), 397–400.
- Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., & Morimoto, M. (1995) Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **79**(4), 395–397.
- Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2006) Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Applied Microbiology*, **101**(2), 331–343.
- Upreti, G. & Hinsdill, R. (1975) Production and mode of action of lactocin 27 - bacteriocin from a homofermentative lactobacillus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **7**(2), 139–145.
- Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H. M. (2009) Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13**(5), 1000–1013.
- Varga, J. J. (2006) The Role of CcpA in Regulating the Carbon-Starvation Response of *Clostridium perfringens*. [online] <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-11272006-133747/> (Accessed May 12, 2012).
- Vignais, P. M. & Billoud, B. (2007) Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chem. Rev.*, **107**(10), 4206–4272.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1996) Structure of the [NiFe] Hydrogenase Active Site: Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**(51), 12989–12996.
- Wang, A., Gao, L., Ren, N., Xu, J., & Liu, C. (2009) Bio-hydrogen production from cellulose by sequential co-culture of cellulosic hydrogen bacteria of *Enterococcus gallinarum* G1 and *Ethanoigenens harbinense* B49. *Biotechnology Letters*, **31**(9), 1321–1326.
- Wang, J. & Wan, W. (2008a) Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(12), 2934–2941.
- Wang, J. & Wan, W. (2008b) Effect of Fe²⁺ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(4), 1215–1220.
- Wang, J. & Wan, W. (2008c) Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(20), 5392–5397.

- Wang, J. & Wan, W. (2009a) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(2), 799–811.
- Wang, J. & Wan, W. (2009b) Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(8), 3313–3323.
- Wang, J. & Wan, W. (2008d) The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Science in China Series B: Chemistry*, **51**(11), 1110–1117.
- Wang, X. J., Ren, N. Q., Sheng Xiang, W., & Qian Guo, W. (2007) Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**(6), 748–754.
- Wang, X. & Zhao, Y. (2009) A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(1), 245–254.
- Willey, J. M. (2007) *Prescott's Microbiology*, McGraw-Hill.
- Woodward, J., Orr, M., Cordray, K., & Greenbaum, E. (2000) Biotechnology: Enzymatic production of biohydrogen. *Nature*, **405**(6790), 1014–1015.
- Xing, D., Ren, N., Gong, M., Li, J., & Li, Q. (2005) Monitoring of microbial community structure and succession in the biohydrogen production reactor by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Science in China Series C: Life Sciences*, **48**(2), 155–162.
- Xing, D., Ren, N., Wang, A., Li, Q., Feng, Y., & Ma, F. (2008) Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(5), 1489–1495.
- Yang, H. & Shen, J. (2006) Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(15), 2137–2146.
- Yim, G., Wang, H. H., & Davies, J. (2007) Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **362**(1483), 1195–1200.
- Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., & Hayashi, S. (2002) Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy*, **22**(5), 389–395.
- Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (1995) Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**(6), 571–574.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (1998) H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, **20**(2), 143–147.

- Yokoyama, H., Ohmori, H., Waki, M., Ogino, A., & Tanaka, Y. (2009) Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **107**(1), 64–66.
- Yoshida, T., Ellner, S. P., Jones, L. E., Bohannon, B. J. M., Lenski, R. E., & Hairston, N. G. (2007) Cryptic Population Dynamics: Rapid Evolution Masks Trophic Interactions. *PLoS Biol*, **5**(9), e235.
- Zeidan, A. A. & van Niel, E. W. J. (2010) A quantitative analysis of hydrogen production efficiency of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor owensensis* OLT. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**(3), 1128–1137.
- Zengler, K. & Palsson, B. O. (2012) A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nature Reviews Microbiology*, **10**(5), 366–372.
- Zhang, C., Lv, F.-X., & Xing, X.-H. (2011) Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, **102**(18), 8344–8349.
- Zhang, H., Bruns, M. A., & Logan, B. E. (2006a) Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research*, **40**(4), 728–734.
- Zhang, W., Zuo, J.-E., Cui, L.-T., Xing, W., & Yang, Y. (2006b) Continuous bio-hydrogen production by mesophilic and thermophilic cultures. *Huan jing ke xue = Huanjing kexue / [bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui “Huan jing ke xue” bian ji wei yuan hui.]*, **27**(1).
- Zhang, Y. & Shen, J. (2006) Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(4), 441–446.
- Zhang, Z.-P., Show, K.-Y., Tay, J.-H., Liang, D. T., Lee, D.-J., & Jiang, W.-J. (2006c) Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, **41**(10), 2118–2123.
- Zhu, H. & Béland, M. (2006) Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**(14), 1980–1988.
- Zhu, H., Gonzalez, R., & Bobik, T. A. (2011) Coproduction of Acetaldehyde and Hydrogen During Glucose Fermentation by *Escherichia Coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(18), 6441–6450.
- Zoetemeyer, R. J., van den Heuvel, J. C., & Cohen, A. (1982) pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. *Water Research*, **16**(3), 303–311.
- Zumstein, E., Moletta, R., & Godon, J. (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, **2**(1), 69–78.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Evolution de la structure au cours du temps des communautés microbiennes des sept inocula utilisés dans le chapitre III

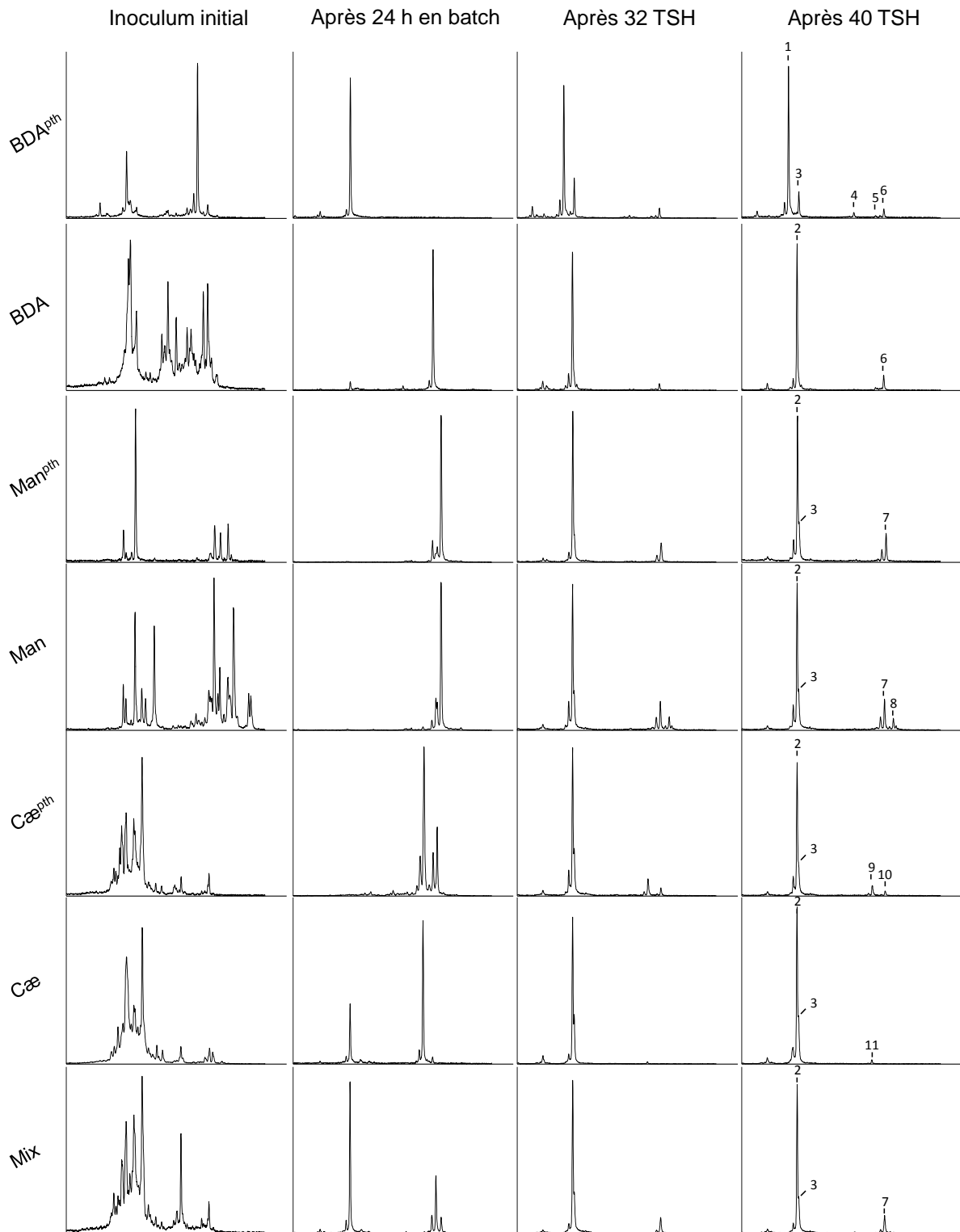
Annexe II : Cinétiques de production d'hydrogène des différents mélanges souche pure / Eco A.

