



**HAL**  
open science

# Influence des produits métaboliques sur la production d'hydrogène par fermentation sombre en culture mixte microbienne

Marie Noguier

► **To cite this version:**

Marie Noguier. Influence des produits métaboliques sur la production d'hydrogène par fermentation sombre en culture mixte microbienne. Biotechnologie. Montpellier SupAgro, 2022. Français. NNT : 2022NSAM0025 . tel-04223374

**HAL Id: tel-04223374**

**<https://theses.hal.science/tel-04223374v1>**

Submitted on 29 Sep 2023

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau  
Spécialité Agroressources, Procédés, Aliments, Bioproduits

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement – INRAE

## Influence des produits métaboliques sur la production de dihydrogène par fermentation sombre en culture mixte microbienne

**Soumise par Marie NOGUER**

**Sous la direction de Eric TRABLY  
et Renaud ESCUDIE**

**Devant le jury composé de**

Patricia BONIN, Directrice de Recherche, CNRS Aix-Marseille

Patrick DABERT, Directeur de Recherche, INRAE Rennes

André PAUSS, Professeur, Université de Compiègne

Pierre FONTANILLE, Professeur, Université Clermont Auvergne

Laurence SOUSSAN, Maîtresse de conférences, Université de Montpellier

Eric TRABLY, Directeur de Recherche, INRAE Narbonne

Renaud ESCUDIE, Directeur de Recherche, INRAE Narbonne

Rapportrice

Rapporteur

Examineur, Président du jury

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER**

 **L'INSTITUT  
agro Montpellier**



## Résumé de la thèse

---

La fermentation sombre est un procédé biologique permettant de valoriser des matières organiques sous forme d'acides organiques, d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>. Elle permet de traiter une grande diversité de déchets organiques grâce à l'utilisation d'écosystèmes microbiens, et compte parmi les bioprocédés de production d'H<sub>2</sub> avec les productivités les plus élevées. Toutefois, celles-ci engendrent l'accumulation de produits métaboliques dans le milieu fermentaire. A concentrations élevées, ces produits métaboliques peuvent altérer l'activité microbienne et inhiber la production d'H<sub>2</sub>. Cette thèse a pour objectif d'améliorer la compréhension des effets liés à l'accumulation des acides organiques (acétate, butyrate, lactate) et des gaz de fermentation (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) sur la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre et ainsi d'élaborer des stratégies de diminution de leurs effets inhibiteurs. Des fermentations en condition batch ont mis en évidence une inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques dépendante de la nature des acides et de leur concentration. Ces inhibitions ont été associées à des changements métaboliques et des changements de communautés microbiennes. Néanmoins, l'incubation prolongée des communautés microbiennes en présence d'acides a favorisé la croissance de bactéries résistantes productrices d'H<sub>2</sub> : *Clostridium quangxiense* et *Clostridium tyrobutyricum*. D'autre part, en batch également, et au cours de la fermentation de biodéchets, les concentrations en gaz ont été modifiées par diminution de la pression totale dans le fermenteur et/ou par captage du CO<sub>2</sub>. Seule la diminution de pression couplée au captage du CO<sub>2</sub> a permis d'améliorer la production d'H<sub>2</sub> de 58 %, notamment en lien avec la diminution de l'abondance de *Streptococcus* sp., bactérie lactique, et l'augmentation d'abondance de bactéries productrices d'H<sub>2</sub>, des *Clostridium* sp.. Lors de fermentations continues alimentées par des biodéchets, l'ajout transitoire de butyrate ainsi que la diminution de pression couplée au captage du CO<sub>2</sub> ont été deux stratégies permettant respectivement de diminuer l'abondances de *Lactobacillus* sp. et de *Streptococcus* sp., bactéries lactiques. La première stratégie a permis d'augmenter la production d'H<sub>2</sub> de 47 % via une augmentation d'abondance de *C. quangxiense*, tandis que la seconde n'a pas permis d'amélioration, des *Bifidobacteriaceae* ayant supplanté *Streptococcus* sp. Ce travail de thèse met en évidence l'intérêt du suivi et du contrôle des concentrations en métabolites comme outil de pilotage des fermentations et apporte de nouvelles connaissances des effets des métabolites sur le fonctionnement des communautés microbiennes.



## Thesis summary

---

Dark fermentation is a biological process aiming to the valorisation of organic matters in the form of organic acids, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. The valorisation of a wide range of organic wastes is made possible through the use of microbial communities and dark fermentation exhibits the highest H<sub>2</sub> productivities among existing H<sub>2</sub> production bioprocesses. However, high productivities irremediably result in the accumulation of metabolic products in the fermentation medium. At high concentrations, these metabolic products can alter microbial activity and inhibit the H<sub>2</sub> production. This thesis aimed to improve the understanding of the effects of organic acids (acetate, butyrate, lactate) and fermentation gases (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) on H<sub>2</sub> production by dark fermentation and to further elaborate strategies to reduce their inhibitory effects. Batch fermentations showed an inhibition of H<sub>2</sub> production by organic acids depending on the nature of the acid and their concentrations. These inhibitions were associated with metabolic and microbial community changes. However, prolonged incubation of microbial communities in the presence of acids resulted in the growth of resistant H<sub>2</sub>-producing bacteria: *Clostridium quangxiense* and *Clostridium tyrobutyricum*. In addition, gas concentrations were also modified in batch fermentation of biowaste by decreasing the total pressure of the fermenter and/or through CO<sub>2</sub> capture. Only the decrease in total pressure coupled with CO<sub>2</sub> capture improved the H<sub>2</sub> production by 58 %. This improvement was related to the decrease in abundance of the lactic acid bacteria *Streptococcus* sp. and the increase in abundance of the H<sub>2</sub>-producing bacteria *Clostridium* sp. In continuous fermentations of biowaste, adaptation with a butyrate shock and pressure reduction coupled with CO<sub>2</sub> capture were two strategies allowing the decrease of *Lactobacillus* sp. and *Streptococcus* sp. abundance, respectively. The first strategy increased the H<sub>2</sub> production by 47 % through an increase in *C. quangxiense* abundance, while the second strategy did not result in any improvement, as *Bifidobacteriaceae* replaced *Streptococcus* sp. This work highlights the relevance of using metabolite concentrations as a tool to control fermentations and provides new knowledge on the effects of metabolites on microbial community functioning.

*Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.*

**Marie Skłodowska-Curie**



## Remerciements

---

Nous voilà désormais cinq ans après mes premiers pas au LBE. Comme d'autres avant moi, j'ai été voir si l'herbe était plus verte ailleurs avant de revenir à la recherche, et quelle expérience !

Je tiens tout d'abord à remercier **Patricia Bonin, Patrick Dabert, André Pauss, Pierre Fontanille** et **Laurence Soussan** d'avoir accepté d'examiner ma thèse. Merci également aux membres de mon comité de suivi : **Lucile Chatellard, Denis Bouyer** et **Gwendoline Christophe** qui ont apporté leur bienveillance ainsi que discussions constructives.

Un grand merci à **Eric Trably** ! Merci de m'avoir recrutée en premier lieu en stage puis d'avoir persévéré pour me voir revenir en thèse. Merci pour ta confiance, pour nos discussions, pour les relectures, pour ta bonne humeur et pour avoir su remettre le train sur les rails quand cela était nécessaire. Un second grand merci à **Renaud Escudié** ! Merci pour ta présence toujours bienveillante, pour ta porte toujours ouverte et également pour toutes nos discussions scientifiques et relectures. Merci également à **Florian Paillet** pour son encadrement en stage, nos discussions sur la recherche et pour les à-côtés à l'antre.

Je tiens particulièrement à remercier **Nicolas Bernet** pour sa direction du LBE pendant ma thèse. Entre confinements, restrictions COVID, cambriolage et j'en passe, ces années n'auront pas été des plus calmes... Malgré cela, la situation a toujours été gérée avec pragmatisme et bienveillance. Merci également à **Nadine Le tinh, Sylvie Farine, Alexandra Meseguer** et **Stéphanie Harmand** pour leur travail indispensable ainsi que pour leurs sourires, même lorsque je m'y prenais au dernier moment (« à l'arrache » ;))... Un merci particulier à Sylvie pour la gestion de notre mémorable périple en train jusqu'à Copenhague !

Merci à tous ceux qui ont accompagné la réalisation de mes expériences. Merci à **Gaëlle Santa-Catalina** pour toutes les analyses biomoléculaires (et son sourire !), merci à **Philippe Sousbie** pour son partage de connaissances infini (et ses chansonnettes !), merci à **Denis Loisel** et **Guillaume Guizard** pour leur aide technique (ainsi que pour les blagues et leur tolérance aux odeurs...). Merci à **Nori Hennaoui** pour la gestion des pépins informatiques et à **Anaïs Bonnafous** pour toutes les contributions pour le collectif. Merci à **Eric Latrille** pour toute l'aide apportée en instrumentation, mais également en statistiques, pour toutes les réflexions scientifiques, et bien sûr pour les à-côtés, dont les fameuses sorties kayak. Je remercie également **Kim Milferstedt** et **Jérôme Hamelin** pour les riches échanges en écologie microbienne.

Un graaaaand merci à mes deux stagiaires de choc : **Lucie Perat** et **Anne Laure Borg**. Vos travaux ont été d'une grande aide pour ma thèse. Merci pour votre implication et votre constante bonne humeur, même lorsque moi-même je ronchonnais !

Merci à l'intégralité du collectif du LBE. Cet environnement jovial et familial, si agréable, est le fruit de vos personnalités et de votre implication. Je souhaiterai toute ma vie travailler dans un environnement si plaisant.

Merci aux chercheurs qui m'ont inspirée et donné le sourire pendant ces belles années : **Dominique Patureau, Julie Jimenez, Elie Le Quemener, Jean-Philippe Steyer, Hélène Carrère.**

Merci à tous les copain·s qui ont assaisonné ces années de tant de rires, de sorties, de plaisirs ! Merci **Clément Flayac** (mon poulet !), **Pablo, Morand, Hicham, Esmée, Ali, Margot** (notamment pour tous les gâteaux !!), **Eqwan, David, Bastien & Clémence, TIO José, Mercedes, Chari, Sandrita, Lucita, Romain, Pierre, Axel, Fernanda, Marilia, Pauline, Lorraine, Cécile, Lucie & Lucie, Céline, Solène, Anissa, Felipe & Yolanda**, de nouveau **Julie, Nicolas**. Merci à **Alexandre** et **Antoine** pour les sorties grimpes et tous les bons moments partagés. Merci **Clément** pour toutes les sorties organisées : barbecue, rivière, randos, plage, antre, etc. Merci à **Julien** et **Kevin B** pour tous les bons moments et nos discussions. Merci bien sûr à la team bureau : **Kevin D** (pour la tchatch'), **Emilie** (pour TANT de choses... Ton sourire, les commérages, les discussions, le plaisir de rentrer dans le bureau chaque jour !), **Aïda** (pour ta gentillesse et nos discussions), **Néméhie**. Merci d'avoir supporté les odeurs de butyrate qui me suivaient parfois... ! Merci aux doctorants que j'ai pu rencontrer au cours de l'aventure MT 180 d'avoir rendu cette expérience si enrichissante.

Merci mille fois à la team training' : les loulous **Malo & Margaud** ! Top 3 dans mes souvenirs de thèse : l'anniversaire à Francfort ! Merci pour tous les bons moments : les fous-rires, les soirées au bar et au live, les jeux, les contacts à base de lotion, les discussions, la théorisation du principe de petite meuf, l'aide pour MT180, les randos, la tolérance de mes happenings dans votre bureau (en roulade), votre participation à la baisse de mon éco-anxiété (si, si !). Merci pour votre bienveillance à mon égard et pour ce pot de thèse mémorable.

Un grand merci à **Noémie** tout ce que tu as fait pour le collectif (tous ces anniversaires !!), pour la grimpe, pour ta gentillesse, pour nos discussions, pour la vie en colocation, pour le partage de bureau, pour les soirées, pour le super confinement dans le Lot, pour tant de fous-rires.

Merci à ma famille et à mes amis lointains (je reste fièr-E !) pour leur tolérance de mon manque de disponibilité et pour leur soutien au cours de cette thèse.

Enfin, merci **Roland** pour toutes les discussions scientifiques qui ont fortement façonné cette thèse, merci pour tous les merveilleux moments partagés, merci de m'avoir toujours accompagnée au plus haut comme au plus bas, et de continuer à le faire. Pour sûr, en trois ans de recherche, la voilà, ma plus belle découverte.



# Sommaire

---

<i>Remerciements</i> .....	<i>i</i>
<i>Sommaire</i> .....	<i>ii</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>iv</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>v</i>
<i>Publications, communications et vulgarisation scientifiques</i> .....	<i>vi</i>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Usages actuels et prospectifs de l’H<sub>2</sub></b> .....	<b>8</b>
1.1.1. Usages actuels .....	8
1.1.2. Perspectives d’usages de l’H <sub>2</sub> à vocation de décarbonation .....	12
<b>1.2. Procédés de production d’H<sub>2</sub></b> .....	<b>19</b>
1.2.1. A partir de ressources fossiles .....	20
1.2.2. A partir de ressources renouvelables .....	21
<b>1.3. La Fermentation sombre</b> .....	<b>24</b>
1.3.1. Une sous-partie de la méthanisation.....	24
1.3.2. Les hydrogénases, enzymes clés de la production d’H <sub>2</sub> .....	26
1.3.3. Voies métaboliques de production d’H <sub>2</sub> .....	27
1.3.4. Microbiologie de la fermentation sombre.....	29
<b>1.4. Facteurs influençant la production d’H<sub>2</sub> en fermentation sombre</b> .....	<b>37</b>
1.4.1. Modes de conduite de culture.....	37
1.4.2. Type de réacteur de fermentation .....	39
1.4.3. Choix du substrat .....	41
1.4.4. Paramètres opératoires .....	44
1.4.5. Couplage de la fermentation sombre avec d’autres procédés.....	50
<b>1.5. Inhibition de la production d’H<sub>2</sub> en fermentation sombre et stratégies de diminution de ces inhibitions</b> .....	<b>50</b>
1.5.1. Inhibiteurs « Pré-process » .....	51
1.5.2. Inhibition par l’H <sub>2</sub> et le CO <sub>2</sub> .....	54
1.5.3. Inhibition par les acides organiques .....	73
<b>2. Matériel et Méthodes</b> .....	<b>97</b>
<b>2.1. Substrats et milieux de culture</b> .....	<b>98</b>
2.1.1. Glucose et milieu de culture défini .....	98
2.1.2. Soupe de déconditionnement .....	99
<b>2.2. Inoculation des milieux de culture</b> .....	<b>102</b>

2.2.1.	Origine de l'inoculum.....	102
2.2.2.	Conditionnement et stockage de l'inoculum.....	102
2.2.3.	Prétraitement de l'inoculum.....	103
<b>2.3.</b>	<b>Dispositifs expérimentaux utilisés pour les fermentations .....</b>	<b>104</b>
2.3.1.	Fioles de fermentation.....	104
2.3.2.	Réacteurs instrumentés.....	105
<b>2.4.</b>	<b>Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>110</b>
2.4.1.	Matière sèche, matière volatile, matière en suspension .....	110
2.4.2.	Acides gras volatils.....	110
2.4.3.	Sucres et autres métabolites .....	111
2.4.4.	Cas particulier de l'éthanol.....	111
2.4.5.	Analyse de la composition du gaz de fermentation .....	111
<b>2.5.</b>	<b>Mesure des concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dissous et estimation des sursaturations en gaz du milieu fermentaire.....</b>	<b>112</b>
2.5.1.	Principe de la mesure d'H <sub>2</sub> dissous par chromatographie statique de l'espace de tête ...	113
2.5.2.	Calcul de la concentration en H <sub>2</sub> et en carbonates dissous.....	114
2.5.3.	Calcul de la concentration en CO <sub>2</sub> dissous.....	115
2.5.4.	Validation de la méthode .....	116
2.5.5.	Sursaturation en gaz dissous .....	117
<b>2.6.</b>	<b>Protocole de mesure de l'activité homoacétogène par prélèvement de milieu fermentaire et suivi de la vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> <i>ex situ</i> .....</b>	<b>117</b>
<b>2.7.</b>	<b>Analyses microbiologiques .....</b>	<b>118</b>
2.7.1.	Séquençage et affiliation taxonomique.....	118
2.7.2.	Quantification d'ADN par PCR quantitative.....	119
<b>2.8.</b>	<b>Traitements de données .....</b>	<b>120</b>
2.8.1.	Quantification des volumes de gaz produit au cours des fermentations.....	120
2.8.2.	Traitement des données de séquençage.....	121
2.8.3.	Détermination des paramètres cinétiques de la production d'H <sub>2</sub> .....	127
2.8.4.	Paramètres cinétiques d'inhibition.....	128
2.8.5.	Analyses statistiques.....	129
<b>2.9.</b>	<b>Synthèse des expériences de la thèse.....</b>	<b>129</b>
<b>3.</b>	<b><i>Influence des acides sur la fermentation sombre et la production d'H<sub>2</sub>.....</i></b>	<b>132</b>
<b>3.1.</b>	<b>Résumé du chapitre.....</b>	<b>132</b>
<b>3.2.</b>	<b>Changements populationnels et métaboliques induits par l'ajout d'acétate, de butyrate ou de lactate .....</b>	<b>134</b>
3.2.1.	Avant-propos .....	134
3.2.2.	Abstract.....	136
3.2.3.	Introduction .....	137
3.2.4.	Material and Methods .....	139
3.2.5.	Results.....	142
3.2.6.	Conclusions.....	160
3.2.7.	Acknowledgements .....	160
3.2.8.	Résultats complémentaires .....	161



<b>3.3. Fermentations secondaires productrices d'H<sub>2</sub> en conditions de stress acide .....</b>	<b>170</b>
3.3.1. Avant-propos .....	170
3.3.2. Mise en œuvre expérimentale.....	171
3.3.3. Résultats .....	176
3.3.4. Conclusion .....	197
<b>3.4. Adaptation de consortium microbien à un stress acide .....</b>	<b>199</b>
3.4.1. Avant-propos .....	199
3.4.2. Abstract.....	201
3.4.3. Introduction.....	201
3.4.4. Materials and Methods .....	204
3.4.5. Results and discussion .....	209
3.4.6. Conclusion .....	222
<b>3.5. A retenir .....</b>	<b>223</b>
<b>4. Influence de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> sur la fermentation sombre et la production d'H<sub>2</sub> ...</b>	<b>226</b>
<b>4.1. Résumé du chapitre.....</b>	<b>226</b>
<b>4.2. Stimulation de la communauté microbienne productrice d'H<sub>2</sub> par la capture du CO<sub>2</sub> et la réduction de pression en batch .....</b>	<b>228</b>
4.2.1. Avant-propos .....	228
4.2.2. Abstract.....	228
4.2.3. Introduction.....	229
4.2.4. Material and Methods .....	231
4.2.5. Results and Discussion .....	238
4.2.6. Conclusions and perspectives.....	249
4.2.7. Acknowledgements .....	249
4.2.8. CRediT authorship contribution statement .....	250
4.2.9. Conclusion étendue en français.....	250
<b>4.3. Intérêt de la capture du CO<sub>2</sub> et de la réduction de pression en fermentation continue</b>	<b>252</b>
4.3.1. Avant-propos .....	252
4.3.2. Mise en œuvre expérimentale.....	252
4.3.3. Résultats .....	256
4.3.4. Conclusion .....	286
<b>4.4. A retenir .....</b>	<b>288</b>
<b><i>Conclusions, discussion générale, et perspectives.....</i></b>	<b>292</b>
<b><i>Références .....</i></b>	<b>305</b>
<b><i>Annexes .....</i></b>	<b>340</b>



## Liste des figures

Figure 1-1 : Demande globale annuelle en hydrogène depuis 1975. Figure issue du rapport de l'IEA 2019 (International Energy Agency, 2019).....	9
Figure 1-2 : Produits de l'industrie chimique dépendant de la production d'H <sub>2</sub> . Figure issue du rapport « Hydrogen supply and Demand » de l'organisation Fuel Cells and Hydrogen Observatory (Fuel cells and hydrogen observatory, 2021).....	11
Figure 1-3 : Demande en chaleur dans l'industrie en fonction du secteur et de la température. Adaptée de IEA 2019, Figure 48. ....	14
Figure 1-4 : Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible. Issue de (Kirubakaran et al., 2009).....	15
Figure 1-5 : Comparaison des émissions de CO <sub>2</sub> en fonction de la motorisation, "du puits à la roue". ICE: Internal combustion Engine. FCEV: Fuel cell electric vehicle. BEV: Battery electric vehicle. SMR: reformage de gaz naturel. Figure issue de « Hydrogen Roadmap Europe: A Sustainable Pathway for the European Energy Transition » (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019). Hypothèses : Voiture de taille moyenne (C-Segment), 4,1L/100 km diesel, 4,8L/100 km essence, batterie de 35,6 kWh. 13 kWh/100 km. Emissions moyennes estimées en 2016 pour une durée de vie de 120 000 km. 10 kgCO <sub>2</sub> /kgH <sub>2</sub> par VGN. Les émissions de fabrication ne sont pas considérées. ....	16
Figure 1-6 : Diagramme de Sankey, exprimant l'énergie nécessaire pour produire un kg d'hydrogène, ainsi que l'énergie électrique résultante. Figure issue du rapport ADEME "Rendement de la chaîne H <sub>2</sub> " de 2020, Figure 2. (ADEME, 2020).....	17
Figure 1-7 : Préférence technologique en fonction de la distance à parcourir et de la charge utile. FCEV : Fuel cell electric vehicle, BEV : Battery electric vehicle. Figure issue de « Hydrogen Roadmap Europe: A Sustainable Pathway for the European Energy Transition », Exhibit 10 (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019). ....	18
Figure 1-8: Procédés de production d'H <sub>2</sub> majoritaires appliqués et en développement.....	19
Figure 1-9 : Etapes de la digestion anaérobie. ....	25
Figure 1-10 : Principales voies de production d'H <sub>2</sub> à partir du glucose. PFL: pyruvate-formate-lyase, FHL: formate-hydrogène-lyase, PFOR: pyruvate-ferrédoxine-oxydoreductase, NFOR: NADH-ferrédoxine oxydoreductase, NFR: NADH-ferrédoxine reductase. Adapté de Ramirez-Morales et al. (2015); Tapia-Venegas et al. (2015).....	27
Figure 1-11 : Schématisation de la voie Wood-Ljungdahl des bactéries acétogènes. Figure issue de (Schuchmann and Müller, 2016) (Fig 1). [H] : équivalent redox (un électron + un proton) ; THF, tétrahydrofolate ; CoFe-SP, protéine fer-soufre corrinoïde. Chez A. woodii, les équivalents redox utilisés sont : l'H <sub>2</sub> pour l'étape de la formate déshydrogénase, NADH pour les étapes de la méthylène-THF déshydrogénase et de la méthylène-THF réductase, et la ferrédoxine réduite pour l'étape de la CO déshydrogénase/acétyl-CoA synthase.....	37
Figure 1-12 : Inhibiteurs de la production d'H <sub>2</sub> par fermentation sombre.....	52

Figure 1-13 : Illustration des différentes étapes du transfert de gaz en réacteur hydrogénique. Figure issue de (Beckers et al., 2015), (Fig 1.).....	57
Figure 1-14 : Valeurs de $p_{H_2}$ à l'équilibre pour les réactions de [FeFe]-hydrogénases avec et sans bifurcation d'électrons, en conditions de référence et compte tenu des plages de potentiel redox ( $E^\circ$ ) de la Fd et des ratios NADH/NAD <sup>+</sup> . Tableau issu des travaux de Jay et al. (2020) (Table 3).....	59
Figure 1-15 : Mécanismes d'inhibition par les formes dissociées et non dissociées des acides produits en fermentation. Figure issue de (Elbeshbishy et al., 2017) , Fig 1.....	75
Figure 2-1 : Illustration du protocole de préparation de la soupe de déconditionnement reconstituée. 1 : Pesée des ingrédients congelés. 2 : Dilution de manière à atteindre 10% de MS par ajout d'eau du robinet et mixage du mélange. Cette préparation est ensuite hygiénisée thermiquement. 3 : Après hygiénisation, le mélange est filtré manuellement. 4 : La matière retenue par le tamis est jetée.....	101
Figure 2-2 : Photographie d'une fiole de 600 mL utilisée pour réaliser des fermentations ...	105
Figure 2-3 : Photo d'un réacteur instrumenté Applikon Bio 3L et schéma simplifié du dispositif expérimental lors des fermentations en mode batch. ....	106
Figure 2-4 : Photo et schématisation simplifiée du dispositif expérimental utilisé lors des fermentations en mode continu. 1 : pompe d'alimentation, 2 : pompe de soutirage, 3 : Pompe de régulation de la pression, 4 : pompe de régulation du pH, 5 : Module de contrôle et d'acquisition, 6 : manomètre, 7 : bidon d'effluent.....	109
Figure 2-5 : Schématisation de la procédure de mesure de concentration en $H_2$ et $CO_2$ dissous par CS-ET. Adapté à partir du rapport de Lucie Perat. Photo d'illustration des flacons utilisés, issu du rapport de Lucie Perat.....	114
Figure 2-6 : Schématisation des méthodes Unweighted Unifrac (a) et Weighted Unifrac (b) utilisées pour calculer la distance entre les communautés microbiennes de deux échantillons. Les cercles ou carrés bleu ou rouge représentent des OTUs retrouvés dans l'échantillon X (en rouge) et l'échantillon Y (en bleu). En (a), les distances violettes correspondent aux branches partagées. En (b), l'épaisseur des branches est dépendante de l'abondance des OTUs. Figure adaptée (Québec, n.d.).....	126
Figure 2-7 : Représentation schématique de la détermination des paramètres cinétiques de production d' $H_2$ suite à la modélisation polynomiale. ....	128
Figure 3-1 : Illustration du plan expérimental appliqué pour évaluer l'influence de l'acétate, du butyrate et du lactate sur la production d' $H_2$ par fermentation sombre à partir de glucose.135	
Figure 3-2 : Graphical abstract.....	136
Figure 3-3 : Effects of acetate (a), butyrate (b) and lactate (c) on mean cumulative hydrogen production $\pm$ standard deviation ( $mLH_2.gglucose\ added^{-1}$ ) .....	144
Figure 3-4 : Effects of acetate, butyrate and lactate on metabolic activity. (a) mean glucose removal (%) $\pm$ standard deviation. Mean yields of products $\pm$ standard deviation as a function of acetate (b), butyrate (c) and lactate (d) concentrations. Yields were calculated in COD of products ( $H_2$ , acetate, butyrate and lactate) per COD of consumed glucose and consumed	

<i>exogenous added acid (viz. glucose + acetate consumed, glucose + butyrate consumed and glucose + lactate consumed for (b), (c) and (d) respectively).....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 3-5 : Bacterial community analysis. Effects of acetate, butyrate and lactate on pielow (a) and richness (b) indexes. Mean relative abundance of bacteria at family level depending on the concentration of added acetate, butyrate and lactate (c).....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 3-6 : Bootstrapped dendrogram of Beta-diversity. Bootstrap probability value (BP) and approximately unbiased probability values (AU) appear in green and red respectively above each node. Clusters associated with an AU &gt; 95 % circled in blue and numbered from 1 to 9. The maximal volume of cumulated H<sub>2</sub> per gram of glucose added (H<sub>c</sub>, mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>) measured in each condition are presented. For each sample, the added acid is abbreviated as “La”, “Bu” and “Ac” for lactate, butyrate and acetate respectively. The initial concentration of the added acid is indicated between two underscores. The end number, from 1 to 4, is used to distinguish the replicates.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 3-7 : Concentration en copies 16S en fonction de la concentration en acide ajouté, pour les trois acides ajoutés, au début de la fermentation (T0) et à quatre jours de fermentation (TF).....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 3-8 : Concentration cellulaire (cellules·mL<sup>-1</sup>) à T0 en fonction de l’OTU considéré, pour les différents acides ajoutés (a). Concentrations cellulaires à TF en fonction de la concentration en acétate ajouté (b), en butyrate ajouté (c) et en lactate ajouté (d), pour les quatre OTUs majoritaires. Les axes des ordonnées sont représentés en échelle logarithmique. Les concentrations cellulaires inférieures au seuil de détection, i.e. ~100 cellules·mL<sup>-1</sup> sont ramenées à 1 sur ce graphique. ....</i>	<i>165</i>
<i>Figure 3-9 : Illustration de la succession d’une fermentation primaire et d’une fermentation secondaire. ....</i>	<i>172</i>
<i>Figure 3-10 : Illustration du protocole expérimental mis en place pour étudier la fermentation sombre secondaire productrice d’H<sub>2</sub> en conditions de stress acide .....</i>	<i>172</i>
<i>Figure 3-11 : Composition des effluents en début de fermentations secondaires en acétate, butyrate et lactate en pourcentage de la concentration en acétate, butyrate et lactate totale (a) ; et en Clostridiaceae, Bacillaceae et Lactobacillaceae, en pourcentage de la concentration en copies 16S totale (b). Les cercles noirs non remplis représentent les positions en lesquelles l’effluent est composé d’un mix de 50 % de chaque couple. ....</i>	<i>175</i>
<i>Figure 3-12 : Production d’H<sub>2</sub> au cours des fermentations secondaires en fonction du temps de fermentation secondaire, pour les différentes fermentations suivies et lors d’ajout initial d’acétate (a), de butyrate (b) et de lactate (c). Les volumes cumulés d’H<sub>2</sub> obtenus en fin de chaque fermentation sont représentés en fonction de la concentration initiale en acide ajouté, pour l’ajout initial d’acétate, de butyrate ou de lactate (d).....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 3-13 : Quantité de substrats consommées (acétate, lactate et glucose) au cours des fermentations secondaires, avec ajout initial d’acétate (a), de butyrate (b) et de lactate (c). Les quantités totales de substrat consommées en fonction de la concentration initiale en acide ajouté, pour les trois différents acides ajoutés sont représentées en (d). ....</i>	<i>180</i>

Figure 3-14 : Rendements métaboliques lors de fermentations secondaires en présence d'acétate initialement ajouté (a), de butyrate initialement ajouté (b), de lactate initialement ajouté (c). Rendement en H <sub>2</sub> en fonction de la concentration initiale en acide ajouté pour les trois types d'acides ajoutés (d). La ligne rouge en pointillé représente le seuil du rendement cible de 1,0 gDCO·gDCO <sup>-1</sup> assurant un bouclage correct du bilan DCO. ....	184
Figure 3-15 : Concentration cellulaire (nombre de cellules·mL <sup>-1</sup> ) des neuf OTUs majoritaires en début (TI) et en fin (TF) des fermentations secondaires considérées, en présence d'acétate ajouté initialement (a), de butyrate ajouté initialement (b) et de lactate ajouté initialement (c). La fermentation Ac_100mM_11 a été exclue de cette représentation à cause d'une concentration trop élevée. L'échelle des ordonnées diffère en (c) par rapport à (a) et (b). ..	191
Figure 3-16 : Croissance relative des OTUs majoritaires en fonction de l'acide exogène ajouté et de sa concentration. La croissance relative d'un OTU représente l'augmentation de sa concentration cellulaire par rapport à l'augmentation totale de la concentration cellulaire. Ac = acétate, Bu = butyrate, La = lactate. ....	193
Figure 3-17 : Croissance de <i>C. tyrobutyricum</i> (a) et de <i>C. guangxiense</i> (b) en fonction de la concentration initiale en acide ajouté et de l'acide ajouté. ....	195
Figure 3-18 : Analyse en composantes principale. Graphique des variables de l'ACP (a), Graphique des individus de l'ACP (b). ....	196
Figure 3-19 : Illustration de la procédure expérimentale appliquée pour évaluer l'effet d'un stress initial au butyrate sur la production d'H <sub>2</sub> par fermentation sombre en mode continu	200
Figure 3-20 : Schematic representation of the experimental setup used. 1, 2, 3, 4, 5: pumps for feed addition, butyric acid addition, pH regulation, effluent withdrawal and pressure regulation. ....	206
Figure 3-21 : Volumetric H <sub>2</sub> production rate in conditions A and B and exogenous butyric acid concentration added in condition B (yellow dashes) during the stress-period (I), the transitional period (II) and the steady-state (III), respectively. The four samples used for microbial community characterization in conditions A and B are represented in black circle filled in grey to indicate their time of collection. ....	210
Figure 3-22 : Endogenous organic acids concentrations in A and B conditions and exogenous butyric acid concentration in condition B, during the periods I at day 2, II at day 5 and III (average of three samples taken during the steady-date period) of the fermentation. ....	213
Figure 3-23: Relative bacterial community abundance (%) in A and B conditions during the periods I (day 2), II (day 5), III-1 (day 8) and III-2 (day 12) ....	218
Figure 3-24 : Principal component analysis. a : individuals plot, b : variables plot ....	219
Figure 4-1 : Graphical abstract. ....	229
Figure 4-2 : Experimental setup ....	233
Figure 4-3 : H <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> concentrations evolution. Partial pressures of H <sub>2</sub> as a function of time (a). Partial pressure of H <sub>2</sub> as a function of cumulated H <sub>2</sub> divided by H <sub>max</sub> (%) (b). The coloured areas around the lines represent standard deviations. Dissolved concentration of H <sub>2</sub> and supersaturation factors at t <sub>1</sub> = 0.70 ± 0.03 day and t <sub>2</sub> = 1.72 ± 0.05 days (c). Dissolved	

concentration of CO <sub>2</sub> and supersaturation factors at t <sub>1</sub> = 0.70 ± 0.03 day and t <sub>2</sub> = 1.72 ± 0.05 days (d).....	242
Figure 4-4 : Bacterial community analysis. (a) Evolution of bacterial community over time at genus level (b) Difference between copy numbers per mL of sample of 16S Bacteria, FTHFS, and hydA genes at 0.95 ± 0.06 day and at the beginning of the fermentation (t <sub>0</sub> ) .....	248
Figure 4-5 : Schéma de fonctionnement du réacteur opéré en continu avec captage du CO <sub>2</sub> .....	253
Figure 4-6 : Illustration du plan expérimental appliqué pour évaluer l'effet des modifications de pressions partielles en H <sub>2</sub> et CO <sub>2</sub> en continu ainsi que l'effet du changement de condition opératoire au cours de la fermentation .....	254
Figure 4-7 : Vitesse de production d'H <sub>2</sub> volumique (par volume de milieu fermentaire) en fonction du temps de fermentation pour les conditions 1b_C (a), 0,5b_C (b), 1b_0CO <sub>2</sub> _C (c) et 0,5b_0CO <sub>2</sub> _C (d). Les barres rouges indiquent le moment où les conditions de fermentation ont été ramenées à 1 bar sans capture du CO <sub>2</sub> (i.e. dans des conditions similaires à celles appliquées en 1b_C).....	256
Figure 4-8 : Suivi des concentrations en métabolites majoritaires en fonction du temps pour les conditions 1b_C (a), 0,5b_C (b), 1b_0CO <sub>2</sub> _C (c) et 0,5b_0CO <sub>2</sub> _C (d). Un problème technique a rendu inexploitable les concentrations en acides organiques avant quatre jours en condition 1b_C, cette période a donc été hachurée. Les barres rouges indiquent le moment où les conditions de fermentation ont été ramenées à 1 bar sans capture du CO <sub>2</sub> (i.e. dans des conditions similaires à celles appliquées en 1b_C).....	260
Figure 4-9 : Conversion du substrat en métabolites quantifiés, en acétate, en butyrate, en lactate et en autres métabolites, pour les différentes conditions de fermentation. Les taux de conversions ont été calculés de six jours à la fin de la fermentation. ....	262
Figure 4-10 : Concentration cellulaire totale en fonction du temps de fermentation pour les différentes conditions de fermentation étudiées. Les barres d'erreurs indiquées ont sont des écart-types calculés à partir des écart-types de chaque PCR quantitative effectuée. ....	264
Figure 4-11 : Concentration relative à l'échelle de la famille en fonction du temps de fermentation, pour les différentes conditions de fermentation. Les traits rouges en pointillés indiquent les moments auxquels les changements de conditions expérimentales ont été effectués. ....	270
Figure 4-12 : Vitesses de consommation d'H <sub>2</sub> mesurée ex-situ en fonction des conditions expérimentales (1b_C, 0,5b_C, 1b_0CO <sub>2</sub> _C, 0,5b_0CO <sub>2</sub> _C) et du moment de prélèvement du milieu fermentaire (1 : avant 6 jours ; 2 : après 6 jours) en présence d'un ciel gazeux composé à 100 % de N <sub>2</sub> (N <sub>2</sub> ) ou enrichi en H <sub>2</sub> et CO <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub> ).....	276
Figure 4-13 : Concentrations en métabolites au début et à la fin des tests d'activité homoacétogène ex situ. 1b_C_1 (a); 0,5b_C_1 (b); 0,5b_C_2 (c) ; 1b_0CO <sub>2</sub> _C_1 (d); 1b_0CO <sub>2</sub> _C_2 (e); 0,5b_0CO <sub>2</sub> _C_1 (f); 0,5b_0CO <sub>2</sub> _C_2 (g). T <sub>0</sub> : concentrations initiales sans ajout d'H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> . T <sub>0</sub> + H <sub>2</sub> : concentrations initiales avec ajout d'H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> . N <sub>2</sub> : concentrations finales sans ajout d'H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> : concentrations finales avec ajout d'H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> . Les astérisques désignent les tests au cours desquels une consommation d'H <sub>2</sub> a été mesurée..	279

*Figure 4-14 : Concentrations en DCO sous la forme d'acides, d'alcools et d'H<sub>2</sub> au début des tests ex situ : en comptabilisant (DCO initiale + H<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>) ou non l'H<sub>2</sub> (DCO initiale N<sub>2</sub>); et en fin des tests ex situ : avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (DCO finale + H<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>) et sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (DCO finale N<sub>2</sub>). Les astérisques indiquent les tests auxquels ont été associés à une apparente consommation d'H<sub>2</sub>. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des concentrations mesurés dans les trois répliquas. .... 281*

*Figure 4-15 : Evolution de la concentration en gène FTHFS dans le milieu de culture en fonction du temps de fermentation, pour les différentes conditions. Les barres d'erreurs correspondent à des écarts-types calculés à partir de l'écart-type des PCRq. .... 283*



## Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Principales voies de production d'H <sub>2</sub> à partir du glucose en fermentation sombre .....	29
Tableau 1-2 : Voies métaboliques en compétition avec les voies de production d'H <sub>2</sub> en fermentation sombre.....	32
Tableau 1-3 : Équations empiriques, rendements en H <sub>2</sub> et microorganismes impliqués dans la production d'H <sub>2</sub> à partir de lactate.....	34
Tableau 1-4 : Voie majoritaires consommatrices d'H <sub>2</sub> en fermentation sombre (adapté à partir de Saady, (2013)).....	36
Tableau 1-5: Composition moyenne de la soupe de déconditionnement fournie par Methelec à l'institut Pascal - Clermond Ferrand en 2017. Tableau issu de Noblecourt et al. (2018) .....	44
Tableau 1-6 : Temps de génération et activité de différents micro-organismes présents dans les réacteurs de fermentation sombre .....	47
Tableau 1-7 : Concentrations dissoutes et sursaturations en H <sub>2</sub> et en CO <sub>2</sub> en digestion anaérobie.....	56
Tableau 1-8 : Résumés des études portant sur les effets des concentrations en H <sub>2</sub> et/ou en CO <sub>2</sub> en fermentation sombre.....	67
Tableau 1-9 : Etudes de l'influence des concentrations en gaz par diminution de pression conduites au LBE. Contexte expérimental et effets sur la production d'H <sub>2</sub> .....	71
Tableau 1-10 : Synthèse des résultats des études portées sur l'inhibition de la production d'H <sub>2</sub> par les acides organiques en fermentation sombre et en cultures mixtes.....	81
Tableau 1-11 : Synthèse des résultats des études portées sur l'inhibition de la production d'H <sub>2</sub> par les acides organiques sous forme non dissociée en fermentation sombre et en cultures mixtes. ....	84
Tableau 2-1 : Composition du milieu de culture défini utilisé lors de la fermentation du glucose .....	98
Tableau 2-2 : Composition nutritionnelle du mélange alimentaire reconstitué, de la soupe de déconditionnement reconstituée, du milieu de culture utilisé et des solutions d'alimentation .....	100
Tableau 2-3 : Caractérisation physico-chimiques du mélange alimentaire .....	101
Tableau 2-4 : Inocula utilisés au cours de cette thèse.....	102
Tableau 2-5 : Pressions minimales tolérées en fonction du modèle. Données fournisseur (Masterflex, 2022). ....	108
Tableau 2-6 : Protocole de réalisation des PCRq en fonctions des régions ciblées. ....	120
Tableau 2-7 : Nombre de copies 16S par cellule pour les OTUs majoritaires identifiés au cours de cette thèse .....	123
Tableau 2-8 : Synthèse des expériences présentées dans ce manuscrit. ....	130
Tableau 3-1 : Kinetic constants describing H <sub>2</sub> production: maximal H <sub>2</sub> production H <sub>c</sub> (mL <sub>H<sub>2</sub></sub> ·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> ), maximal H <sub>2</sub> production rate HPR (mL <sub>H<sub>2</sub></sub> ·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> ) and lag phase λ (days) at different concentrations of acetate, butyrate and lactate. The data are shown for	

<i>the different groups of quadruplicates (mean values and standard deviation). NA: not applicable. ....</i>	<i>145</i>
<i>Tableau 3-2 : Inhibition parameters of maximum HPR by acids and associated initial pH of fermentation in this study and in the literature .....</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 3-3 : Relative abundance of bacteria at genus or species level (%) of most represented OTUs depending on the concentration of acetate, butyrate and lactate. For each condition, all replicates for which a microbial community analysis was conducted are presented and separated by a vertical line. ....</i>	<i>156</i>
<i>Tableau 3-4 : Synthèse des effets des acides sur la croissance des OTUs majoritaires identifiés au cours de la fermentation en fonction de l'acide ajouté initialement. ....</i>	<i>166</i>
<i>Tableau 3-5 : Voies métaboliques de production d'H<sub>2</sub> à partir de glucose, de lactate ou de lactate et d'acétate, dans la littérature et dans cette étude. Les équations de réactions dans ce tableau sont référencées avec des lettres, de Equation 3-3-a à Equation 3-3-x ».....</i>	<i>186</i>
<i>Tableau 3-6 : Identification des OTUs majoritaires entrés en croissance en fermentation secondaire et caractéristiques de ces OTUs d'après la littérature. ....</i>	<i>188</i>
<i>Tableau 3-7 : Feedstock Characterization .....</i>	<i>205</i>
<i>Tableau 3-8 : Performances of the continuous fermentation in the periods I, II and III in conditions A and B.....</i>	<i>215</i>
<i>Tableau 3-9 : . Species abundances in periods I, II, III-1 and III-2 in conditions A and B and diversity indexes .....</i>	<i>222</i>
<i>Tableau 4-1 : Initial composition of the fermentation medium .....</i>	<i>232</i>
<i>Tableau 4-2 : Fitted gompertz parameters describing hydrogen production kinetics .....</i>	<i>238</i>
<i>Tableau 4-3 : Metabolic yields, hydrogen production efficiency (HPE) and substrate degradation efficiency (SDE) measured at at t1 = 0.70 ± 0.03 day and t2 = 1.72 ± 0.05 days for each condition. ....</i>	<i>244</i>
<i>Tableau 4-4 : Recensement des OTUs issus des expériences 1b_C, 0,5b_C, 1b_0CO<sub>2</sub>_C et 0,5b_0CO<sub>2</sub>_C appartenant aux genres identifiés comme comportant des espèces à activité homoacétogène.....</i>	<i>284</i>
<i>Tableau 4-5 : Concentrations cellulaires des espèces du genre Clostridium identifiées comme potentiellement homoacétogènes en fonction des conditions expérimentales .....</i>	<i>285</i>



## Liste des abréviations

English abbreviation	Abréviation française	English term	Terme français
<b>[CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub></b>	[CO <sub>2</sub> ] <sub>aq</sub>	Dissolved CO <sub>2</sub> concentration	Concentration en CO <sub>2</sub> dissous
<b>[H<sub>2</sub>]<sub>aq</sub></b>	[H <sub>2</sub> ] <sub>aq</sub>	Dissolved H <sub>2</sub> concentration	Concentration en H <sub>2</sub> dissous
<b>AFBR</b>		Fluidised Bed Reactor	Réacteur à Lit Fluidisé
<b>AnMBR</b>		Anaerobic Membrane Reactor	Réacteur à membrane anaérobie
<b>ANOVA</b>	ANOVA	Analysis Of Variance	Analyse de Variance
<b>ATP</b>	ATP	Adenosine Triphosphate	Adénosine Triphosphate
<b>BLAST</b>	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Outil d'alignement de séquences
<b>CG-ET</b>	HS-GC	Static Headspace Gas Chromatography	Chromatographie en phase gazeuse dans l'espace de tête statique
<b>CH<sub>4</sub></b>	CH <sub>4</sub>	Methane	Méthane
<b>CO<sub>2</sub></b>	CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide	Dioxyde de Carbone
<b>CoA</b>	CoA	Coenzyme A	Coenzyme A
<b>COD</b>	DCO	Chemical Oxygen Demand	Demande Chimique en Oxygène
<b>CSTR</b>		Continuous Stirred Tank Reactor	Réacteur continu à cuve agitée
<b>DF</b>		Dark fermentation	
<b>DNA</b>	ADN	Deoxyribonucleic Acid	Acide Désoxyribonucléique
<b>EGSBr</b>		Expanded Granular Sludge Bed Reactor	Réacteur à Lit de Boues Granulaires Expansées
<b>FC</b>	PAC	Fuel Cell	Pile à Combustible
<b>FCH-JU</b>		Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking	Alliance pour les piles à combustible et l'hydrogène
<b>Fdox</b>	Fdox	Oxidised Ferredoxin	Férrédoxine oxydée
<b>Fdred</b>	Fdred	Reduced Ferredoxin	Férrédoxine réduite
<b>FHL</b>	FHL	Formate Hydrogen Lyase	Formiate hydrogène lyase
<b>FW</b>		Food Waste	Biodéchet
<b>GC</b>	CPG	Gas Chromatography	Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>GHG</b>	GES	Greenhouse Gases	Gaz à Effet de Serre
<b>H<sub>2</sub></b>	H <sub>2</sub>	Dihydrogen (hydrogen by abuse of language)	Dihydrogène (hydrogène par abus de langage)
<b>HAc</b>	HAc	<i>Undissociated form of acetic acid</i>	<i>Forme non dissociée de l'acide acétique</i>
<b>HBu</b>	HBu	<i>Undissociated form of butyric acid</i>	<i>Forme non dissociée de l'acide butyrique</i>
<b>Hmax</b>	Hmax	Maximum Cumulative H <sub>2</sub> Production	Production d'H <sub>2</sub> Maximale Cumulée
<b>HPB</b>	HPR	Hydrogen Producing Bacteria	Bactéries Productrices d'H <sub>2</sub>
<b>HPLC</b>		High Performance Liquid Chromatography	Chromatographie Liquide à Haute Performance
<b>HPR</b>		Maximum H <sub>2</sub> Production Rate	Vitesse Maximale de Production d'H <sub>2</sub>
<b>HRT</b>	TSH	Hydraulic Retention Time	Temps de séjour hydraulique
<b>i.e.</b>	<i>i.e.</i>	Latin expression : that is to say	locution latine : c'est-à-dire
<b>IEA</b>	AIE	International Energy Agency	Agence Internationale de l'Energie
<b>LAB</b>		Lactic Acid Bacteria	Bactéries Lactiques

<b>MES</b>	<b>MES</b>	<b>2-(N-morpholino)ethanesulfonic Acid</b>	<b>Acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonic</b>
<b>N<sub>2</sub></b>	N <sub>2</sub>	Dinitrogen	Diazote
<b>NADH / NAD<sup>+</sup></b>	NADH / NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NCBI</b>		National Center for Biotechnology Information	Centre américain de données biotechnologiques
<b>NGS</b>	VGN	Natural Gas Reforming	Vaporeformage de Gaz Naturel
<b>OFMSW</b>	FFOM	Organic Fraction of Municipal Solid Waste	Fraction Fermentescible des Ordures Ménagères
<b>OLR</b>		Organic Loading Rate	Charge Organique
<b>pCO<sub>2</sub></b>	pCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> partial pressure	Pression Partielle en CO <sub>2</sub>
<b>PCR</b>	PCR	Polymerase Chain Reaction	Réaction en Chaîne par Polymérase
<b>PFL</b>	PFL	Pyruvate Formate Lyase	Pyruvate Formate Lyase
<b>PFOR</b>	PFOR	Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase	Pyruvate Ferrédoxine Oxydoreductase
<b>pH<sub>2</sub></b>	pH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> Partial Pressure	Pression Partielle en H <sub>2</sub>
<b>qPCR</b>	PCRq	Quantitative PCR	PCR Quantitative
<b>RNA</b>	ARN	Ribonucleic Acid	Acide ribonucléique
<b>RPM</b>	RPM	Rotations Per Minute	Rotations Par Minute
<b>SRB</b>	BSR	Sulphate-reducing bacteria	Bactéries Sulfatoréductrices
<b>STP</b>	CNTP	Standard Temperature and Pressure	Conditions Normales de Température et de Pression
<b>TAN</b>		Total ammonia nitrogen	Azote total
<b>TCD</b>		Thermal Conductivity Detector	Détecteur de conductivité thermique
<b>Toe</b>	Tep	Ton of oil equivalent	Tonne equivalent pétrole
<b>TS</b>	MS	Total solids	Matière sèche
<b>UASB</b>		Upflow sludge bed reactors	Réacteurs à lit de boues à flux ascendant
<b>USD</b>		American dollar	Dollar Américain
<b>VFA</b>	AGV	Volatil Fatty Acid	Acide Gras Volatil
<b>VS</b>	MV	Volatile Solids	Matière Volatile
<b>VSS</b>	MES	Volatile Suspended Solids	Matière En Suspension
<b>λ</b>	λ	Lag Phase before H <sub>2</sub> production	Latence avant production d'H <sub>2</sub>
<b>μGC</b>	μCPG	Micro Gas Chromatograph	Micro Chromatographe en Phase Gazeuse
	INRAE		Institut National de la Recherche pour l'Agriculture et l'Environnement
	LBE		Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement



## **Publications, communications et vulgarisation scientifiques**

---

A la date du dépôt de cette thèse, les travaux présentés dans le présent document et plus largement l'activité de recherche en lien avec la thématique présentée ont donné lieu aux communications suivantes.

### **Publications en revues à comité de lecture :**

Noguer MC, Escudié R, Bernet N, Trably E. Populational and metabolic shifts induced by acetate, butyrate and lactate in dark fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.163>.

Noguer MC, Magdalena JA, Bernet N, Escudié R, Trably E. Enhanced Fermentative Hydrogen Production from Food Waste in Continuous Reactor after Butyric Acid Treatment. *Energies* 2022; 15:4048. <https://doi.org/10.3390/en15114048>

Noguer MC, Perat L, Latrille E, Bernet N, Escudié R, Trably E. Boosting hydrogen-producing microbial community through CO<sub>2</sub> capture and low headspace pressure. *Soumission prévue à International journal of Hydrogen Energy* en octobre 2022.

Braga Nan L, Noguer M, Dauptain K et Trably E. Microbial and ecological aspects in biohydrogen production by dark fermentation. – In: *Microbiology of Green Fuels*, ed. Abu Yousuf and Elia Tomás-Pejó, CRC Press Taylor and Francis Group. 2022. *Chapitre de livre en cours d'édition*.

### **Communication orale en congrès international :**

Noguer MC, Perat L, Latrille E, Bernet N, Escudié R, Trably E. Improved hydrogen production from food waste through CO<sub>2</sub> capture and lowered pressure. *9th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation*, Copenhagen, June 26- June 30, 2022.

### **Communication orale en congrès national :**

Noguer MC, Escudié R, Bernet N, Trably E. Les inhibiteurs métaboliques induisent des changements populationnels en fermentation mixte microbienne. *16e Congrès National de la Société Française de Microbiologie*, Nantes, 22 - 24 septembre 2021.

### **Vulgarisation scientifique :**

Marie Noguer. Influence de sous-produits métaboliques inhibiteurs sur la production d'hydrogène par fermentation sombre en culture mixte microbienne. Ma thèse en 180 secondes. Finale Régionale Occitanie – Est 2022. Premier prix du jury. [https://www.youtube.com/watch?v=xfrVx5Qmox0&ab\\_channel=CampusMagOccitanie](https://www.youtube.com/watch?v=xfrVx5Qmox0&ab_channel=CampusMagOccitanie)

Marie Noguer. Influence de sous-produits métaboliques inhibiteurs sur la production d'hydrogène par fermentation sombre en culture mixte microbienne. Ma thèse en 180 secondes. Demie finale nationale. Totem de l'Institut des systèmes complexes, CNRS, Paris. 7 – 9 avril 2022.

### **Autre :**

Marie Noguer. Influence de sous-produits métaboliques inhibiteurs sur la production d'hydrogène par fermentation sombre en culture mixte microbienne. Journée de Filière APAB. Vendredi 24 juin 2022. Premier prix.





# Introduction

---

En France, en 2022, si vous interrogez au hasard un individu majeur sur ce qu'il sait de « l'hydrogène » (H<sub>2</sub>), vous aurez 84 % de chances pour qu'il en ait déjà entendu parlé, mais seulement 34 % déclareront savoir précisément de quoi il s'agit (Harris, 2022)<sup>1</sup>. Une majorité des sondés associeront la notion d'H<sub>2</sub> à l'énergie ou bien à l'eau (Harris, 2022). Parmi ceux déclarant être suffisamment informés sur l'H<sub>2</sub>, 88 % diront en avoir une bonne opinion, c'est-à-dire autant que pour la géothermie ou l'énergie solaire<sup>2</sup>. Après une brève mise-à-niveau non orientée sur la thématique H<sub>2</sub>, 87 % des sondés pensent que l'H<sub>2</sub> est « d'avenir » et « propre » (Harris, 2022). Enfin, 49 % le percevaient comme dangereux en 2021, mais ils ne sont plus que 36 % en 2022. L'H<sub>2</sub> bénéficie donc d'une image globalement positive auprès de la population française.

L'utilisation de l'H<sub>2</sub> par l'humanité n'est pas nouvelle. Il a transporté nos dirigeables aux 18 et 19<sup>e</sup> siècles et alimenté les premiers moteurs à combustion il y a plus de 200 ans. Depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle, il nous nourrit *via* la synthèse d'engrais ammoniacal et contribue à assouvir la demande énergétique mondiale grandissante *via* le raffinage du pétrole. Dans les années 60, il nous a emmenés sur la lune (International Energy Agency, 2019a).

La notoriété actuelle de l'H<sub>2</sub> est néanmoins à relier non pas à ses usages historiques mais plus probablement à l'identification de l'H<sub>2</sub> comme une technologie d'intérêt dans le cadre de la lutte contre le changement climatique. Dans le rapport du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) « Global Warming of 1.5°C » (GIEC, 2018) publié en 2018, il est écrit :

*« Dans les trajectoires qui limitent le réchauffement planétaire à 1,5 °C sans dépassement ou avec un dépassement minime, les émissions de CO<sub>2</sub> issues du secteur industriel seront, selon les projections, inférieures d'environ 65 à 90 % (intervalle interquartile) en 2050 par rapport à 2010 [...]. Ces baisses peuvent être accomplies grâce à un ensemble de technologies et de pratiques nouvelles ou déjà existantes, telles que l'électrification, l'hydrogène, les matières premières d'origine biologiques durables, les produits de substitution, ainsi que le captage, l'utilisation et le stockage du CO<sub>2</sub>. ».*

Plus récemment, dans le rapport du GIEC « Climate Change 2022 : Mitigation of Climate Change » (IPCC, 2022), le mot hydrogène est employé 1008 fois. Le développement de sa

---

<sup>1</sup> Sondage réalisé par Harris Interactive, en ligne, en janvier 2022, sur un échantillon de 1016 personnes représentatif de la population française majeure, commandité par Téréga. Les méthodes des quotas et de redressement ont été appliquées aux variables suivantes : sexe, âge, catégorie socioprofessionnelle et région de l'interviewé(e).

<sup>2</sup> Le sondage dont sont issues ces données fait une approximation, parlant « d'énergie hydrogène » et comparant l'hydrogène à de multiples sources d'énergie dans la première partie de l'étude, comme s'il en était une.

production par des méthodes peu émettrices de gaz à effet de serre y est identifié comme un enjeu fort pour la décarbonation des activités anthropiques, sous des aspects multiples :

- **La décarbonation de la production actuelle d'H<sub>2</sub>.**
- L'usage de l'H<sub>2</sub> pour le **stockage de l'énergie** pour les systèmes électriques à faible émission de carbone.
- L'usage d'H<sub>2</sub> en tant que **carburant dans des secteurs difficiles à décarboner**, sous la forme d'H<sub>2</sub> directement, mais aussi d'ammoniac ou d'autres vecteurs énergétiques.
- **L'alimentation de piles à combustible** dans le domaine du transport, particulièrement pour les véhicules utilitaires lourds.
- La **décarbonation de l'industrie de production d'acier.**
- La **production de molécules intermédiaires** (méthanol, éthanol et éthylène) via l'usage d'H<sub>2</sub> et de dérivés d'H<sub>2</sub> en tant que vecteurs énergétiques de substitution combinés à au captage du CO<sub>2</sub>.
- L'exploration de l'utilité de l'H<sub>2</sub> **dans le secteur du bâtiment.**

Des feuilles de routes pour le développement de la production et des usages de l'H<sub>2</sub> à l'échelle internationale ont été proposées depuis 2017 par divers organismes<sup>3</sup> (Blanco et al., 2018; Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019; International Renewable Energy Agency, 2018; Navigant, 2019; Press release Hydrogen Council, 2017) et projettent une augmentation de la part de l'H<sub>2</sub> dans la consommation finale d'énergie mondiale<sup>4</sup>, de 1 % actuellement (soit 8 EJ) (International Renewable Energy Agency, 2018) à 6 - 18 % d'ici 2050 (International Renewable Energy Agency, 2019). De plus, des stratégies nationales en faveur de la production et des usages de l'H<sub>2</sub> ont été annoncées depuis 2017 dans de nombreux pays (Japon, Corée du sud, Australie, Canada, Chili, République tchèque, France, Allemagne, Hongrie, Pays-Bas, Norvège, Portugal, Russie, Espagne, Royaume-Uni, Colombie) ainsi qu'à l'échelle de l'Union Européenne (*Global Hydrogen Review*, 2021). Il existe donc une dynamique actuelle forte en faveur du développement d'une production d'H<sub>2</sub> portée par la communauté scientifique, le monde industriel, les états et plébiscité par les citoyens<sup>5</sup>.

---

<sup>3</sup> Hydrogen Council, International Renewable Energy Agency, Fuel Cell and Hydrogen Joint Undertaking, Gas for Climate

<sup>4</sup> La consommation finale d'énergie se définit comme l'énergie totale consommée par les utilisateurs finaux, tels que les ménages, l'industrie et l'agriculture. Il s'agit de l'énergie qui atteint la porte du consommateur final et exclut celle qui est utilisée par le secteur énergétique lui-même. ("Glossary Eurostat: Final energy consumption," 2018)

<sup>5</sup> Tout du moins, en France.

Dans le cadre de la transition énergétique, le développement de la production d'H<sub>2</sub> prend néanmoins un sens uniquement si cette production est décarbonée. De nos jours, la production mondiale d'H<sub>2</sub> atteint environ 140 millions de tonnes par an, dont 10 millions de tonnes en Europe et 1 million de tonnes en France (FCHO, 2020; IRENA, 2022; Malbrunot, 2020). Or, 96 % de cet H<sub>2</sub> est produit à partir de ressources fossiles, à savoir principalement du gaz naturel, des hydrocarbures liquides ou du charbon (Malbrunot, 2020). Les procédés de production employés étant très émetteurs de CO<sub>2</sub>, la production mondiale d'H<sub>2</sub> actuelle est responsable de l'émission de plus de 830 millions de tonnes de CO<sub>2</sub> par an, ce qui correspond aux émissions additionnées de l'Indonésie et du Royaume Uni (International Energy Agency, 2019a), et à 2 % des émissions anthropiques de CO<sub>2</sub> totales (Friedlingstein et al., 2020). Il existe donc un enjeu majeur au caractère urgent de décarbonation des productions d'H<sub>2</sub> actuelles et futures.

Dans ce contexte, la matière organique constitue une ressource alternative aux hydrocarbures fossiles pour la production d'H<sub>2</sub>. Entre autres, l'H<sub>2</sub> peut être généré par un procédé biologique de dégradation de la matière organique en anaérobiose : la fermentation sombre. Dans ce type de bioprocédé, des bactéries fermentaires doivent éliminer un surplus d'électrons apporté par leur substrat pour croître. Ces électrons sont évacués *via* la production de sous-produits du métabolisme comme l'acétate, le butyrate, l'éthanol, le lactate, le CO<sub>2</sub>, et également l'H<sub>2</sub>. Ces bactéries fermentaires produisent jusqu'à 4 moles d'H<sub>2</sub> par mole de glucose, et vivent dans de nombreux écosystèmes microbiens comme le système digestif de mammifères et des termites, dans les sols et les marais, et sont donc facilement disponibles pour un usage biotechnologique.

Depuis une quinzaine d'années, ces écosystèmes microbiens ont été cultivés dans des bioréacteurs en conditions contrôlées afin d'étudier leurs capacités à produire de l'H<sub>2</sub>. En comparaison avec la culture de souches pures de microorganismes, ces cultures mixtes apportent diversité et redondance fonctionnelle, comme des activités hydrolytiques multiples, des capacités de production d'H<sub>2</sub> à partir de substrats variés ou encore une consommation de l'O<sub>2</sub> résiduel toxique. Cette diversité de fonctions est très intéressante pour valoriser de multiples substrats en H<sub>2</sub> tels que les déchets lignocellulosiques, la fraction fermentescible des ordures ménagères, les déchets alimentaires ou encore les déchets agro-industriels. La fermentation sombre en culture mixte permet ainsi, en plus de produire de l'H<sub>2</sub>, de valoriser les déchets. Cependant, les cultures mixtes présentent l'inconvénient d'être également composées de microorganismes délétères pour la production d'H<sub>2</sub> : (i) des bactéries consommant le substrat sans produire d'H<sub>2</sub>, comme les bactéries productrices de lactate, et (ii) des microorganismes consommateurs d'H<sub>2</sub>, comme des archées méthanogènes ou des bactéries à activité homoacétogène. Toutefois, des ajustements des conditions de fermentation (pH, temps de séjour) et des prétraitements peuvent être appliqués pour limiter la croissance de ces microorganismes délétères. Parmi les critères-clés en vue de la montée en échelle du procédé de fermentation sombre, l'amélioration des rendements en H<sub>2</sub> et leur stabilisation au cours du procédé apparaissent essentiels. En effet, les rendements en H<sub>2</sub>

expérimentaux sont souvent inférieurs aux rendements théoriques maximaux, et plusieurs phénomènes ont été identifiés comme responsables de ces limitations.

L'un des principaux verrous est l'accumulation de produits métaboliques dans le milieu de culture tels que les acides organiques, les alcools, le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> lui-même. Cette accumulation peut altérer l'activité microbienne de façon variable en fonction des espèces de microorganismes. A ce jour, en cultures mixtes, les études sur l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les produits métaboliques mènent à des conclusions disparates.

Par exemple, concernant les acides organiques, les seuils d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> ont été mesurés à moins de 10 mM ainsi qu'à plus de 100 mM selon l'étude considérée. Les connaissances des facteurs abiotiques, comme le pH ou la nature de l'acide, sont insuffisantes pour expliquer la variabilité des effets des concentrations variables en acides organiques. En effet, puisque les microorganismes ont des tolérances variables aux acides, la composition microbienne d'une culture mixte est probablement liée à la tolérance aux acides des espèces qui la composent.

L'accumulation d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> peut également affecter négativement la production d'H<sub>2</sub>. La diminution des concentrations de ces gaz a permis, selon diverses études, d'augmenter la production d'H<sub>2</sub>, parfois faiblement (+ 10 %) et parfois drastiquement (+ 1000 %). De nouveau, la connaissance des facteurs d'influence est insuffisante pour expliquer les effets variables des concentrations en gaz. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ces améliorations de la production d'H<sub>2</sub>. La diminution des concentrations en gaz peut, par exemple, favoriser leur production en réduisant les rétro-inhibitions, mais également réduire l'activité des microorganismes consommateurs d'H<sub>2</sub>. De nouveau, la composition microbienne de la culture mixte est probablement liée aux effets des concentrations en gaz, mais l'effet de ce paramètre reste encore mal compris.

Ainsi, les sous-produits métaboliques de l'activité microbienne fermentaire, qu'il s'agisse d'acides organiques ou de gaz de fermentation, peuvent affecter significativement la production d'H<sub>2</sub>. Les connaissances actuelles ne permettent pas de prédire les effets inhibiteurs de ces molécules ni de choisir la meilleure stratégie pour les réduire. Il existe donc un grand intérêt à approfondir notre compréhension des effets de ces produits métaboliques afin d'anticiper les limitations des rendements en H<sub>2</sub> et de sélectionner des stratégies de contrôle efficaces des concentrations en produits métaboliques.

Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre les effets des produits métaboliques majoritaires en fermentation sombre, à savoir l'acétate, le butyrate, le lactate, l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>, sur la production d'H<sub>2</sub> en culture mixte et d'investiguer l'intérêt de stratégies pour réduire leurs effets inhibiteurs. La méthodologie appliquée a consisté à analyser les communautés microbiennes afin de clarifier les liens entre ces-dites communautés et les produits métaboliques. Un modèle de substrat simple, du glucose, et un modèle de substrat complexe, un mélange de biodéchets reconstitué en laboratoire, ont été utilisés pour la production d'H<sub>2</sub>. Les expériences ont été conduites dans un premier temps en mode batch afin d'étudier les

mécanismes d'inhibition par les produits métaboliques. Dans un second temps, les expériences ont été conduites en mode continu afin d'évaluer les performances de stratégies de limitation des inhibitions sur une durée prolongée.

Le manuscrit est divisé en cinq chapitres.

Le **premier chapitre** est une revue de la littérature principalement portée sur la production d' $H_2$  par fermentation sombre et les inhibitions associées. Les modes de production et les usages de l' $H_2$  actuels et prospectifs sont tout d'abord présentés. Les connaissances fondamentales sur la fermentation sombre, comme les enzymes impliquées, les voies de production d' $H_2$ , la microbiologie en culture mixte et les principaux facteurs influençant le procédé sont ensuite exposés. Dans une troisième partie, les effets des acides organiques d'une part, et des gaz de fermentation d'autre part, sur l'activité bactérienne et la production d' $H_2$  sont décrits. Enfin, les stratégies existantes de levée de ces inhibitions sont abordées.

Le **second chapitre** présente les méthodes et dispositifs expérimentaux utilisés au cours de cette thèse.

Le **troisième chapitre** expose une première partie des résultats et discussions issus de l'étude des effets des acides sur la fermentation sombre et de l'intérêt de stratégies de levée des inhibitions par ces-dits acides. Trois parties distinctes composent cette section.

Premièrement, les effets des acides sur la fermentation du glucose (en batch) ont été étudiés. Une étude de la diversité de la communauté microbienne en fonction des stress appliqués a été réalisée afin de distinguer changements de communauté microbienne et changements de métabolisme cellulaire.

Considérant le potentiel d'adaptation des microorganismes en milieux stressants, la croissance d'espèces productrices d' $H_2$  résistantes aux acides a ensuite été étudiée *via* la fermentation prolongée en présence d'acides, à partir de glucose (en batch).

Enfin, la stratégie précédente ayant mis en évidence la croissance de microorganismes producteurs d' $H_2$  résistants, l'ajout transitoire d'acide au cours d'une fermentation continue alimentée par biodéchet a été expérimenté dans le but de favoriser le développement de microorganismes producteurs d' $H_2$  résistants.

Le **quatrième chapitre** décrit les résultats et discussions issus de l'étude des effets des gaz de fermentation ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) sur la fermentation sombre et de l'intérêt de la mise en œuvre de stratégies de levée des inhibitions par ces gaz. Deux parties distinctes composent cette section.

Tout d'abord, les effets de l' $H_2$  et du  $CO_2$  sur les voies métaboliques et les communautés microbiennes ont été étudiées à partir de biodéchets (en batch). Une méthode de mesure de l' $H_2$  et du  $CO_2$  dissous a été développée et des techniques physiques et génétiques de mesure

de l'activité homoacétogène ont été utilisées pour améliorer la compréhension des mécanismes en présence.

Enfin, la persistance des effets de la modification des concentrations en  $H_2$  et  $CO_2$  sur les voies métaboliques et les communautés microbiennes a été évaluée au cours d'une fermentation continue, à partir de biodéchet.

Enfin, une conclusion générale et des perspectives à ces travaux de recherche closent cette thèse.

## **1. Synthèse bibliographique**

---

Cette synthèse bibliographique est organisée en cinq parties. La première aborde les usages actuels et prospectifs de l'H<sub>2</sub>. La seconde est une vue d'ensemble des procédés de



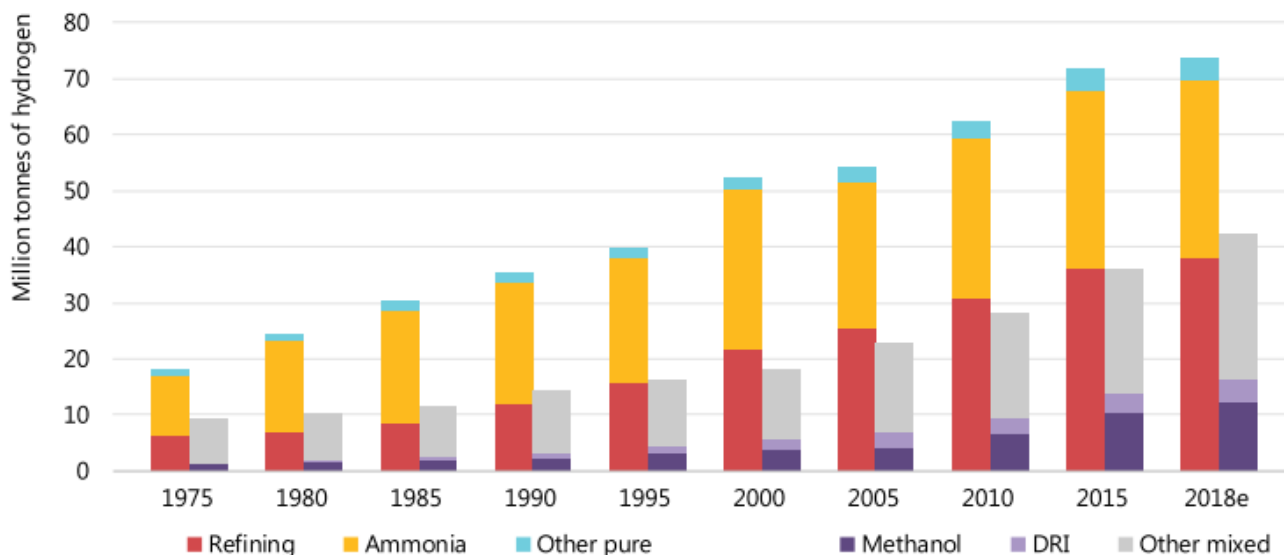
production d'H<sub>2</sub>. La troisième s'intéresse à la fermentation sombre : les enzymes, les voies métaboliques impliquées et sa microbiologie. Les paramètres opératoires d'intérêt pour sa mise en œuvre et l'optimisation de la production d'H<sub>2</sub> sont ensuite présentés dans une quatrième partie. Enfin, la dernière partie est focalisée sur les inhibitions de la production d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre et les stratégies de diminution de ces inhibitions. Un intérêt particulier est porté sur les produits de fermentation majoritaires : l'acétate, le butyrate, le lactate, l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>.

Une partie de cette synthèse est issue et adaptée de la publication : Braga Nan L., Noguer M., Dauptain K. et Trably E (2023) *Microbial and ecological aspects in biohydrogen production by dark fermentation*. – In : *Microbiology of Green Fuels*, ed. Abu Yousuf and Elia Tomás-Pejó, CRC Press Taylor and Francis Group. (Chapitre de livre révisé par les pairs et en cours d'édition).

## 1.1. Usages actuels et prospectifs de l'H<sub>2</sub>

### 1.1.1. Usages actuels

Les usages actuels de l'H<sub>2</sub> sont principalement industriels. En effet, 33 % permet le raffinage des hydrocarbures, 27 % la production d'ammoniac, 11 % la production de méthanol et 8 % la production d'autres molécules (Figure 1-1).



Notes: DRI = direct reduced iron steel production. Refining, ammonia and "other pure" represent demand for specific applications that require hydrogen with only small levels of additives or contaminants tolerated. Methanol, DRI and "other mixed" represent demand for applications that use hydrogen as part of a mixture of gases, such as synthesis gas, for fuel or feedstock.

**Figure 1-1 : Demande globale annuelle en hydrogène depuis 1975. Figure issue du rapport de l'IEA 2019 (International Energy Agency, 2019)**

- **Raffinage des hydrocarbures**

Dans le secteur du raffinage, l'H<sub>2</sub> est principalement utilisé pour éliminer les impuretés des hydrocarbures par hydrotraitement, et pour convertir les coupes lourdes par hydrocraquage. Lors de l'hydrotraitement, les impuretés principalement éliminées sont : le soufre, l'azote, l'oxygène, les oléfines et les métaux (Parkash, 2003). L'H<sub>2</sub> est également utilisé en plus petits volumes pour la transformation de sables bitumineux et dans l'hydrotraitement des biocarburants (International Energy Agency, 2019a). L'évolution de la consommation d'H<sub>2</sub> par les raffineries dépend d'effets multiples. En effet, d'un côté, la législation évolue en faveur d'une diminution du taux de soufre dans les carburants. De plus, la demande pour des produits de distillation légers augmente tandis que celle de produits lourds diminue, ce qui contribue à augmenter la consommation d'H<sub>2</sub> des raffineries. De l'autre côté, la progression de l'électrification et l'amélioration de l'efficacité énergétique doit tendre à réduire la consommation d'hydrocarbures, et donc consommation d'H<sub>2</sub>. Le scénario « Net Zero emissions » de l'AIE prévoit ainsi une tendance à la diminution du tonnage d'H<sub>2</sub> utilisé par les

raffineries entre 2020 et 2030, passant de 37 à 26 millions de tonnes (International Energy Agency, 2021).

Environ un tiers de l'H<sub>2</sub> utilisé dans les raffineries est un co-produit des autres étapes du raffinage. Le reste est obtenu soit par production sur site d'H<sub>2</sub> (40 %), principalement par vaporeformage de gaz naturel (VGN), soit, lorsque la raffinerie est située dans une zone industrielle dense où des réseaux d'H<sub>2</sub> existent, *via* l'achat d'H<sub>2</sub> marchand (25 %, comme au hub Amsterdam – Rotterdam – Antwerp). L'H<sub>2</sub> marchand est aussi principalement produit par VGN (International Energy Agency, 2019a). Pour les raffineries équipées d'une production d'H<sub>2</sub> sur site, le captage, l'utilisation et le stockage du carbone (CUSC) tendent à être la stratégie la plus efficiente économiquement pour réduire les émissions de CO<sub>2</sub>.

- **Industrie chimique**

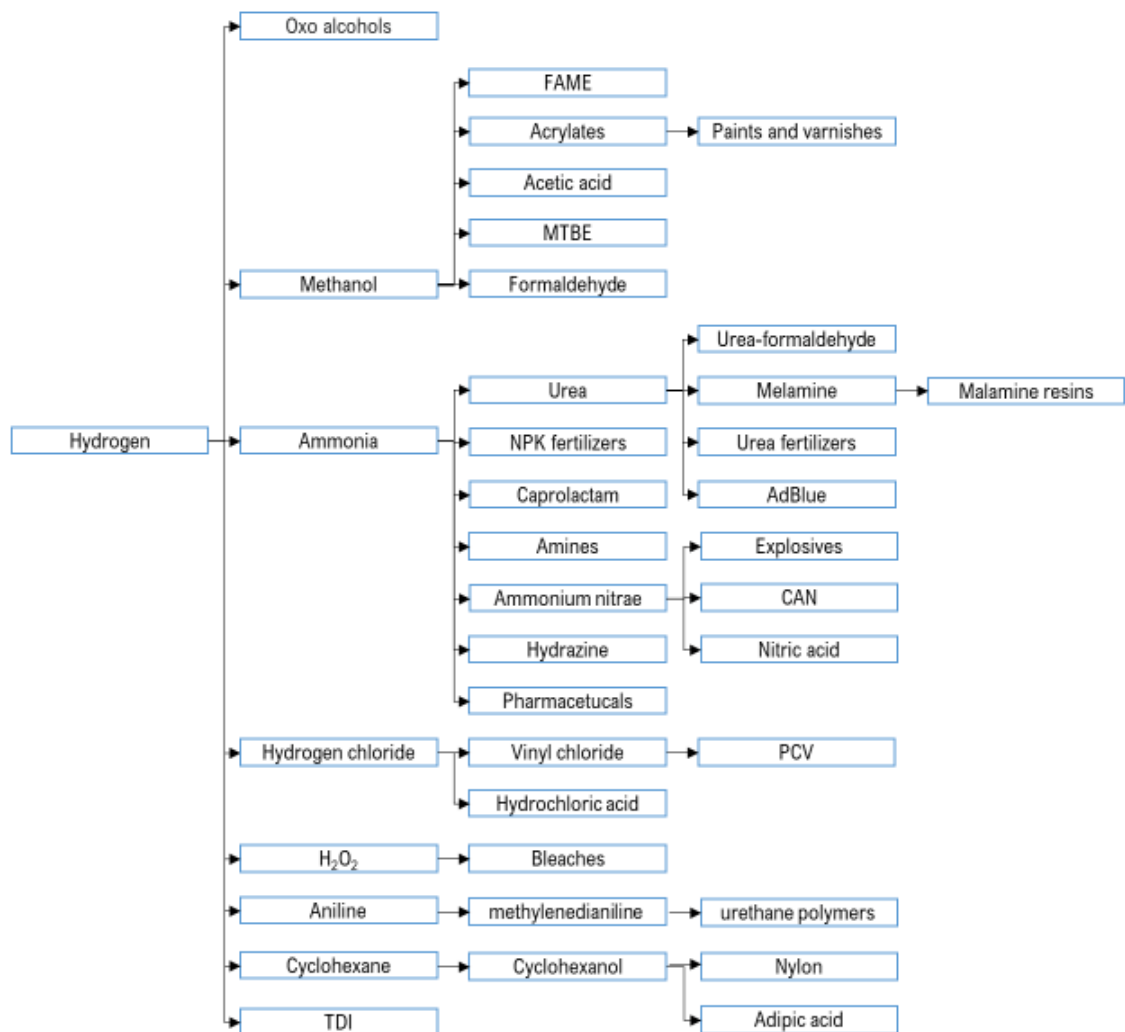
La synthèse d'une diversité importante de molécules nécessite l'utilisation d'H<sub>2</sub> (Figure 1-2, (Fuel cells and hydrogen observatory, 2021)). Ces molécules sont nécessaires pour la production de plastiques, d'engrais, de solvants ou encore dans d'explosifs (Fuel cells and hydrogen observatory, 2021). Par exemple, les productions annuelles d'ammoniac et de méthanol nécessitent respectivement plus de 31 et 12 millions de tonnes d'H<sub>2</sub> (International Energy Agency, 2019a) qui sont principalement générées par VGN dans le monde (> 90 %), à l'exception de l'Asie, où la gazéification du charbon prédomine (International Energy Agency, 2019a).