Annexe III : Cinétiques de production d'hydrogène des différents mélanges souche pure / Eco A.

Annexe IV : Cinétiques de production d'hydrogène des différents mélanges souche pure / Eco C.

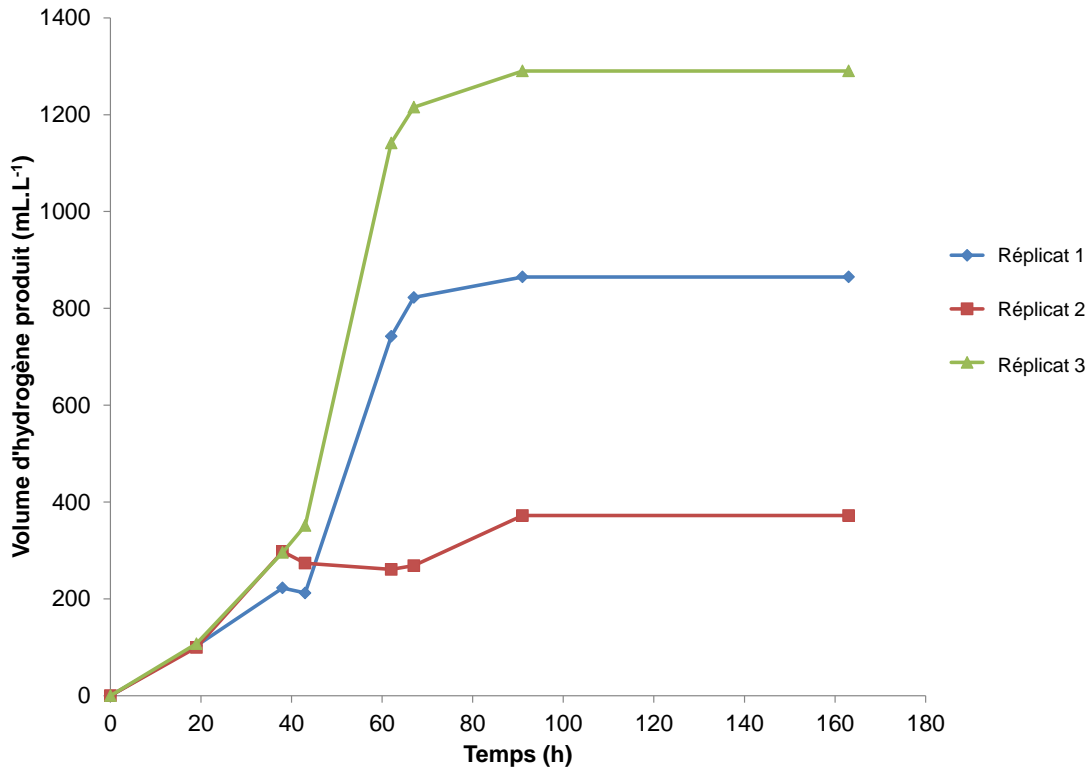
Annexe I :

Evolution de la structure au cours du temps des communautés microbiennes des sept inocula utilisés dans le chapitre III

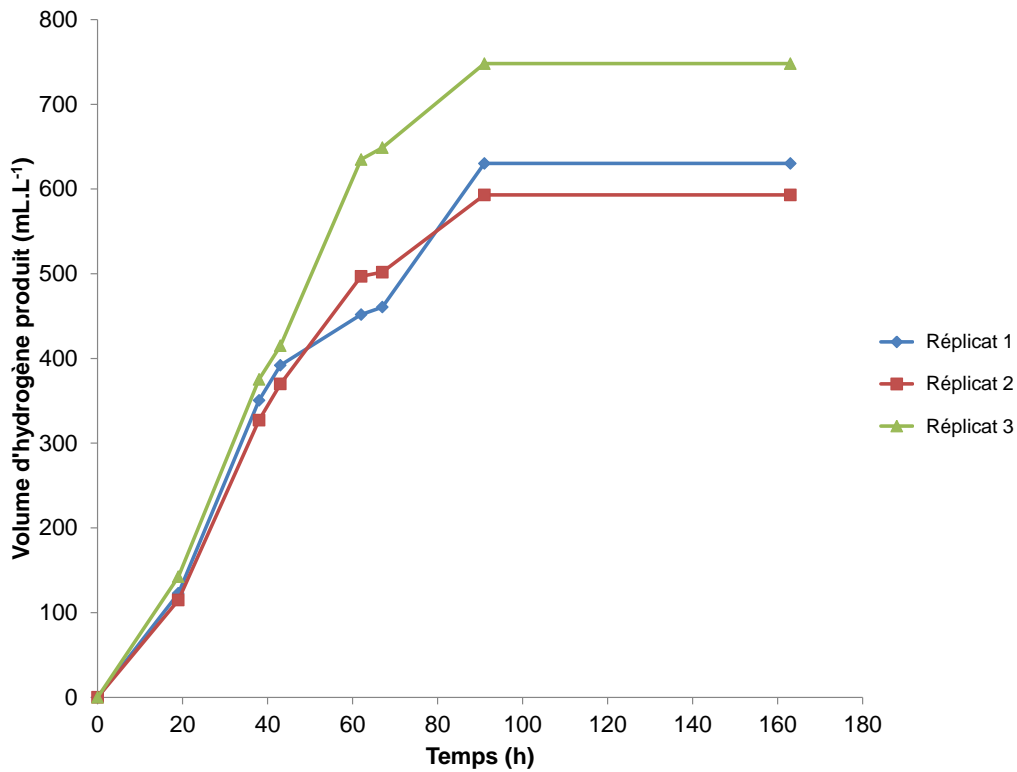


Evolution de la structure au cours du temps des communautés microbiennes des sept inocula utilisés dans le chapitre III : les boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement (BDA^{pth}), les boues de digesteur anaérobie (BDA), le manioc fermenté prétraité thermiquement (Man^{pth}), le manioc fermenté (Man), les cæcotrophes prétraités thermiquement (Cæ^{pth}), les cæcotrophes (Cæ) et le mélange des trois inocula non prétraité thermiquement (Mix).

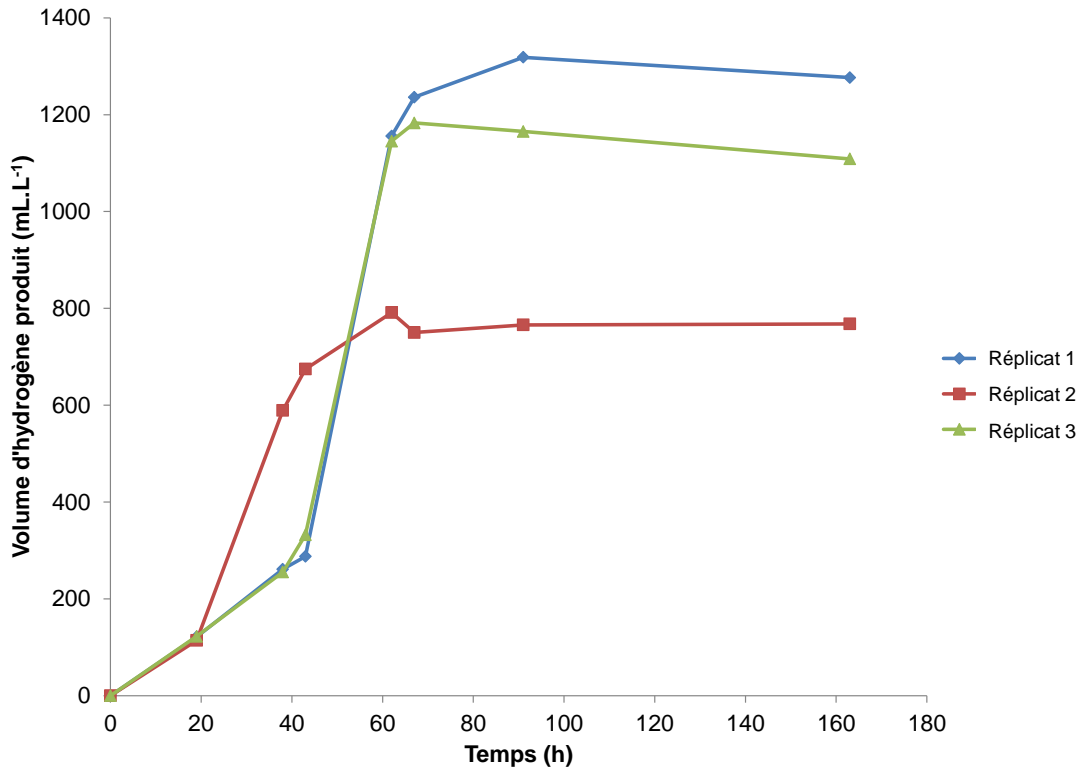
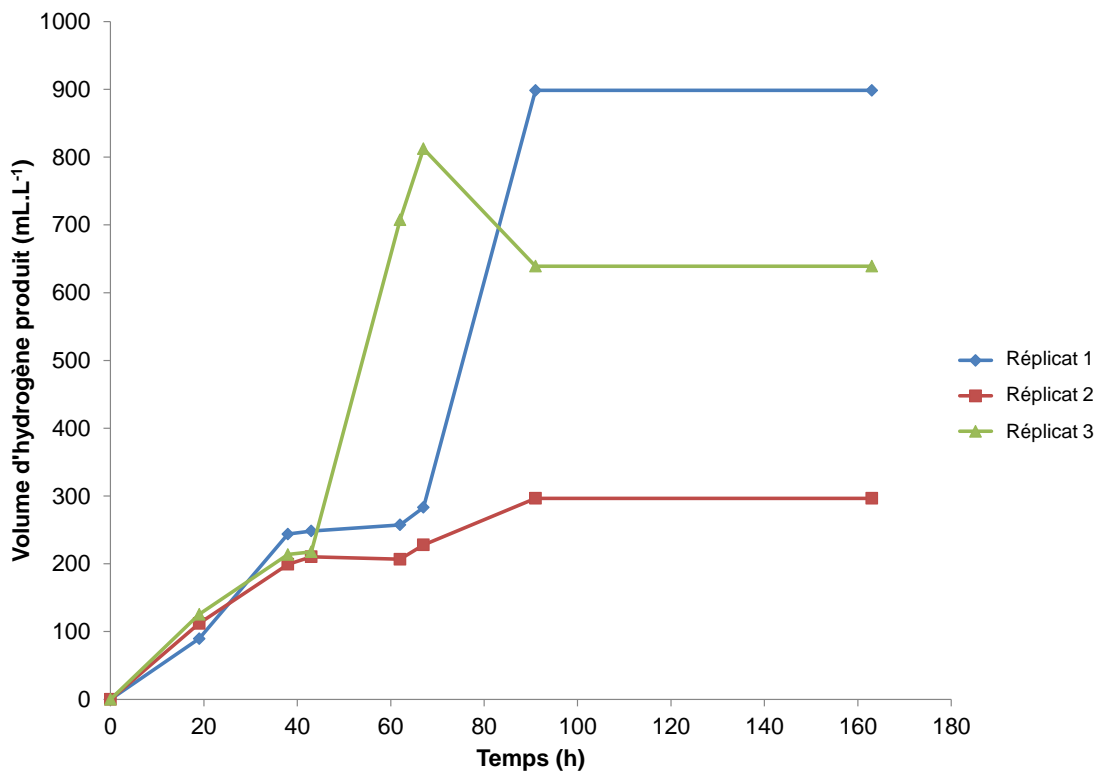
Annexe II :
Cinétiques de production d'hydrogène des différents
mélanges souche pure / Eco A.

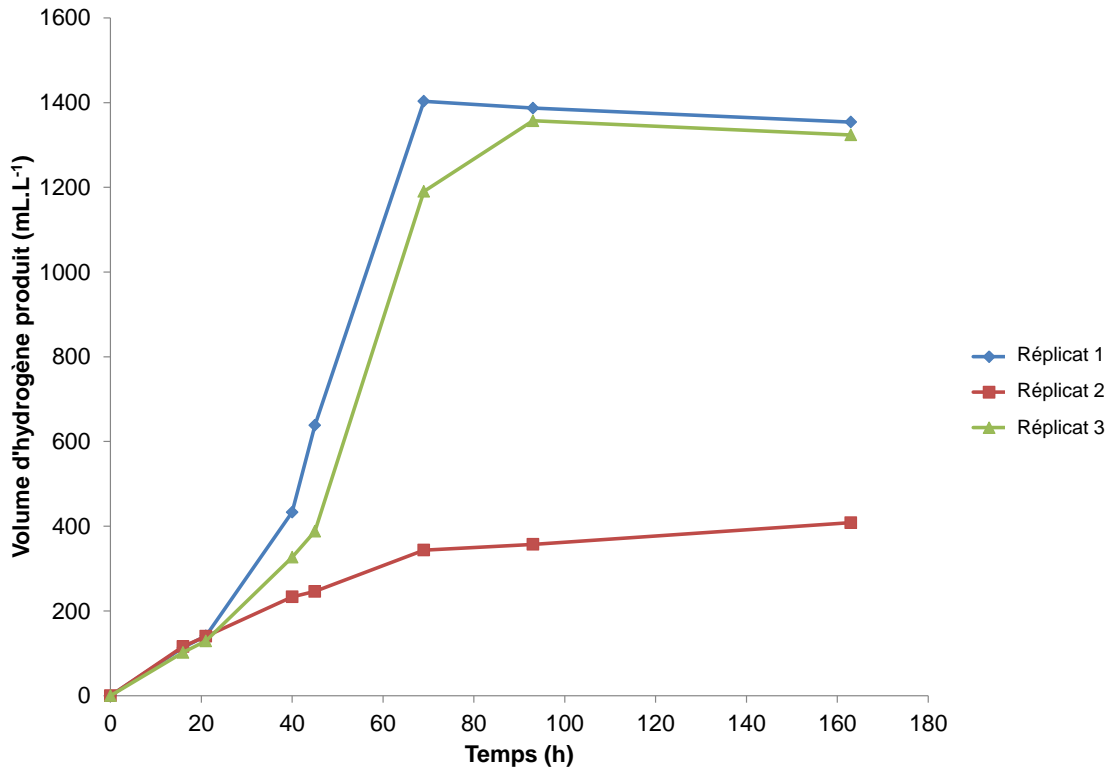


Annexe II-A : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco A / *Clostridium pasteurianum*

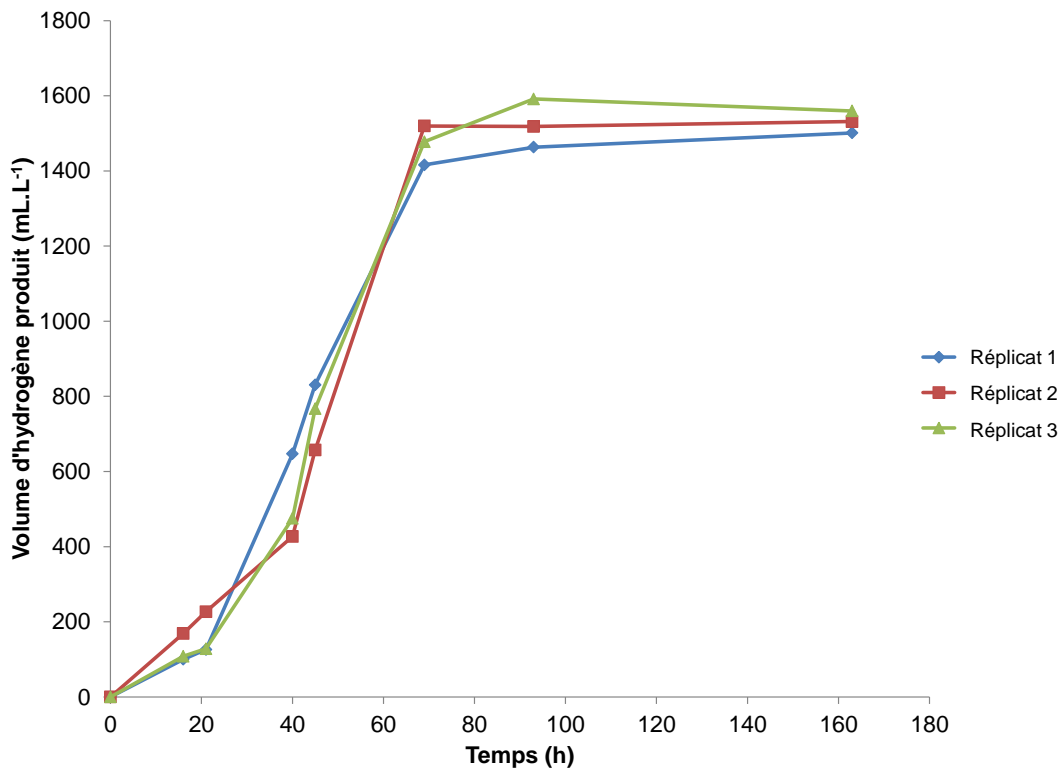


Annexe II-B : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco A / *Enterobacter cloacae*