- **Ammoniac**

L'ammoniac est utilisé en grande partie pour produire des engrais. Il sert également à la fabrication d'explosifs ou de polymères et est retrouvé dans les cigarettes ou comme fluide frigorigène. Il est produit *via* le procédé Haber-Bosch par hydrogénation du diazote (N<sub>2</sub>) atmosphérique en présence d'un catalyseur selon la réaction suivante (Equation 1-1).



La réaction requiert 175 à 180 kg d'H<sub>2</sub> par tonne d'ammoniac (Fuel cells and hydrogen observatory, 2021). En Europe, la production d'ammoniac (9 500 tonnes / jour) est répartie dans 36 usines qui satisfont leur besoin en H<sub>2</sub> *via* une production sur site par vaporeformage ou oxydation partielle du gaz naturel (Fuel cells and hydrogen observatory, 2021).



○ Méthanol

**Figure 1-2 : Produits de l'industrie chimique dépendant de la production d'H<sub>2</sub>. Figure issue du rapport « Hydrogen supply and Demand » de l'organisation Fuel Cells and Hydrogen Observatory (Fuel cells and hydrogen observatory, 2021)**

Le méthanol est principalement utilisé directement comme désinfectant ou conservateur ou utilisé pour synthétiser du formaldéhyde (35 % du méthanol produit). Il est utilisé aussi pour la synthèse de résines et de polyols (application en isolation, plastiques, peinture, explosifs), de méthyl tert-butyl éther (19 %, MTBE, additif de l'essence et solvant en synthèse), d'acide acétique (10 %, utilisé en synthèse, dans l'alimentaire, le textile, comme agent de nettoyage, coagulant, bactériostatique), du méthacrylate de méthyle (3 %, MMA, plastiques) ou encore des methylamines (2 %, utilisé en synthèse) (Dalena et al., 2018). Les 24 % restants correspondent à une conversion du méthanol en d'autres molécules.

Le méthanol est le plus souvent produit par une succession de deux étapes. La première consiste à créer un gaz de synthèse (ou syngas), un mélange de CO et d'H<sub>2</sub>, *via* VGN ou gazéification du charbon (voir partie 1.2). Ensuite, le mélange CO / H<sub>2</sub> est introduit dans un réacteur de synthèse, où les réactions présentées en Equation 1-2 et en Equation 1-3 ont lieu, à 250 °C, en présence d'un catalyseur à base de cuivre (Vasconcelos and Lavoie, 2019).



La production d'une tonne de méthanol par ce procédé requiert 126 kg d'H<sub>2</sub>. 23 usines assurent la production méthanol en Europe et utilisent du gaz naturel ou du charbon pour la génération du gaz de synthèse.

- **Production de fer et d'acier**

La réduction directe du minerai de fer (*Direct Reduced Iron*, DRI) est une méthode de production d'acier. Trois pourcents de l'H<sub>2</sub> mondial (sous forme pure et mélangée) est utilisé au cours de ce procédé, ce qui en fait la 4<sup>e</sup> plus grande source de consommation d'H<sub>2</sub> (International Energy Agency, 2019a). L'H<sub>2</sub> est produit sur site, par VGN (75 %) ou gazéification de charbon (25 %). Ce procédé assure la production de 99 millions de tonnes d'acier par an, soit seulement 5 % de la production mondiale. La majeure partie du reste de la production (71 %) est assurée par la voie du haut fourneau à oxygène (*blast furnace-basic oxygen furnace*, BF-BOF). 23 % est assurée par la refonte de ferrailles d'acier dans un four à arc électrique (*electric arc furnace*, EAF).

- **Autres applications**

L'H<sub>2</sub> est également utilisé pour faire du peroxyde d'hydrogène (utilisé pour le blanchiment de la pâte à papier, dans l'industrie électronique, dans le traitement des eaux, en agroalimentaire), dans l'industrie du verre ou comme carburant pour lanceurs spatiaux.

#### 1.1.2. Perspectives d'usages de l'H<sub>2</sub> à vocation de décarbonation

L'intérêt porté actuellement sur l'H<sub>2</sub> vise d'une part à la décarbonation de son marché actuel mais également à la décarbonation d'autres secteurs (directement ou indirectement).

- **Production de fer et d'acier**

Actuellement, produire une tonne d'acier brut génère en moyenne 1,4 tonnes de CO<sub>2</sub>, sans prendre en compte la production d'électricité, ou les émissions associées à l'exploitation du gaz co-produit (« *works-arising gases* », WAG) (International Energy Agency, 2019a). Au total, la production d'acier est responsable de 6 % des émissions de CO<sub>2</sub> anthropiques mondiales (Liu et al., 2020). L'utilisation d'H<sub>2</sub> bas carbone est une piste d'intérêt pour décarboner le secteur de la production de fer et d'acier. En effet, il peut être utilisé en tant qu'agent réducteur pour remplacer le carbone (CO) utilisé pour réduire les oxydes de Fer selon l'Equation 1-4. On parle « *d'hydrogen metallurgy* » (Liu et al., 2020) :



L'apport d'H<sub>2</sub> en remplacement du carbone peut être partiel, ou total. En considérant un remplacement total, une production d'H<sub>2</sub> par électrolyse et une hypothèse de 55 kWh·kgH<sub>2</sub><sup>-1</sup>, il faut 3 TWh pour produire une tonne d'acier. Si la production annuelle mondiale d'acier était effectuée grâce à ce principe, il faudrait alors 3840 TWh d'électricité, soit presque 20 % de la production d'électricité mondiale annuelle (International Energy Agency, 2019a). L'H<sub>2</sub> pourrait aussi additionnellement être utilisé dans le secteur comme carburant pour générer la chaleur requise par le procédé.

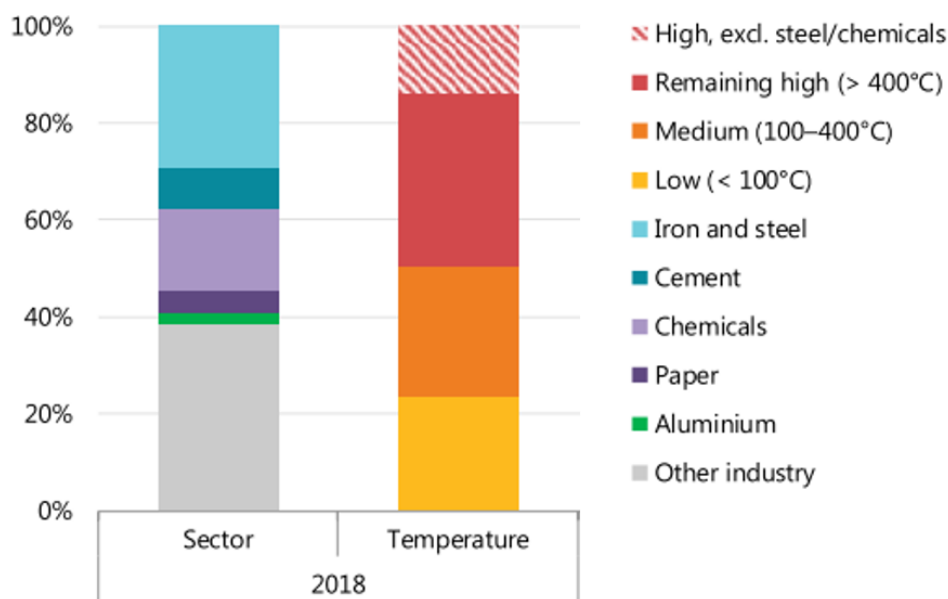
- **Chaleur industrielle**

L'utilisation de chaleur par l'industrie est à l'origine d'environ 10 % des émissions des gaz à effets de serre (GES) (Innovation for Cool Earth Forum, 2019), soit plus que l'aviation et le transport individuel combinés. Les énergies fossiles sont la première source de chaleur à haute température, avec 65 % provenant du charbon, 20 % du gaz naturel et 10 % du pétrole (International Energy Agency, 2019a). Cette chaleur peut être classée en trois gammes de températures : basse (< 100 °C), moyenne (100 – 400 °C) et haute (> 400 °C). La Figure 1-3 présente la répartition de la demande en chaleur en fonction du secteur et du type de chaleur. Les industries de l'acier et de la synthèse représentent à elles seules environ 50 % de toute la demande en chaleur industrielle.

La chaleur industrielle est ainsi principalement utilisée par des industries dites « lourdes » dont les caractéristiques rendent complexes la décarbonation du secteur (International Energy Agency, 2019a) :

- Ce sont des industries à fort investissement, nécessitant un temps long d'amortissement (donc peu évolutives).

- Les produits de ces industries sont commercialisés à l'échelle internationale et de faibles variations des coûts de production peuvent affecter fortement leurs compétitivités.
- Beaucoup de ces industries ne sont pas localisées près de ressources renouvelables d'énergie comme la biomasse ou un rayonnement solaire abondant.
- Ce sont souvent des industries dont l'activité peut être considérée comme relever de la sécurité nationale.



Source: IEA 2019. All rights reserved.

**Figure 1-3 : Demande en chaleur dans l'industrie en fonction du secteur et de la température.**  
Adaptée de IEA 2019, Figure 48.

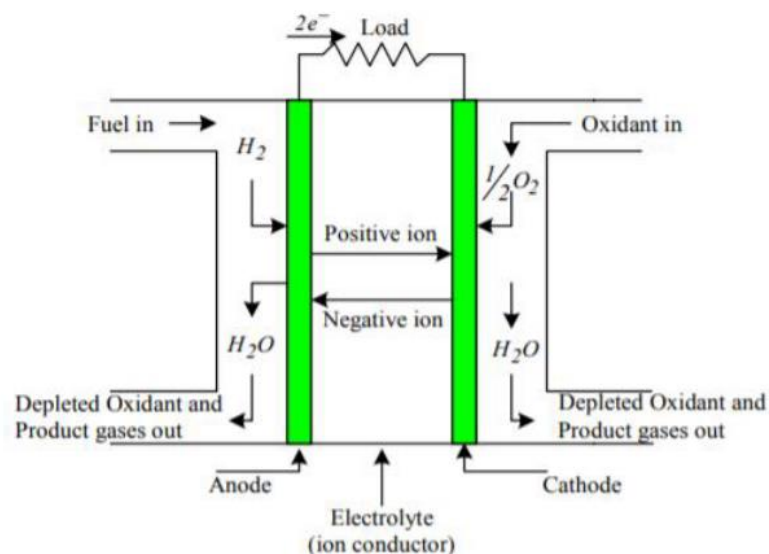
Les pistes de décarbonation de la chaleur industrielle incluent l'H<sub>2</sub> bas carbone, la biomasse, l'électrification, le captage et le stockage du carbone. L'intérêt de l'H<sub>2</sub> est que sa combustion génère de la chaleur sans émettre de CO<sub>2</sub>. Il peut potentiellement être utilisé comme carburant en remplacement du charbon, du pétrole et du gaz naturel. Dans le domaine de la synthèse chimique, il pourrait être utilisé dans les systèmes de chauffage industriels existants avec peu de modifications (Innovation for Cool Earth Forum, 2019). En revanche, dans beaucoup de secteurs, la spécificité des équipements de conversion d'énergie rend impossible un simple passage du gaz naturel / charbon à l'H<sub>2</sub>. Le rapport de l'IEA de 2019 (International Energy Agency, 2019a) sur l'H<sub>2</sub> présente notamment l'exemple de la complexité du remplacement des énergies fossiles par l'H<sub>2</sub> dans l'industrie du ciment : l'H<sub>2</sub> a une vitesse de combustion élevée par rapport aux autres combustibles utilisés, la flamme est non lumineuse et donc difficile à contrôler optiquement, le transfert par rayonnement de la

flamme générée est faible par rapport aux autres carburants, il peut provoquer de la corrosion et fragiliser les infrastructures en entrant en contact avec des métaux, etc.

- **Transport**

De nos jours, le secteur du transport est responsable de 20 % des émissions globales de GES, et d'un quart de la consommation énergétique mondiale (*Global Hydrogen Review*, 2021). Les dérivés du pétrole représentent 90 % des ressources énergétiques du secteur (*Global Hydrogen Review*, 2021).

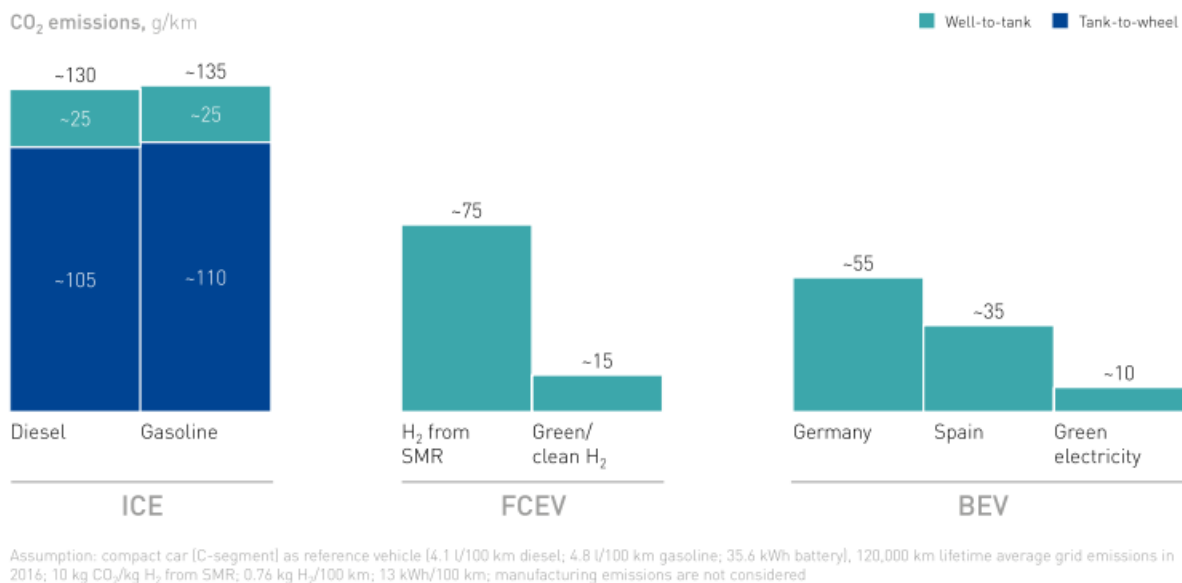
L' $H_2$  peut jouer un rôle majeur dans la décarbonation des transports *via* le développement de l'usage des piles à combustibles (PAC). Une PAC est composée d'une anode, une cathode et d'un électrolyte (Figure 1-4). L' $H_2$  alimente le compartiment anodique et de l'air / de l' $O_2$  pur alimente la cathode. A l'anode, les électrons sont séparés des ions  $H^+$  par une membrane. Les ions passent par la membrane jusqu'au compartiment cathodique où ils se recombinent avec l'oxygène pour produire de l' $H_2O$ . De l'électricité et de la chaleur sont générés au cours du processus (Manoharan et al., 2019).



**Figure 1-4 : Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible. Issue de (Kirubakaran et al., 2009)**

Cette technologie peut s'appliquer à différents modes de transports, comme les vélos, les voitures, les bus, les camions, les trains ou les bateaux. Pour assurer une mobilité *via* PAC, l' $H_2$  est stocké sous forme comprimée et l'électricité produite par la pile alimente un moteur électrique.

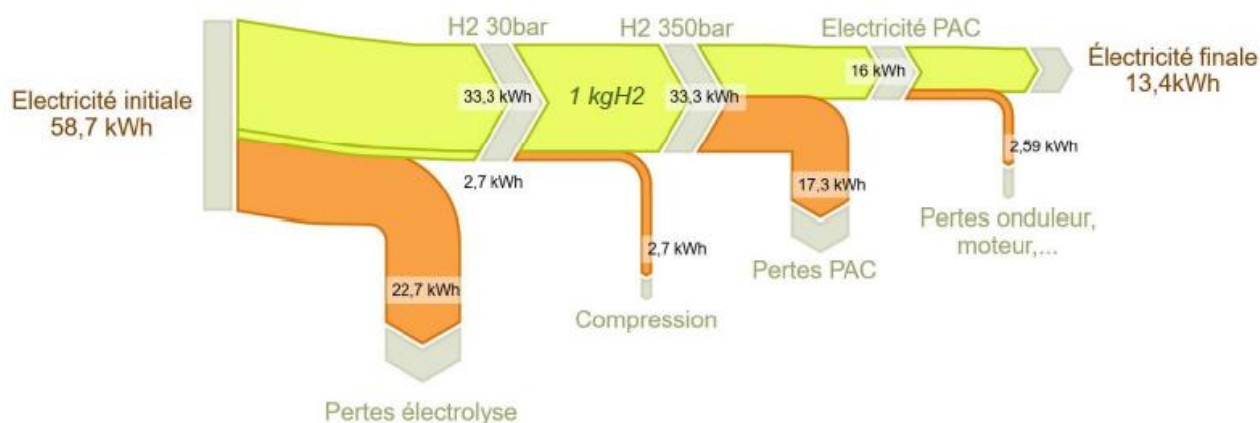




**Figure 1-5 : Comparaison des émissions de CO<sub>2</sub> en fonction de la motorisation, "du puits à la roue". ICE: Internal combustion Engine. FCEV: Fuel cell electric vehicle. BEV: Battery electric vehicle. SMR: reformage de gaz naturel. Figure issue de « Hydrogen Roadmap Europe: A Sustainable Pathway for the European Energy Transition” (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019). Hypothèses : Voiture de taille moyenne (C-Segment), 4,1L/100 km diesel, 4,8L/100 km essence, batterie de 35,6 kWh. 13 kWh/100 km. Émissions moyennes estimées en 2016 pour une durée de vie de 120 000 km. 10 kgCO<sub>2</sub>/kgH<sub>2</sub> par VGN. Les émissions de fabrication ne sont pas considérées.**

A l’heure actuelle, les mobilités basées sur l’utilisation des PAC (FCEV, fuel cell electric vehicle, en anglais) et sur des véhicules électriques à batterie (BEV, battery electric vehicle, en anglais) sont les deux technologies les plus avancées pour assurer une mobilité sans émissions de GES et d’oxydes d’azote (NO<sub>x</sub>) au cours du déplacement. Dans son rapport de 2019 (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019), la FCH-JU estime qu’en utilisant de « l’électricité verte » et de « l’H<sub>2</sub> vert », les émissions de CO<sub>2</sub> d’un véhicule à PAC et à batterie sont de 15gCO<sub>2</sub>·km<sup>-1</sup> et 10gCO<sub>2</sub>·km<sup>-1</sup> (Figure 1-5), respectivement (en prenant en compte les émissions liées à la production du carburant). Les auteurs de l’étude estiment également que la prise en compte des émissions de production des véhicules serait au bénéfice des véhicules à PAC puisque les PAC requièrent moins d’énergie à la production que les batteries.

Toutefois, si l’H<sub>2</sub> est produit à partir d’électricité *via* électrolyse de l’eau, la succession d’opérations appliquées aboutissent à un rendement de la chaîne H<sub>2</sub> (de l’électron à la mobilité) de seulement 25 % environ (ADEME, 2020) (Figure 1-6). En comparaison, le stockage par batterie présente un rendement de conversion de 70 %. Du point de vue énergétique, l’utilisation de batteries devrait donc être privilégiée lorsque cela est techniquement possible.

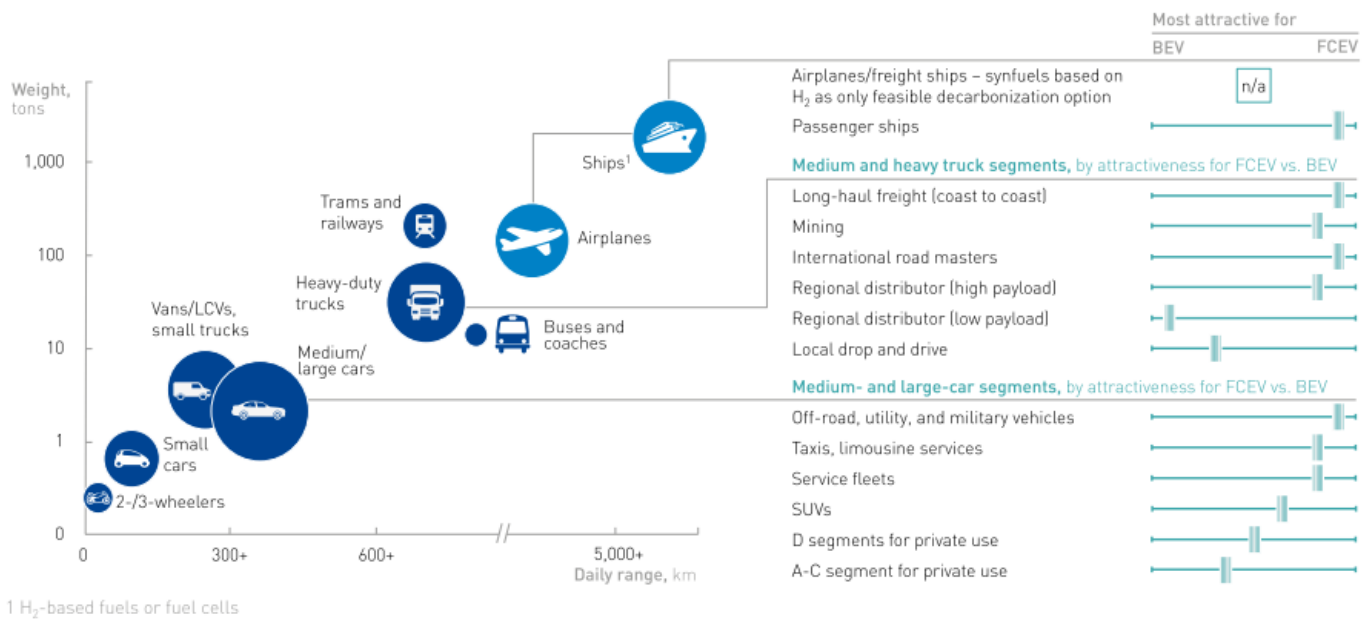


**Figure 1-6 : Diagramme de Sankey, exprimant l'énergie nécessaire pour produire un kg d'hydrogène, ainsi que l'énergie électrique résultante. Figure issue du rapport ADEME "Rendement de la chaîne H<sub>2</sub>" de 2020, Figure 2. (ADEME, 2020)**

Néanmoins, ces technologies sont davantage complémentaires qu'en compétition (Ademe, 2018). En effet, grâce à la densité énergétique plus élevée de l'H<sub>2</sub> par rapport aux batteries (en termes de volume et de poids), et puisque le poids et la taille d'un stockage énergétique sont limités dans un véhicule, les véhicules à PAC ont une charge utile et une autonomie plus élevée que les véhicules à batterie. Cela fait des véhicules à PAC une meilleure solution pour le transport lourd sur longues distances (camions et bus). A l'inverse, la batterie s'avère être une solution plus adéquate pour les véhicules de tourisme sur des trajets quotidiens (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019). L'infographie en Figure 1-7 issue du rapport 2019 de la FCH-JU résume la préférence technologique en fonction de la distance à parcourir et de la charge utile (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019).

Concernant le trafic ferroviaire, les PAC pourraient également apporter des solutions de mobilité bas carbone d'intérêt en substitution de l'électrification des voies et les trains électriques à batteries (conçus pour permettre le passage entre des zones tout électrique et des zones non électrifiées), notamment dans le cadre du fret à charge utile élevée (International Energy Agency, 2019b). Dans son rapport « The Future of Rail » de 2019, l'IEA présente une perspective d'évolution des coûts par kilomètre de différentes technologies : (i) 10 USD en train électrifié par caténaire, (ii) 12 USD en train à batterie sur courte distance de 400 km, (iii) 17 USD en train à batterie sur plus longue distance de 750 km et (iv) 8-9 USD en train à PAC (Page 85, fig. 2.15) (International Energy Agency, 2019b). En aviation, l'usage de carburants dérivés d'H<sub>2</sub> (« hydrogen-based liquid fuels ») fait également l'objet de recherches (International Energy Agency, 2019a).

Bubble color representing FCEV or synfuel application of H<sub>2</sub> ○ Bubble size roughly representing the annual energy consumption of this vehicle type in 2050



**Figure 1-7 : Préférence technologique en fonction de la distance à parcourir et de la charge utile. FCEV : Fuel cell electric vehicle, BEV : Battery electric vehicle. Figure issue de « Hydrogen Roadmap Europe: A Sustainable Pathway for the European Energy Transition », Exhibit 10 (Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019).**

- **Chauffage des bâtiments et usages domestiques**

Environ 22 % de la consommation d'énergie dans le monde sont dévolus au chauffage, à la production d'eau chaude et à la cuisson des aliments. Cela représente 2 200 millions de tonnes équivalent-pétrole (Tep) en 2017, dont la moitié vient de ressources fossiles, et plus particulièrement 620 millions de Tep du gaz naturel (International Energy Agency, 2019a). Environ 28 % des émissions de GES du secteur de l'énergie proviennent de l'utilisation d'énergie dans le secteur du bâtiment. L'H<sub>2</sub> pourrait être utilisé de différentes manières dans ce secteur :

- En mélange avec le gaz naturel présent dans le réseau. Ce mélange se fait actuellement à hauteur de 6 % d'H<sub>2</sub>. Des essais sont réalisés pour porter le taux d'H<sub>2</sub> dans le réseau de gaz naturel à 20 %.
- En produisant du méthane à partir d'H<sub>2</sub> bas carbone, puis en l'injectant dans le réseau de gaz.
- En usage direct (100 % H<sub>2</sub>), ce qui occasionnerait moins de pertes énergétiques qu'en effectuant une conversion de l'H<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub>, mais qui requiert des changements de réseaux et d'équipements.

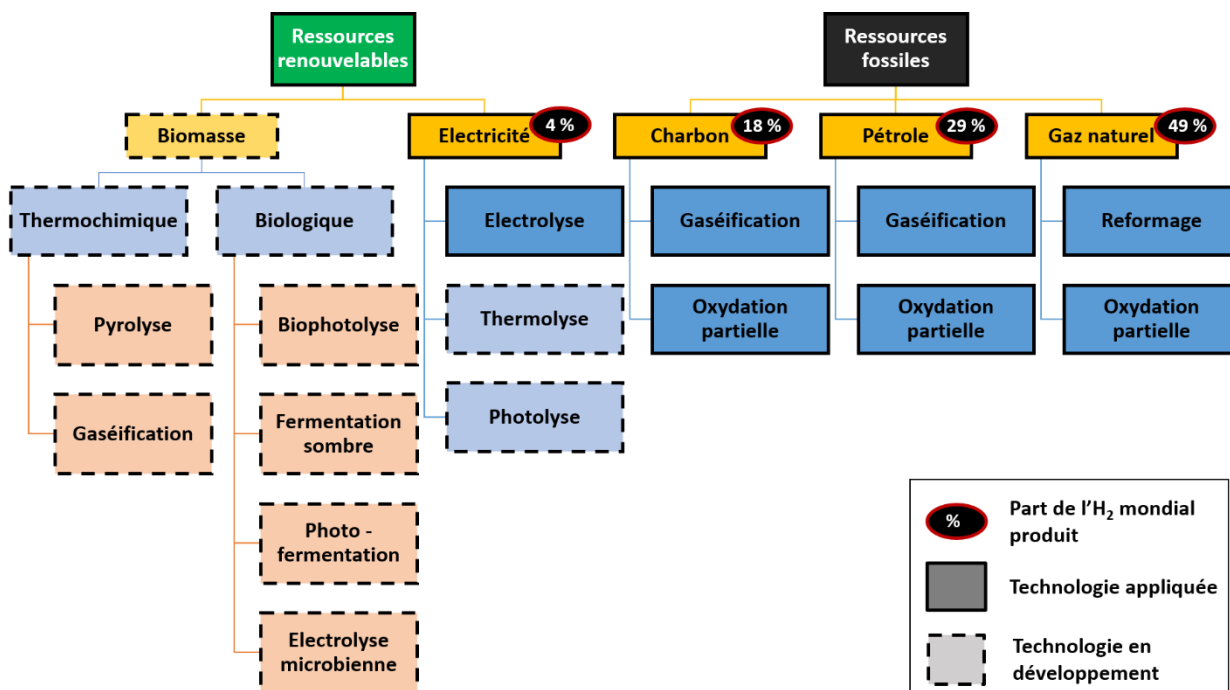
- Via une PAC et par co-génération, ce qui offre un service « multi-énergies » (chaleur + électricité).

- **Production et stockage d'électricité**

Enfin, avec l'augmentation de la part d'énergies non pilotables dans le mix électrique, comme l'éolien et le solaire, la flexibilité du réseau de distribution d'électricité diminue. L'H<sub>2</sub> et les carburants-dérivés-d'H<sub>2</sub> (CH<sub>4</sub>, ammoniac, etc.) sont des options potentielles pour stocker le surplus d'électricité produit sur le long terme et à grande échelle (International Energy Agency, 2019a).

### 1.2. Procédés de production d'H<sub>2</sub>

La production d'H<sub>2</sub> peut être réalisée à partir de ressources fossiles (gaz naturel, pétrole, charbon), ou à partir de ressources renouvelables (biomasse, eau) (Figure 1-8). Dans cette partie, les principaux procédés de production d'H<sub>2</sub> appliqués actuellement ainsi que des procédés de substitution potentiels sont présentés.



**Figure 1-8: Procédés de production d'H<sub>2</sub> majoritaires appliqués et en développement**

### 1.2.1. A partir de ressources fossiles

- **Vaporeformage de gaz naturel (VGN)**

Le vaporeformage du gaz naturel est le procédé le plus utilisé pour produire de l'H<sub>2</sub>. Durant le VGN, le gaz naturel est utilisé à la fois comme réactif et comme carburant pour la réaction. La part de gaz naturel brûlée pendant l'opération, pour fournir la chaleur nécessaire, est non négligeable, entre 15 % (ADEME, 2022) et 30 – 40% (International Energy Agency, 2019a). Le procédé consiste à faire réagir du méthane avec de la vapeur d'eau en présence d'un catalyseur, à haute température (840 – 950 °C) et sous pression (20 à 30 bars) (Equation 1-5).



Le monoxyde de carbone produit réagit aussi avec l'eau pour produire de l'H<sub>2</sub> (Equation 1-6, « water-gas shift reaction »).



En 2018, le prix de l'H<sub>2</sub> produit par VGN variait de 1,0 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> aux Etats Unis à environ 1,75 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> en Europe (International Energy Agency, 2019a). Les émissions du procédé en lui-même sont d'environ 9,5 kgCO<sub>2</sub>·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup>. Dans le rapport « Impact climatique de l'hydrogène "bleu" » (2022) (ADEME, 2022), il est estimé que le bilan du procédé monte à 11,7 kgCO<sub>2</sub>·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> en prenant en compte la production du CH<sub>4</sub>, son transport et son stockage.

- **Gazéification du charbon**

Il existe environ 130 usines de gazéification du charbon dans le monde, dont plus de 80 % sont localisées en Chine. *Via* ce procédé, 19 kg de CO<sub>2</sub> sont émis par kg d'H<sub>2</sub>, soit 2 fois plus que par VGN. En Chine, le procédé permet de produire l'H<sub>2</sub> pour un coût de 1 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> (International Energy Agency, 2019a). Le principe consiste à chauffer le charbon en présence d'O<sub>2</sub> et de vapeur d'eau (Equation 1-6, Equation 1-7) (International Energy Agency, 2019a).



## 1.2.2. A partir de ressources renouvelables

### 1.2.2.1. A partir de l'eau

- **Electrolyse**

L'électrolyse de l'eau est un procédé électrochimique séparant l'H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> (Equation 1-8), *i.e.* l'opposé du principe de la PAC précédemment présenté.



L'efficacité des électrolyseurs se situe actuellement entre 60 et 81 % en fonction de la technologie employée (International Energy Agency, 2019a). Actuellement, la capacité globale en électrolyseurs est de 290 MW, dont plus de 40 % sont situés en Europe, 9 % au Canada et 8 % en Chine (*Global Hydrogen Review*, 2021). Pour donner un ordre de grandeur, si la demande en H<sub>2</sub> mondiale devait être entièrement satisfaite par électrolyse de l'eau, cela requerrait 3600 TWh, soit plus que la consommation annuelle d'électricité de l'Union Européenne (International Energy Agency, 2019a). Le coût de l'H<sub>2</sub> par ce procédé varie de 4,2 à 23,3 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> en fonction de la source d'électricité et du dimensionnement de l'électrolyseur (Nikolaidis and Poullikkas, 2017). La consommation du procédé en eau est d'environ 9 L·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup>. L'usage d'eau salée n'est pas actuellement possible, provoquant de la corrosion et une production de chlore. En revanche, il est possible de coupler l'électrolyse à un procédé d'osmose inverse, avec un surcoût relativement mineur de 0,01-0,02 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> (International Energy Agency, 2019a).

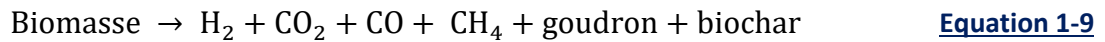
### 1.2.2.2. A partir de la biomasse

- **Voies thermochimiques**

Les procédés thermochimiques appliqués à la biomasse pour la production d'H<sub>2</sub> comprennent principalement la pyrolyse et la gazéification. Outre la production directe d'H<sub>2</sub>, ces deux procédés de conversion produisent notamment du CH<sub>4</sub> et du CO qui peuvent être convertis en H<sub>2</sub> par VGN et réaction du gaz à l'eau.

- **Pyrolyse**

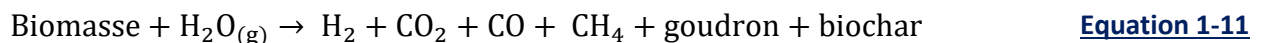
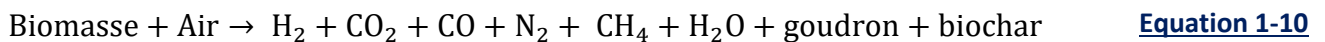
La pyrolyse de la biomasse est un processus thermochimique qui permet de générer des huiles liquides, du biocharbon et des composés gazeux en chauffant la biomasse à une température comprise entre 350 et 650 °C, sous une pression de 0,1 - 0,5 MPa, en absence d'O<sub>2</sub> (Equation 1-9) (Nikolaidis and Poullikkas, 2017).



Le rendement de la production d'H<sub>2</sub> à partir de la pyrolyse de la biomasse dépend du type de matière première, du type de catalyseur utilisé, de la température et du temps de séjour (Nikolaidis and Poullikkas, 2017). Le coût de production d'H<sub>2</sub> varie de 1,25 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup> à 2,20 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup>, en fonction de la taille de l'installation et du type de biomasse (Nikolaidis and Poullikkas, 2017).

- **Gazéification**

La gazéification de la biomasse est similaire au procédé de gazéification du charbon. Elle correspond à sa conversion thermochimique en un gaz de synthèse, en présence d'O<sub>2</sub> et/ou de vapeur d'eau. Elle a lieu à des températures comprises entre 500 et 1400 °C, à des pressions allant de 1 à 33 bars, en fonction de l'échelle de l'installation et de l'application finale du gaz de synthèse produit (Equation 1-10, Equation 1-11) (Nikolaidis and Poullikkas, 2017).



Le gaz de synthèse produit subit la même réaction à l'eau que lors de la pyrolyse pour être enrichi en H<sub>2</sub> (Equation 1-6). Le coût de production d'H<sub>2</sub> *via* ce procédé peut être estimé à 1,77 à 2,05 USD·kg<sub>H<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup>.

- **Voies biologiques**

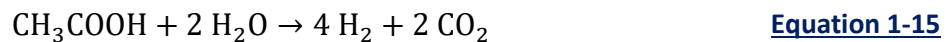
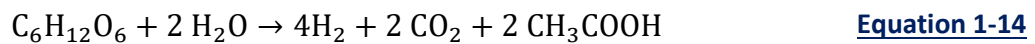
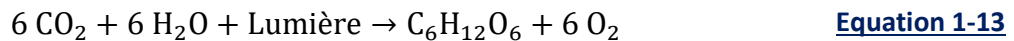
Les voies biologiques de production d'H<sub>2</sub> décrites dans cette partie sont des procédés qui font l'objet de recherches et qui sont actuellement non matures pour un développement industriel.

- **Biophotolyse**

Des organismes photoautotrophes (microalgues vertes et cyanobactéries) réalisent la biophotolyse directe en convertissant les molécules d'H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub> grâce à l'activité catalytique d'une enzyme, une hydrogénase (possédant un site métallique [Fe-Fe] ou [Ni-Fe]). Pour ce faire, ces microorganismes utilisent notamment l'énergie lumineuse dans des conditions anaérobies (Dinesh et al., 2018) (Equation 1-12).



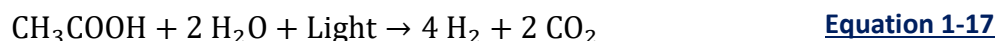
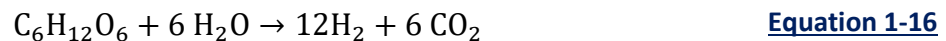
Alternativement, la biophotolyse indirecte se décompose en trois étapes. Des glucides tels que l'amidon et le glycogène sont accumulés par des organismes photoautotrophes en présence de lumière (Equation 1-13). Ces glucides sont ensuite consommés dans une deuxième étape en condition anaérobie et occasionnent alors la production d'H<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> et d'acétate (Equation 1-14). L'acétate produit peut être additionnellement consommé et occasionner la production d'H<sub>2</sub> au cours d'une troisième étape en présence de lumière (Equation 1-15) (Dinesh et al., 2018).