Annexe II-C : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco A / *Escherichia coli*Annexe II-D : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco A / *Enterococcus casseliflavus*

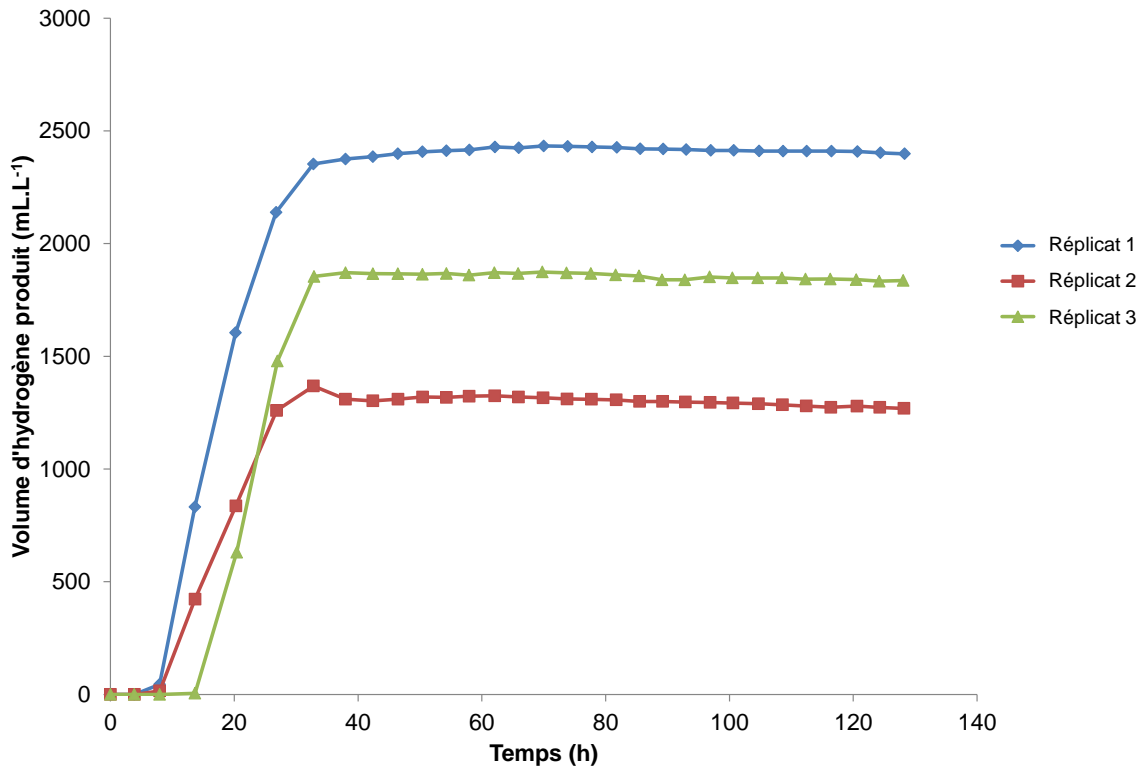


Annexe II-E : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco A / *Pseudomonas fluorescens*

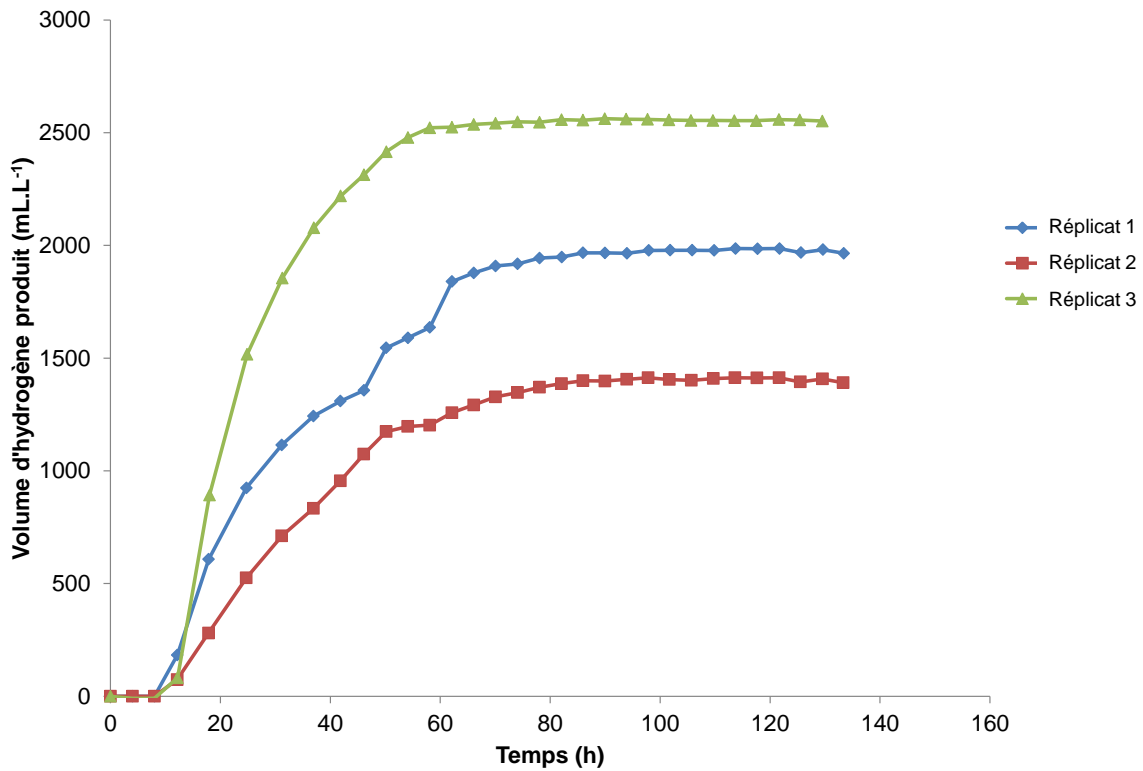


Annexe II-F : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco A / *Ralstonia eutropha*

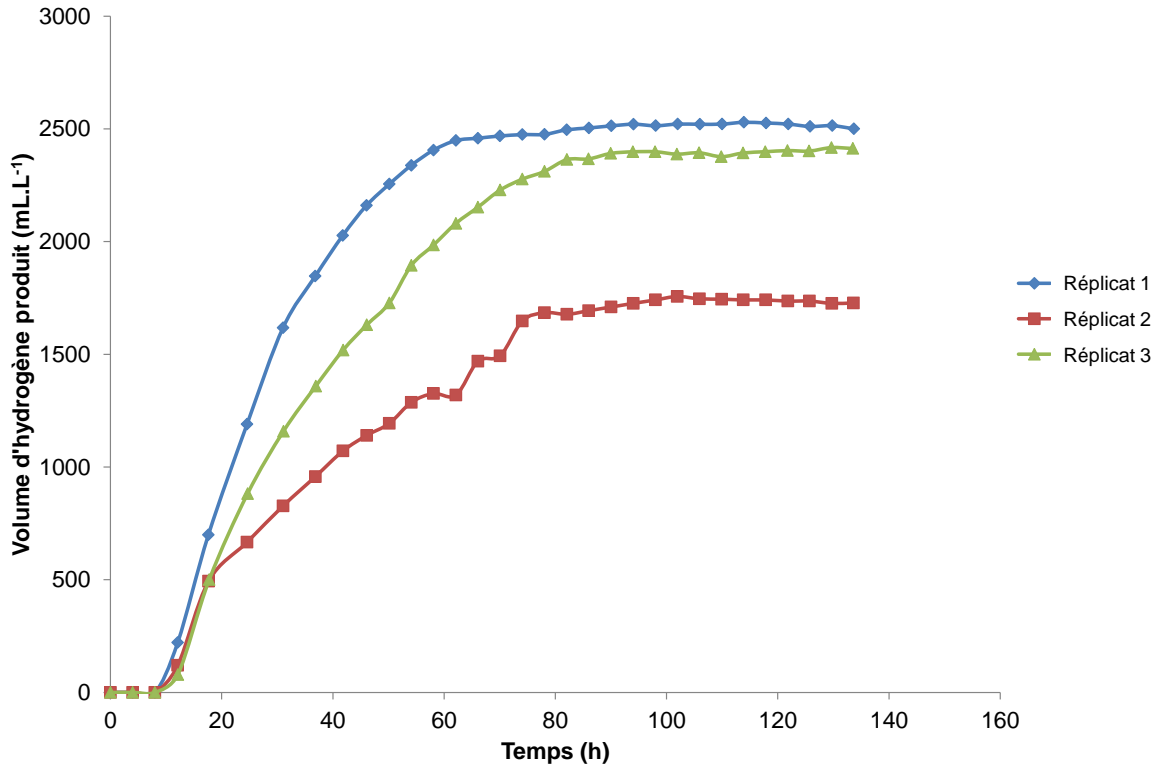
Annexe III :
Cinétiques de production d'hydrogène des différents
mélanges souche pure / Eco B.



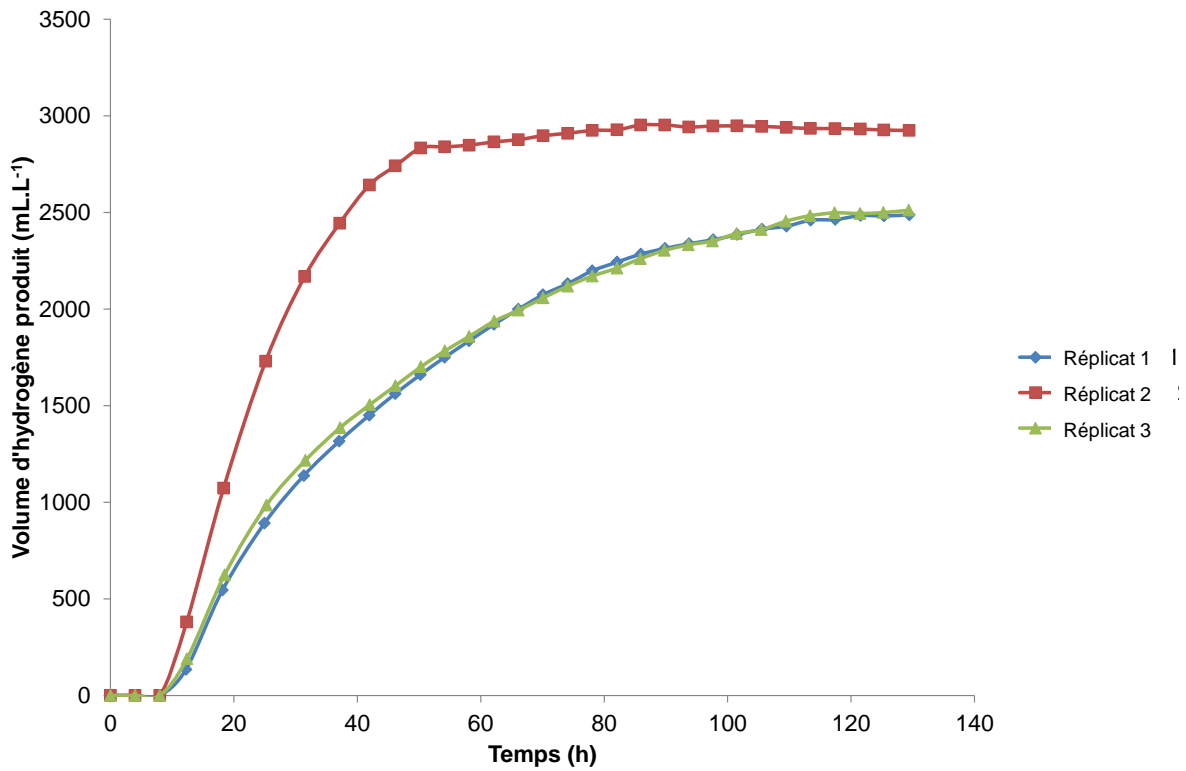
Annexe III-A : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Clostridium acetobutylicum*



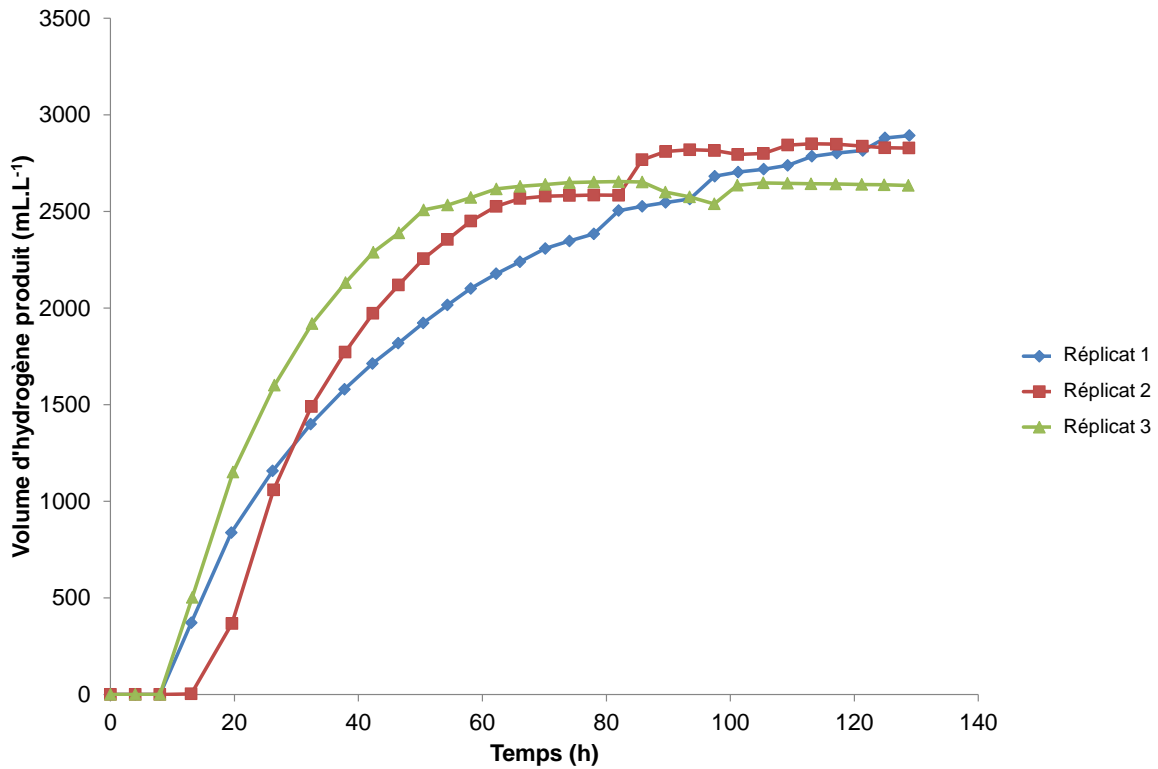
Annexe III-B : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Clostridium pasteurianum*



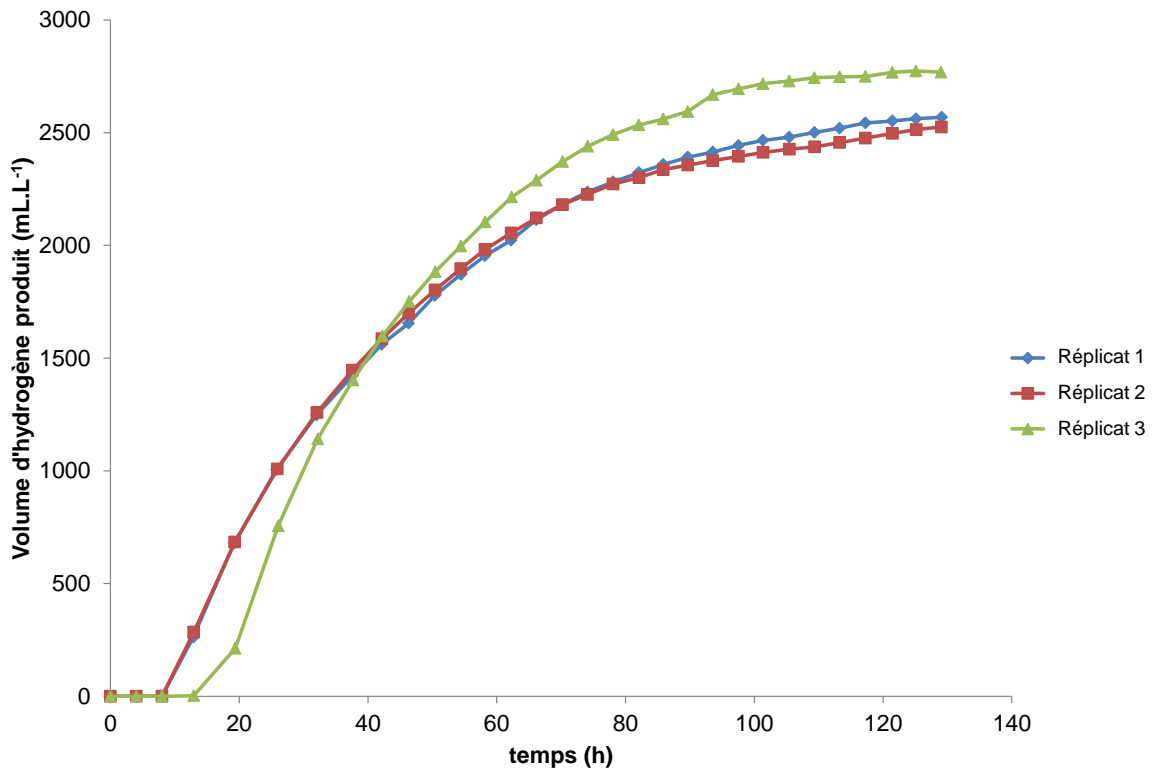
Annexe III-C : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Escherichia coli*