Dinesh et al. (2018) ont recensé des productivités volumiques en H<sub>2</sub> par biophotolyse de l'ordre de 0,4 à 7,91 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

- **Photofermentation**

La production d'H<sub>2</sub> par photofermentation est réalisée à partir de sucres ou d'acides organiques, en présence de lumière et en condition anaérobie, par les bactéries photosynthétiques comme les bactéries pourpres non sulfureuses et les bactéries sulfureuses vertes (Equation 1-16, Equation 1-17).



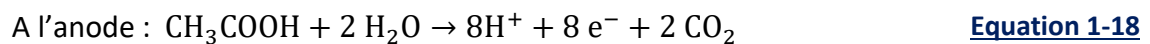
Les bactéries pourpres non sulfureuses des genres *Rhodobater*, *Rhodopseudomonas* ou *Rhodospirillum* par exemple, produisent de l'H<sub>2</sub> par photofermentation. Elles dégradent une grande diversité de substrat en H<sub>2</sub> grâce à une nitrogénase. Cette enzyme permet la fixation de l'azote, mais également une réduction des protons en H<sub>2</sub> en condition de carence



en azote. Des productivités en H<sub>2</sub> de l'ordre de 25-60 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> pour la photofermentation ont été rapportées par (Ghimire et al., 2015).

- **Electrolyse microbienne**

La production d'H<sub>2</sub> en cellule d'électrolyse microbienne repose sur l'utilisation de microorganismes pour catalyser des réactions biochimiques produisant des protons et des électrons par oxydation de la matière organique à une anode. Les protons générés migrent alors dans un compartiment abiotique où ils sont réduits en H<sub>2</sub> *via* l'application d'une faible tension entre anode et cathode (0,11 V) (Dinesh et al., 2018) (Equation 1-18, Equation 1-19). Les microorganismes utilisés à l'anode sont dits « électroactifs ». Les plus couramment retrouvés sont *Shewanella sp.* et *Geobacter sp.* (Osman et al., 2020).



Osman et al. rapportent des productivités volumiques en H<sub>2</sub> en cellule d'électrolyse microbienne de l'ordre de 0,1 – 8 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (Osman et al., 2020).

- **Fermentation sombre**

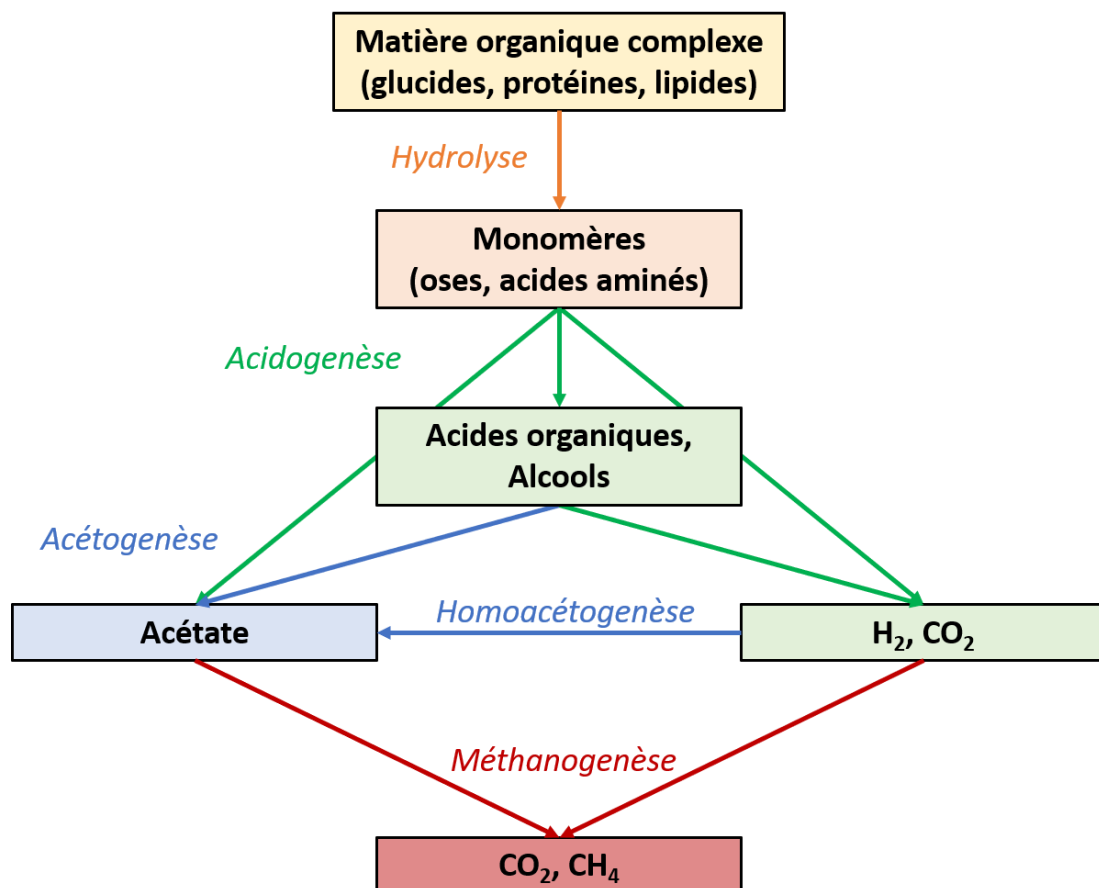
Une autre voie de production biologique d'H<sub>2</sub> repose sur l'activité de microorganismes hétérotrophes anaérobies : la fermentation sombre (Dinesh et al., 2018). Les microorganismes impliqués dans ce procédé sont des anaérobies stricts ou facultatifs, utilisant des hydrogénases pour assurer une production d'H<sub>2</sub>. Ghimire et al. (2015) rapportent des productivités volumiques en H<sub>2</sub> de l'ordre de 16 à 10 000 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Ce procédé, objet de cette thèse, est décrit plus en détails dans la partie suivante.

### 1.3. La Fermentation sombre

#### 1.3.1. Une sous-partie de la méthanisation

La fermentation sombre (*dark fermentation* en anglais, aussi parfois appelée fermentation obscure en français) est un processus microbien de dégradation anaérobie de la matière organique produisant de l'H<sub>2</sub>, du CO<sub>2</sub>, des alcools et des acides organiques. Elle correspond à une sous-partie du processus de digestion anaérobie aboutissant à la production de méthane dont la Figure 1-9 schématise les principales étapes.

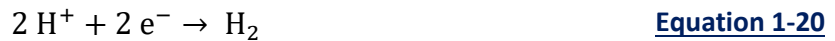
La matière organique suit une première étape d'hydrolyse qui la convertit en monomères et oligomères. S'en suivent les étapes d'acidogénèse et d'acétogénèse convertissant ces molécules en acides (acétate, butyrate, propionate), alcools (éthanol), H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. La fermentation sombre s'arrête à ces étapes. La dernière étape est celle de la méthanogénèse au cours de laquelle l'acétate, l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> sont convertis en CH<sub>4</sub> et en CO<sub>2</sub>. Dans les environnements naturels en anaérobie (tourbières, fonds des lacs etc.) ainsi que dans les digesteurs de méthanisation industriels, ces quatre étapes sont réalisées par un écosystème microbien composé de diverses espèces assurant des fonctionnalités redondantes et complémentaires. Cet écosystème est le siège de symbioses, par exemple entre les bactéries fermentaires productrices d'H<sub>2</sub> et les archées méthanogènes consommatrices d'H<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub> y joue le rôle d'un vecteur énergétique pour le transfert d'électrons entre espèces. L'arrêt de la digestion anaérobie à l'étape d'acidogénèse et d'acétogénèse est réalisable soit en appliquant un traitement à l'écosystème microbien, de manière à sélectionner les bactéries sporulantes et à éliminer les archées méthanogènes, responsable de la méthanogénèse, soit en appliquant des conditions opératoires défavorables aux méthanogènes.



**Figure 1-9 : Etapes de la digestion anaérobie.**

### 1.3.2. Les hydrogénases, enzymes clés de la production d'H<sub>2</sub>

La production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre est basée sur l'action d'un type de métalloenzymes appelées hydrogénases. Ces enzymes ont la capacité de réduire les protons en H<sub>2</sub> (Equation 1-20).



Elles sont classées en trois groupes, en fonction de la nature métallique de leur site actif : (i) les hydrogénases [Ni-Fe], (ii) les hydrogénases [Fe-Fe] et (iii) les hydrogénases [Fe]. Les hydrogénases [Fe-Fe] catalysent la réaction de réduction des protons en H<sub>2</sub> (Equation 1-20), tandis que les hydrogénases [Ni-Fe] catalysent également cette réaction tout en étant dotées d'une activité réversible. Enfin, les hydrogénases [Fe] sont principalement présentes chez les méthanogènes et ont des propriétés catalytiques différentes de celles des autres hydrogénases pour la fixation de H<sub>2</sub> (Calusinska et al., 2010; Dey et al., 2013; Heinekey, 2009).

Les hydrogénases [Ni-Fe] sont retrouvées chez les archées et les bactéries (Cadoux and Milton, 2020). Elles peuvent remplir plusieurs fonctions au sein de la cellule telles que (i) la production d'H<sub>2</sub>, chez des bactéries fermentaires comme *Escherichia coli* et chez des *Clostridium* sp. (Calusinska et al., 2010); (ii) l'oxydation de l'H<sub>2</sub>, principalement observée chez les archées méthanogènes hydrogénotrophes, les bactéries sulfato-réductrices, Fe<sup>3+</sup>-réductrices et dénitrifiantes, qui utilisent les électrons provenant de l'oxydation de H<sub>2</sub> pour produire de l'ATP (Vignais and Billoud, 2007) ; et (iii) la détection de l'H<sub>2</sub> dans l'environnement local de la cellule, pouvant déclencher une cascade de réactions impliquées dans l'activation des gènes codant pour les hydrogénases oxydant l'H<sub>2</sub> (Kim and Kim, 2011). Ce dernier type d'hydrogénases [Ni-Fe] est notamment présent chez des espèces comme : *Bradyrhizobium japonicum* ou *Rhodobacter capsulatus* (Shafaat et al., 2013).

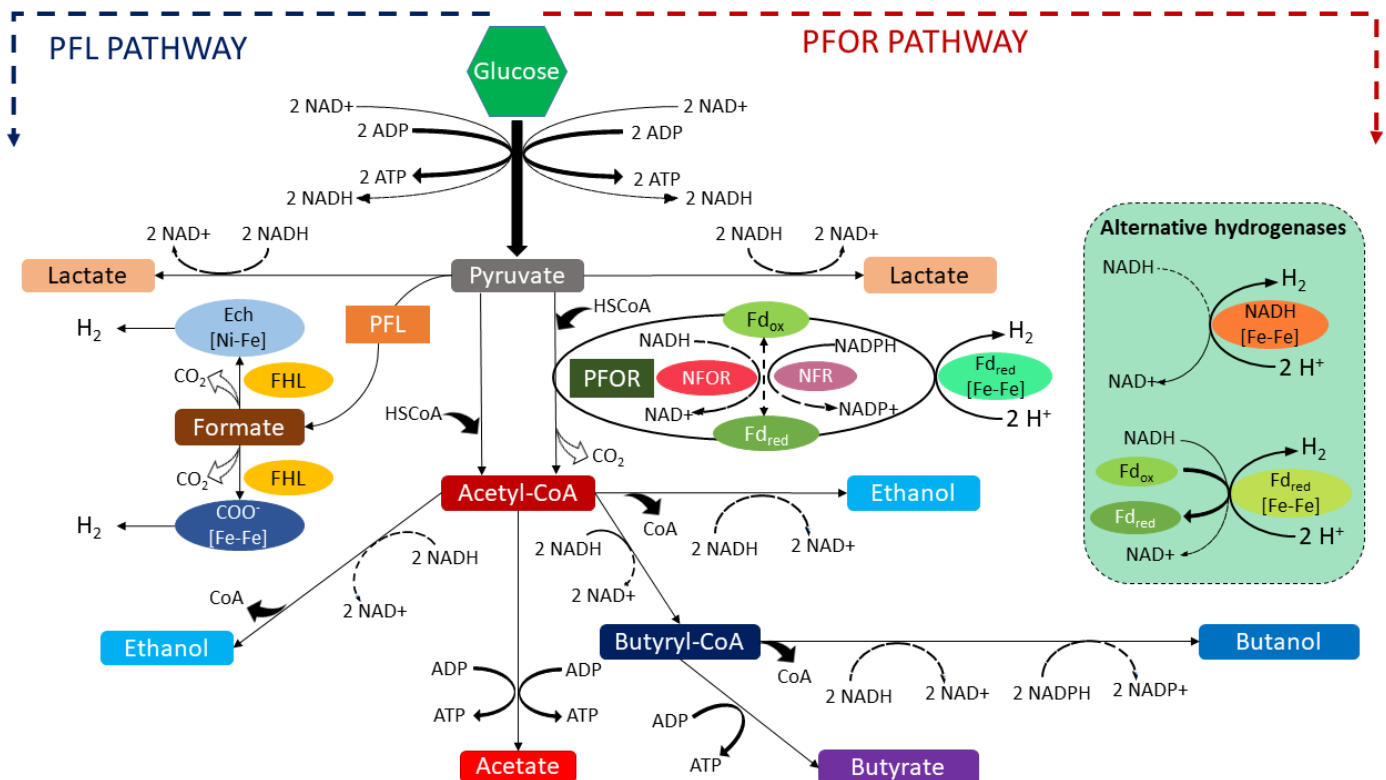
Les hydrogénases [Fe-Fe] sont couramment retrouvées chez les procaryotes anaérobies stricts, comme *Clostridium* sp. (Vignais and Billoud, 2007). Ce sont les seules hydrogénases que l'on trouve chez des eucaryotes. Ces enzymes agissent comme régulateurs de l'équilibre redox de la cellule. Leur principale fonction est de réduire l'excès d'électrons en H<sub>2</sub>, produit par le métabolisme des bactéries anaérobies fermentaires, comme *Clostridium* sp. ou par les chloroplastes de certaines microalgues vertes (Hallenbeck and Benemann, 2002; Vignais and Billoud, 2007). Dans les cellules, les électrons générés par le métabolisme cellulaire sont transportés par les ferrédoxines (Fd<sub>ox</sub>) ou les adénines dinucléotides (NAD(P)<sup>+</sup>) sous leurs formes réduites, c'est-à-dire Fd<sub>red</sub> et NAD(P)H<sup>+</sup> (Figure 1-10). Cependant, pour assurer l'équilibre de la cellule, les transporteurs réduits doivent être réoxydés en transférant les électrons à une autre molécule. Les hydrogénases [Fe-Fe] participent à la réoxydation de ces transporteurs en utilisant les électrons pour réduire les protons en H<sub>2</sub>.

### 1.3.3. Voies métaboliques de production d'H<sub>2</sub>

Deux voies principales de production d'H<sub>2</sub> ont été décrites (Figure 1-10) :

- la voie pyruvate-ferrédoxine-oxydoreductase, dite PFOR
- la voie pyruvate-formate-lyase, dite PFL.

Ces deux voies présentent des réactions initiales similaires avec la production de pyruvate à partir du glucose, par la voie d'Entner-Doudoroff également appelée glycolyse (Angenent et al., 2004). Le Tableau 1-1 résume les réactions de production d'H<sub>2</sub>, les voies métaboliques associées et un exemple de micro-organisme impliqué pour les voies PFOR et PFL.



**Figure 1-10 : Principales voies de production d'H<sub>2</sub> à partir du glucose. PFL: pyruvate-formate-lyase, FHL: formate-hydrogène-lyase, PFOR: pyruvate-ferrédoxine-oxydoreductase, NFOR: NADH-ferrédoxine oxydoreductase, NFR: NADH-ferrédoxine réductase. Adapté de Ramírez-Morales et al. (2015); Tapia-Venegas et al. (2015).**

Par la voie PFOR, le pyruvate est transformé en acétyl-CoA et en CO<sub>2</sub>, générant une ferrédoxine réduite (Fd<sub>red</sub>), qui est ensuite oxydée par une hydrogénase [Fe-Fe] dépendante de la ferrédoxine pour produire de l'H<sub>2</sub>. L'acétyl-CoA issu de cette réaction est ensuite oxydé en acétate pour former un ATP. Une production d'H<sub>2</sub> supplémentaire peut provenir de l'activité d'une hydrogénase [Fe-Fe] dépendante du NADH et de la ferrédoxine (hydrogénase

alternative  $Fd_{red}[Fe-Fe]$ ). A des pressions partielles en  $H_2$  ( $p_{H_2}$ ) très faibles, *i.e.* inférieures à 0,02 - 1,5 mbars (Jay et al., 2020), la réoxydation du NADH produit pendant la glycolyse par une hydrogénase  $[Fe-Fe]$  dépendante du NADH (hydrogénase alternative NADH- $[Fe-Fe]$ ) peut également avoir lieu. Par conséquent, si tout le NADH est oxydé par les hydrogénases, le rendement théorique maximal en  $H_2$  est de  $4 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$  (Equation 1-21, Tableau 1-1). Cependant, aux  $p_{H_2}$  usuelles de fermentation (0,2 – 0,7 bar), le NADH est régénéré par la réduction de l'acétyl-CoA en d'autres métabolites, comme le butyrate, ce qui réduit le rendement en  $H_2$  à  $2 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$  (Equation 1-22) (Dessi et al., 2018b). Ainsi, les produits les plus courants de la fermentation sombre sont l'acétate et le butyrate (Hawkes et al., 2007).

Par la voie PFL, le pyruvate est transformé en acétyl-CoA et en formiate. Ensuite, le formiate est converti en  $H_2$  et  $CO_2$  par un complexe enzymatique, composé de l'enzyme formiate-hydrogène lyase (FHL) et d'une hydrogénase  $[Ni-Fe]$  dépendante du formiate (appelée hydrogénase Ech) ou d'une hydrogénase  $[Fe-Fe]$  dépendante du formiate, selon le micro-organisme impliqué (Hallenbeck et al., 2012; Estela Tapia-Venegas et al., 2015). L'acétyl-CoA est ensuite converti en acétate, en butyrate, en éthanol ou en butanediol selon le microorganisme et ses conditions environnementales (Li and Fang, 2007). Les microorganismes produisant de l' $H_2$  par la voie PFL, principalement les bactéries anaérobies facultatives, n'ont pas les hydrogénases nécessaires pour transformer le NADH en  $H_2$  et sont donc limités à un rendement maximal de  $2 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$  (Equation 1-23) (Ghimire et al., 2015; Hallenbeck et al., 2012).

En culture mixte, la combinaison des différentes voies métaboliques permettant aux cellules d'équilibrer leur redox et d'assurer leur croissance dans des conditions usuelles de fermentation peut aboutir à un rendement de  $2,5 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ mol}_{butyrate} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$  et  $0,5 \text{ mol}_{Acetate} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$  (Ghimire et al., 2015) (Equation 1-24). Néanmoins, les rendements réels observés en  $H_2$  sont plus faibles, variant entre 0,5 et  $2,5 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{glucose}^{-1}$ . Ceci est notamment lié aux faibles concentrations maximales en  $H_2$  requises pour atteindre les rendements maximums, condition difficile à atteindre dans des fermenteurs producteurs d' $H_2$  (Castelló et al., 2020). De plus, les réacteurs de fermentation sont généralement inoculés avec des cultures mixtes qui présentent les avantages d'une certaine flexibilité métabolique et de robustesse, mais l'inconvénient d'incorporer dans le fermenteur des bactéries indésirables, telles que les bactéries consommatrices d' $H_2$  ou non productrices d' $H_2$  en compétition pour le substrat. Ces bactéries peuvent supplanter les bactéries productrices d' $H_2$  et réduire les rendements en  $H_2$  (E. Tapia-Venegas et al., 2015).

**Tableau 1-1 : Principales voies de production d'H<sub>2</sub> à partir du glucose en fermentation sombre**

Type de fermentation	Equations avec rendements en H <sub>2</sub> théoriques maximaux	Bactéries	Voie	N°
Acétate	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 2 CO_2 + 4 H_2$	<i>Clostridium</i> sp.	PFOR	<a href="#">Equation 1-21</a>
Butyrate	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$	<i>Clostridium</i> sp.	PFOR	<a href="#">Equation 1-22</a>
Acétate + Ethanol	$C_6H_{12}O_6 + 3H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$	<i>Enterobacter</i> sp.	PFL	<a href="#">Equation 1-23</a>
Acétate + Butyrate	$4 C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 3 CH_3CH_2CH_2COOH + 2 CH_3COOH + 6 CO_2 + 10 H_2$	Culture mixte	mixte	<a href="#">Equation 1-24</a>

#### 1.3.4. Microbiologie de la fermentation sombre

La montée en échelle du procédé de fermentation est plus facilement réalisable avec des cultures mixtes qu'avec des cultures pures, car les conditions stériles ne sont pas nécessaires (Castelló et al., 2020). De plus, la diversité microbienne dans les cultures mixtes apporte de la flexibilité métabolique, de la robustesse, de la redondance de fonctions et facilite la dégradation et la conversion en H<sub>2</sub> des substrats complexes. Par exemple, la présence de microorganismes du genre *Bacillus* peut aider les bactéries fermentaires productrices d'H<sub>2</sub> (*Hydrogen producing bacteria*, HPB) en libérant des enzymes hydrolytiques qui dégradent les substrats complexes comme la lignine, l'amidon ou la cellulose, augmentant ainsi la quantité de glucides facilement dégradables (Liu and Wang, 2012; Mugnai et al., 2021). Les bactéries anaérobies facultatives peuvent également consommer les traces d'oxygène et favoriser la croissance des bactéries à haut rendement anaérobies strictes, telles que *Clostridium* sp. en créant des environnements locaux hautement anaérobies (Chong et al., 2009).

En contrepartie, la diversité microbienne peut également nuire au processus de production d'H<sub>2</sub>. L'un des principaux inconvénients de l'utilisation de cultures mixtes est notamment la prévalence de microorganismes qui concurrencent les bactéries productrices d'H<sub>2</sub> pour le substrat organique, ou qui consomment l'H<sub>2</sub> produit, diminuant les rendements en H<sub>2</sub> (Cabrol et al., 2017).

##### 1.3.4.1. Bactéries productrices d'H<sub>2</sub> – HPB

Diverses bactéries et archées anaérobies fermentatives sont capables de produire de l'H<sub>2</sub>. Ces microorganismes peuvent être anaérobies stricts ou facultatifs (Łukajtis et al., 2018).

Parmi les microorganismes anaérobies stricts capables de produire de l'H<sub>2</sub>, les membres du genre *Clostridium* (phylum Firmicutes) sont considérés comme les producteurs d'H<sub>2</sub> les plus

efficaces, car ils sont généralement associés à des rendements et des productivités élevés en H<sub>2</sub> (Palomo-Briones et al., 2017).

Une caractéristique importante des espèces du genre *Clostridium* est leur capacité à sporuler, leur permettant de survivre à des conditions difficiles, comme un pH faible ou élevé, une température extrême, une absence d'eau ou une exposition à des produits chimiques toxiques. Grâce à cette caractéristique, elles peuvent être sélectionnées et séparées des bactéries non sporulantes par un traitement adapté de l'inoculum (Bundhoo et al., 2015). En outre, elles ont la capacité de fermenter une grande variété de sucres et de produire de l'H<sub>2</sub> plus efficacement que les bactéries anaérobies facultatives (Łukajtis et al., 2018). Ainsi, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* sont les organismes producteurs d'H<sub>2</sub> les plus étudiés. En raison de la versatilité du métabolisme du genre *Clostridium*, le type de substrat et les conditions de fermentation déterminent quels métabolites sont coproduits avec l'H<sub>2</sub> (Castelló et al., 2020). En outre, certaines réactions métaboliques délétères pour la production d'H<sub>2</sub> peuvent également se produire avec certains membres du genre *Clostridium*. Par exemple, à un pH faible et à des concentrations élevées en sucres, *C. acetobutylicum* peut passer de la production de butyrate et d'acétate, voies productrices d'H<sub>2</sub>, à la production d'acétone et de butanol (Xue and Cheng, 2019), réaction appelée « solvantogénèse ». Certaines espèces du genre *Clostridium*, par exemple *C. aceticum*, *C. ljungdahlii* et *C. carboxidivorans*, peuvent également consommer directement l'H<sub>2</sub> en fixant du CO<sub>2</sub> pour produire de l'acétate par homoacétogénèse (Drake, 1991; Lazaro et al., 2014).

D'autres bactéries anaérobies obligatoires non sporulantes ont également été signalées comme produisant efficacement de l'H<sub>2</sub> (Cabrol et al., 2017). Au sein du phylum des Firmicutes, *Ethanoligenens harbinense* s'est avérée dominante dans les réacteurs producteurs d'H<sub>2</sub> avec une fermentation productrice d'éthanol à un pH acide (<3,0 - 4,5) (Mota et al., 2018; Ren et al., 2007). *E. harbinense* produit de l'H<sub>2</sub> ainsi que de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> par la voie PFOR (Li et al., 2019).

Certaines bactéries anaérobies facultatives produisent aussi de l'H<sub>2</sub>. Les espèces de *Bacillus* (appartenant à la famille des *Bacillaceae* et au phylum Firmicutes), telles que *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cloacae*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus polymyxa* effectuent une fermentation mixte lorsqu'elles se développent sans O<sub>2</sub>, produisant de l'H<sub>2</sub> et des acides organiques (Kotay and Das, 2007; Łukajtis et al., 2018; Patel et al., 2014; Song et al., 2013).

De même, les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (appartenant au phylum Proteobacteria), telles qu'*Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Shigella sp.*, *Citrobacter sp.*, entre autres, effectuent des fermentations mixtes générant H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, éthanol, succinate, lactate et acétate. Les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ainsi que certaines espèces de *Bacillus sp.* produisent de l'H<sub>2</sub> par la voie PFL (Cabrol et al., 2017). Ces

bactéries facultatives présente des avantages, par rapport aux anaérobies obligatoires, de résistance à l'O<sub>2</sub> et de capacités hydrolytiques (Łukajtis et al., 2018; Patel et al., 2014).

Les microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> thermophiles et hyperthermophiles, tels que *Thermoanaerobacter sp.* et *Thermotoga sp.*, présentent les rendements en H<sub>2</sub> les plus élevés (Verhaart et al., 2010). Ces microorganismes se développent à des températures supérieures à 60 °C, qui sont thermodynamiquement plus favorables à la production d' H<sub>2</sub>, car la conversion du sucre en acétate est énergétiquement de plus en plus favorable à mesure que la température augmente (Stams, 1994). Par exemple, *Thermotoga sp.* (appartenant à l'embranchement des Thermotogae) et *Thermoanaerobacter sp.* (de l'embranchement des Firmicutes) recyclent presque tous leurs équivalents réducteurs (NADH et Fd<sub>red</sub>) générés pendant la glycolyse en formant de l'H<sub>2</sub>, atteignant des rendements en H<sub>2</sub> allant jusqu'à 3 - 4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> (Verhaart et al., 2010). Même si les microorganismes hyperthermophiles présentent les rendements les plus élevés en fermentation sombre, leurs productivités volumétriques sont inférieures à celles rapportées pour les microorganismes mésophiles, en lien avec leur développement à des densités cellulaires plus faibles (Pawar et al., 2013). De plus, les températures élevées requises sont préjudiciables au bilan énergétique global.

#### 1.3.4.2. *Compétition, rôles ambivalents et hydrolyse*

- **Compétition pour le substrat**

Certaines bactéries non productrices d'H<sub>2</sub> peuvent entrer en compétition pour le substrat avec les HPB, c'est-à-dire qu'elles vont consommer une partie du substrat sans occasionner de production d'H<sub>2</sub> et réduire ainsi la quantité de substrat disponible pour la production d'H<sub>2</sub>. L'activité de ces microorganismes peut être associée à la production de divers métabolites comme : le lactate, l'acétate, le propionate, le succinate ou le butanol (Tableau 1-2). Par exemple, des bactéries des genres *Megasphaera sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Selenomonas sp.*, *Propionispira sp.* ou *Schwartzia sp.* ont été précédemment identifiées comme productrices de propionate (Cabrol et al., 2017). Le propionate peut être généré dans les voies liées à l'Equation 1-28 ou à l'Equation 1-29. L'éthanol peut être produit par des bactéries appartenant à l'ordre des Enterobacterales selon l'Equation 1-30, sans production d'H<sub>2</sub> (Zhou et al., 2018). Les voies de l'acétone, de l'éthanol et du butanol (fermentation ABE) sont également favorisées après un stress métabolique résultant d'une baisse soudaine du pH ou de la température, ainsi que de l'accumulation d'acides gras volatils (Dessi et al., 2018a; S. Van Ginkel and Logan, 2005). Mugnai et al. (2021) ont identifié des membres des genres tels que *Romboustia sp.*, *Caproiciproducens sp.*, *Lachnoclostridium sp.*, *Ruminiclostridium sp.* et *Clostridium sp.* comme étant capables de produire du formiate (Equation 1-32) mais aussi de le reconsumer pour produire de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>, en raison de la présence d'une enzyme FHL.



**Tableau 1-2 : Voies métaboliques en compétition avec les voies de production d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre**

Metabolites	Equation	N°	Reference
Lactate et acetate	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + 1.5 CH_3COOH$	<a href="#">Equation 1-25</a>	(S. Wang et al., 2020)
Lactate et ethanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2$	<a href="#">Equation 1-26</a>	(Ferreira et al., 2018)
Lactate	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH$	<a href="#">Equation 1-27</a>	(S. Wang et al., 2020)
Propionate	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + 2 H_2O$	<a href="#">Equation 1-28</a>	(Ferreira et al., 2018)
Propionate et acetate	$1.5 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$	<a href="#">Equation 1-29</a>	(Q. Wang et al., 2020)
Ethanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$	<a href="#">Equation 1-30</a>	(Q. Wang et al., 2020)
Butanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2OH + 2 CO_2 + H_2O$	<a href="#">Equation 1-31</a>	(Q. Wang et al., 2020)
Formiate	$CH_3COCO_2H + HSCoA \rightarrow HCOOH + CH_3COSCoA$	<a href="#">Equation 1-32</a>	(Kurokawa and Tanisho, 2005)

• **Bactéries lactiques, amies ou ennemies ?**

Les bactéries lactiques (LAB) sont des microorganismes anaérobies facultatifs qui métabolisent les sucres selon trois voies différentes en fonction de l'espèce : (i) la voie homofermentaire productrice de lactate (*Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp. et *Lactobacillus* sp.); (ii) la voie hétérofermentaire productrice de lactate, de CO<sub>2</sub> et d'éthanol ou d'acétate (*Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Weissella* sp.) (Wang et al., 2021) et (iii) la voie bifide : productrice d'acétate et de lactate (*Bifidobacterium* sp.). Les principales LAB rencontrées en fermentation sombre sont des *Lactobacillus* sp., *Sporolactobacillus* sp. et les *Streptococcus* sp (García-Depraect et al., 2021a). Plusieurs espèces de l'ordre des Bacillales telles que *Paenibacillus* sp. ou *Bacillus* sp. ont également été signalées comme productrices de lactate (Chatellard et al., 2016). Les LAB sont souvent considérées comme responsables de l'instabilité des fermentations et de faibles rendements en H<sub>2</sub> (Palomo-Briones et al., 2017), notamment en raison de leur capacité à produire du lactate à partir de glucides sans produire d'H<sub>2</sub> (Equation 1-25, Equation 1-26, Equation 1-27). Les LAB sont également des productrices de bactériocines, bio-inhibiteurs pouvant inhiber la croissance de *Clostridium* sp. (Etchebehere et al., 2016). *Lactococcus* sp. est particulièrement cité comme ayant une activité antagoniste avec *Clostridium* sp. (Castelló et al., 2020). L'accumulation de lactate due au développement des LAB peut également contribuer à générer des conditions défavorables pour les HPB via une diminution du pH du milieu de culture (en dessous de 5 - 6) (Hye et al., 2007; Kawagoshi et al., 2005).

La présence des LAB a néanmoins parfois été associée à des rendements en H<sub>2</sub> élevés (Etchebehere et al., 2016). En effet, bien que l'accumulation de lactate soit souvent considérée

comme un indicateur d'échec de la fermentation, certaines études ont suggéré que la présence de LAB pourrait avoir un effet positif sur la production d'H<sub>2</sub>. Tout d'abord, les LAB pourraient améliorer les rendements en H<sub>2</sub> par la consommation d'O<sub>2</sub>, car ce sont des bactéries anaérobies facultatives, créant un environnement anaérobie bénéfique pour les HPB. Ces bactéries produisent aussi des enzymes qui hydrolysent des composés complexes, les transformant en substrats plus simples potentiellement utilisables par des HPB (J.-J. Chang et al., 2008; S. L. Li et al., 2011). De plus, le lactate peut également être un substrat utilisé pour la production d'H<sub>2</sub> (García-Depraect et al., 2020). En particulier, le Tableau 1-3 recense des voies métaboliques productrices d'H<sub>2</sub> à partir de lactate et les microorganismes impliqués associés.

Les voies de l'acrylate et la voie PFOR ont été signalées comme les principales voies de production d'H<sub>2</sub>, respectivement à partir de lactate seul ou du lactate avec de l'acétate (García-Depraect et al., 2021a). Le besoin en acétate comme accepteur d'électrons supplémentaire est lié à une activité plus faible de l'hydrogénase pendant la fermentation du lactate que pendant la fermentation du glucose. Ceci entraîne un rendement en H<sub>2</sub> plus faible lorsque les HPB se développent à partir du lactate en utilisant la voie PFOR (0,1 - 0,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>Lactate</sub><sup>-1</sup>) (Diez-Gonzalez et al. 1995). Detman et al. (2019) ont montré que les bactéries capables de convertir le lactate et l'acétate en butyrate utilisent des complexes flavoprotéiques de transfert d'électrons qui sont très spécifiques de l'oxydation du lactate et de la formation du butyrate. Comme le montre le Tableau 1-3, certains *Clostridium sp.* sont capables de consommer l'acétate et le lactate générés par les LAB, produisant ainsi du butyrate et de l'H<sub>2</sub>. L'association entre LAB et HPB consommatrices de lactate pourrait expliquer le rôle ambigu des LAB en fermentation sombre.

- **Bactéries hydrolytiques**

L'hydrolyse de la biomasse est souvent l'étape limitante du processus de fermentation sombre lorsque le substrat à dégrader est complexe. L'hydrolyse résulte de l'activité d'enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que les amylases, les cellulases ou les xylanases (Cabrol et al., 2017; Mugnai et al., 2021). Divers genres de bactéries ont été signalés comme libérant des enzymes hydrolytiques, tels que *Bacillus sp.*, *Proteus mirabilis*, les membres de la famille des *Ruminococcaceae* ou certains *Clostridium sp.* (*C. acetobutylicum*, *C. cellulosi* ou *C. stercorarium*). Hung et al. (2011) ont signalé que les *Bifidobacterium sp.* pouvaient également contribuer à la dégradation de la biomasse. Ces bactéries favorisent la production d'H<sub>2</sub> en convertissant la matière organique complexe en monomères qui peuvent ensuite être utilisés par les HPB. Cependant, le rôle exact et les interactions entre ces microorganismes et les HPB doivent encore être clarifiés en fermentation sombre, car leurs fonctions exactes ne sont pas comprises (Rafrafi et al., 2013).

**Tableau 1-3 : Équations empiriques, rendements en H<sub>2</sub> et microorganismes impliqués dans la production d'H<sub>2</sub> à partir de lactate**

Microorganismes ou culture mixte	Equation	Rendement H <sub>2</sub> (mol·mol <sub>lactate</sub> <sup>-1</sup> )	Références
<i>Clostridium neopropionicum</i>	$Lactate \rightarrow H_2 + CO_2 + 0,5 Butyrate$	1	(Tholozan et al., 1992)
<i>Lactobacillus bifermantans</i>	$Lactate \rightarrow 0,5 Acetate + 0,5 EtOH + H_2 + CO_2$	1	(Kandler et al., 1983)
soil culture	$Lactate \rightarrow 0,5 Acetate + 0,35 Butyrate + 0,1 H_2 + 0,55 CO_2$	0,1	(Bhat and Barker, 1947)
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	$Lactate \rightarrow 0,47 Acetate + 0,37 Butyrate + 0,005 H_2 + 0,49 CO_2$	0,005	(Shen et al., 1996)
<i>Clostridium termitidis</i> + <i>Clostridium beijerinckii</i>	$Lactate \rightarrow 2 H_2 + CO_2 + Acetate$	2	(Flores et al., 2017)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	$Lactate \rightarrow 0,8 H_2 + 1,16 CO_2 + 0,12 Acetate + 0,26 Butyrate$	0,8	(Prabhu et al., 2012)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> P262	$Lactate + 0,4 Acetate \rightarrow 0,6 H_2 + CO_2 + 0,7 Butyrate$	0,6	(Diez-Gonzalez et al., 1995)
<i>Clostridium diolis</i> JPC H-3	$Lactate + 0,5 Acetate \rightarrow 0,5 H_2 + CO_2 + 0,75 Butyrate$	0,5	(Matsumoto and Nishimura, 2007)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	$Lactate + 0,37 Acetate \rightarrow 0,53 H_2 + 0,97 CO_2 + 0,63 Butyrate$	0,53	(Bryant and Burkey, 1955)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	$Lactate + 0,48 Acetate \rightarrow 0,59 H_2 + CO_2 + 0,65 Butyrate$	0,59	(Bhat and Barker, 1947)
<i>Clostridium sp. BPY5</i> This	$Lactate + 0,27 Acetate \rightarrow 0,47 H_2 + 0,52 CO_2 + 0,66 Butyrate$	0,47	(Tao, 2016)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	$Lactate + 0,27 Acetate \rightarrow 0,09 H_2 + 0,36 CO_2 + 0,65 Butyrate$	0,09	(Wu et al., 2012)
	$Lactate + 0,28 Acetate \rightarrow 0,16 H_2 + 0,43 CO_2 + 0,69 Butyrate$	0,16	
	$Lactate + 0,42 Acetate \rightarrow 0,47 H_2 + 0,7 CO_2 + 0,71 Butyrate$	0,47	
	$Lactate + 0,38 Acetate \rightarrow 0,45 H_2 + 0,67 CO_2 + 0,68 Butyrate$	0,45	
$Lactate + 0,16 Acetate \rightarrow 0,21 H_2 + 0,51 CO_2 + 0,66 Butyrate$	0,21		
Acidogenic anaerobic reactor sludge	$Lactate + 0,28 Acetate \rightarrow 0,39 H_2 + 0,67 Butyrate$	0,39	(Blanco et al., 2019)

#### 1.3.4.3. Microorganismes consommateurs d'H<sub>2</sub>

En cultures mixtes, trois groupes de microorganismes consommateurs d'H<sub>2</sub> sont généralement présents dans les réacteurs producteurs d'H<sub>2</sub> : les bactéries sulfato-réductrices, les archées méthanogènes hydrogénotrophes et les bactéries homoacétogènes (Castelló et al., 2020).

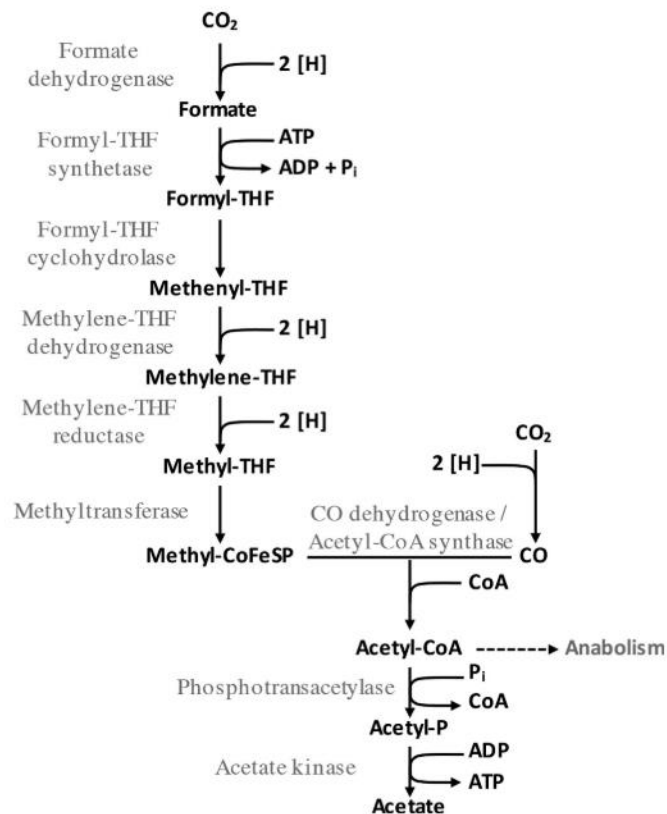
Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont extrêmement compétitives en milieu anaérobie et consomment de l'H<sub>2</sub> par une réaction qui est énergétiquement plus favorable que l'homoacétogénèse ou la méthanogénèse (Tableau 1-4). Cette réaction peut se produire à de très faibles concentrations en H<sub>2</sub> (~10<sup>-6</sup> atm) mais nécessite la présence de sulfate. La croissance des BSR peut donc être limitée en contrôlant la concentration d'ions sulfate dans le milieu ainsi que le pH et le temps de rétention hydraulique (TSH) (Guo et al., 2010). En particulier, les pH inférieurs à 6 ont été signalés comme étant efficaces pour limiter la croissance de BSR (Ghimire et al., 2015).

Les archées méthanogènes hydrogénotrophes produisent du CH<sub>4</sub> à partir d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>. La consommation d'H<sub>2</sub> par ces microorganismes lors de la fermentation sombre a été très largement rapportée dans la littérature (Carrillo-Reyes et al., 2012; Castelló et al., 2009; Etchebehere et al., 2016). Plusieurs stratégies ont été proposées pour éliminer les méthanogènes hydrogénotrophes des communautés microbiennes. L'application d'un traitement par choc thermique à l'inoculum est le plus souvent utilisé, les archées n'étant pas capable de sporuler contrairement aux *Clostridiaceae*. Ce prétraitement a été rapporté comme étant la méthode la plus efficace (Carrillo-Reyes et al., 2014). Une autre stratégie consiste à modifier les paramètres de fonctionnement du fermenteur pour limiter la présence de ces microorganismes. En particulier, un pH inférieur à 6 est défavorable à la croissance des méthanogènes (Greses et al., 2021). La réduction du temps de séjour hydraulique (TSH) à une valeur inférieure à 24 h est également recommandée pour éliminer les archées méthanogènes (Akhlaghi and Najafpour-Darzi, 2020). En effet, ces dernières présentent généralement un temps de doublement de population plus élevé que les bactéries productrices d'H<sub>2</sub>, avec par exemple des temps de 9 à 24 h pour *Methanosarcina sp.* (Ferguson and Mah, 1983a) par rapport à 2,1 h pour *Clostridium butyricum* (Abbad-Andaloussi et al., 1995). Cependant, ces stratégies ne sont pas toujours efficaces, et la croissance d'archées méthanogènes peut persister malgré un prétraitement de l'inoculum par choc thermique (Carrillo-Reyes et al., 2014), l'emploi d'un TSH court (<24h) (Mariakakis et al., 2011) ou un pH bas (<6) (Castelló et al., 2009).

**Tableau 1-4 : Voie majoritaires consommatrices d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre (adapté à partir de Saady, (2013))**

Microorganismes	Equation	ΔG° (Kj/mol)	N°
Réductrices de soufre	$SO_4^{2-} + 4 H_2 + H^+ \rightarrow HS^- + 4 H_2O$	-152,5	<a href="#">Equation 1-33</a>
Archées méthanogènes hydrogénotrophes	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	-135	<a href="#">Equation 1-34</a>
Bactéries homoacétogènes	$4 H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2O$	-104,5	<a href="#">Equation 1-35</a>

Enfin, les bactéries homoacétogènes sont responsables de la consommation d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> pour former de l'acétate *via* la voie Wood-Ljungdahl (Drake et al., 2008) (Figure 1-11). L'activité homoacétogène n'est pas un trait phylogénétique et est portée par des microorganismes appartenant à diverses familles bactériennes. A titre d'exemple, peuvent être retrouvées dans les réacteurs producteurs d'H<sub>2</sub> : *Acetobacterium sp.*, *Moorella thermoacetica* et un large éventail d'espèces de *Clostridium* telles que *C. aceticum*, *C. thermoautotrophicum*, *C. stercorarium* et *C. ljungdahlii* (Saady, 2013). Les homoacétogènes se distinguent par une grande versatilité métabolique (Schuchmann and Müller, 2016), car elles sont capables d'assurer une croissance autotrophe, à partir de CO/CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>, une croissance hétérotrophe à partir d'une grande variété de substrats (sucres, acides organiques, alcools) ou encore une croissance mixotrophe à partir d'H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et de glucose par exemple (Schuchmann and Müller, 2016). Leur mode de croissance est alors dépendant de l'espèce et des conditions de fermentation. Par exemple, *A. woodii* a une croissance mixotrophe en présence de 67 % H<sub>2</sub> et 33 % CO<sub>2</sub> (1 bar) et de 10 mM de fructose à pH 7, alors que *C. aceticum* possède une croissance hétérotrophe dans les mêmes conditions et produit de l'H<sub>2</sub> (Braun and Gottschalk, 1981). Autre exemple, Huang et al. (2010) ont observé que l'abondance de *C. lundense*, *C. peptidivorans* et *C. vincentii*, des productrices d'H<sub>2</sub>, augmentait lorsque la production d'H<sub>2</sub> diminuait, et ont supposé que ces microorganismes consommaient l'H<sub>2</sub> *via* des hydrogénases bidirectionnelles. Etant donnée leur affiliations phylogénétiques très diverses, l'identification et la suppression de la croissance des bactéries homoacétogènes dans les réacteurs producteurs d'H<sub>2</sub> est complexe (Cabrol et al., 2017). Comme elles produisent de l'acétate, un métabolite commun à d'autres réactions se produisant en fermentation sombre et plus précisément au cours de réactions productrices d'H<sub>2</sub>, leur activité ne peut pas être suivie par l'accumulation de métabolites. L'homoacétogénèse semble être indépendante de la température, du pH et est même renforcée dans les réacteurs à haute densité cellulaire où les mécanismes de transfert d'hydrogène inter-espèces sont favorisés (Dinamarca et al., 2011; Saady, 2013).



**Figure 1-11 : Schématisation de la voie Wood-Ljungdahl des bactéries acétogènes. Figure issue de (Schuchmann and Müller, 2016) (Fig 1). [H] : équivalent redox (un électron + un proton) ; THF, tétrahydrofolate ; CoFe-SP, protéine fer-soufre corrinoïde. Chez *A. woodii*, les équivalents redox utilisés sont : l' $H_2$  pour l'étape de la formate déshydrogénase, NADH pour les étapes de la méthylène-THF déshydrogénase et de la méthylène-THF réductase, et la ferrédoxine réduite pour l'étape de la CO déshydrogénase/acétyl-CoA synthase.**

#### 1.4. Facteurs influençant la production d' $H_2$ en fermentation sombre

##### 1.4.1. Modes de conduite de culture

La fermentation sombre, comme tout bioprocédé, peut être conduite selon trois principaux modes de culture : en batch, en fed-batch ou en continu (éventuellement séquentiel).

- Batch

Le batch est le mode de culture le plus déployé dans l'industrie pharmaceutique et brassicole, de par son efficacité et son bon contrôle (S. Y. Li et al., 2011). En début de fermentation, le réacteur est alimenté avec un inoculum et le milieu réactionnel. Ce mode de fonctionnement se caractérise donc par une absence d'entrée d'alimentation et de sortie de milieu réactionnel pendant la fermentation, si bien que le volume de liquide dans le réacteur reste quasiment constant (il peut modérément augmenter et diminuer au gré des ajouts d'acide/base afin de réguler le pH et de prélèvements liquides). Bien entendu, en fermentation sombre, les gaz s'accumulant dans le réacteur sont évacués, de manière à ce que la pression dans l'enceinte n'augmente pas dangereusement. A l'échelle industrielle, l'inconvénient de ce mode de conduite est qu'il est associé à une succession de phases différentes qui nécessitent des opérations : préparation du milieu fermentaire, préparation d'inoculum et inoculation, initiation de la fermentation, fermentation, vidange, nettoyage. Ces étapes induisent des périodes sans fermentation, et donc une production de biogaz discontinuée, à moins de multiplier le nombre de cuves, et donc le coût du procédé.

- Fed-Batch

La culture en Fed-batch est généralement réalisée lorsqu'une inhibition par le substrat peut réduire les performances du procédé ou en cas de répression catabolique, *i.e.*, une utilisation préférentielle d'une source de carbone. Elle se caractérise par l'augmentation du volume de milieu réactionnel par l'introduction continue ou séquentielle d'une solution d'alimentation, tandis qu'il n'y a pas de soutirage du milieu fermentaire. Ce procédé est associé à une accumulation des produits de fermentation, ce qui peut générer des inhibitions (S. Y. Li et al., 2011). Comme pour le mode batch, l'usage du fed-batch implique des temps d'arrêt du procédé.

- Continu

La culture en continu se caractérise par l'ajout continu ou séquentiel du substrat dans le milieu réactionnel, et le soutirage de ce milieu continu ou séquentiel également, afin de maintenir un volume constant dans le réacteur de fermentation. L'intérêt de ce mode de conduite du procédé est que le temps de séjour appliqué constitue une pression de sélection sur les microorganismes. D'un point de vue théorique, seuls ceux dont le temps de doublement de population divisé par  $\ln(2)$  est inférieur au temps de séjour appliqué pourront s'y maintenir. Le mode continu minimise le temps d'arrêt du procédé, et permet, si la

fermentation atteint un état stationnaire, de délivrer un débit d'H<sub>2</sub> stable et continu. Le temps de latence avant fermentation est également minimisé (S. Y. Li et al., 2011).

#### 1.4.2. Type de réacteur de fermentation

Deux grands types de réacteurs sont principalement distinguables (Jung et al., 2011) :

- Les bioréacteurs à biomasses (*i.e.*, microorganismes) en suspension, comprenant principalement : les réacteurs parfaitement agités (CSTR), les réacteurs discontinus séquentiels (ASBR) et les réacteurs à membrane (AnMBR)
- Les bioréacteurs à biomasses immobilisées comprenant principalement : les réacteurs à lit de boues à flux ascendant (UASBr), les réacteurs à lit de boues granulaires expansées (UASBr), les réacteurs de boues granulaires expansées (EGSBr) et les réacteurs à lit fluidisé (AFBR).

- **Réacteur à cuve agitée CSTR**

Le réacteur CSTR ou infiniment mélangé est la configuration la plus simple. Dans la plupart des cas, le réacteur est une cuve cylindrique dont l'agitation est assurée par des turbines (Jung et al., 2011). Les HPB y sont suspendus dans le milieu fermentaire. D'un côté, un bon contact substrat-microbes et un bon transfert de masse peuvent être accomplis. D'un autre côté, la biomasse ne peut pas être maintenue à des concentrations très élevées et un lessivage est possible à de trop faibles TSH.

- **Réacteur discontinu séquentiel ASBR**

Le réacteur discontinu séquentiel anaérobie (ASBR) permet de découpler le temps de séjour des solides (TRS, et donc notamment de la biomasse) du temps de séjour des liquides. Ce découplage permet théoriquement d'augmenter la charge organique appliquée et la productivité en H<sub>2</sub>, *via* la baisse du TSH et l'augmentation du TRS induisant une augmentation de la rétention des bactéries productrices d'H<sub>2</sub>. Néanmoins, une augmentation de l'activité consommatrice d'H<sub>2</sub> a pu être observée avec l'augmentation de la rétention de la biomasse (Dinamarca et al., 2011; Saady, 2013). Le procédé implique plusieurs étapes : alimentation du réacteur en substrat, fermentation, décantation de la biomasse puis élimination de la phase liquide. Avec ce type de réacteur, une rétention des matières volatiles en suspension (VSS,



assimilable à la biomasse) de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  peut être atteinte, contre  $1,5\text{-}2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en CSTR (Jung et al., 2011).

- **Réacteur à membrane AnMBR**

L'utilisation d'un réacteur anaérobie à membrane permet de retenir la biomasse dans le réacteur de fermentation. Cette membrane peut être soit immergée dans le réacteur, soit externe et traversée par un flux transversal de milieu fermentaire. Concrètement, l'AnMBR consiste souvent en un CSTR pour lequel le flux sortant est filtré au travers d'une membrane afin de retenir la biomasse (Jung et al., 2011). Son avantage est de permettre une rétention effective de la biomasse.

- **Réacteurs à lit de boues à flux ascendant UASB**

Un réacteur à lit de boues à flux ascendant est composé d'une colonne cylindrique ou rectangulaire et d'un séparateur gaz-liquide-solide solide en haut. Le flux entrant est situé en bas, tandis que l'effluent de fermentation et le gaz sortent par le haut. Au fond du réacteur se trouve donc la biomasse granulaire décantée (le lit) qui est caractérisée, contrairement à la biomasse en suspension, par une vitesse de décantation très élevée. Au-dessus du lit se trouve une couche de biomasse et de particules de boue qui tend à se déplacer vers le haut, entraînée par le biogaz produit ainsi que par le flux ascendant de liquide (Jung et al., 2011; Mainardis et al., 2020). Le principal avantage de l'UASB est sa capacité à retenir la biomasse.

- **Réacteur à lit de boue granulaire expansé EGSB**

Le réacteur à lit de boue granulaire expansé (EGSBr) est une variante du concept UASBr. Il a été mis au point pour éviter les problèmes tels que les flux préférentiels et les zones mortes qui peuvent se produire dans les UASB. Dans ce type de réacteur, un flux ascendant faible permet une expansion partielle (fluidisation) du lit de biomasse granulaire, ce qui améliore le contact entre le substrat et la biomasse ainsi que la séparation des petites particules inactives en suspension du lit de biomasse (Jung et al., 2011).

- **Réacteurs à lit fluidisé AFBR**

Le réacteur à lit fluidisé contient un matériau inerte sur lequel les microorganismes sont immobilisés sous forme de biofilm, ce qui permet d'augmenter leur rétention. Ce matériau piégé est fluidisé par des vitesses élevées de fluide ascendant générées par une combinaison d'alimentation et de milieu fermentaire recirculé. Un réacteur est dit à lit expansé lorsque l'augmentation de la hauteur du lit avec le flux ascendant, *i.e.*, l'expansion du lit, est inférieure ou égale à 30 % et à lit fluidisé lorsqu'elle est supérieure à 30 % (Saravanane and Murthy, 2000).

#### 1.4.3. Choix du substrat

Le substrat utilisé pour la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre est un facteur majeur, impactant fortement les rendements en H<sub>2</sub> et les productivités des fermentateurs. Les monosaccharides, comme le glucose, et les disaccharides, comme le lactose ou le saccharose, sont les sources de carbone les plus favorablement converties par les microorganismes fermentaires. Ces sucres peuvent être dérivés de la dégradation de polymères végétaux comme l'amidon, la cellulose ou l'hémicellulose. Les substrats riches en amidon seront globalement facilement hydrolysés, alors que les substrats riches en cellulose, de par leur structure compacte, nécessiteront potentiellement des prétraitements pour augmenter l'accessibilité des sucres aux microorganismes (Łukajtis et al., 2018). Globalement, les rendements en H<sub>2</sub> sont d'autant plus faibles que la complexité du substrat augmente. Il est par exemple possible de prédire les rendements en H<sub>2</sub> à partir de la caractérisation de la fraction soluble et facilement accessible du substrat, *i.e.* la teneur en oligosaccharides libérés (Guo et al., 2014).

Une grande diversité de déchets sont valorisables par fermentation sombre en H<sub>2</sub> tels que les eaux usées, la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM), les déchets agro-industriels, les déchets agricoles ou encore les déchets alimentaires. A l'échelle du laboratoire, des « substrats modèles » sont souvent utilisés pour garantir une homogénéité du substrat au cours d'une étude. Ainsi, dans un premier temps, l'impact de l'utilisation d'un substrat modèle par rapport à un déchet réel est discuté. Ensuite, la soupe de déconditionnement, substrat complexe utilisé au cours de cette thèse, est présenté de même que son contexte réglementaire.

- Substrat modèle et substrat réel, quel enjeu ?

Les substrats simples, « modèles » comme le glucose déshydraté, ont été largement utilisés pour étudier la fermentation sombre en cultures pures et mixtes (Łukajtis et al., 2018). Les avantages d'un tel substrat sont (i) qu'il peut être facilement quantifié dans le but de suivre son état de dégradation ainsi que pour boucler le devenir du carbone / des électrons lors de la fermentation, (ii) qu'il est homogène et (iii) facilement conservable dans le temps. Etant largement utilisé dans la littérature, il permet également de comparer aisément les résultats de la fermentation, comme les rendements en métabolites, avec d'autres études. Cette simplification du système fermentaire recherchée est également son désavantage. En effet, avec un substrat simple, la fermentation ne requiert pas la croissance de bactéries à activité hydrolytique, donc toute évaluation des effets d'un changement de paramètre opératoire (pH, température, etc.) à partir d'un substrat simple ne prendra pas en compte l'influence dudit paramètre sur les bactéries hydrolytiques. Par ailleurs, le substrat simple n'apporte pas de « bactéries indigènes », *i.e.*, la flore microbienne associée à une biomasse. Ce constat s'applique également aux déchets « reconstitués », *i.e.*, que l'expérimentateur crée en laboratoire à partir de la composition du déchet « réel<sup>6</sup> ». Par exemple, la flore indigène de FFOM réelles ou de biodéchets réels, qui peuvent être valorisés suite à plusieurs jours de stockage à température ambiante, est sans aucun doute différente de la flore indigène de la FFOM ou de biodéchets de laboratoire reconstitué à partir, notamment, de frites, steak haché et légumes achetés au supermarché et stockés à -20°C avant usage. Néanmoins, la reconstitution d'un substrat / déchet est une méthode d'intérêt pour s'abstraire de la variabilité de la constitution du déchet réel dans le temps et de son hétérogénéité.

Ces bactéries indigènes, qui se développent naturellement sur le substrat, sont identifiées comme telles par opposition aux bactéries exogènes qui sont ajoutées par le biais d'un inoculum externe. D'un côté, plusieurs études ont montré l'impact positif des bactéries indigènes sur les rendements en H<sub>2</sub> en comparaison avec l'ajout d'un inoculum externe (Dauptain et al., 2020; Favaro et al., 2013; François et al., 2021). De l'autre côté, Favaro et al. (2013) ont mesuré un rendement en H<sub>2</sub> plus élevé (70 mLH<sub>2</sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>) lorsqu'un inoculum prétraité était ajouté, par rapport aux seules bactéries indigènes (42 mLH<sub>2</sub>·g<sub>MV</sub><sup>-1</sup>), en utilisant de la FFOM comme substrat. Ce résultat pourrait être expliqué par la forte abondance de LAB parmi les bactéries indigènes. Ces auteurs ont également montré une production plus faible d'H<sub>2</sub> à partir de FFOM stérilisé, ce qui indique probablement des interactions positives entre bactéries indigènes et exogènes. Globalement, la littérature recense peu de résultats sur l'influence de la flore indigène des substrats par rapport à l'inoculum ajouté.

---

<sup>6</sup> Le déchet « réel » est défini par opposition au déchet reconstitué.

- La soupe de déconditionnement

Au cours de cette thèse, un déchet alimentaire reconstitué a été utilisé comme substrat agro-industriel modèle : la soupe de déconditionnement. Une soupe de déconditionnement (en anglais : *depackaging food waste*) est composée d'un mélange de biodéchets et d'eau. Les biodéchets sont définis par la législation française comme : « *les déchets non dangereux biodégradables de jardin ou de parc, les déchets alimentaires ou de cuisine provenant des ménages, des bureaux, des restaurants, du commerce de gros, des cantines, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que les déchets comparables provenant des usines de transformation de denrées alimentaires* » ("Code de l'environnement : Prévention et gestion des déchets (Articles L541-1 à L541-50)," 2022).

Les aliments collectés (dans une grande surface, par exemple) sont premièrement séparés de leur emballage *via* des « déconditionneurs de biodéchets » (QSE Consult SARL, EREP SA, 2021) afin de permettre une valorisation et un éventuel retour au sol sans pollution plastique. Le processus comporte une incorporation d'eau permettant notamment de laver les emballages plastiques. Les biodéchets peuvent contenir des sous-produits animaux de catégorie 3, c'est-à-dire : « *des produits d'origine animale ou les aliments contenant de tels produits, qui ne sont plus destinés à la consommation humaine pour des raisons commerciales ou en raison de défauts de fabrication ou d'emballage ou d'autres défauts n'entraînant aucun risque pour la santé humaine ou animale* ». La législation concernant ces sous-produits s'impose donc à eux. Le mélange de biodéchets doit ainsi subir une étape d'hygiénisation pendant une heure à 70 °C et présenter une granulométrie inférieure à 12 mm ("Arrêté du 9 avril 2018," 2018). Le mélange ainsi produit constitue la soupe de déconditionnement.

Les « soupes de déconditionnement » ont émergés avec la loi Grenelle 2 (Article L. 541-21-1 du code de l'environnement 2012) qui imposait aux producteurs de plus de 120 tonnes de déchets alimentaires par an de trier et valoriser leurs déchets. En 2016, cette limite est passée à 10 tonnes, et au 1<sup>er</sup> janvier 2023, l'obligation s'appliquera à toute personne produisant / détenant plus de 5 tonnes de biodéchets par an. La législation prévoit que le tri à la source soit généralisé pour tous les producteurs de biodéchets en France, qu'il s'agisse d'entreprises ou de particuliers et quel que soit le tonnage annuel produit, d'ici 2025.

Ces soupes de déconditionnement sont actuellement principalement valorisées par méthanisation. Dans la littérature, de nombreuses études de fermentation sombre / méthanisation sont réalisées en utilisant des déchets alimentaires (Yasin et al., 2013) ou la fraction fermentescible des ordures ménagères (Dong et al., 2008), mais peu d'études abordent spécifiquement la valorisation des soupes de déconditionnement (Noblecourt et al., 2018).

Au cours de sa préparation et de son transport, la soupe de déconditionnement peut subir une pré-fermentation non contrôlée liée à la croissance d'une flore indigène, et ainsi contenir, avant valorisation en fermentation / méthanisation, une concentration importante en lactate. Par exemple, Noblecourt et al. (2018) ont utilisé comme substrat une soupe de déconditionnement fournie par la société Methelec (unité de méthanisation à Ennezat (63) valorisant des effluents d'élevage et des déchets d'industries agroalimentaires) présentée en Tableau 1-5. Les résultats présentés correspondent à la composition moyenne du substrat à l'issue de cinq prélèvements effectués sur un intervalle de huit mois. Le substrat contenait  $28 \pm 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactate et  $4 \pm 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sucre. Le suivi de la fermentation de cette soupe a montré que le lactate était le principal substrat utilisé pour la production d' $\text{H}_2$  (Noblecourt, 2017).

**Tableau 1-5: Composition moyenne de la soupe de déconditionnement fournie par Methelec à l'institut Pascal - Clermont Ferrand en 2017. Tableau issu de Noblecourt et al. (2018)**

Detailed composition of DWs and comparison with standard culture medium.

	Average composition ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Standard deviation	Complete medium ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
Total carbon	33,12	6,35		
Total nitrogen	4,26	1,14		
DCO	153,00	45,54	23,31	
Sugar	4,15	0,49	20,00	
Organic acids	Acetate	4,10	0,00	
	Butyrate	0,69	0,47	
	Propionate	0,11	0,08	
	Lactate	27,69	2,86	
	Ethanol	6,57	1,84	
	Isovalerate	0,50	0,30	
	Valerate	0,05	0,07	
Mineral salts	Ammonium	0,42	0,49	
	Phosphate	1,16	0,56	
	Iron	ND <sup>1</sup>	ND	0,35
	Sulphate	0,01		0,37
	Chloride	1,33		1,06
	Magnesium	ND	ND	48,5 <sup>2</sup>
	Sodium	1,33		0,35
	Calcium	1,30		86,7 <sup>2</sup>
Potassium	0,84		0,33	

<sup>1</sup> ND: Not determined.

<sup>2</sup> Concentration expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 1.4.4. Paramètres opératoires

Le procédé de fermentation sombre est souvent associé à une instabilité de la production d' $\text{H}_2$  causée par des changements dans les facteurs biotiques ou abiotiques. Castelló et al. (2020) ont montré qu'une faible diversité microbienne était probablement la cause de

l'instabilité du procédé en raison du manque de redondance fonctionnelle au sein de la communauté microbienne. En effet, la restauration d'une fonction dans une communauté microbienne perturbée dépend fortement de la redondance fonctionnelle. Cette diversité peut varier en fonction du type de réacteur (CSTR, UASB, etc.) et de ses paramètres opératoires (Etchebehere et al., 2016). Par conséquent, les changements dans les communautés microbiennes dus à une perturbation des conditions opératoires peuvent affecter fortement la production d'H<sub>2</sub>. Alors qu'une forte abondance de membres du genre *Clostridium* est généralement associée à de bonnes performances de fermentation sombre, un changement de la composition de la communauté vers de faibles producteurs d'H<sub>2</sub>, comme *Megasphaera* sp., ou des consommateurs d'H<sub>2</sub>, comme les homoacétogènes et les méthanogènes, pourrait conduire à une instabilité (Etchebehere et al., 2016). Plusieurs stratégies ont été développées pour orienter l'activité fermentaire vers la production d'H<sub>2</sub>. En particulier, la modification des paramètres opératoires de la fermentation pour sélectionner les HPB vise à contrôler l'écosystème microbien et à améliorer sa résilience et sa résistance. Parmi les paramètres opératoires, le pH, le TSH, la concentration en substrat et la température ont été rapportés comme ayant un effet significatif sur les communautés microbiennes et les voies métaboliques, comme détaillé ci-dessous.

- pH

Le pH a un impact significatif sur la communauté microbienne, les voies métaboliques associées et les activités enzymatiques. Par exemple, le pH optimal pour la méthanogenèse se situe entre 6,5 et 8,5, tandis que pour la fermentation lactique, le pH optimal est de 5,5 - 6,5. La plupart des études examinées par Elbeshbishy et al. (2017) ont indiqué que le pH optimal pour la production d'H<sub>2</sub> se situe entre 5 et 6 dans des réacteurs continus et discontinus, ce qui coïncide avec la plage de pH optimale pour certains HPB, par exemple *Clostridium* sp. (Wong et al., 2014).

En dehors de cette gamme, d'autres réactions métaboliques peuvent se produire, détournant le flux d'électrons de la production de H<sub>2</sub> vers d'autres produits métaboliques. À titre d'exemple, à un pH acide (<4), l'accumulation d'acides et d'alcools peut induire un stress chez les microorganismes, en pénétrant dans la cellule et en interférant avec les activités métaboliques (Elbeshbishy et al., 2017). Il a été observé que ce stress pouvait nuire à la production d'H<sub>2</sub> (Lu et al., 2011) et à la dégradation du substrat (Fang and Liu, 2002). Cependant, aucune tendance claire entre le pH et des voies métaboliques n'a été établie (Łukajtis et al., 2018). Par exemple, De Gioannis et al., (2014) ont étudié l'impact du pH de 5,5 à 8,5 sur la fermentation sombre du lactosérum. Les auteurs ont observé que le pH optimal dépendait fortement des caractéristiques du substrat et de la source d'inoculum. Il a été conclu qu'il n'existe pas de lien clair entre les changements de pH et les changements de voies

métaboliques en raison des multiples voies qui peuvent coexister au cours de la fermentation. La variabilité des produits métaboliques observés à différents pH sont principalement dus à la croissance optimale de microorganismes spécifiques au sein de la communauté microbienne cultivée. Les pH neutres et alcalins ( $\geq 7$ ) peuvent induire une diminution de la production d' $H_2$  en favorisant la méthanogenèse ou en redirigeant l'activité métabolique vers la production d'acétate, du propionate, d'éthanol ou du formiate (Temudo et al., 2008).

Cependant, des exceptions ont été documentées dans la littérature. Par exemple, Lee et al., (2002) ont observé une production optimale d' $H_2$  lors de la croissance d'une espèce apparentée à *Clostridium* à un pH de 9. De plus, *Clostridium quinii* et *Clostridium interstinale* ont été trouvés dominants à un pH de 7,5 - 8 (Temudo et al., 2008). A l'inverse, Mota et al. (2018) ont observé une production optimale d' $H_2$  à pH 3 avec une communauté microbienne dominée par *Ethanoligenens* sp. et *Clostridium* sp. Enfin, le pH optimal et l'activité de production d' $H_2$  de la bactérie productrice d' $H_2$ , *Klebsiella oxytoca* ont été signalés à un pH neutre (6-7) (Temudo et al., 2008).

- Temps de séjour hydraulique

Dans les réacteurs fonctionnant en mode continu, le TSH sélectionne spécifiquement les microorganismes ayant un taux de croissance suffisamment élevé pour résister à la dilution causée par le flux de liquide. Łukajtis et al. (2018) ont montré que le TSH optimal pour la production d' $H_2$  dépend principalement du type de substrat et de sa biodégradabilité mais qu'il varie entre 0,5 h et 12 h. En utilisant un réacteur à lit fluidisé à 30 °C sans contrôle du pH et en utilisant du glucose comme substrat, la diminution du TSH de 8 h à 2 h a augmenté le rendement en  $H_2$  de 1,4 à 2,5  $\text{mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  (Cavalcante de Amorim et al., 2009). De même, lors de la fermentation de sucres plus complexes comme le lactose et le saccharose, les TSH les plus bas évalués, *i.e.* 6 h et 12 h respectivement, ont conduit aux meilleures productivités volumiques en  $H_2$  (2,0  $\text{L}_{H_2} \cdot \text{L} \cdot \text{j}^{-1}$  et 4,4  $\text{L}_{H_2} \cdot \text{L} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivement) (Palomo-Briones et al., 2017; Salem et al., 2018). L'optimisation du TSH pourrait donc permettre de sélectionner les bactéries productrices d' $H_2$  avec un court temps de génération. Son optimisation permet également de lessiver les méthanogènes présentant un temps de génération plus élevé (Tableau 1-6). Néanmoins, pour d'autres substrats complexes, comme les résidus de melon et de pastèque, l'application de long TSH (> 20 j) couplé à un pH de 5,5 a permis d'assurer une production d' $H_2$  sans développement d'activité méthanogène (Greses et al., 2021).

**Tableau 1-6 : Temps de génération et activité de différents micro-organismes présents dans les réacteurs de fermentation sombre**

Microorganisme	Temps de génération (h)	Activité	Référence
<i>Clostridium butyricum</i>	2,1	Producteur d'H <sub>2</sub>	(Abbad-Andaloussi et al., 1995)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	< 3,5	Producteur d'H <sub>2</sub>	(Linger et al., 2020)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1,4	Producteur d'H <sub>2</sub>	(Malette et al., 1974)
<i>Methanococcus maripaludis</i>	8,3	Méthanogène hydrogénotrophe	(Costa et al., 2013)
<i>Methanosarcina sp.</i>	9 -24	Méthanogène hydrogénotrophe	(Ferguson and Mah, 1983b)
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	6,9 - 11,5	Homoacétogène	(Lanzillo et al., 2020)
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	4,6	Homoacétogène	(Whitham et al., 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,7 – 3,4	Producteur de lactate	(Sedewitz et al., 1984)

Palomo-Briones et al. (2017a) ont étudié l'impact du TSH, de 6 à 24 h, sur la production d'H<sub>2</sub> et la dynamique des communautés microbiennes, en utilisant le lactose comme substrat. Un rendement maximal en H<sub>2</sub> de 0,86 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> a été observé avec un TSH de 6 h, en lien avec la croissance d'une communauté dominée par *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* et *Enterobacteriaceae*. Un TSH plus long a favorisé l'émergence de bactéries productrices de lactate, notamment *Sporolactobacillaceae* et *Streptococcaceae*. De même, lors de la fermentation de mélasse, la productivité volumique en H<sub>2</sub> a augmenté de 153 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub>·L·j<sup>-1</sup> à 390 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub>·L·j<sup>-1</sup>, via la baisse du TSH de 12 à 3 h (J. J. Chang et al., 2008).

- Concentration en substrat et charge organique

La concentration en substrat exerce également une forte pression sélective sur les populations microbiennes. En effet, des concentrations trop élevées en substrat peuvent induire une accumulation d'acides et être associé à une diminution de la production d'H<sub>2</sub> (Łukajtis et al., 2018). Kyazze et al., (2006) ont étudié l'influence de différentes concentrations en saccharose (10 à 50 g·L<sup>-1</sup>) sur la production d'H<sub>2</sub> en fermentation en mode continue. Une production stable d'H<sub>2</sub> a été atteinte à 10, 20 et 40 g·L<sup>-1</sup> mais l'alimentation du réacteur avec une solution de 50 g·L<sup>-1</sup>, a conduit à une instabilité de la production d'H<sub>2</sub>. Dans l'ensemble, le rendement en H<sub>2</sub> a diminué avec l'augmentation de la concentration en saccharose de 1,7 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> à 10 g·L<sup>-1</sup> à 0,8 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> à 50 g·L<sup>-1</sup>. Il a été suggéré que, généralement, des concentrations supérieures à 20 g<sub>COD</sub>·L<sup>-1</sup> défavorisent la production d'H<sub>2</sub> en mode batch (Elbeshbishy et al., 2017). En outre, les substrats non stériles peuvent également être porteurs de populations microbiennes indigènes nuisibles qui peuvent supplanter les bactéries productrices d'H<sub>2</sub>. À titre d'illustration, lors de la fermentation de déchets alimentaires réels,



des concentrations supérieures à 15 g<sub>MV</sub>·L<sup>-1</sup> étaient défavorables à la production d'H<sub>2</sub>, induisant une fermentation lactique en lien avec l'introduction de LAB avec le substrat (Pu et al., 2019).

Lors d'une fermentation en mode continu, la concentration du substrat est un facteur à prendre en compte, mais également la charge organique (*organic loading rate*, OLR). La charge organique (g·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>) est la quantité de matière organique par unité de volume du réacteur alimentée pendant une durée donnée. L'Equation 1-36 introduit la formule de la charge organique où C<sub>substrat</sub> représente la concentration de la solution d'alimentation (g·L<sup>-1</sup>), Q représente le débit d'alimentation du réacteur en substrat (L·j<sup>-1</sup>), V représente le volume utile du réacteur (L) et TSH est le temps de rétention hydraulique appliqué au réacteur (j).

$$\text{Charge organique} = \frac{C_{\text{substrat}} \times Q}{V} = \frac{C_{\text{substrat}}}{\text{TSH}} \quad \text{Equation 1-36}$$

La gamme optimale de charge organique pour la production d'H<sub>2</sub> se situe entre 18 et 180 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>, en fonction du substrat utilisé (monosaccharides, saccharose, déchets alimentaires), de la configuration du réacteur (réacteur anaérobie à lit fluidisé, réacteur parfaitement agité, réacteur anaérobie à membrane), de la température (de 23 °C à 60 °C) et des inocula microbiens (Elbeshbishy et al., 2017). Les réacteurs dotés de systèmes de rétention de la biomasse peuvent assurer une dégradation du substrat et une production d'H<sub>2</sub> à des charges organiques plus élevées (S. W. Van Ginkel and Logan, 2005). Par exemple, Hafez et al., (2010) ont utilisé un réacteur CSTR couplé à un décanteur par gravité, ce qui a augmenté la rétention de biomasse dans le réacteur et a permis de maintenir un rendement élevé en H<sub>2</sub> (2,8 mol<sub>H2</sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) tout en augmentant la charge organique de 6,5 g<sub>DCO glucose</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> à 103 g<sub>DCO glucose</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Néanmoins, une augmentation de la charge à 154 ou 206 g<sub>DCO glucose</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> a entraîné une baisse du rendement en H<sub>2</sub> (à 1,2 et 1,1 mol<sub>H2</sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>, respectivement). Des augmentations rapides de charge organiques peuvent provoquer des changements dans la communauté microbienne, comme cela a été rapporté avec de multiples substrats et configurations de réacteurs. L'impact de l'augmentation de charge appliquée dépend alors principalement de la communauté microbienne. Par exemple, Macías-muro et al. (2021) ont observé un changement de *Clostridium* sp. à *Sporolactobacillus* sp. dans un réacteur CSTR alimenté avec des vinasses à pH 5,5 et un TSH de 6 h lorsque la charge organique a été augmentée de 80 à 160 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Ce changement a eu un effet délétère sur la production d'H<sub>2</sub>. A l'inverse, Veeravalli et al., 2017 ont observé une amélioration de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> dans les réacteurs UASB (37 °C, pH 5, TSH de 24 h) alimentés avec du glucose, lorsque la charge organique a été augmentée de 9 à 13 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Cette amélioration a été attribuée au remplacement des *Synergistaceae* et *Propionibacteriaceae* par des *Clostridiaceae* et *Ruminococcaceae*.

- Température

La fermentation peut être conduite à différentes températures : psychrophile (0-25 °C), mésophile (25-45 °C), thermophile (45-65 °C), thermophile extrême (65-80 °C) et hyper thermophile (> 80 °C). La plupart des études en fermentation sombre ont été réalisées dans des conditions mésophiles, car la plupart des bactéries productrices d'H<sub>2</sub> dans les inocula utilisés sont mésophiles (Wong et al., 2014). Néanmoins, les températures thermophiles peuvent conduire à des rendements en H<sub>2</sub> plus élevés, et en particulier les températures hyperthermophiles, dans lesquelles des rendements en H<sub>2</sub> proches du maximum théorique de 4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> ont été atteints (Chou et al., 2007). A l'inverse, la fermentation en conditions psychrophiles peut être réalisée par des bactéries spécialisées, dont le taux de croissance et l'activité sont les plus élevés à des températures comprises entre 0 et 25 °C. Alvarado-Cuevas et al. (2015) ont isolé des microorganismes de l'Antarctique qui étaient capables de produire de l'H<sub>2</sub> en conditions psychrophiles. Ces auteurs ont rapporté que la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> (17 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) a été atteinte lors de la croissance d'une souche apparentée à *Janthinobacterium agaricidamnorum*, tandis que le rendement en H<sub>2</sub> le plus élevé (1,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) a été atteint lors de la croissance d'une souche apparentée à *Polaromonas jejuensis*. La conduite de fermentation sombre à basse température s'avère être une solution intéressante pour augmenter les gains énergétiques nets du procédé (Rodríguez-Valderrama et al., 2019).