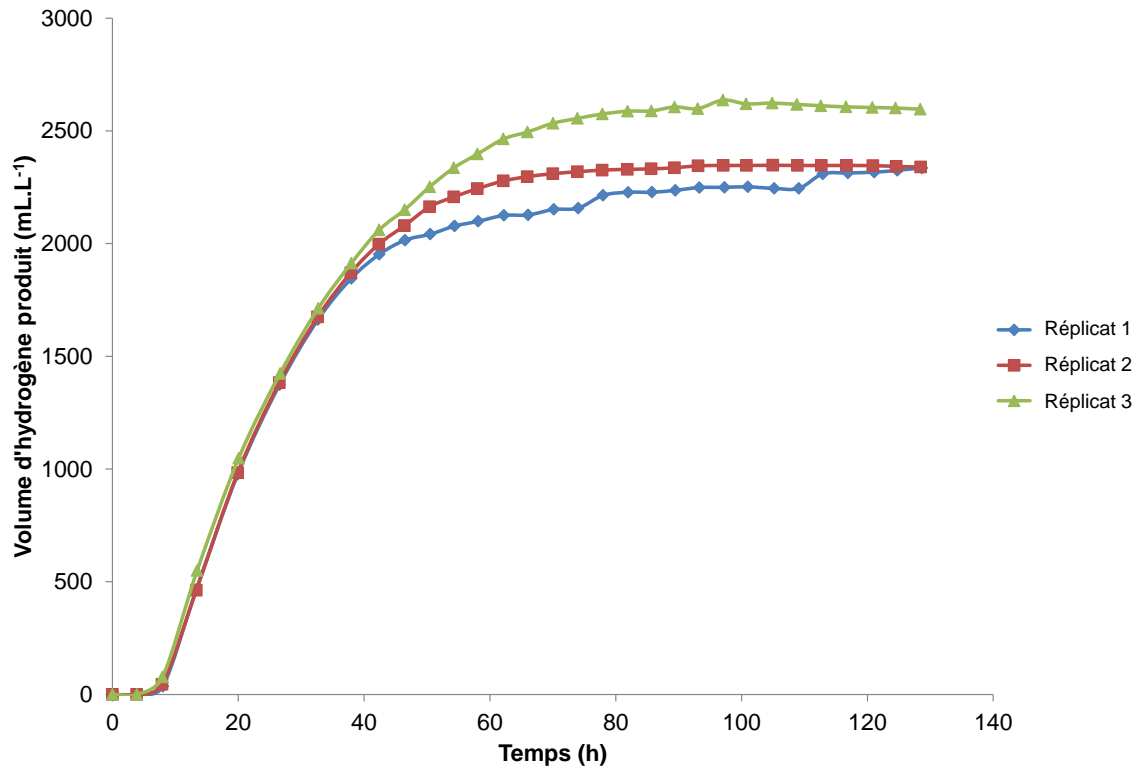
Annexe III-D : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Enterococcus casseliflavus*



Annexe III-E : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Pseudomonas fluorescens*

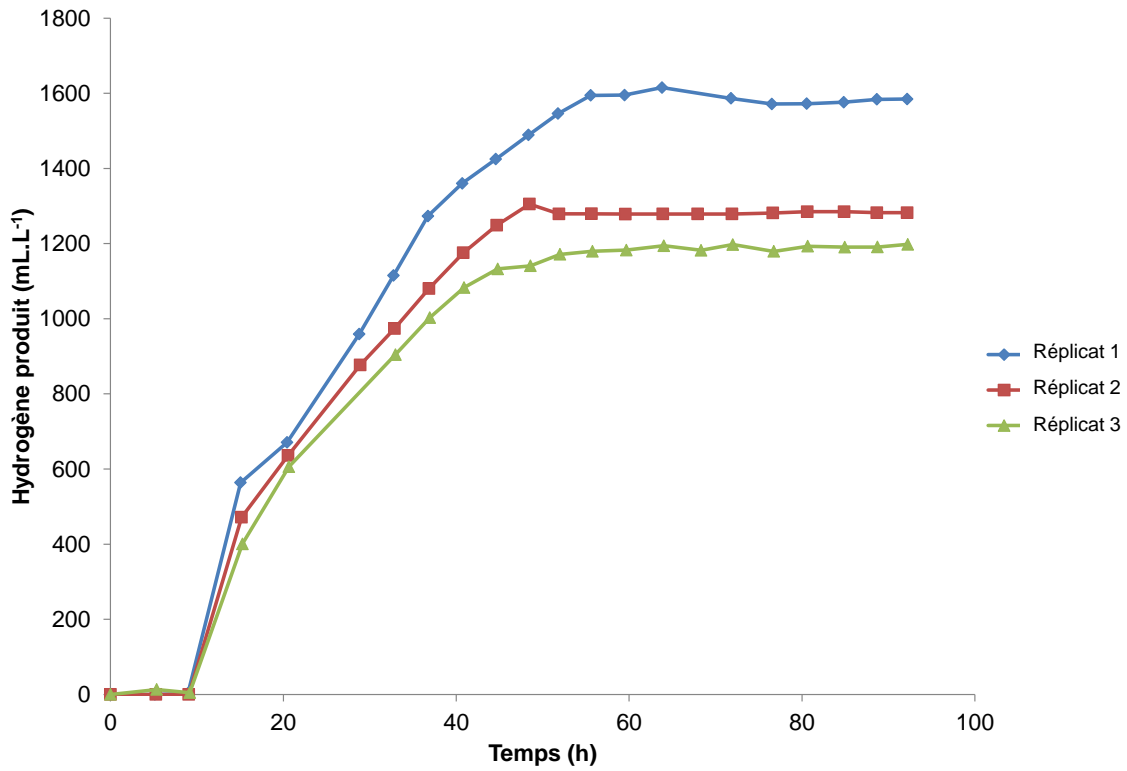


Annexe III-F : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Desulfovibrio vulgaris*

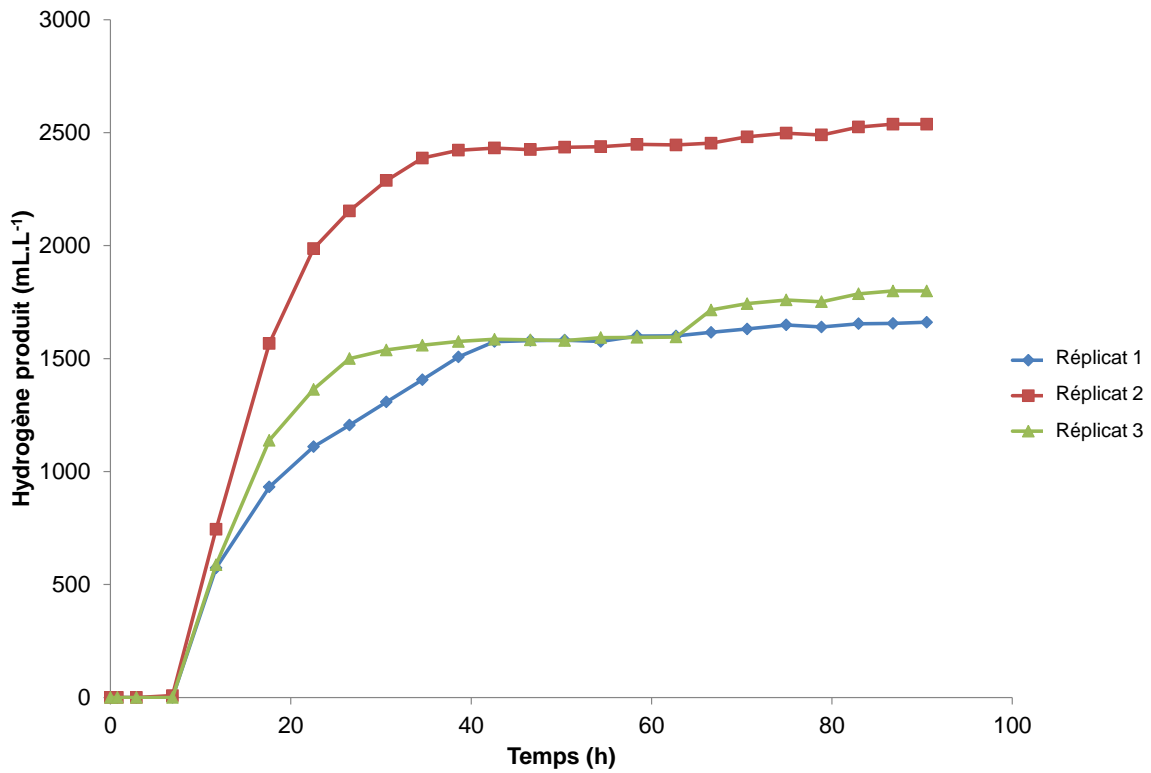


Annexe III-G : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Ralstonia eutropha*