Comme pour le pH, le TSH, la concentration en substrat et la charge organique, différents microorganismes sont sélectionnés en fonction de la température de fermentation. Les changements populationnels peuvent alors être associés à des changements de productions métaboliques. Par exemple, dans un fermenteur semi-continu alimenté avec des FFOM, les concentrations en acétate étaient plus élevées dans des conditions thermophiles que dans des conditions mésophiles (Valdez-Vazquez et al., 2005). A l'inverse, Lazaro et al., (2014) ont montré que pendant la fermentation des vinasses, *Clostridium* sp. dominait en conditions mésophiles, tandis que *Thermoanaerobacter* sp. dominait dans en condition thermophile, mais que les rendements en H<sub>2</sub> étaient similaires dans les deux conditions (2,2 et 2,3 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>DCO molasse</sub>, respectivement). Sivagurunathan et al. (2014) ont montré que l'augmentation de la température de 37 °C à 45 °C augmentait la vitesse de production et le rendement en H<sub>2</sub> de 8,6 à 13,6 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> et de 1,0 à 1,7 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup>, respectivement. L'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> était alors due à un changement populationnel, en défaveur de *Selenomonas lacticifex* et *Bifidobacterium catenulatum*, producteurs de propionate, à une dominance de *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringenes*, *Clostridium acetobutylicum* et *Ethanoligenens harbinense*, producteurs d'H<sub>2</sub>.

#### 1.4.5. Couplage de la fermentation sombre avec d'autres procédés

Malgré toute optimisation du procédé de fermentation sombre, au maximum 4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> peuvent être produites, ce qui correspond au maximum à 33 % de la DCO du substrat valorisé sous forme d'H<sub>2</sub>. Le reste se trouve sous forme d'acides, d'alcools ou de substrats non-dégradés, qu'il convient de valoriser également. Cette valorisation peut se faire *via* le couplage du procédé de fermentation sombre avec différents autres procédés comme : la méthanisation pour produire du méthane, la photofermentation ou la cellule d'électrolyse microbienne pour produire davantage d'H<sub>2</sub>, la croissance de microalgues pour la production de lipides, ou encore, par exemple, un procédé d'extraction et de purification des acides, valorisables en tant que tel (Estela Tapia-Venegas et al., 2015).

#### 1.5. Inhibition de la production d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre et stratégies de diminution de ces inhibitions

La production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre peut être restreinte par des phénomènes d'inhibition du procédé. **Dans toute cette thèse, le terme « inhibiteur » sera considéré au sens large, ne définissant pas une molécule défavorisant une réaction, mais comme tout mécanisme restreignant une activité (croissance, production d'H<sub>2</sub>, etc.).** Les phénomènes d'inhibition en fermentation sombre ont été particulièrement étudiés et documentés dans des synthèses bibliographiques (Bundhoo and Mohee, 2016; Chen et al., 2021a; Elbeshbishy et al., 2017; Łukajtis et al., 2018; Sivagurunathan et al., 2016). L'ensemble des inhibiteurs potentiels est présenté en Figure 1-12.

Ces inhibiteurs peuvent être classés en deux catégories qui seront discutées séparément :

- Les inhibiteurs dits « *pre-process* » présents dans le substrat ou l'inoculum, avant même que le processus de fermentation ne se mette en place.
- Les inhibiteurs dits « *in-process* » qui s'accumulent au cours du procédé de fermentation sombre.

Après une brève vue d'ensemble des différents inhibiteurs, l'inhibition par les produits de fermentation sera détaillée.

### 1.5.1. Inhibiteurs « Pré-process »

- **Métaux**

Les ions métalliques sont essentiels au métabolisme bactérien et à la production d'H<sub>2</sub>. Néanmoins, des concentrations trop élevées en ions métalliques légers (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) ou en ions métalliques lourds (Ni, Pb, Hg, Zn, Cd, Cr, Cu) peuvent induire des inhibitions (Chen et al., 2021a). Les concentrations inhibitrices sont très variables, même pour un seul métal considéré, en fonction des conditions et des microorganismes. Par exemple, une réduction de 50 % de la production d'H<sub>2</sub> par le Zn a été mesurée entre 1 mg·L<sup>-1</sup> et 1500 mg·L<sup>-1</sup> lors de deux études distinctes en culture mixte (Chen et al., 2021a).

- **Concurrents pour le substrat et hydrogénotrophes**

L'inoculum et le substrat peuvent tous deux incorporer au bioréacteur de fermentation des microorganismes non-producteurs d'H<sub>2</sub> exerçant potentiellement une compétition pour le substrat (LAB) ou une activité hydrogénotrophe (voir partie 1.3.4).

- **Inhibiteurs issus de prétraitements du substrat**

Des prétraitements sont souvent appliqués aux substrats lignocellulosiques pour augmenter leur biodégradabilité et la quantité de sucres accessibles aux microorganismes. Néanmoins ces prétraitements peuvent être associés à la libération de composés inhibiteurs pour la production d'H<sub>2</sub>, comme les dérivés de furane, notamment le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) et le furfural (Bundhoo and Mohee, 2016), ou encore des phénols (vanilline, syringaldehyde). Le prétraitement de la biomasse a pu générer 0 à 12 g·L<sup>-1</sup> de furfural et 0 à 1,6 g·L<sup>-1</sup> de 5-HMF (Chen et al., 2021a). Il a été rapporté que la croissance bactérienne est totalement inhibée à partir de 2 g·L<sup>-1</sup> de dérivés de furane (Chen et al., 2021a).

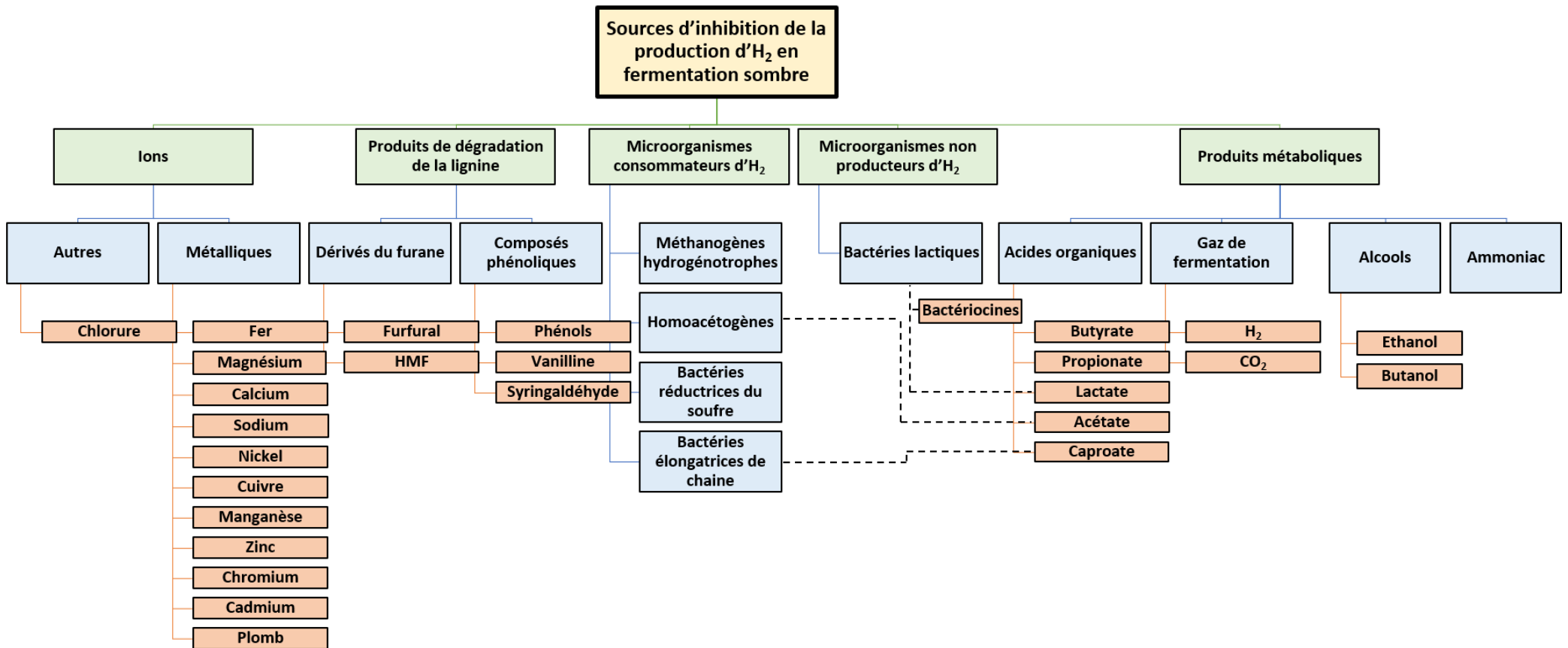


Figure 1-12 : Inhibiteurs de la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre.

- **Bactériocines**

Les bactériocines sont un groupe de peptides antimicrobiens résistants aux fortes températures et actifs sur une large gamme pH. Bien que la plupart des bactéries et des archées aient la capacité d'en sécréter, les LAB sont identifiées comme les bactéries principalement productrices de bactériocines en fermentation sombre (Chen et al., 2021a). Ces peptides sont sécrétés par une bactérie « pour » tuer les autres bactéries entrant en compétition pour le substrat. En fermentation sombre, les instabilités de la production d'H<sub>2</sub> en lien avec la croissance de LAB ont souvent été attribuées à la production de bactériocines (Castelló et al., 2020; Pérez-Rangel et al., 2022).

- **Ammoniac**

Certains substrats comme les fumiers peuvent contenir des concentrations élevées en azote ammoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et en ammoniac (NH<sub>3</sub>). Wang et al. (2009) ont étudié l'effet de l'azote sur la production d'H<sub>2</sub> en ajoutant du NH<sub>4</sub>Cl dans le milieu de culture, de façon à augmenter la concentration en azote total (TAN *total ammonia nitrogen*) de 0,01 à 10 g·L<sup>-1</sup>. En réalisant la fermentation à 35 °C, à pH 7 et avec du glucose comme substrat, les auteurs ont observé une inhibition de 24 % du rendement en H<sub>2</sub> à 5 g·L<sup>-1</sup> d'azote total. L'ajout d'azote au milieu de culture à concentration plus faible a toutefois augmenté la production d'H<sub>2</sub>, avec un maximum de production atteint à 0,1 g·L<sup>-1</sup> d'azote total. En comparaison, différents auteurs rapportent une concentration totale en azote optimale pour la production d'H<sub>2</sub> comprise entre 0,01 et 7 g·L<sup>-1</sup> (Wang et al., 2009), en utilisant des substrats variés (glucose, amidon, biodéchet) et des inocula variés (digestat de réacteur de méthanisation, *C. butyricum*). Par ailleurs, une inhibition de la production d'H<sub>2</sub> à une concentration totale en azote supérieure à 1,6 g·L<sup>-1</sup> (soit 0,4 mg<sub>NH<sub>3</sub></sub>·L<sup>-1</sup>) a été observée par Salerno et al. (2006) lors d'une culture en mode continu, mais les mêmes auteurs n'ont observé aucune inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par l'azote lors de fermentations en batch. Les conditions opératoires, les inocula et les substrats affectent donc probablement l'inhibition observée. Le pKa du couple NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> étant de 7,2, aux pH usuels de fermentation sombre (5,0 - 6,5), la forme protonée est majoritaire. La forme non protonée (NH<sub>3</sub>) est généralement considérée comme la forme la plus toxique, à cause de sa capacité à pénétrer les membranes cellulaires, capter un proton dans le cytoplasme et ainsi perturber l'homéostasie du pH intracellulaire (Bundhoo and Mohee, 2016).

- **Osmolarité**

Il a été suggéré que l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par l'ammoniac était partiellement non spécifique et due à une augmentation de la pression osmotique, avec un seuil inhibiteur estimé *via* la mesure de la force ionique à  $0,75 \pm 0,13$  M (Paillet et al., 2020). Des effets non spécifiques dus à l'augmentation de la pression osmotique ont également été rapportés en présence d'acides organiques (Ciranna et al., 2014; Hirshfield et al., 2003; van Niel et al., 2003). D'après ces études, l'accumulation globale de composés (ions métalliques, acides organiques, ammoniac, bactériocines, produits de dégradation de la lignine *etc.*) peut contribuer à l'inhibition du procédé de fermentation.

### 1.5.2. Inhibition par l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>

Une vaste littérature scientifique s'est développée autour des mécanismes d'inhibition par l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> en culture pures et en culture mixtes (Beckers et al., 2015; Bundhoo and Mohee, 2016). Cette partie est dédiée à la description des effets inhibiteurs décrits et aux concepts associés. Les auteurs ont le plus souvent étudié les effets de l'H<sub>2</sub> et/ou du CO<sub>2</sub> en les éliminant de la culture microbienne. Les études portant sur les mécanismes d'inhibition évaluent donc également l'intérêt d'une stratégie de levée d'inhibition. Les deux sujets sont donc abordés conjointement dans cette partie.

#### 1.5.2.1. Transferts gazeux et sursaturations en digestion anaérobie

Au cours de la fermentation, les gaz sont produits sous forme dissoute, et un transfert de la phase liquide à la phase gazeuse a lieu. Lors du suivi d'une fermentation productrice d'H<sub>2</sub>, les expérimentateurs suivent généralement l'évolution de la pression partielle en H<sub>2</sub> (pH<sub>2</sub>) dans le ciel gazeux du fermenteur. La mesure est facilement réalisée à partir de la pression totale et de la composition du biogaz. Dans le cas d'un équilibre entre la phase gazeuse et la phase liquide, la pression partielle d'un composé X (P<sub>X</sub>) est liée à la concentration saturée en gaz dissous (c<sub>s</sub>) par la loi de Henry (Equation 1-37).

$$c_s = H_X^{cp} \times P_X \quad \text{Equation 1-37}$$

Avec,  $H_X^{cp}$  constante de Henry pour le composé X, à une température donnée.

Cet équilibre se définit comme un état idéal dans lequel le transfert à l'interface liquide/gaz des molécules (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) est suffisamment efficace pour qu'aucune des phases n'accumule la molécule produite. Dans de telles conditions, l'expérimentateur peut déduire

la concentration en H<sub>2</sub> dissous de la mesure de p<sub>H2</sub>. Néanmoins, il a été observé à de multiples reprises en digestion anaérobie que l'état d'équilibre n'est pas atteint durant la production de biogaz, *i.e.* que l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> s'accumulent en phase liquide (Tableau 1-7). Le milieu est alors dit sursaturé en gaz dissous. La loi de Henry n'est alors plus applicable pour connaître la concentration d'un gaz dissous à partir de sa pression partielle. Cet état de sursaturation d'un gaz dissout peut être apprécié par la détermination d'un facteur de sursaturation (S<sub>f</sub>). Ce facteur se définit comme le rapport entre la concentration mesurée en gaz dissous et la concentration à l'équilibre en gaz dissous estimée d'après la loi de Henry (Equation 1-38).

$$S_f = \frac{H_{2aq}}{H_{2eq}} \quad \text{Equation 1-38}$$

Avec  $H_{2aq}$  la concentration en H<sub>2</sub> dissous,  $H_{2eq}$  la concentration en H<sub>2</sub> dissous à l'équilibre.

Dans ces conditions, la concentration en H<sub>2</sub> dans la phase liquide peut alors être déterminée théoriquement à partir de l'Equation 1-39 (Dreschke et al., 2019a).

$$\frac{dH_{2aq}}{dt} = HPR - k_L a (H_{2aq} - H_{2eq}) \quad \text{Equation 1-39}$$

Avec HPR la vitesse de production d'H<sub>2</sub> et  $k_L a$  le coefficient de transfert volumétrique gaz/liquide (h<sup>-1</sup>).

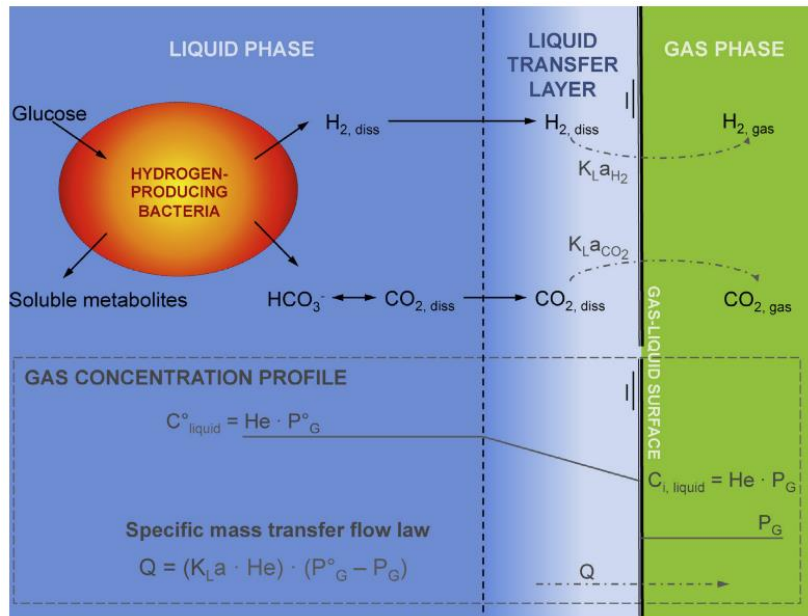
Le facteur  $k_L a$  dans cette équation est défini par les propriétés du bioréacteur, du liquide, et les paramètres d'agitation. Il est composé de deux termes : (i)  $k_L$  le coefficient de transfert côté liquide et (ii)  $a$  l'aire interphasique spécifique par unité de volume de liquide. La Figure 1-13 schématise les différentes étapes du transfert du gaz produit, du microorganisme à la phase gazeuse. D'un point de vue expérimental, il est très difficile d'accéder au coefficient de transfert  $k_L a$  dans le cas où le gaz est produit biologiquement dans la phase liquide.



**Tableau 1-7 : Concentrations dissoutes et sursaturations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> en digestion anaérobie**

Conditions	Gaz	Concentration dissoute (mM)	Facteur de Sursaturation $S_f$	$k_{La}$ (h <sup>-1</sup> )	Référence
Continuous hydrogenic mixed culture, CSTR, 70°C	H <sub>2</sub>	0.29-0.64	1-20.6	7.0-10.2	(Zhang et al., 2013)
Continuous hydrogenic mixed culture, 25°C	H <sub>2</sub>	0.1- 1.6	3-11	/	(Kraemer and Bagley, 2006)
Continuous hydrogenic mixed culture, 25°C	CO <sub>2</sub>	1-22	1.6-1.7	/	(Kraemer and Bagley, 2006)
Batch serum bottles, <i>Clostridium butyricum</i> , 30°C	H <sub>2</sub>	0.5-3.7	7	0.3-6.3 <sup>a</sup>	(Beckers et al., 2015)
AnSBR, <i>Clostridium butyricum</i> , 30°C	H <sub>2</sub>	0.2- 1.6	1-4	0.08-4.6	(Beckers et al., 2015)
Batch <i>Thermotoga neapolitana cf. capnolactica</i> , 80°C	H <sub>2</sub>	0.3-1.34 <sup>b</sup>	3	/	(Dreschke et al., 2019a)
Batch hydrogenic <i>Thermotoga neapolitana</i> , 80°C	H <sub>2</sub>	0.22-1.79 <sup>b</sup>	3	/	(Dreschke et al., 2019b)
Batch hydrogenic <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> , 70°C	H <sub>2</sub>	0.28-0.9	12-34	5-11	(Ljunggren et al., 2011)
Fed Batch Methanogenic CSTR , 35°C	H <sub>2</sub>	2 x 10 <sup>-3</sup>	35	0.16	(Pauss et al., 1990)
Batch Methanogenic CSTR, 35°C	H <sub>2</sub>	2 x 10 <sup>-3</sup>	15-55	0.02-0.06	(Pauss et al., 1990)
Continuous methanogenic USB, 32°C	H <sub>2</sub>	1.5 x 10 <sup>-3</sup> -2.75 x 10 <sup>-3</sup>	38-56	0.03-0.06	(Pauss et al., 1990)
Continuous methanogenic USB, 32°C	CO <sub>2</sub>	/	1.41	0.14	(Pauss et al., 1990)
Continuous methanogenic UBF, 35°C	H <sub>2</sub>	8.1 x 10 <sup>-3</sup> -18.8 x 10 <sup>-3</sup>	52-71	0.05-0.4	(Pauss et al., 1990)
Continuous methanogenic UBF, 35°C	CO <sub>2</sub>	/	1.33	1.68	(Pauss et al., 1990)
Methanogenic UASB and UBF reactors	H <sub>2</sub>	0.02	19-102	0.04-0.46	(Pauss and Guiot, 1993)
UASB Methanogenic reactor, 36°C	H <sub>2</sub>	0.4 x 10 <sup>-3</sup> -1.1x 10 <sup>-3</sup>	3-14	0.7-20.9	(Frigon and Guiot, 1995)
Methanogenic CSTR, 37°C	H <sub>2</sub>	0.5 x 10 <sup>-3</sup> -3 x 10 <sup>-3</sup>	60	/	(Kuroda et al., 1991)

<sup>a</sup> $k_{La}$  associated to O<sub>2</sub> data, <sup>b</sup>conversion from data in the article in mL/L, considering gas volume was expressed in Standard conditions (1bar, 25°C)



**Figure 1-13 : Illustration des différentes étapes du transfert de gaz en réacteur hydrogénique.**  
**Figure issue de (Beckers et al., 2015), (Fig 1.)**

Le Tableau 1-7 recense des études ayant mesuré les concentrations dissoutes en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dans des réacteurs producteurs de CH<sub>4</sub> ou d'H<sub>2</sub>. Ces mesurent sont plus complexes que les mesures de pressions partielles, et sont donc rarement réalisées. Les concentrations en H<sub>2</sub> dissous dans les études considérées ont varié entre 0,4 x 10<sup>-3</sup> mM et 0,02 mM dans les réacteurs producteurs de CH<sub>4</sub> et entre 0,1 et 3,7 mM dans les réacteurs producteurs d'H<sub>2</sub>. Pour comparaison, la solubilité de l'H<sub>2</sub> dans l'eau à 37°C à 1 atm s'élève à 0,7 mM.

Les facteurs de sursaturation en H<sub>2</sub> en réacteur de fermentation sombre et de méthanisation varient de 1 à 34 et de 15 à 71, respectivement. Concernant le CO<sub>2</sub>, les sursaturations sont moindres, avec des facteurs de sursaturation de 1,41 à 1,7 mesurés. Dans ces études, les conditions opératoires n'étaient donc pas suffisantes pour assurer un transfert du gaz sans sursaturation importante dans la phase liquide. Le coefficient de transfert kLa a parfois été estimé, et a varié entre 0,02 et 11h<sup>-1</sup>. Pour comparaison, lors d'une culture aérobie avec agitation mécanique, le kLa est généralement de l'ordre de 10 à 20 h<sup>-1</sup> (Pauss et al., 1990). Certaines études précisent que, bien que l'agitation du système n'était pas suffisante pour assurer un transfert gazeux optimal, elle était néanmoins suffisante pour assurer une bonne homogénéisation de la phase liquide du réacteur (évaluée par suivi de traceurs) (Pauss et al., 1990).

De par ces résultats, il apparait important de considérer les concentrations en gaz dissous et non pas les pressions partielles en gaz lors de l'évaluation des effets d'inhibitions par les gaz en fermentation sombre.

Dans la suite de cette partie, les mécanismes d'inhibitions sont décrits à différentes échelles : thermodynamique, enzymatique, puis cellulaires et enfin à l'échelle d'une population microbienne, en culture mixte.

#### 1.5.2.2. Mécanismes d'inhibition et stratégies de levée d'inhibition

##### ❖ Effets thermodynamiques des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub>

La production d'H<sub>2</sub> par transfert d'électrons du NADH ou de la Fd<sub>red</sub> vers les protons dépend du potentiel d'oxydoréduction du couple, de la température, du pH interne de la cellule, de la force ionique, des rapports de concentrations NADH/NAD<sup>+</sup> et Fd<sub>red</sub>/Fd<sub>ox</sub> et de la concentration en H<sub>2</sub> (Angenent et al., 2004; Bastidas-Oyanedel et al., 2012). Une élévation de la concentration en H<sub>2</sub> va défavoriser la production d'H<sub>2</sub> et favoriser les voies métaboliques alternatives pour régénérer les équivalents réducteurs. L'analyse thermodynamique réalisée par Jay et al. (2020) montre :

- que la réaction de production d'H<sub>2</sub> à partir du NADH est favorable à des pH<sub>2</sub> très faibles, en dessous de 0,02 à 1,5 mbars (*i.e.*  $H_{2aq} < 10^{-3}$  mM) en conditions de référence (pH 7, E°(NADH) = - 0,320, 25°C, force ionique I = 0 mM) et en fonction du ratio NADH/NAD<sup>+</sup> (Jay et al., 2020) (Figure 1-14).

- La production d'H<sub>2</sub> à partir de Fd<sub>red</sub> est favorable à des pH<sub>2</sub> plus élevées, inférieures à 0,7 mbars ou 1,9·10<sup>9</sup> mbar avec des Fd à potentiels E° de -0,32 et -0,60, respectivement (*i.e.*  $H_{2aq} < 5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^6$  mM) (Jay et al., 2020). Le potentiel E° de la Fd est le paramètre le plus impactant sur la faisabilité de la production d'H<sub>2</sub> à partir de la Fd (Jay et al., 2020).

- La production d'H<sub>2</sub> à partir du NADH et de la Fd<sub>red</sub> *via* hydrogénase à bifurcation électronique est favorable à des pH<sub>2</sub> intermédiaires, inférieures à 0,1 ou 5,3·10<sup>4</sup> mbars avec des Fd à potentiels E° de -0,32 et -0,60, respectivement (*i.e.*  $H_{2aq} < 7 \cdot 10^{-5} - 38$  mM) (Jay et al., 2020).

Le génome des microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> peut contenir des gènes encodant différentes Fd (à différents E°) et différentes hydrogénases, dont l'expression peut varier en fonction des conditions de fermentation afin d'optimiser la conservation de l'énergie sur une large gamme de pH<sub>2</sub> (Jay et al., 2020; Zheng et al., 2014). Par exemple, le génome de *Clostridium thermocellum* contient des gènes qui codent probablement sept homologues de la protéine Fd qui pourraient cibler des enzymes spécifiques, y compris quatre hydrogénases différentes utilisant la Fd (Jay et al., 2020). Autre exemple : *Ruminococcus albus* (bactérie du rumen) possède une [FeFe]-hydrogénase dépendante de la Fd et une [FeFe]-hydrogénase à bifurcation. La bactérie possède ainsi une flexibilité métabolique lui permettant d'utiliser

l'hydrogénase à bifurcation à faible  $pH_2$  et l'hydrogénase dépendante de la Fd à  $pH_2$  plus élevée (Zheng et al., 2014). L'élévation de la concentration en  $H_2$  va donc, en fonction du microorganisme, le contraindre à modifier sa synthèse protéique et éventuellement influencer ses voies métaboliques, diminuant potentiellement le rendement en  $H_2$ .

Enzyme <sup>a</sup>	Reaction(s)	Fd E°(V)	$pH_2$ at equilibrium (mbar) <sup>b</sup>	
			NAD(P)H <sub>red</sub> <sup>c</sup>	NAD(P)H <sub>HT</sub> <sup>d</sup>
Electron bifurcating [FeFe]-Hydrogenase	$2 Fd_{red} + NAD(P)H + 3H^+ \rightleftharpoons 2 H_2 + 2 Fd_{ox} + NAD(P)^+$	-0.32	0.1	1.0
		-0.42	5.6	48.1
		-0.60	$6.2 \times 10^3$	$5.3 \times 10^4$
Non-bifurcating [FeFe]-Hydrogenases	$NAD(P)H + H^+ \rightleftharpoons H_2 + NAD(P)^+$	-	0.02	1.5
			$pH_2$ at equilibrium (mbar)	
	$2 Fd_{red} + 2H^+ \rightleftharpoons H_2 + 2 Fd_{ox}$	-0.32	0.7	
		-0.42	$1.6 \times 10^3$	
	-0.60	$1.9 \times 10^9$		

<sup>a</sup> Hydrogenase complexes: tetrameric (Hyd1) and trimeric (Hyd2) [FeFe] hydrogenases and NADPH dependent [FeFe] hydrogenase (Hyd3).

<sup>b</sup>  $pH_2$  at equilibrium was calculated with experimentally reported redox poise of  $[NAD(P)H]/[NAD(P)^+]$  and assumes a  $[Fd_{red}]/[Fd_{ox}] = 1$  (across the three Fd reduction potentials).

<sup>c</sup> Low redox poise (NAD(P)H<sub>red</sub>):  $[NAD(P)H]/[NAD(P)^+] = 0.03$ .

<sup>d</sup> High redox poise (NAD(P)H<sub>HT</sub>):  $[NAD(P)H]/[NAD(P)^+] = 2.22$ . 1 bar =  $1 \times 10^5$  Pa.

**Figure 1-14 : Valeurs de  $pH_2$  à l'équilibre pour les réactions de [FeFe]-hydrogénases avec et sans bifurcation d'électrons, en conditions de référence et compte tenu des plages de potentiel redox (E°) de la Fd et des ratios NADH/NAD+. Tableau issu des travaux de Jay et al. (2020) (Table 3).**

Concernant les effets thermodynamiques de la concentration en  $CO_2$ , D. H. Kim et al. (2012) ont proposé une analyse thermodynamique de ses effets sur la production d' $H_2$  en culture mixte. L'analyse suggère que l'élimination du  $CO_2$  (< 5%) ou son sparging dans le milieu de culture (> 95 %  $CO_2$ , sparging) peuvent tous deux favoriser les réactions productrices d' $H_2$  (voies acétate et butyrate). D'après l'analyse, la consommation d' $H_2$  par homoacétogénèse est davantage défavorisée par le sparging du  $CO_2$  que par son élimination. Indirectement, le  $CO_2$  peut également influencer thermodynamiquement la production d' $H_2$  en modifiant le pH du milieu de culture et le pH intracellulaire (Devi et al., 2010).

#### ❖ Altération de l'activité enzymatique

La vitesse de production d' $H_2$  est liée à l'activité des hydrogénases. Cette activité peut être inhibée par une concentration en  $H_2$  trop élevée. Par exemple, Fourmond et al. (2013) ont montré qu'une [FeFe]-hydrogénase était peu inhibée par l' $H_2$  ( $K_m = 0,64$  atm  $H_2$  ;  $K_i = 7,0$  atm  $H_2$ ) en comparaison avec une [NiFe]-hydrogénase ( $K_m = 0,01$  atm  $H_2$  ;  $K_i = 0,2$  atm  $H_2$ ). Les auteurs expliquent l'inhibition par un encombrement d' $H_2$  dans le canal dédié de l'enzyme.

Plusieurs mécanismes d'action du CO<sub>2</sub> sur des activités enzymatiques ont été rapportés (Dixon and Kell, 1989; Esmailian et al., 2021; Yu and Chen, 2019). Des effets d'induction/répression de la synthèse enzymatique ou une inhibition d'activité enzymatique sont suspectés. Ces phénomènes ont notamment été observés pour la Formiate-hydrogénase d'*E. Coli* (Swanson and Ogg, 1969).

#### ❖ Effets décrits en cultures pures

Le Tableau 1-8 présente une synthèse de résultats issus d'un ensemble d'études portant sur les effets des concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> sur la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre, en culture pure et en culture mixte. Y sont rapportés : les conditions de fermentations évaluées, les pressions totales et la proportion en H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> composant l'espace de tête du fermenteur, les effets sur les rendements en H<sub>2</sub> rapportés et les résultats majeurs associés. Les concentrations en gaz dissous ne sont pas compilées dans ce tableau, ces données étant rarement relevées dans la littérature (malgré l'intérêt précédemment souligné).

Les stratégies appliquées par les auteurs pour réduire les concentrations en H<sub>2</sub> et/ou CO<sub>2</sub> sont principalement :

- (i) la modification de la méthode de régulation de la pression dans le fermenteur (relargage plus fréquent du biogaz, par exemple) et par extension (ii) la fermentation à basse pression,
- (iii) le « *flushing* »<sup>7</sup> de l'espace de tête, qui consiste à délivrer un flux de gaz dans l'espace de tête du réacteur
- (iv) Le « *sparging* » ou encore le « *stripping* » : le gaz est injecté dans le milieu fermentaire. Avec ce dernier, la diminution des pressions partielles en H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et une augmentation du k<sub>La</sub> sont combinés. Les gaz utilisés peuvent être directement le biogaz produit, un gaz inerte (N<sub>2</sub>, Ar) ou de l'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.
- (v) l'extraction sélective d'H<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub>,
- (vi) l'amélioration de l'agitation du milieu fermentaire,
- Plus anecdotiquement : (vii) l'ajout d'une phase organique extractive ou encore (viii) l'ultrasonication du milieu fermentaire.

Chung (1976) a évalué l'effet inhibiteur de l'H<sub>2</sub> sur la croissance et la production d'H<sub>2</sub> de *Clostridium cellobioparum*. En dégazant l'H<sub>2</sub> de la fiole de fermentation *via* un flux de CO<sub>2</sub>, la production d'H<sub>2</sub> et la croissance de *C. cellobioparum* était améliorée. Les auteurs expliquaient

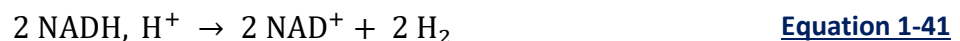
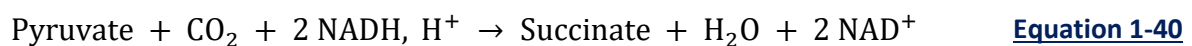
---

<sup>7</sup> Stripping = élimination d'une molécule en utilisant un gaz. Sparging = méthode spécifique de stripping qui consiste à faire buller un gaz dans un liquide. Flushing = Application d'un flux de gaz dans une phase gazeuse pour diminuer la concentration d'un gaz.

alors cette amélioration par un accroissement du rendement en ATP de *C. cellobioparum* avec la diminution de la concentration en H<sub>2</sub>. Oh et al. (2009) ont amélioré le rendement en H<sub>2</sub> de 2,50 à 2,64 mol·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> en augmentant le volume de ciel gazeux lors de la culture de *C. acetobutylicum*.

Avec un sparging de N<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub>, la culture en continu de *C. butyricum* a été associée à une augmentation de la production d'acétate, mais cet effet s'atténuait avec la diminution du TSH de 45 à 3 h (pas de mesure de la production d'H<sub>2</sub>) (van Andel et al., 1985). En cohérence, la réduction de la pression (0,28 atm) lors de la culture de *C. butyricum* en continu avec un faible TSH de 8 h n'a pas permis d'améliorer la production d'H<sub>2</sub> ou d'influencer la production de métabolites, avec des rendements de 1,4 à 2,2 et de 1,3 à 2,2 mol<sub>H2</sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> à 1 atm et 0,28 atm, respectivement (Kataoka et al., 1997). A l'inverse, la culture d'*Enterobacter cloacae* en fiole, en batch, à pression réduite (0,5 bar) a fortement augmenté le rendement en H<sub>2</sub> de 1,9 à 3,9 mol<sub>H2</sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> par rapport à une culture à 1 bar (Mandal et al., 2006). L'amélioration était associée à une diminution de la phase de latence et de la production de biomasse (la production d'acides n'est pas mentionnée).

Tanisho et al. (1998) ont montré que l'élimination du CO<sub>2</sub> par sparging avec de l'H<sub>2</sub> augmentait le rendement en H<sub>2</sub> d'*Enterobacter aerogenes* de 0,52 à 1,07 mol·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>. Le sparging avec de l'Argon a résulté en une amélioration du rendement en H<sub>2</sub> similaire, à hauteur de 1,09 mol·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>. Cette amélioration était associée à une augmentation de production d'acétate et une réduction de la production de succinate. Les auteurs ont supposé qu'une diminution de la concentration en CO<sub>2</sub> défavorisait thermodynamiquement la production de succinate et donc la régénération du NADH, H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup> *via* cette voie (Equation 1-40), augmentant le pool NADH, H<sup>+</sup> disponible pour la production d'H<sub>2</sub> (Equation 1-41).



Enfin, le sparging au CO<sub>2</sub> d'une culture de *C. acetobutylicum* n'a pas eu d'influence sur la production de biomasse mais tend à favoriser la production de butanol et de butyrate au détriment de l'acétate et de l'éthanol (Mollah and Stuckey, 1992).

Ces résultats suggèrent que la nature du gaz utilisé lors de la réalisation d'un sparging ou d'un flushing n'a pas forcément d'importance, ce qui est cohérent avec l'idée que le milieu de culture est saturé en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (donc, faire buller de l'H<sub>2</sub> / du CO<sub>2</sub> ne va pas augmenter sa concentration dissoute). De plus, le moindre effet des stratégies de bullage et de basse pression à faible TSH, à des productivités en gaz plus élevées, pourrait s'expliquer par leur inefficacité à baisser les sursaturations en gaz dans ces conditions. Potentiellement, les effets des stratégies appliquées pour diminuer les concentrations en gaz dissous (basse pression, sparging) sont très dépendantes de la capacité de transfert de gaz du système initial (agitation,

design du bioréacteur) mais également de la souche utilisée (de son équipement enzymatique) et des conditions de culture (TSH).

Sous un autre point de vue, le stripping initial d'une culture de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* avec du CO<sub>2</sub> (pour éliminer l'O<sub>2</sub>) a été associé à une réduction de la productivité en H<sub>2</sub> ( $12 \pm 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) et de la production de biomasse par rapport à un stripping au N<sub>2</sub> ( $20 \pm 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) à cause d'une augmentation de l'osmolarité du milieu de culture.

En plus d'augmenter l'osmolarité du milieu de culture, le CO<sub>2</sub> peut présenter des effets bactériostatiques largement étudiés, mais dont les mécanismes d'inhibition ne sont pas bien compris. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés (Dixon and Kell, 1989; Esmailian et al., 2021; Yu and Chen, 2019) :

- La réduction du pH et extracellulaire et intracellulaire par dissociation de l'acide carbonique
- Un effet sur la fluidité membranaire. Le CO<sub>2</sub> interagissant avec les lipides ou des groupes amines de protéines de la membrane et défavorisant l'afflux d'ions variés (Dixon and Kell, 1989).
- Un effet sur la composition membranaire lipidique
- Une inhibition des réactions de carboxylation, décarboxylation
- L'entraînement de cycles futiles, associés à des pertes en ATP.

La concentration en CO<sub>2</sub> peut également influencer la sporulation. 1 atm CO<sub>2</sub> peut inhiber la germination des spores de *Bacillus cereus* mais favoriser celle de *C. perfringens* (Dixon and Kell, 1989). Le CO<sub>2</sub> a également été observé comme léthal pour certains Clostridia, comme *C. butyricum*, mais à pression partielle très élevée (7 atm) (Dixon and Kell, 1989).

#### ❖ Effets décrits en cultures mixtes

La littérature est riche en études sur l'influence des gaz en cultures mixtes (Tableau 1-8). De nouveau, différentes stratégies ont été utilisées pour modifier les concentrations en H<sub>2</sub> – CO<sub>2</sub> et étudier les effets inhibiteurs / positifs associés.

Historiquement, différentes méthodes de mesure de la production de biogaz ont été comparées. Le relargage du biogaz peut être continu (pression constante, méthode dite « respirométrique ») ou intermittent (variation de pression entre deux seuils, méthode dite « Owen ») (Logan et al., 2002; Owen, 1986). En relarguant en continu la pression par rapport à un relargage intermittent, la production d'H<sub>2</sub> à partir de glucose ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en batch a pu être augmentée de 42 % et 189 %, de 101 à 143 mL et de  $0,28 \pm 0,01$  à  $0,81 \pm 0,03 \text{ mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ , respectivement (Chang et al., 2012; Logan et al., 2002). Lors d'une fermentation en mode

continu, la régulation de la pression entre 1,1 et 1,9 atm n'a pas eu d'effet positif sur le rendement en H<sub>2</sub> en comparaison avec une fermentation avec régulation de la pression entre 1 atm et 2,4 atm ; mais une régulation de la pression à une valeur inférieure à 1,1 bar a permis d'augmenter de 73 % le rendement en H<sub>2</sub>, de 1,1 à 1,9 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> (Esquivel-Elizondo et al., 2014). La production de biomasse et d'acétate ont été légèrement favorisées par cette réduction de pression.

Lors de la fermentation de molasses en mode continu, en régulant la pression à 0,8 bar ou 1 bar, par rapport à une régulation à 1,2 ou à 1,4 bar, le rendement en H<sub>2</sub> a pu être amélioré, passant d'une valeur entre 0,6 et 2,2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> à une valeur entre 2,8 et 4,5 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>équivalents hexose</sub><sup>-1</sup> (Nunes Ferraz Júnior et al., 2020). Cette amélioration n'a pas été associée à un changement populationnel ou métabolique. Ce résultat pourrait potentiellement s'expliquer par une diminution de l'activité homoacétogène (et de la production d'acétate) masquée par une augmentation de production d'H<sub>2</sub> par la voie acétate. Dans une autre étude, la réduction de pression de 1 à 0,2 bar a drastiquement augmenté la productivité en H<sub>2</sub> de 0,63 à 10,71 mmol·j<sup>-1</sup> en réacteur continu (Liu and Wang, 2017). Toutefois, puisqu'une partie non négligeable des métabolites produits n'a pas été identifiée, le mécanisme derrière cette amélioration est resté incompris (Liu and Wang, 2017). À l'inverse, la réduction de pression de 1 bar à 0,17 bar lors d'une fermentation en continu à partir de sucrose n'a été associée qu'à une amélioration de 9 % de la productivité, de 0,35 à 0,38 mol·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> (Lee et al., 2012). Ce résultat était accompagné par une augmentation du flux de DCO vers la production de butyrate et une diminution du flux vers la production de propionate et d'éthanol. Les effets de la modification de la pression de fermentations sont extrêmement divers, et probablement influencés par les communautés microbiennes cultivées et les conditions opératoires (substrat, type de réacteur, etc.).

De nombreux auteurs ont employé les stratégies du *sparging* ou du *flushing* pour réduire les concentrations en gaz de fermentation, avec des effets variables sur le rendement en H<sub>2</sub>, de 0 % à + 300 % (Bastidas-Oyanedel et al., 2012; Buitrón et al., 2020; D.-H. H. Kim et al., 2006; D. H. Kim et al., 2012; J. Kraemer and Bagley, 2008; J. T. Kraemer and Bagley, 2008; Massanet-nicolau et al., 2010; Mizuno et al., 2000). Plusieurs auteurs relatent un effet négatif du *sparging* ou du *flushing* sur la croissance de la biomasse en fermentation en continu (Bastidas-Oyanedel et al., 2012; D.-H. H. Kim et al., 2006; Mizuno et al., 2000), bien qu'ayant utilisé différents gaz (N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>), tout en observant une amélioration de la production d'H<sub>2</sub>. Ce résultat pourrait s'expliquer par un stress de la biomasse dû aux conditions d'agitation (Bastidas-Oyanedel et al., 2012).

Lors de la fermentation en continu de sucrose (20 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup>, TSH = 12 h), un *sparging* à 300 mL·min<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> a eu un effet plus bénéfique sur la production d'H<sub>2</sub> (+ 118 %, 1,7 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>, à pH régulé) qu'un *sparging* au N<sub>2</sub> (+ 19 %, 0,9 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) tandis qu'un *sparging via* le biogaz interne à débit identique n'a pas eu d'effet positif sur le rendement en H<sub>2</sub> (0,8 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) (D.-H. H. Kim et al., 2006). L'absence d'effet de la recirculation du



biogaz interne suggère que, contrairement aux précédentes observations, le milieu de culture n'était pas sursaturé en gaz. Le sparging au N<sub>2</sub> était associé à une augmentation de la production de butyrate et une diminution de la production de lactate sans changement apparent des communautés microbiennes. Potentiellement donc, l'amélioration du transfert de gaz a diminué la concentration en H<sub>2</sub> dissous et ainsi favorisé thermodynamiquement sa production et la production de butyrate associée, en défaveur de la production de lactate, à l'échelle cellulaire. Le sparging au CO<sub>2</sub> a également été associé à une augmentation de la production de butyrate et une diminution de la production de lactate mais également à une diminution de la production d'acétate, de la dégradation du substrat et de la croissance microbienne. L'analyse des communautés microbiennes révèle une simplification de la communauté, avec une diminution de l'abondance de *Lactobacillus sp.*, des acétogènes, et une prolifération de Clostridiales (D.-H. H. Kim et al., 2006). Le flux de CO<sub>2</sub> appliqué a donc exercé une pression de sélection sur la communauté microbienne en faveur des productrices d'H<sub>2</sub>. La concentration en CO<sub>2</sub> mais également l'augmentation de l'osmolarité probablement induite peuvent avoir guidé cette sélection. Il est néanmoins curieux que des *Lactobacillus sp.* aient été défavorisés à une forte concentration en CO<sub>2</sub>, ces derniers étant connus pour être favorisés par la présence de de CO<sub>2</sub> (Esmailian et al., 2021). A l'inverse, la recirculation du biogaz interne en réacteur UASB en continu lors de la fermentation d'effluents vinicoles a amélioré la production d'H<sub>2</sub> de 105 %, passant de 22 à 45 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> (Buitrón et al., 2020). Les auteurs ont observé une augmentation de la production d'éthanol et une diminution de l'abondance d'homoacétogènes (*C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii*). Cette fois-ci donc, la stratégie appliquée a probablement permis de désaturer le milieu et a influencé les communautés microbiennes.

Notons que dans l'étude de Massanet-nicolau et al. (2010), le *flushing* de l'espace de tête a induit une amélioration de la production d'H<sub>2</sub> (+ 56 %) moins intéressante que le sparging (+ 121 %). Le *flushing* a tout de même suscité une amélioration du rendement en H<sub>2</sub> de 300 % dans l'étude de Bastidas-Oyanedel et al. (2012), malgré son moindre effet que le sparging sur l'augmentation du transfert interphasique gaz/liquide.

Une énième technique consiste à éliminer sélectivement l'H<sub>2</sub> ou le CO<sub>2</sub> du réacteur de fermentation. Notons que ces stratégies imposent l'augmentation de la concentration en l'un des deux gaz produits. La capture du CO<sub>2</sub> a été largement réalisée, cette dernière étant facile à conduire en recirculant le biogaz produit dans une solution de NaOH ou KOH, ou en plaçant des pastilles de soude directement dans un réceptacle placé dans l'espace de tête du réacteur (Chang et al., 2012; Nasr et al., 2015). La capture du CO<sub>2</sub> affecte positivement le rendement en H<sub>2</sub>, avec des augmentations de production allant de + 22 % (sans sparging, avec du glucose comme substrat) (Nasr et al., 2015) à + 929 % (avec sparging, avec du sucrose comme substrat) (Massanet-Nicolau et al., 2016). Notons que cela suggère que l'augmentation de p<sub>H<sub>2</sub></sub> associée à la capture du CO<sub>2</sub> a moins d'impact que la diminution de pCO<sub>2</sub>. L'évolution des voies métaboliques associée à l'augmentation du rendement en H<sub>2</sub> est variable, avec une

augmentation (Nasr et al., 2015) ou une diminution (Chang et al., 2012) de la production d'acétate en fonction des études. Une seule étude rapporte une analyse des communautés microbiennes. Dans cette étude, les auteurs ont observé une augmentation de la richesse, de la diversité bactérienne et une augmentation de l'abondance de producteurs d'H<sub>2</sub> lors de la capture du CO<sub>2</sub> (Nasr et al., 2015). Ce résultat est cohérent avec les résultats de l'article présentant un sparging au CO<sub>2</sub> réduisant la diversité de la communauté microbienne (D.-H. H. Kim et al., 2006). Autre exemple, lors d'une fermentation de glucose, en enrichissant le biogaz en CO<sub>2</sub> *via* une séparation membranaire et en le recirculant, l'abondance de *Lactobacillus casei* a augmenté de 5 à 25 %, tout comme la production d'H<sub>2</sub>, de 20 % (Bakonyi et al., 2017).

En culture mixte, la concentration en CO<sub>2</sub> pourrait donc servir de pression de sélection sur la communauté microbienne. En effet, le CO<sub>2</sub> est utilisé depuis les années 1930 en agroalimentaire pour la préservation des aliments (Dixon and Kell, 1989), ou plus récemment (2005) en chirurgie, en créant une atmosphère de CO<sub>2</sub> autour d'une plaie ouverte (Persson et al., 2005). Globalement, son effet sur le microbiote d'un produit alimentaire est d'accroître la phase de latence et le temps de générations de organismes pathogènes et « nuisibles » (Esmailian et al., 2021). Les bactéries Gram négatives sont en effet plus sensibles au CO<sub>2</sub> que les Gram positives (Esmailian et al., 2021). La préservation des aliments avec des atmosphères riches en CO<sub>2</sub> ne fonctionne pas forcément *via* un contrôle de la croissance microbienne globale mais plutôt en exerçant une pression de sélection. Cette dernière a notamment tendance à favoriser des *Lactobacillus sp.*. Cet effet est considéré comme bénéfique puisque ces bactéries sont connues pour leur effet antagoniste envers d'autres bactéries et pour ne pas être pathogènes (Dixon and Kell, 1989). Globalement, des effets inhibiteurs ou stimulants du CO<sub>2</sub> ont été remarqués dans des procédés variés de fermentation ou de préservation, et le contrôle de la concentration en CO<sub>2</sub> pouvait servir à piloter la composition de communautés microbiennes dans de multiples environnements (Kolbeck et al., 2020; Mudgett, 1980).

L'élimination sélective de l'H<sub>2</sub> a également été réalisée plus récemment, par exemple, *via* un procédé électrochimique reposant sur l'usage d'une membrane échangeuse de proton couplée à l'application d'un faible courant (Massanet-Nicolau et al., 2016), ou d'un module membranaire poreux en polydiméthylsiloxane (Bakonyi et al., 2017). De manière cohérente, le sparging du milieu de culture avec le biogaz enrichi en H<sub>2</sub> dans ces deux études a mené à une diminution de la production d'H<sub>2</sub>, de 7,0–7,3 LH<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> à 2,7–3,0 LH<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> dans un cas (Bakonyi et al., 2017), et de 0,72 mol·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> jusqu'à atteindre une production non mesurable dans l'autre cas (Massanet-Nicolau et al., 2016). Contrairement à un ensemble de résultats précédents, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la p<sub>H<sub>2</sub></sub> peu défavoriser la production d'H<sub>2</sub>.

Le transfert de gaz peut être également optimisé en augmentant l'agitation du réacteur de fermentation (Palomo-Briones et al., 2019). En augmentant l'agitation du réacteur de fermentation de 100 à 400 RPM, le k<sub>L</sub>a a augmenté de 307 %, 1,04 à 4,23 h<sup>-1</sup>, améliorant le

rendement en H<sub>2</sub> de 77 %, de  $0,6 \pm 0,2$  à  $1,1 \pm 0,2$  mol·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup>. Cette amélioration du transfert de gaz a été associée à une augmentation de la production d'acétate, de butyrate, de la dégradation du substrat et de l'abondance du genre *Clostridium sp.* (Palomo-Briones et al., 2019).

Enfin, d'autres stratégies innovantes ont été mises en œuvre. Montoya-Rosales et al. (2022) ont utilisé une huile de silicone comme phase organique extractive dans le milieu fermentaire. L'ajout de 10 % v/v d'huile a amélioré de 14 % le rendement en H<sub>2</sub>, en lien avec une augmentation de la production d'acétate. L'analyse des communautés microbiennes au niveau du genre n'a pas révélé de changement populationnel. Notons néanmoins que l'analyse au niveau du genre est inadaptée pour distinguer les espèces de *Clostridium* productrices et consommatrices d'H<sub>2</sub>. Cho et al. (2018) ont appliqué une ultrasonication à faible intensité pour favoriser le dégazage du milieu fermentaire, ce qui a permis d'augmenter de 65 % le rendement en H<sub>2</sub>, de  $0,5$  à  $0,9$  mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>. L'application des ultrasons a influencé la communauté microbienne notamment en diminuant l'abondance de *C. butyricum* et en augmentant celle de *C. pasteurianum* et d'*E. cloacae*. Ainsi, l'ultrasonication a imposé une pression de sélection entre les bactéries productrices d'H<sub>2</sub>. Enfin, l'ajout de matériau favorisant la création de bulles dans le milieu fermentaire (*bubble induction*) a été suggéré pour favoriser le transfert des gaz dissous vers la phase gazeuse (Dreschke et al., 2019b; Sonnleitner et al., 2012).

**Tableau 1-8 : Résumés des études portant sur les effets des concentrations en H<sub>2</sub> et/ou en CO<sub>2</sub> en fermentation sombre**

Substrate	Substrate concentration	pH	Inoculum	Fermentation reactor	Conditions evaluated (1), (2)	Partial pressures (1)	Partial pressures (2)	H <sub>2</sub> production (1)	H <sub>2</sub> production (2)	H <sub>2</sub> improv. (%)	Major results associated	Reference
Glc	7g/L	6.2	<i>Clostridium acetobutylicum</i> mutant M5	Batch in 26ml tubes vs respirometers	continuous gas release respirometer vs intermitent gas release with high headspace volume	/	Reduced, less than 0.565 bar	2.5 mol/mol	2.64 mol/mol	6	/	(Oh et al., 2009)
Glc	7g/L	6.2	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Batch in 26ml tubes vs respirometers	continuous gas release respirometer vs intermitent gas release with high headspace volume	/	Reduced, less than 0.565 bar	1.6 mol/mol	1.79 mol/mol	12	/	(Oh et al., 2009)
Glc	7g/L	6.2	mixed culture	Batch in 26ml tubes vs respirometers	continuous gas release respirometer vs intermitent gas release with high headspace volume	/	Reduced, less than 0.565 bar	1.1 mol/mol	1.21 mol/mol	10	/	(Oh et al., 2009)
Glc	4gCOD/L	6	heat treated soil	batch 294mL	Intermitent gas release vs continuous gas release	/	/	101 mL	143mL	42	/	(Logan et al., 2002)
Glc	10 g/L	7	sludge from WWTP	Batch	Intermitent gas release vs continuous gas release	/	/	0.28±0.01 mol/mol HPR: 2.1 ± 0.2 mL/h	0.81±0.03 mol/mol HPR: 7.7 ± 0.5 mL/h	189	↑ lag phase, Bu COD % and glucose degradation efficiency ↓ Ac and Eth COD %	(Chang et al., 2012)
Glc	10 g/L	5.5	mixed microbial consortium	30L continuous CSTR, 31h HRT	1bar - 2.36 bar 1.14 bar - 1.88 bar	30-50 % H <sub>2</sub> 0.12 - 0.63 atm	55% H <sub>2</sub> 0.32 atm (max = 0.47 atm)	1.2 HPR mL/L/h : 36.4	1.1 HPR mL/L/h : 59.0	-8	/	(Esquivel-Elizondo et al., 2014)
Glc	10 g/L	5.5	mixed microbial consortium	30L continuous CSTR, 31h HRT	1.14 bar - 1.88 bar < 1.12 bar	55-60 % H <sub>2</sub> 0.32 atm (max = 0.47 atm)	55-60% H <sub>2</sub> 0.04-0.12 atm	1.1 HPR mL/L/h : 59.0	1.9 HPR mL/L/h : 108.0	73	↑ X and Ac (slightly). ↓ Bu (slightly)	(Esquivel-Elizondo et al., 2014)
Molasses	85 mM glucose <sub>eq</sub>	6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Batch 450mL	Ar sparging 30mL/min	/	/	0.52 mol/mol (estimated)	1.09 mol/mol (estimated)	110	↓ Succ, ↑ Ac	(Tanisho et al., 1998)
Molasses	85 mM glucose <sub>eq</sub>	6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Batch 450mL	H <sub>2</sub> sparging 30mL/min	/	/	0.52 mol/mol (estimated)	1.07 mol/mol (estimated)	106	↓ Succ, ↑ Ac	(Tanisho et al., 1998)
Glc	10 g/L	6	<i>Clostridium butyricum</i>	Continuous	N <sub>2</sub> sparging	0.55-0.62 atm p <sub>H2</sub> 0.38-0.45 atm p <sub>CO2</sub>	~0 atm p <sub>H2</sub> et p <sub>CO2</sub>	/	/	/	↑ Ac, Bu and Ratio Ac/Bu, Lower effect at reduced HRT	(van An del et al., 1985)
Glc	10 g/L	6	<i>Clostridium butyricum</i>	Continuous	CO <sub>2</sub> sparging	0.55-0.62 atm p <sub>H2</sub> 0.38-0.45 atm p <sub>CO2</sub>	environ 0 p <sub>H2</sub> , 1 atm CO <sub>2</sub>	/	/	/	/	(van An del et al., 1985)

Substrate	Substrate concentration	pH	Inoculum	Fermentation reactor	Conditions evaluated (1), (2)	Partial pressures (1)	Partial pressures (2)	H <sub>2</sub> production (1)	H <sub>2</sub> production (2)	H <sub>2</sub> improv. (%)	Major results associated	Reference
Glc	10 g/L	5.5	methanogenic sludge (no heat treatment)	Continuous	N <sub>2</sub> sparging 31 mL/min/L	59 % H <sub>2</sub> , 41 % CO <sub>2</sub>	10 % H <sub>2</sub> , 7 % CO <sub>2</sub>	1.31 mol/mol	1.87 mol/mol	43	No significant change in the in-situ rate of H <sub>2</sub> consumption	(J. T. Kraemer and Bagley, 2008)
Glc	10 g/L	6	mixed culture previously enriched from soya bean meal	continuous CSTR	N <sub>2</sub> sparging 110mL/min	53 % H <sub>2</sub>	5 % H <sub>2</sub>	0.85 ± 0.32 mol/mol 2.08 mL/min/L	1.43 ± 0.12 mol/mol 3.31 mL/min/L	68	↓ X and flocculation	(Mizuno et al., 2000)
Sucrose	20 gCOD/L	5.3	sludge from WWTP	continuous CSTR	Internal gas Sparging 300mL/min	63 % H <sub>2</sub> + 36 % CO <sub>2</sub>	63 % H <sub>2</sub> + 37 % CO <sub>2</sub>	0.77 mol/mol	0.77 mol/mol	0	/	(D.-H. H. Kim et al., 2006)
Sucrose	20 gCOD/L	5.3	sludge from WWTP	continuous CSTR	N <sub>2</sub> Sparging 300mL/min	63 % H <sub>2</sub> + 36 % CO <sub>2</sub>	6 % H <sub>2</sub> + 7 % CO <sub>2</sub>	0.77 mol/mol	0.95 mol/mol	19	↑ Bu, ↓ Lac No change in microbial communities.	(D.-H. H. Kim et al., 2006)
Sucrose	20 gCOD/L	5.3	sludge from WWTP	continuous CSTR	CO <sub>2</sub> sparging 300mL/min	63 % H <sub>2</sub> + 36.5 % CO <sub>2</sub>	6.7 % H <sub>2</sub> + 93 % CO <sub>2</sub>	0.77 mol/mol	1.68 mol/mol	118	↑ Bu, ↓ X, substrate removal, Lac and Ac. Simplification of microbial community. ↓ <i>Lactobacillus sp.</i> and acetogens, ↑ Clostridiales	(D.-H. H. Kim et al., 2006)
Food waste	27g carbohydrateCO D/L	5.3	anaerobic digester sludge	Sequencing batch reactor	80 L/L/ d CO <sub>2</sub> sparging	52 % H <sub>2</sub>	3.4 % H <sub>2</sub>	81.1 ± 5.2 mL H <sub>2</sub> /g Vsadded	97.3 ± 3.5 mL H <sub>2</sub> /g Vsadded	20	↑ butyrate and isopropanol	(D. H. Kim et al., 2012)
Sucrose	20 gCOD/L	5.3	sludge from WWTP	continuous CSTR	Internal biogaz sparging 100mL/min	63 % H <sub>2</sub> + 36.5 % CO <sub>2</sub>	70 % H <sub>2</sub> + 29,6 % CO <sub>2</sub>	0.77 mol/mol	0.86 mol/mol	12	No change in microbial communities	(D.-H. H. Kim et al., 2006)
sewage biosolids	/	5.5	mesophilic anaerobic digester sludge	10L continuous CSTR	N <sub>2</sub> Sparging 60mL/L/min	/	/	12.2LH <sub>2</sub> /kgad dedVS	27LH <sub>2</sub> /kgad edVS	121	/	(Massanet-nicolau et al., 2010)
sewage biosolids	/	5.5	mesophilic anaerobic digester sludge	10L continuous CSTR	N <sub>2</sub> headspace flushing 60mL/L/min	/	/	12.2LH <sub>2</sub> /kgad dedVS	19LH <sub>2</sub> /kgad edVS	56	/	(Massanet-nicolau et al., 2010)
Glc	10 g/L	4.5	mixed culture	1.3L 6h HRT continuous CSTR	N <sub>2</sub> headspace flushing 58.4 L/d	pH <sub>2</sub> = 0.6 bar, pCO <sub>2</sub> = 0.39 bar	pH <sub>2</sub> < 0.15 bar, PCO <sub>2</sub> < 0.1 bar	1 ± 0.3 mol/mol <sub>glucose</sub> 1.6 ± 0.2 mmolH <sub>2</sub> /L/h	3.25 ± 0.4 mol/mol <sub>glucose</sub> 7.3 ± 0.1 mmolH <sub>2</sub> /L/h	225	↓ Eth, X	(Bastidas-Oyanedel et al., 2012)
Glc	10 g/L	5.5	mixed culture	1.3L 6h HRT continuous CSTR	N <sub>2</sub> headspace flushing of 7.3 L/d	pH <sub>2</sub> = 0.75 bar, pCO <sub>2</sub> = 0.25 bar	pH <sub>2</sub> = 0.18 bar, PCO <sub>2</sub> = 0.1 bar	~1.2 mol/mol <sub>glucose</sub> 2 ± 0.2 mmolH <sub>2</sub> /L/h	~1.2 mol/mol <sub>glucose</sub> 2 ± 0.2 mmolH <sub>2</sub> /L/h	0	↑ Eth, ↓ Bu and X	(Bastidas-Oyanedel et al., 2012)

Substrate	Substrate concentration	pH	Inoculum	Fermentation reactor	Conditions evaluated (1), (2)	Partial pressures (1)	Partial pressures (2)	H <sub>2</sub> production (1)	H <sub>2</sub> production (2)	H <sub>2</sub> improv. (%)	Major results associated	Reference
Glc	10 g/L	6.5	mixed culture	1.3L 6h HRT continuous CSTR	N <sub>2</sub> headspace flushing 58.4 L/d	pH <sub>2</sub> = 0.65 bar, pCO <sub>2</sub> = 0.07 bar	pH <sub>2</sub> < 0.1 bar, pCO <sub>2</sub> < 0.03 bar	0.6 ± 0.1 mol/mol <sub>glucose</sub> 0.5 ± 0.2 mmolH <sub>2</sub> /L/h	2.4 mol/mol <sub>glucose</sub> 4.1 ± 0.1 mmolH <sub>2</sub> /L/h	300	↓ X, Bu and Lac	(Bastidas-Oyanedel et al., 2012)
Glc	20 g/L	5.5	anaerobic digester sludge	2L continuous CSTR	N <sub>2</sub> sparging 12mL/min/L	60% H <sub>2</sub> , 40% CO <sub>2</sub>	35% H <sub>2</sub> , 20% CO <sub>2</sub>	1 mol/mol 0.64 gH <sub>2</sub> /d	2 mol/mol 1.33 gH <sub>2</sub> /d	100	↑ Substrate degradation, Ac, Bu ↑ Eth	(J. Kraemer and Bagley, 2008)
Winery wastewater effluents	35-50 g/L 218 gCOD/L/d	4,5 ± 0,2	Anaerobic granular methanogenic sludge	continuous UASB 2.5 L	Headspace recirculation in the liquid phase at 9.7, 17.8 m/d	/	/	22 mLH <sub>2</sub> /L/d	~45 mLH <sub>2</sub> /L/d	105	↓ H <sub>2</sub> consumption, Homoacetogens abundance ( <i>C. carboxidivorans</i> , <i>C. ljungdahlii</i> ) and undetermined COD (Lac?),	(Buitrón et al., 2020)
Glc	2 g/L	6.2	sludge from WWTP	300mL batch bottles	CO <sub>2</sub> capture (KOH) without sparging	64% H <sub>2</sub> max, 24% CO <sub>2</sub> max	87% H <sub>2</sub> max, 5% CO <sub>2</sub> max	1.4 ± 0.1 mol/mol	2.0 ± 0.1 mol/mol	43	/	(Park et al., 2005)
Sucrose	10 g/L	5.5	sludge from WWTP	continuous CSTR	CO <sub>2</sub> capture (NaOH) with sparging	/	/	0.07 mol /mol <sub>hexose</sub> (added) 0.27mL/min	0.72 mol /mol <sub>hexose</sub> (added) 2.82mL/min	929	↑ Bu and ↓ Ac	(Massanet-Nicolau et al., 2016)
Sucrose	10 g/L	5.5	sludge from WWTP	continuous CSTR	CO <sub>2</sub> capture (NaOH) and H <sub>2</sub> elimination (electrochemical) with sparging	/	1% H <sub>2</sub> max	0.72 mol /mol <sub>hexose</sub> (added) 2.82mL/min	1.79 mol /mol <sub>hexose</sub> (added) 6.98 mL/min	149	↑ substrate degradation and Bu, ↓ Ac	(Massanet-Nicolau et al., 2016)
Glc	8 g/L, OLR: 25.7 gCOD/L/d	5.2	sludge from WWTP	integrated biohydrogen reactor clarifier system, CSTR 7 L	CO <sub>2</sub> capture (KOH) without sparging	57% H <sub>2</sub>	~ 100% H <sub>2</sub>	2.42 ± 0.15 mol/mol 57 LH <sub>2</sub> /d	2.96 ± 0.14 mol/mol 70 LH <sub>2</sub> /d	22	↑ Ac, bacterial richness, diversity and identified H <sub>2</sub> producers	(Nasr et al., 2015)
Glc	10 g/L	7	sludge from WWTP	Batch	CO <sub>2</sub> capture (NaOH) without sparging	35% H <sub>2</sub> max	60-65% H <sub>2</sub> max	0.81±0.03 mol/mol HPR: 7.7 ± 0.5 mL/h 12±1 mmol/L/h	1.45±0.08 mol/mol HPR: 15.9 ± 1.1 mL/h 20±2 mmol/L/h	79	↑ lag phase, Bu COD % and glucose degradation efficiency. ↓ Ac and Eth COD %,	(Chang et al., 2012)
Glc	5 g/L	6.5	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	batch	Initial stripping of fermentation medium with CO <sub>2</sub>	100% CO <sub>2</sub> ini	100% N <sub>2</sub> ini	2.7±0.1 mol/mol	3.0±0.1 mol/mol	67	↑ medium osmolarity. ↓ X	(Willquist et al., 2009)
Glc	20 g/L	5,5± 2	sludge from WWTP	Continuous gas separation membrane reactor	Recirculation of CO <sub>2</sub> rich-permeate (~50/50 H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> )	/	/	6.96–7.35 L H <sub>2</sub> /L-d	8.9–9.2 L H <sub>2</sub> /L-d	25	↑ <i>Lactobacillus casei</i>	(Bakonyi et al., 2017)

Substrate	Substrate concentration	pH	Inoculum	Fermentation reactor	Conditions evaluated (1), (2)	Partial pressures (1)	Partial pressures (2)	H <sub>2</sub> production (1)	H <sub>2</sub> production (2)	H <sub>2</sub> improv. (%)	Major results associated	Reference
Glc	20 g/L	5,5±2	sludge from WWTP	Continuous gas separation membrane reactor	Recirculation of H <sub>2</sub> rich- retentate (66/34 H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> )	/	/	6.96–7.35 L H <sub>2</sub> /L-d	2.7–3.03 L H <sub>2</sub> /L-d	- 55	/	(Bakonyi et al., 2017)
Glc	5 g/L	6.7	<i>Clostridium butyricum</i>	continuous	Vacuum 0.28 atm	0.38 - 0.46 atm H <sub>2</sub>	0.28 atm total	2-2.3 mol/mol	1.8 - 2.3 mol/mol	0	/	(Kataoka et al., 1997)
Glc	10 g/L	6.7	<i>Clostridium butyricum</i>	continuous	Vacuum 0.28 atm	0.38 - 0.46 atm H <sub>2</sub>	0.28 atm total	1.4-2 mol/mol	1.3 - 2.2 mol/mol	0	/	(Kataoka et al., 1997)
Molasses	21 gCOD/L	5.5	mixed culture	continuous	Vacuum: 0.8 bar, 1bar, 1.2 bar, 1.4 bar	1.2 - 1.4 bar, 0.61 - 0.71 bar H <sub>2</sub>	0.8 - 1 bar, 0.41 - 0.49 bar H <sub>2</sub>	0.56 - 2.15 mol/mol 62 - 210 mLH <sub>2</sub> /h	2.79 - 4.51 mol/mol 302 - 406 mLH <sub>2</sub> /h	110	No change in microbial communities. No distinction in metabolic production	(Nunes Ferraz Júnior et al., 2020)
Whey permeate	20-35 gCOD/L/d	5.7-5.8	sludge from UASB reactor	upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor	Vacuum: - 35 to - 25 mbars	/	/	4.37 mol H <sub>2</sub> /kg COD	4.55 mol H <sub>2</sub> /kg COD	4	/	(Kisielewska et al., 2015)
Sucrose	20 gCODsucose/L	5,5	seacoast sludge	continuous CSTR	Vacuum: 1 bar to 0.173 bar	~46-50 % H <sub>2</sub>	~46-50 % H <sub>2</sub>	0.348 mol/L/d	0.376 mol/L/d	9	↑ % COD Bu and X. ↓ H <sub>2</sub> specific productivity	(Lee et al., 2012)
Glc	3 g/L	7,12 <sup>a</sup>	Seed sludge from anaerobic reactor	semi-continuous bottles	Vacuum: 1.0 bar, 0.2 bar	20-37 % H <sub>2</sub> , 70 - 85 % CO <sub>2</sub>	20-37 % H <sub>2</sub> , 70 - 85 % CO <sub>2</sub>	0.63 mmol/j	10.71 mmol/j	1598	↑ COD Ac, ↓ Bu	(Liu and Wang, 2017)
Glc	10 g/L	6	<i>Enterobacter cloacae</i>	300 mL Shake flask batch	Vacuum: 1.0 - 0.5 bar	/	/	1.9 mol/mol 6 μmol/L/h	3.9 mol/mol 17 μmol/L/h	105	↓ Lag phase and X	(Mandal et al., 2006)
Glucose	10g/L	5.0 ± 0.1	Mix of pig manure and fermentation broth	Semi continuous 800mL serum glass bottles	Reduced pressure	53 ± 10 % H <sub>2</sub>	10 ± 2 % H <sub>2</sub>	1.61 ± 0.24mmol/L/d	22.01 ± 1.97 mmol/L/d	1267	↓ Ac consumed by homoacetogenesis	(Huang et al., 2021)
Cheese Whey	5 gcarbohydrates/L	7.5	Anaerobic sludge	Batch in 600mL bottles with intermittent stirring	two-phase partitioning bioreactor with 10% (v/v) silicone oil	52 ± 2 %H <sub>2</sub> 48 ± 1 % CO <sub>2</sub>	65 ± 1 % H <sub>2</sub> 35 ± 2 % CO <sub>2</sub>	1.19 ± 0.4 LH <sub>2</sub> /L 2.07 mol/mol	1.53 ± 0.1 LH <sub>2</sub> /L 2.37 mol/mol	14	↑ Ac, No changes in microbial community at genus level.	(Montoya-Rosales et al., 2022)
Glucose	15gCOD/L	4.8-4.9	Anaerobic sludge from digester	UASB, 8h HRT	low-strength-ultrasonication	36 % H <sub>2</sub>	43 % H <sub>2</sub>	0.54 mol/mol	0.89 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	65	↑ H <sub>2</sub> %, Bu, abundance of <i>C. pasteurianum</i> , <i>E. cloacae</i> and <i>Aeromonas hydrophila</i> ; ↓ Prop, abundance of <i>Clostridium butyricum</i>	(Cho et al., 2018)
Cheese whey	15glactose /L	5,9	Anaerobic WWTP sludge	CSTR, 6h HRT	Increase of kLa by mixing from 1.04 to 4.23 h <sup>-1</sup>	0.39 atm H <sub>2</sub>	0.40 atm H <sub>2</sub>	0.61 ± 0.15 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	1.08 ± 0.21 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	77	↑ Substrate degradation, Ac, Bu, <i>Clostridium sp.</i> abundance	(Palomo-Briones et al., 2019)

- Conclusion sur les apports de la littérature

De nombreuses stratégies reposant sur la modification des concentrations en H<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> ont permis d'améliorer substantiellement la production d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre, avec des résultats très disparates. Quelques études ont recensé des effets très limités voire nuls (Bastidas-Oyanedel et al., 2012). En cohérence, des essais préalablement menés au LBE ont également été associés à des effets très variables sur la production d'H<sub>2</sub> (Tableau 1-9). Les mécanismes associés aux améliorations de la production d'H<sub>2</sub> sont donc probablement dépendants des communautés microbiennes cultivées, et des conditions opératoires.

**Tableau 1-9 : Synthèse des études portées sur l'influence des concentrations en gaz réalisées par diminution de pression conduites au LBE.**

Project / Operator	Substrate	Reactor volume (L)	Mode	Headspace	H <sub>2</sub> production (1)	H <sub>2</sub> production (2)	H <sub>2</sub> production improv. (%)	Reference
				total pressure (1) vs (2) (bar)				
Paul-Antoine Fougères	Biowaste	2	B	1 vs 0.8	4486 mL	3847 mL	- 14	Unpublished (period: 2010)
Paul-Antoine Fougères	Biowaste	2	B	1 vs 0.5	4486 mL	6275 mL	+ 40	Unpublished (period: 2010)
NoaW	Vinasses	21	B	1 vs 0.5	13 mL <sub>H<sub>2</sub></sub> ·g <sub>VS</sub> <sup>-1</sup>	34 mL <sub>H<sub>2</sub></sub> ·g <sub>VS</sub> <sup>-1</sup>	+ 155	Unpublished (period: 2016-2019)
Djalma Nunes Ferraz	Sugarcane molasses	2	C	0.8 - 1 vs 1.2 - 1.4	0.56 - 2.15 mol/mol	2.79 - 4.51 mol/mol	+ 110	(Nunes Ferraz Júnior et al., 2020)

Une partie des études ont rapporté une augmentation de la production d'acétate (Esquivel-Elizondo et al., 2014; J. Kraemer and Bagley, 2008; Montoya-Rosales et al., 2022; Nasr et al., 2015; Palomo-Briones et al., 2019), suggérant que la production d'H<sub>2</sub> a augmenté *via* une **augmentation de la voie acétate**, la plus efficace pour produire de l'H<sub>2</sub> (4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>acetate</sub><sup>-1</sup>). Une évolution des produits métabolites a été observée à plusieurs reprises sans évolution apparente de la communauté microbienne, suggérant que l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> était due à des **effets métaboliques à l'échelle cellulaire**, sans effet populationnel.

D'autres études au contraire ont rapporté une diminution de la production d'acétate, et ont attribué l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> à une **baisse d'activité homoacétogène** (Huang et al., 2021; Massanet-Nicolau et al., 2016; Montiel Corona and Razo-Flores, 2018; Nunes Ferraz Júnior et al., 2020). Notons que cette justification a bien souvent été étayée par des indicateurs sujets à caution. Par exemple, le calcul de la part d'acétate issu de l'homoacétogénèse (Nunes Ferraz Júnior et al., 2020) est difficilement applicable dès que le



lactate fait partie des produits métabolites, ce qui est souvent le cas. En réalité, l'analyse des communautés microbiennes n'a clairement révélé une diminution de la croissance d'organismes ayant une activité homoacétogène que dans une seule des études recensées dans cette synthèse (Buitrón et al., 2020), avec une diminution de l'abondance de *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* de 16 à 2 %. Et même dans cette étude, l'amélioration du transfert gazeux a aussi été associée à l'augmentation de l'abondance d'un producteur d'H<sub>2</sub> de 47 à 69 % (*Megasphaera* sp.), montrant que la réduction de l'activité homoacétogène n'était pas l'unique mécanisme expliquant l'augmentation de la production d'H<sub>2</sub>.

La concentration en CO<sub>2</sub> est apparue comme **une pression de sélection** intéressante, pouvant favoriser les producteurs d'H<sub>2</sub> à forte (D.-H. H. Kim et al., 2006) ou à faible (Nasr et al., 2015) concentration, à pH constant, parfois en lien avec un effet sur l'osmolarité du milieu (Willquist et al., 2009). L'effet positif des stratégies de captage de CO<sub>2</sub> malgré l'augmentation la pH<sub>2</sub> induite remet en question la focalisation récurrente des études sur la réduction de la concentration en H<sub>2</sub>. De l'autre côté, quelques études ont rapporté un effet négatif de la recirculation d'un gaz enrichi en H<sub>2</sub> (Bakonyi et al., 2017; Massanet-Nicolau et al., 2016), malgré la diminution de la pCO<sub>2</sub> associée. Les effets indépendants de la concentration en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> restent donc incompris et un **cumul de divers mécanismes de sélection microbienne et de restriction d'inhibition à l'échelle cellulaire** doit être considérés.

L'absence d'effet positif de la recirculation du biogaz avec *sparging* ou du *flushing* au N<sub>2</sub> sur la production d'H<sub>2</sub> (Bastidas-Oyanedel et al., 2012; D.-H. H. Kim et al., 2006) a suggéré que les fermentations étudiées n'ont **pas toutes été associées à une sursaturation** en gaz dissous, ou tout du moins que la réduction de la sursaturation opérée a été sans effet sur la production d'H<sub>2</sub>. A l'inverse, Zhang et al. (2013) ont suggéré qu'une sursaturation élevée était inévitable en fermentation en culture mixte thermophile car les k<sub>La</sub> à atteindre pour assurer un transfert gazeux suffisamment efficaces sont 10 à 1000 fois supérieurs au k<sub>La</sub> maximum atteint *via* un *sparging* au N<sub>2</sub>. Les auteurs ont suggéré que le débit de *sparging* doit représenter 2 à 10 fois le débit de production d'H<sub>2</sub> pour être efficace. Il est néanmoins très difficile de présumer de la sursaturation des dispositifs de fermentation avec les données généralement fournies dans les études, notamment parce que la géométrie des bioréacteur ou les propriétés du milieu fermentaire induisent des transferts de masse variables, non renseignés (J. Kraemer and Bagley, 2008). En conséquence, il est difficile de présumer de l'intérêt des différentes stratégies proposées pour une fermentation dans des conditions données, malgré la très vaste littérature sur le sujet.