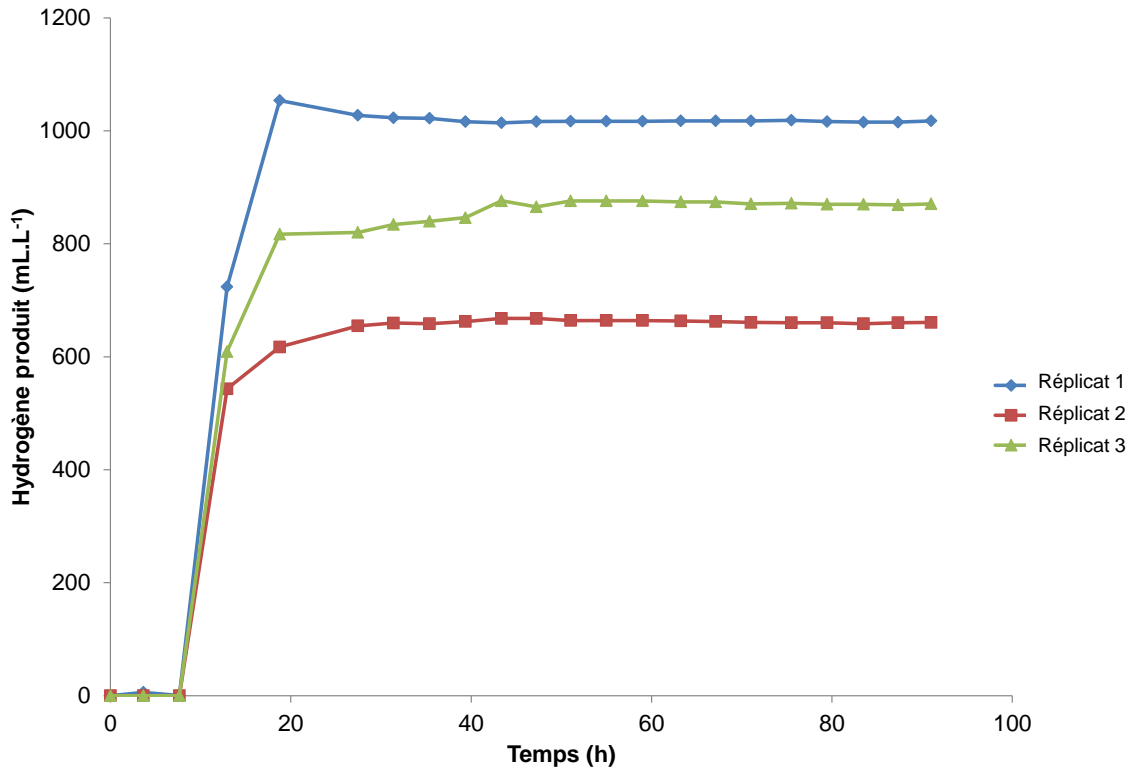
Annexe IV :
Cinétiques de production d'hydrogène des différents
mélanges souche pure / Eco B.



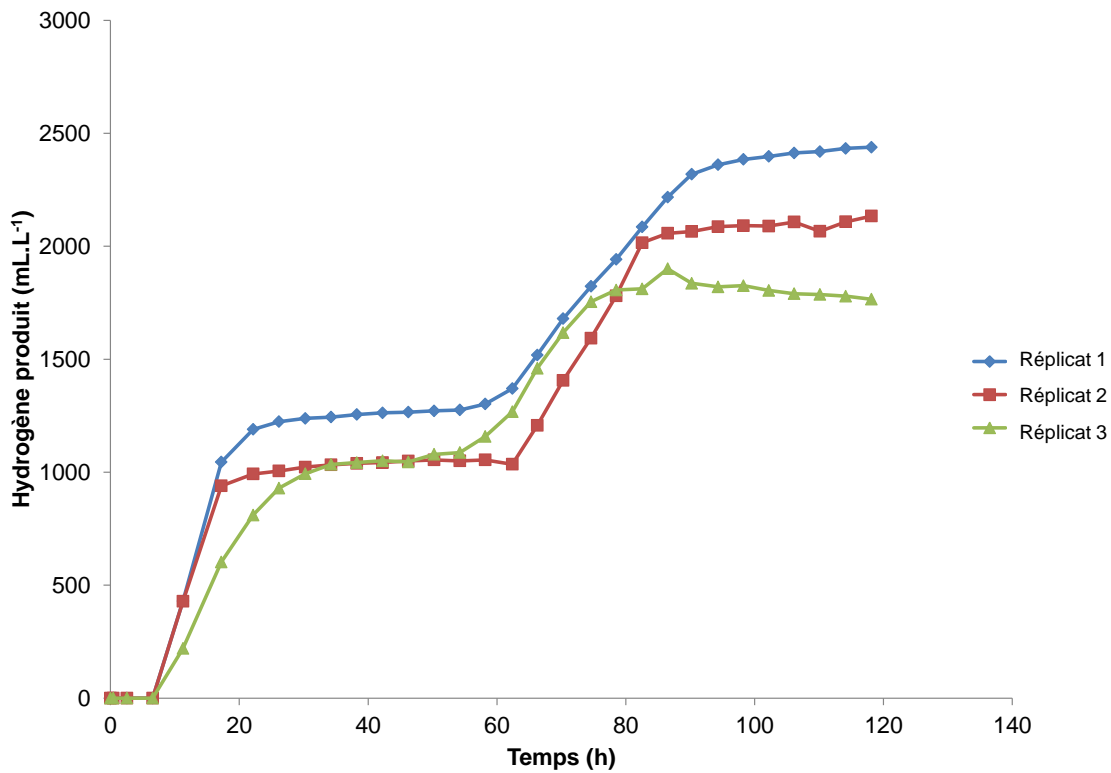
Annexe IV-A : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Clostridium acetobutylicum*



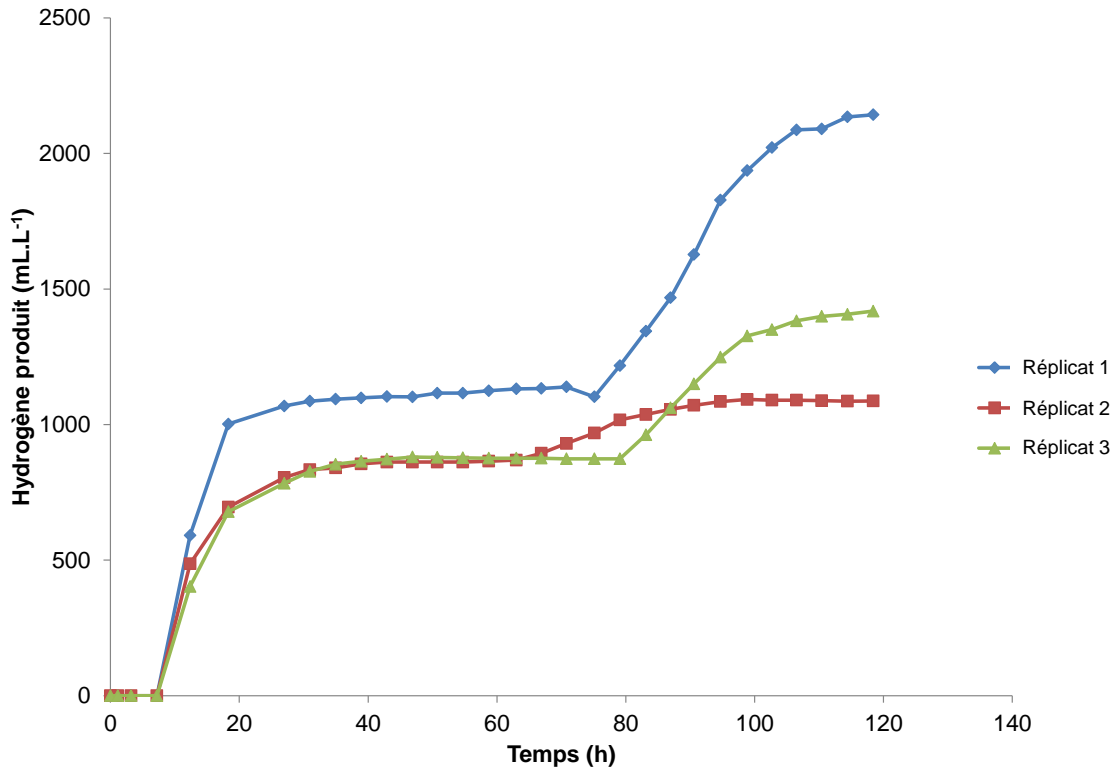
Annexe IV-B : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Clostridium pasteurianum*



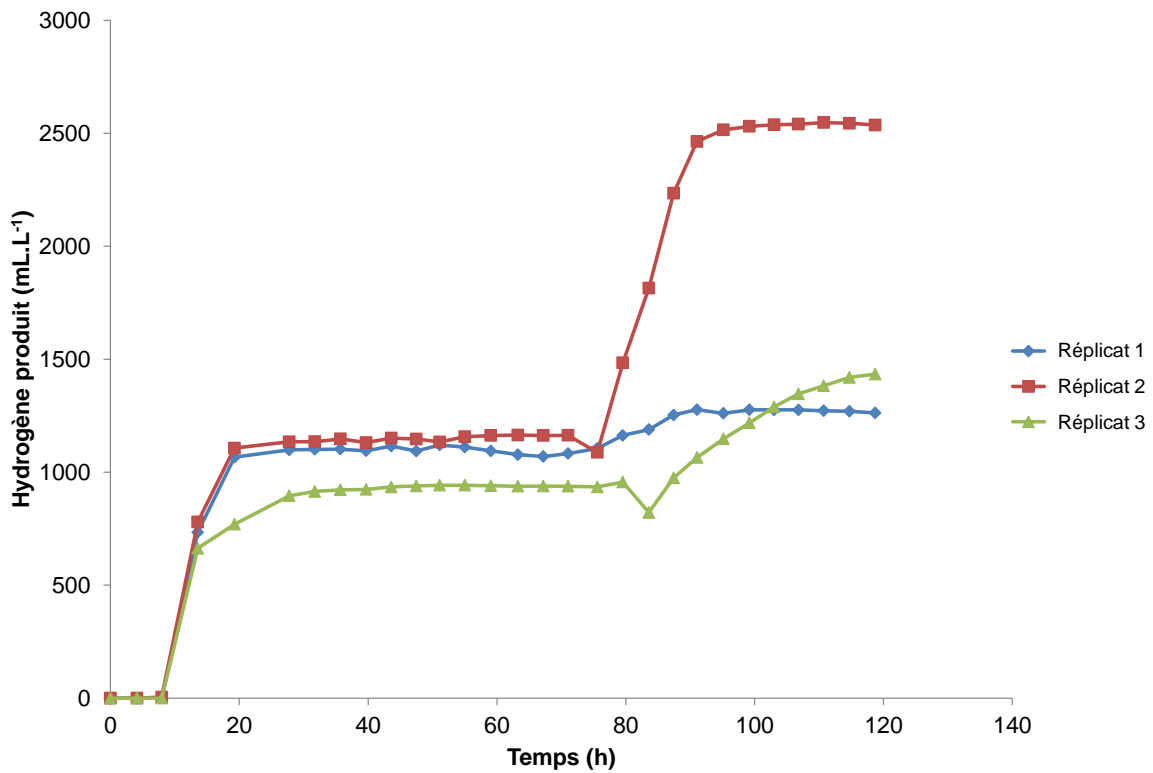
Annexe IV-C : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Lactobacillus bulgaris*



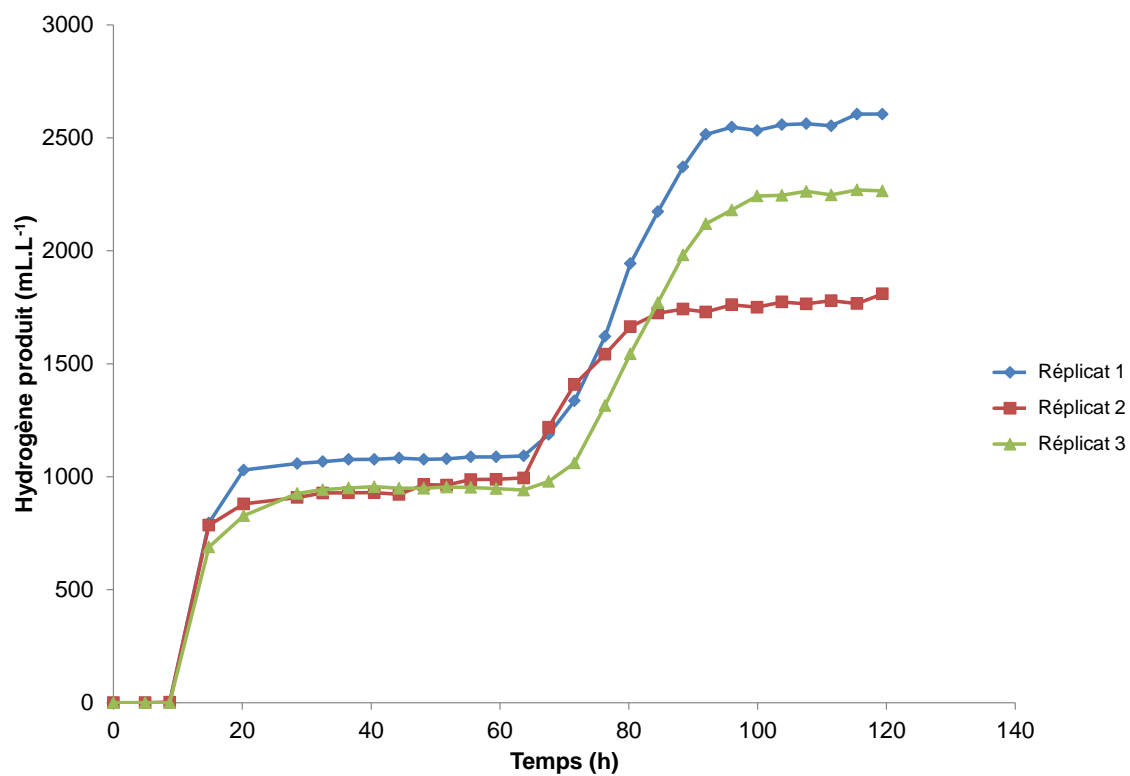
Annexe IV-D : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Escherichia coli*



Annexe IV-E : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Enterococcus casseliflavus*



Annexe IV-F : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Desulfovibrio vulgaris*



Annexe IV-G : Cinétiques de production d'hydrogène du mélange Eco B / *Ralstonia eutropha*



Abstract

Nowadays, mixed cultures are considered as a serious alternative to pure cultures for biotechnology processes. Indeed, mixed cultures can be efficient under non-sterile conditions, and can use a wide variety of organic compounds as substrate. Their main limitation is instability due to the presence of unwanted metabolic pathways resulting from complex microbial interactions. In particular, the role of bacteria in low abundance remains to be elucidated.

This work consisted in determination of the role of minority bacteria in the hydrogen production by dark fermentation. Seven inocula were used in a continuous reactor operated under the same conditions. Six times on seven, the same bacteria was found to be the main dominant species of the ecosystem, despite significant differences in hydrogen production. Considering the seven ecosystems, only the nature and the diversity of low abundant species differed, showing that the bacteria in low abundance can play a key role by modulating the overall ecosystem metabolism. In a second step, this work consisted in using some of these minority species as ecological engineers of microbial ecosystem. In order to study this aspect, a hydrogen-producing microbial community was modified artificially by adding exogenous bacterial strains with redundant functions and/or complementary native strains. Results in batch reactors have shown that hydrogen production performances could be improved by the addition of certain strains. Results obtained cannot be explained by simple trophic interactions and suggest the presence of interaction mechanism of cooperation between microorganisms. Moreover, under more favorable operating conditions; the addition of certain species in low abundance could stabilize the metabolism of microbial ecosystem without affecting the hydrogen production. In all cases, competitive interactions were not favorable for hydrogen production. Assays were then carried out in continuous reactors. These assays showed that the method used to implant strains in reactors could be a key factor for using ecological engineers.

(PhD thesis in French)

Defended on June 28th, 2012 at :



With the financial support of :



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement UR50

Avenue des Etangs F-11100 NARBONNE – France

Tel. +00 33 (0)468 425 151 · Fax +00 33 (0) 468 425 160 Email: lbe.contact@supagro.inra.fr

<http://www.montpellier.inra.fr/narbonne/>