Plusieurs études ont rapporté un effet nul voire négatif des stratégies appliquées pour diminuer les concentrations en gaz dissous lorsqu'elles étaient déployées dans des valeurs extrêmes, en lien avec un stress de la biomasse induit par les conditions d'agitation / de cisaillement appliquées (Bastidas-Oyanedel et al., 2012; Mizuno et al., 2000; Willquist et al., 2009). **Il existe donc un compromis à trouver entre l'optimisation du transfert gazeux et le stress appliqué sur les cellules.**

Enfin, la quasi-intégralité des études discutées ici ont été réalisées en utilisant du glucose ou un substrat simple (ne nécessitant pas d'hydrolyse). Or, dans le cas d'une application d'une stratégie de désaturation en fermentation d'un déchet réel, les microorganismes exerçant une activité hydrolytique tout comme la flore indigène au déchet sont susceptibles d'être affectés.

### 1.5.3. Inhibition par les acides organiques

Les principaux acides coproduits lors de la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre sont l'acétate, le butyrate et le lactate (Chen et al., 2021a; Lopez-Hidalgo et al., 2022; S. Van Ginkel and Logan, 2005). Plus précisément, Lopez-Hidalgo et al. (2022) relève par une méta-analyse de la littérature que la concentration moyenne dans les effluents de fermentation sombre est de 35 mM d'acétate (entre 1 et 147 mM), 22 mM de lactate (entre 0,2 et 78 mM) et 25 mM de butyrate (entre 0,3 et 150 mM). A l'opposé de la littérature concernant l'inhibition par les gaz de fermentation, les auteurs ont le plus souvent étudié l'inhibition par les acides en les ajoutant au milieu de culture, au début de la fermentation. Dans cette partie, les mécanismes d'inhibition de l'activité microbienne et de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques sont décrits dans un premier temps, puis des stratégies déployées pour limiter leurs effets inhibiteurs sont présentées.

#### 1.5.3.1. Mécanismes d'inhibition

La production d'acétate et de butyrate est notamment inévitable lors de la croissance bactérienne, de par la production d'ATP *via* phosphorylation au niveau du substrat. La fermentation peut également être associée à une accumulation d'autres molécules organiques comme le formiate, l'éthanol ou le propionate (Lopez-Hidalgo et al., 2022; Sivagurunathan et al., 2014). Ces molécules peuvent par ailleurs être présentes dans le milieu fermentaire dès le début de la fermentation, en s'accumulant initialement dans le substrat. Ainsi, la littérature recense une accumulation de lactate dans les soupes de déconditionnement à hauteur de 300 mM (Noblecourt et al., 2018), d'éthanol dans des effluents vinicoles à hauteur de 240 mM (Buitrón et al., 2020) et d'acétate dans les substrats lignocellulosiques prétraités à hauteur de 200 mM (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

De nombreux articles rapportent des effets inhibiteurs associés à l'accumulation des acides dans le milieu de culture (Castro-Villalobos et al., 2012; Noblecourt et al., 2017; Pratt et al., 2012; Sivagurunathan et al., 2016; Srikanth and Venkata Mohan, 2014; S. Van Ginkel and Logan, 2005). La grande majorité de ces études rapporte les effets des acides organiques en fermentation sombre en les ajoutant initialement au milieu de culture. Dans cette partie, les mécanismes d'inhibition d'activité enzymatiques, de l'activité bactérienne et de la

production d'H<sub>2</sub> par les métabolites majoritaires : l'acétate, le butyrate et le lactate sont présentés.

**Dans tout ce manuscrit, le terme « stress acide » se rapportera au stress généré par la présence d'acides organiques, et non pas à une baisse de pH.**

#### ❖ Altération de l'activité enzymatique

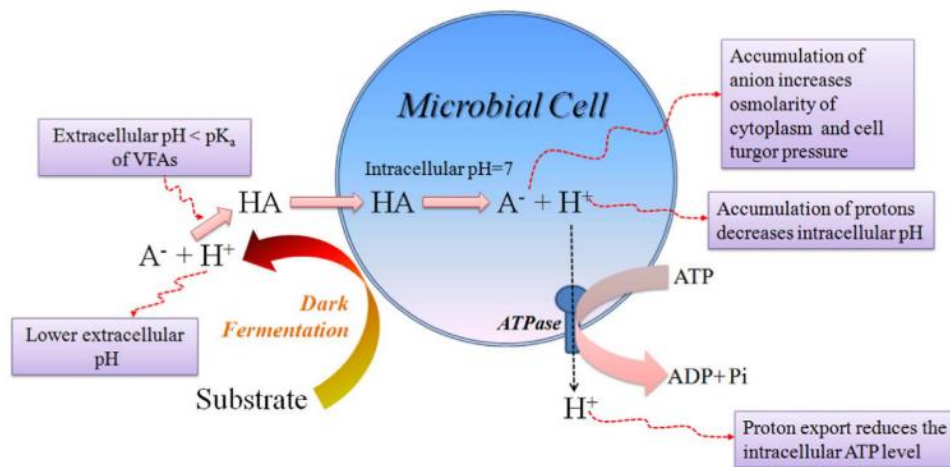
L'accumulation d'acides peut affecter directement l'activité des enzymes et perturber les voies métaboliques. Lors de la réalisation simultanée d'une saccharification enzymatique et d'une fermentation par *Clostridium thermoaceticum*, l'accumulation d'acétate (dès ~5 g·L<sup>-1</sup>) inhibait l'activité des cellulases dans le milieu réactionnel (Borden et al., 2000). Zhu and Yang (2004) ont étudié l'effet inhibiteur du butyrate sur l'activité de plusieurs enzymes exprimées par *C. tyrobutyricum* à pH 7,4 : (i) la phosphotransacetylase (PTA) et (ii) l'acétate kinase (AK), toutes deux impliquées dans la production d'acétate ; (iii) la phosphotransbutyrylase (PTB, production de butyrate) et enfin (iv) la lactate dehydrogenase (LDH, production de lactate). Ainsi, les quatre enzymes PTA, AK, PTB et LDH ont été inhibées par le butyrate, avec notamment une perte totale d'activité de PTA dès 50 mM de butyrate. Les effets des acides organiques sur l'activité enzymatique sont variables en fonction des microorganismes. Par exemple, chez *E. Coli.*, l'acétate inhibe la croissance en inhibant la voie de synthèse de la méthionine (Roe et al., 2002). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'acétate affecte l'activité de certaines enzymes de la glycolyse (Pampulha, 1990).

#### ❖ Effets décrits en cultures pures

A l'échelle cellulaire, l'accumulation d'acétate et de butyrate dans le milieu de culture peut affecter l'activité des microorganismes *via* de multiples mécanismes. La Figure 1-15 présente une visualisation d'une partie de ces mécanismes d'inhibition.

**Sous leurs formes non dissociées**, ces acides peuvent traverser librement la membrane cellulaire (Nicolaou et al., 2010). L'acétate et le butyrate se dissocient alors dans le cytosol, qui a un pH neutre, puisque leur pKa est de 4,76 et 4,82, respectivement. Les protons ainsi libérés induisent une diminution du pH interne, dissipant le gradient de protons de la membrane ( $\Delta pH$ ), limitant donc la force proton-motrice ( $\Delta p$ ) et perturbant l'homéostasie cellulaire. Pour contrer cet effet, la cellule extrude activement ces protons en utilisant des pompes consommatrices d'ATP, ce qui augmente l'énergie de maintenance et réduit la quantité d'énergie disponible pour la croissance de la biomasse (Baronofsky et al., 1984; Herrero et al., 1985; Russell, 1992; van Niel et al., 2003). La libération de protons dans le

cytosol par les acides organiques peut aussi causer des dommages à l'ARN ribosomal et à l'ADN (Nicolaou et al., 2010).



**Figure 1-15 : Mécanismes d'inhibition par les formes dissociées et non dissociées des acides produits en fermentation. Figure issue de(Elbeshbishy et al., 2017) , Fig 1.**

**Sous leurs formes dissociées**, l'acétate et le butyrate augmentent la pression osmotique et entraînent une inhibition de la croissance (van Niel et al., 2003). Chez *E. Coli* par exemple, il a été observé que la présence d'acétate induit une régulation de l'expression génique correspondant à une réponse à un stress osmotique (Hirshfield et al., 2003). Chez *Caloramator celer* (*Clostridiaceae*), l'acétate induit une inhibition de la production d' $H_2$  au-delà de 150 mM (glucose  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,2) ; il a été conclu que cette inhibition était due à une augmentation de l'osmolarité, l'ajout de sels induisant la même inhibition, et les effets n'étant pas pH-dépendants (Ciranna et al., 2014).

A l'extérieur de la cellule, la production d'acétate, de butyrate et la libération des protons associée sont également à l'origine d'une diminution du pH. Si ce dernier n'est pas régulé, l'activité microbienne productrice d' $H_2$  sera alors progressivement réduite, jusqu'à ce que le pH sorte de la gamme tolérée par les bactéries productrices d' $H_2$  (Srikanth and Venkata Mohan, 2014).

Par ailleurs, l'effet du stress par l'acétate et le butyrate sur l'expression génétique de *C. acetobutylicum* a été étudiée (Alsaker et al., 2010). L'exposition à 45 mM d'acétate ou 30 mM de butyrate à pH 5,8 a notamment induit une réponse caractérisée par une sur-régulation de gènes impliqués dans la réponse au stress. Curieusement, l'acétate a induit une sous-régulation de l'expression des gènes de synthèse du butyrate et *vice versa*. Chez *C. acetobutylicum* (Alsaker et al., 2010) et *C. beijerinckii* (Chen and Blaschek, 1999), l'accumulation de butyrate a été associée au déclenchement de la solvantogénèse.

L'ajout d'acétate ( 0 – 500 mM) ou de butyrate (0 – 250 mM) à une culture de *Clostridium bifermentans* (glucose 10 g·L<sup>-1</sup>, pH 7) a induit une inhibition de la production d'H<sub>2</sub> dose-dépendante, dès 20 mM (Zhang et al., 2012). La croissance de *C. bifermentans* a été affectée dès 100 mM d'acétate ou 20 mM de butyrate. De plus, une concentration de 400 mM d'acétate ou de 50 mM de butyrate a restreint la dégradation du glucose de près de 50 %. La présence d'acides a également influencé les voies métaboliques empruntées. Dès 110 mM d'acétate, la production d'acétate a diminué en faveur de la production de propionate. L'ajout de butyrate a induit une légère augmentation de la production de lactate et une diminution de la production d'acétate (Zhang et al., 2012).

Les effets observés sont très différents chez *C. butyricum* cultivé sur glycérol à pH 7 régulé au cours de la fermentation (Colin et al., 2001). Jusqu'à 250 mM d'acétate ou 170 mM de butyrate, la croissance bactérienne n'a pas été affectée. Néanmoins, les voies métaboliques ont été modifiées avec une augmentation de la production de biomasse et de butyrate couplée à une réduction de la production de 1,3-propanediol en présence d'acétate, et à l'inverse une augmentation de la production de 1,3-propanediol et une réduction de la production de biomasse et de butyrate en présence de butyrate. En comparaison, l'ajout de lactate, d'acétate et de butyrate a différemment affecté la croissance de *C. butyricum* dans l'étude de Szymanowska-Powałowska and Kubiak (2015). Les auteurs ont cultivé *C. butyricum* à un pH initial de 7 non régulé pendant la fermentation et avec du glycérol comme substrat. L'acétate a présenté l'effet le plus inhibiteur, divisant par deux la production de biomasse à seulement 3 mM, ce qui a été observé à 7 mM butyrate ou le lactate. Les auteurs ont observé que les acides induisaient des effets inhibiteurs beaucoup moins marqués lorsqu'ils étaient ajoutés en début de phase exponentielle et non pas dès l'inoculation du milieu de culture. Ajoutés en début de phase exponentielle, il a fallu 170 mM d'acétate pour diviser par deux la production de biomasse, et entre 110 et 170 mM pour obtenir le même effet inhibiteur du butyrate ou du lactate. L'absence de régulation du pH dans cette étude explique probablement la toxicité plus élevée relevée par rapport à l'étude de Colin et al. (2001).

Kovanda et al. (2019) ont montré que la tolérance aux acides organiques varie selon les espèces et les souches de microorganismes. Par exemple, la concentration minimale inhibitrice<sup>8</sup> en butyrate était de 14 ; 23 ; 26 et 28 mM pour *Clostridium perfringens* ATCC 12915, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Escherichia coli* F18, respectivement (le milieu de culture et son pH ne sont pas détaillés dans l'article) (Kovanda et al., 2019). Ces différentes sensibilités aux acides entre microorganismes peuvent s'expliquer par des différences de perméation membranaire et d'homéostasie du pH (Slonczewski et al., 2009).

---

<sup>8</sup> Concentration minimale inhibant l'augmentation de la turbidité du milieu de culture.

Pour résumer, les acides peuvent présenter des effets inhibiteurs, sous leur forme dissociée et non dissociée, variables en fonction de l'espèce bactérienne considérée. Les effets de l'acétate et du butyrate sont distincts. Les effets du lactate sont moins étudiés. La présence des acides peut affecter la dégradation du substrat, la croissance de la biomasse, sur-exprimer des gènes de réponse au stress, altérer les voies métaboliques et notamment affecter la production d'H<sub>2</sub>.

#### ❖ Effets décrits en culture mixte

Le Tableau 1-10 présente une synthèse d'études ayant porté sur l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par des acides organiques en cultures mixtes. Dans toutes ces études, l'effet inhibiteur a été étudié par ajout de la molécule inhibitrice. Le tableau présente les seuils d'inhibition (i) de la production d'H<sub>2</sub>, (ii) de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub>, (iii) de la latence avant production ainsi (iv) que le seuil éventuellement déclencheur d'une solvantogénèse.

**Un seuil d'inhibition se définit comme la concentration la plus élevée ne résultant pas en une inhibition significative du paramètre étudié.** Ainsi, lorsqu'une inhibition est observée dès la plus faible concentration étudiée, à 10 mM par exemple, alors le seuil d'inhibition est inférieur à 10 mM.

La plupart des études ont utilisé le glucose comme substrat et étaient conduites en mode batch. Le seuil d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> a considérablement varié, quelle que soit la molécule étudiée. Ainsi, il a varié de < 8 mM à 98 mM lors d'ajout d'acétate, de < 10 mM à 71 mM lors d'ajout de butyrate, de < 10 mM à > 136 mM lors d'ajout de propionate.

Le seuil d'inhibition de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> correspond souvent au même seuil que l'inhibition du rendement en H<sub>2</sub>, bien qu'il arrive que la vitesse de production d' H<sub>2</sub> soit réduite sans diminuer le rendement en H<sub>2</sub> (Noblecourt et al., 2017; Y. Wang et al., 2008; Zheng and Yu, 2005). Une réduction de la vitesse de production sans affecter le rendement s'explique par un ralentissement du métabolisme, ou une diminution de la biomasse active (Noblecourt et al., 2017), sans modification des voies métaboliques et sans que le ralentissement de la production d'H<sub>2</sub> ne soit au bénéfice des activités consommatrices d'H<sub>2</sub>.

La revue de la littérature présentée dans le Tableau 1-10 est employée dans la suite de cette partie pour distinguer et discuter l'effets de différents paramètres impactant l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques.

- **Effets des acides produits par les microorganismes en comparaison avec ceux ajoutés au milieu de culture**

Trois études en culture mixte ont rapporté des effets inhibiteurs des acides distincts selon que ces derniers aient été produits par les bactéries, de manière endogène suite à la consommation du substrat ou bien qu'ils aient été introduits par l'expérimentateur dans le milieu de culture (Heuvel et al., 1988; Noblecourt et al., 2017; S. Van Ginkel and Logan, 2005).

Van Ginkel and Logan (2005) ont rapporté que la production par les microorganismes d'acides à une concentration sous leur forme non dissociée de 19 mM (13 mM de butyrate non dissocié, H<sub>Bu</sub>) initiait une solvantogénèse et une chute du rendement en H<sub>2</sub> de  $2,5 \pm 0,1$  à  $1,6 \pm 0,1 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ . En revanche, l'ajout de 25 mM de H<sub>Bu</sub> au milieu de culture a seulement réduit le rendement de  $2,5 \pm 0,1$  à  $2,0 \pm 0,1 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  sans initier de solvantogénèse.

De façon cohérente, Heuvel et al. (1988) ont comparé l'inhibition induite par l'ajout de butyrate dans un réacteur en mode continu avec celle induite en augmentant la concentration en glucose par Zoetemeyer et al. (1982). Les auteurs ont observé que les acides produits semblent induire une plus forte inhibition de la croissance, avec une différence de facteur 2 du taux de croissance.

Enfin, Noblecourt et al. (2017) ont observé une inhibition de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> à une concentration de 155 mM composée de 113 mM de butyrate et 42 mM d'acétate lors de l'accumulation d'acides produits par les microorganismes, (glucose 60 g·L<sup>-1</sup>, pH 6 régulé). Les auteurs ont mesuré une inhibition à la même concentration lors d'une fermentation en conditions similaires avec un ajout initial au milieu de culture de 46 mM de butyrate et 15 mM d'acétate (inhibition à 116 mM de butyrate et 38 mM d'acétate). L'inhibition était alors caractérisée par un ralentissement de la production d'H<sub>2</sub> sans modification apparente de la production de métabolites, et sans diminution du rendement en H<sub>2</sub>. Cependant, en ajoutant 26 mM d'acétate et 73 mM de butyrate en phase ascendante de la production d'H<sub>2</sub>, une solvantogénèse a été initiée. Cette observation tend à être contradictoire avec les résultats observés en culture pure par Colin et al. (2001).

Des effets inhibiteurs variables ont donc été décrits en fonction que les acides aient été ajoutés ou produits. Une plus forte toxicité des acides ajoutés pourrait s'expliquer (i) par une augmentation de l'osmolarité plus importante que lors de la production des acides, due à l'ajout d'un contre-ion, ou encore (ii) par l'absence de temps d'adaptation des microorganismes au stress acide. A l'inverse, une inhibition plus élevée en présence d'acides produits pourrait par exemple s'expliquer par une inhibition par le substrat, ou par l'accumulation d'autres produits métaboliques dans le milieu de culture.

## ○ Effet pH

Globalement, les études présentant les seuils d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> les plus élevés, avec 97 mM d'acétate, 83 mM d'acétate, 29 mM de butyrate et 15 + 46 mM d'acétate et de butyrate respectivement (Noblecourt et al., 2017; S. Van Ginkel and Logan, 2005; Y. Wang et al., 2008) sont celles effectuant une régulation du pH. A l'inverse, une partie des études avec les seuils les plus faibles tels que < 8 mM (Siqueira and Reginatto, 2015), < 10 mM (B. Wang et al., 2008) et 6 mM (Chen et al., 2021b) ont été effectuées sans tampon (Siqueira and Reginatto, 2015) (ou non indiqué) ou avec un tampon potentiellement inadaptée (Chen et al., 2021b; B. Wang et al., 2008) (48 mM NaHCO<sub>3</sub> ajoutés au milieu de culture pour tamponner la fermentation de 10g·L<sup>-1</sup> de glucose. Même tampon à pH 5,5 ; 6,0 ; 6,5 et 7,0). Ceci suggère que le pH joue un rôle important dans l'inhibition par les acides, ce qui est cohérent avec l'idée que sous leur forme non dissociée, les acides présenteraient une plus grande toxicité que sous leur forme dissociée (Eklund, 1985, 1983; S. Van Ginkel and Logan, 2005).

S. Van Ginkel and Logan (2005) ont étudié l'inhibition par le butyrate sous sa forme non dissociée et ont observé que 158 mM de butyrate à pH 5.5 (25 mM HBU) résultait en une inhibition du rendement en H<sub>2</sub> de 2,5 à 2,0 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> (et HPR diminuait de 0,29 à 0,23 L·h<sup>-1</sup>). Une concentration similaire de 160 mM de butyrate à pH 5,0 (60 mM HBU) résultait en une inhibition totale de la production d'H<sub>2</sub>. Plus récemment, Chen et al. (2021b) ont également étudié l'inhibition par le butyrate en fonction du pH et ont observé que le seuil inhibiteur du rendement en H<sub>2</sub> était de 6 mM à pH 5,5, alors qu'il s'élevait à 17 mM et 227 mM à pH 6 et 7, respectivement. Ceci suggère une nouvelle fois une moindre toxicité des acides à pH neutre. L'analyse des communautés microbiennes montrait alors que, en l'absence de butyrate, les communautés microbiennes différaient en fonction du pH. A pH 5,5 et pH 7, la communauté était dominée par 60 - 65 % de *Clostridium sp.* et le reste de la communauté était dominé par (i) *Klebsiella sp.* à pH 5,5 et (ii) *Enterobacter sp.* à pH 7,0. A pH 6, les abondances relatives des principaux OTUs se répartissent comme suit : 20 % *Clostridium sp.*, 20 % *Enterobacter sp.*, 30 % *Bacillus sp.* et 15 % *Acinetobacter sp.*. A ce stade, il ne peut être conclu que pour une même communauté bactérienne, l'élévation du pH diminue l'effet toxique des acides, mais plutôt qu'avec l'élévation du pH la toxicité des acides s'avère moins importante sur les communautés entrant en croissance.

Les données issues des articles présentés en Tableau 1-10 ont été converties afin de présenter les seuils d'inhibition par les acides en concentration non dissociées en Tableau 1-11. Globalement, cette conversion ne permet pas de diminuer la disparité des résultats observés en fonction des études. Les seuils inhibiteurs du rendement en H<sub>2</sub> varient entre < 0,07 et 15 mM d'acétate non dissocié, et entre < 0,07 et 6 mM de butyrate non dissocié. Néanmoins, Van Ginkel and Logan, (2005) et Y. Wang et al. (2008) ont mesuré un seuil



d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> par l'acétate non dissocié (HAc) ajouté à des valeurs similaires de 15 et 13 mM, respectivement. Concernant le butyrate, Van Ginkel and Logan (2005), Zoetemeyer et al. (1982) et Zheng and Yu (2005) trouvent également des seuils d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> similaires, respectivement à 5 mM, < 4 mM et 4 mM H<sub>2</sub>Bu. Par ailleurs, Noblecourt et al. (2017) ont observé une inhibition de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> en présence du mélange de 2 et 7 mM d'HAc et de H<sub>2</sub>Bu, respectivement, ce qui est en accord avec un effet inhibiteur du butyrate non dissocié de ~ 5 mM.

**Tableau 1-10 : Synthèse des résultats des études portées sur l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques en fermentation sombre et en cultures mixtes.**

Inoculum	Pretreatment	Substrate	Inhibitor	Mode	Range studied (mM)	Thr. H <sub>2</sub> Y <sup>1</sup> (mM)	Thr. HPR <sup>2</sup> (mM)	Thr. Latence <sup>3</sup> (mM)	Thr. Solvento. <sup>3</sup> (mM)	pH	Reference
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Acetate	C	0 – 164 in 11 - 138 out	97 in, 98 out	98 out	ND	>165 out	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)
Digested sludge	15 min at 100°C	Glucose 10gCOD/L	Acetate	B	0 - 300 in	<10	<10	ND	>300 in	pHi = 7, not fixed	(B. Wang et al., 2008)
sludge from UASB treating citrate-producing wastewater	1,5h à 105°C	Sucrose-rich synthetic waste water 25g COD/L	Acetate	B	0 – 833 in	83	<83	<83	>833 in	pH = 5,5 fixed	(Y. Wang et al., 2008)
Sludge from an UASB treating vinasse	12h à 105°C	Glucose 40gCOD/L	Acetate	B	0 – 167 in	<8	<8	8	>167 in	pHi = 6, not fixed	(Siqueira and Reginatto, 2015)
Municipal waste activated sludge	70°C 30 min	Starch 5g/L	Acetate	B	0-10	<10*	<10	/	/	pHi = 7, not fixed	(Baghchehsaraee et al., 2009)
Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Acetate	B	0 , 171	<171*	<171	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Digested sludge	15 min at 100°C	Glucose 10gCOD/L	Butyrate	B	0 - 300	<10	<10	ND	>300 in	pHi = 7, not fixed	(B. Wang et al., 2008)
Anaerobic sludge	1h at 85°C	Glucose 10gCOD/L	Butyrate	B	0 – 285	71	<47	95	>285 in	pHi = 6, not fixed	(Zheng and Yu, 2005)
Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Butyrate	B	0 - 107	<107*	<107	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Butyrate	C	0 - 145 in 13 - 160 out	29 in, 38 out	14 in, 29 out	ND	>158 out	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)

Municipal waste activated sludge	70°C 30 min	Starch 5g/L	Butyrate	B	0-10	<10*	<10	/	/	pHi = 7, not fixed	(Baghchehsaraee et al., 2009)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-80	6	<6	<6	>80	pHi = 5,5, not fixed	(Chen et al., 2021b)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-114	17	<6	<6	>114	pHi = 6,0, not fixed	(Chen et al., 2021b)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-170	17	<17	17	>170	pHi = 6,5, not fixed	(Chen et al., 2021b)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-284	227	<57	<57	>284	pHi = 7,0, not fixed	(Chen et al., 2021b)
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Acetate, Butyrate	C	32Ac + 116Bu in	<32 Ac+116 Bu in	< 32 Ac +116 Bu in	ND	>42Ac+12 8Bu out	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Acetate, Butyrate	B	81Ac + 72Bu in	< 81 Ac + 72 Bu in	< 81 Ac + 72 Bu in	ND	> 100 Ac+ 94 Bu out	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)
Derived from sewage treatment plant sludge	2-bromoethanesulfonate 10mM	Glucose 60g/L	Acetate, Butyrate	B	15 Ac + 46 Bu in 26Ac + 73Bu in	15Ac + 46 Bu in	<15Ac + 46Bu in	> 26Ac + 73Bu in	<26Ac + 73Bu in	6 fixed	(Noblecourt et al., 2017)
Municipal waste activated sludge	70°C 30 min	Starch 5g/L	Lactate	B	0 - 56	>56	>56	>56	>56	pHi = 7, not fixed	(Baghchehsaraee et al., 2009)
activated sludge	UV lamp 15 min	Apple pomace	Lactate	B	0 - 136	>136	>136	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Digested sludge	15 min at 100°C	Glucose 10gCOD/L	Propionate	B	0 - 300 in	<10	<10	ND	>300 in	pHi = 7, not fixed	(B. Wang et al., 2008)

Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Propionate	B	0 - 131	>131*	>131	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
--	----------------	--------------	------------	---	---------	-------	------	---	---	--------------------	---------------------

---

<sup>1</sup> Seuil d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub>

<sup>2</sup> Seuil d'inhibition de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub>

<sup>3</sup> Seuil d'augmentation de la latence avant production d'H<sub>2</sub>

<sup>4</sup> Seuil déclencheur de solvantogénèse

\* Volume d'H<sub>2</sub>

**Tableau 1-11 : Synthèse des résultats des études portées sur l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques sous forme non dissociée en fermentation sombre et en cultures mixtes.**

Inoculum	Pretreatment	Substrate	Inhibitor	Mode	Range studied (mM)	Thr. H <sub>2</sub> Y <sup>1</sup> (mM)	Thr. HPR <sup>2</sup> (mM)	Thr. Lag phase <sup>3</sup> (mM)	Thr. Solvento. <sup>4</sup> (mM)	pH	Reference
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Acetate	C	0 – 60 in 3 – 50 out	15 in / out	15 in / out	ND	>50 out, > 60 in	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)
sludge from UASB treating citrate-producing wastewater	1,5h à 105°C	Sucrose-rich synthetic waste water 25g COD/L	Acetate	B	0 – 127	13	<13	<13	>127	pH = 5,5 fixed	(Y. Wang et al., 2008)
Sludge from an UASB treating vinasse	12h à 105°C	Glucose 40gCOD/L	Acetate	B	0 – 9 in	<0,4	<0,4	0,4	>9 in	pHi = 6, not fixed	(Siqueira and Reginatto, 2015)
Digested sludge	15 min at 100°C	Glucose 10gCOD/L	Acetate	B	0 - 2 in	<0,1	<0,1	ND	>2 in	pHi = 7, not fixed	(B. Wang et al., 2008)
Municipal waste activated sludge	70°C 30 min	Starch 5g/L	Acetate	B	0, 0,06 in	<0,06	<0,06	/	/	pHi = 7, not fixed	(Baghchehsaraee et al., 2009)
Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Acetate	B	0 , 1	<1	<1	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Butyrate	C	0 – 60 in 4 – 63 out	5 in, 6 out	2,5 in, 5 out	ND	> 61 out	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)
Anaerobic sludge	1h at 85°C	Glucose 10gCOD/L	Butyrate	B	0 – 18	4	<3	6	>6	pHi = 6, not fixed	(Zheng and Yu, 2005)

Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-14	1,0	<1,0	1,0	>14	5,5, not regulated	(Chen et al., 2021b)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-7	1,1	<0,4	1,1	>7	6, not regulated	(Chen et al., 2021b)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-3	0,3	<0,3	<0,3	>3	6,5, not regulated	(Chen et al., 2021b)
Anaerobic digested sludge	100°C 15 min	Glucose 10g/L	Butyrate	B	0-2	1.5	<0,4	<0,4	>2	7, not regulated	(Chen et al., 2021b)
Digested sludge	15 min at 100°C	Glucose 10gCOD/L	Butyrate	B	0 - 2 in	<0,1	<0,1	ND	>2 in	pHi = 7, not fixed	(B. Wang et al., 2008)
Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Butyrate	B	0 , 0,7	<0,7	<0,7	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Municipal waste activated sludge	70°C 30 min	Starch 5g/L	Butyrate	B	0 , 0,07 in	<0,07	<0,07	/	/	pHi = 7, not fixed	(Baghchehsaraee et al., 2009)
Derived from sewage treatment plant sludge	2-bromoethanesulfonate 10mM	Glucose 60g/L	Acetate, Butyrate	B	0 – 1Ac + 3Bu in 0 – 2Ac + 7Bu out	> 2Ac + 7Bu out	2Ac + 7Bu out	> 2Ac + 7Bu out	<1Ac + 5Bu in	6 fixed	(Noblecourt et al., 2017)
Sieved Agricultural soil	2h at 100°C	Glucose 5gCOD/L	Acetate, Butyrate	C	5Ac + 20Bu in 12,5Ac + 12,5Bu in	<25 in	<25 in	ND	>69 out	5,5 fixed	(S. Van Ginkel and Logan, 2005)
Municipal waste activated sludge	70°C 30 min	Starch 5g/L	Lactate	B	0 – 0,4 in	> 0,4	> 0,4	> 0,4	> 0,4	pHi = 7, not fixed	(Baghchehsaraee et al., 2009)

Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Lactate	B	0, 0,1	>0,1	>0,1	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Activated sludge from sewage treatment plant	UV lamp 15 min	Apple pomace	Propionate	B	0, 1	>1	>1	/	/	pHi = 7, not fixed	(Wang et al., 2010)
Digested sludge	15 min at 100°C	Glucose 10gCOD/L	Propionate	B	0 - 2 in	<0,1	<0,1	ND	>2 in	pHi = 7, not fixed	(B. Wang et al., 2008)

<sup>1</sup> Seuil d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub>

<sup>2</sup> Seuil d'inhibition de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub>

<sup>3</sup> Seuil d'augmentation de la latence avant production d'H<sub>2</sub>

<sup>4</sup> Seuil déclencheur de solvantogénèse

### ○ Effet de la nature de l'acide

Van Ginkel and Logan (2005) ont trouvé que le butyrate était plus inhibiteur que l'acétate, avec une inhibition dès 38 mM et 97 mM, respectivement, ce qui est cohérent avec des résultats en culture pure précédemment décrits. En revanche, l'ajout simultané d'acétate et de butyrate dans des proportions différentes (32 mM Ac + 116 mM Bu d'une part et 81 mM Ac + 72 mM Bu d'autre part), a engendré la même réduction de la vitesse de production d' $H_2$  de 0,29 à 0,25  $L \cdot h^{-1}$  et des inhibitions des rendements en  $H_2$  de 2,5 à 2,1 et 1,9  $mol \cdot mol^{-1}$  (Van Ginkel and Logan, 2005). Autrement dit, l'effet plus toxique du butyrate sur l'acétate ne se retrouve pas dans ces résultats en mélange, dans des conditions expérimentales identiques.

L'effet inhibiteur du lactate sur la production d' $H_2$  par fermentation sombre et sur les communautés microbiennes associées a été peu étudiée. En effet, le lactate est généralement utilisé comme substrat pour la production d' $H_2$  (Noblecourt et al., 2018). Par exemple, l'ajout de 10 mM de lactate lors de la fermentation d'amidon a augmenté la vitesse et le rendement de production d' $H_2$  de 4,31 à 8,23  $mL \cdot h^{-1}$  et de 5,70 à 9,08  $mmol_{H_2} \cdot g_{amidon}^{-1}$ , respectivement. Son pKa étant faible (4,86), les concentrations en lactate non dissocié aux pH usuels de fermentation (5-6,5) sont restreintes, ce qui lui confère potentiellement un moindre effet inhibiteur. Néanmoins, l'ajout de 44 mM de L-Lactate a induit une diminution de 35 % de la production d' $H_2$  pendant la fermentation de déchets alimentaires (Noblecourt et al., 2018). Les mêmes auteurs observaient que le lactate produit à une concentration de 300 mM par la flore indigène d'une soupe de déconditionnement était le principal substrat pour la production d' $H_2$  (Noblecourt et al., 2018). Ce résultat suggère que la forme énantiomérique du lactate puisse influencer son effet inhibiteur. Par ailleurs, T. H. Kim et al. (2012) ont observé que 178 mM de lactate (forme énantiomérique inconnue) induisait une augmentation de 40 % de la phase de latence. Le D-Lactate et le L-Lactate étant naturellement produits par les LAB (Chang et al., 1999), l'inhibition par le lactate dépend probablement des conditions de fermentation et de l'inoculum.

B. Wang et al. (2008) ont étudié les effets inhibiteurs de l'acétate, du propionate, du butyrate et de l'éthanol lors de la fermentation du glucose à un pH de 7. Toutes les molécules ajoutées ont présenté un effet inhibiteur dès 10 mM. En fonction de la concentration, la toxicité relative des molécules étudiées a varié. Ainsi, à 200 mM, l'acétate et le butyrate ont induit une réduction distincte de 73 % et 28 % du rendement en  $H_2$ , respectivement ; alors qu'à 300mM, ils ont induit une réduction proche du rendement de 82 % et 89 %, respectivement. L'éthanol présentait l'effet inhibiteur le moins prononcé, avec une faible réduction de 27 % du rendement en  $H_2$  à 300 mM. Le propionate présentait un effet inhibiteur similaire à celui du butyrate, avec  $\sim 45$  % de réduction du rendement à 200 mM, et  $\sim 90$  % à 300 mM. A l'inverse, la présence de  $\sim 130$  mM de propionate a amélioré la production d' $H_2$  à partir de marc de pomme à pH 5, de 102  $mL \cdot g_{MS}^{-1}$  à  $\sim 120$   $mL \cdot g_{MS}^{-1}$  (Wang et al., 2010).



- **Effet sur la latence avant la production d'H<sub>2</sub>**

Dans ce document, la latence correspond au temps nécessaire avant qu'une production d'H<sub>2</sub> soit mesurée lors d'une fermentation en mode batch. Le seuil d'augmentation de la latence correspond à la concentration en acide ajoutée la plus faible à laquelle la latence n'est pas significativement augmentée. Les seuils d'augmentation de la latence ont été relevés à des concentrations en acétate de 8 mM et < 83 mM (Siqueira and Reginatto, 2015; Y. Wang et al., 2008) et à des concentrations en butyrate de < 6 mM et 95 mM (Chen et al., 2021b; Zheng and Yu, 2005). Siqueira and Reginatto (2015) et Zheng and Yu (2005) ont mesuré un seuil d'augmentation de la latence à une concentration plus élevée que le seuil d'inhibition de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> et du rendement en H<sub>2</sub>. À l'inverse, Y. Wang et al. (2008) ont relevé un seuil d'augmentation de la latence à la même concentration que le seuil d'inhibition de la vitesse de production d'H<sub>2</sub>.

- **Effet sur l'activité de dégradation du substrat**

Le taux de dégradation du substrat est défini comme la quantité de substrat consommée par rapport à la quantité de substrat introduite dans le milieu de culture. B. Wang et al. (2008) ont rapporté un effet modéré de l'ajout d'éthanol, d'acétate, de butyrate et de propionate de 0 à 300 mM sur la dégradation du glucose, avec une diminution du taux de dégradation de ~99 % à 72 – 80 % lors d'ajout des acides, et une légère diminution du taux de dégradation à 90 % lors de l'ajout d'éthanol. L'ajout de 0 à 833 mM d'acétate lors de la fermentation de sucrose a induit une diminution dose-dépendante de la vitesse de dégradation du sucrose ainsi qu'une augmentation de la latence avant consommation dose-dépendante (Y. Wang et al., 2008). Néanmoins, l'intégralité du sucrose a été consommée à 833 mM d'acétate au bout de 150 h de fermentation. Une diminution de la vitesse de consommation du glucose a également été mesurée avec l'ajout de butyrate de 0 à 284 mM, mais le taux de dégradation est resté de 100 % jusqu'à 190 mM (Zheng and Yu, 2005).

- **Effet sur la production d'acides organiques et d'alcools**

Noblecourt et al. (2017) ont rapporté une solvantogénèse induite par l'addition de 26 mM d'acétate et 73 mM de butyrate (ajoutés conjointement) en phase d'accélération de la production d'H<sub>2</sub>. Une solvantogénèse a également été observée lorsque la concentration en acides non dissociés produits a atteint 19 mM (13 mM H<sub>2</sub>Bu) (S. Van Ginkel and Logan, 2005).

B. Wang et al. (2008) ont observé lors d'ajout d'acétate à pH 7 une diminution de la production d'acétate et une augmentation de la production de butyrate. Pour Y. Wang et al. (2008), l'ajout d'acétate à pH 5,5 a également induit une diminution de la production d'acétate mais au profit de butyrate, d'éthanol et de propionate. Enfin, pour Siqueira and Reginatto (2015), l'acétate ajouté a été partiellement consommé.

Pour B. Wang et al. (2008), à pH 7, l'ajout de butyrate a augmenté la production de butyrate et de propionate et diminué la production d'acétate. A l'inverse, pour Zheng and Yu (2005) à pH 6, l'ajout de butyrate a diminué sa propre production et augmente la production de valérate, d'éthanol et d'acétate. Chen et al. (2021b) observent que son ajout réduit la production d'éthanol à pH 7.

#### ○ Effets métaboliques ou populationnels ?

Les effets des acides organiques sur la production d'acides et d'alcools peuvent être dus à (i) des changements métaboliques à l'échelle cellulaire, *i.e.*, les microorganismes changent de métabolisme en lien avec le stress subit ; (ii) à des changements populationnels, *i.e.*, la communauté microbienne évolue face au stress subit : la croissance de certains microorganismes diminue et celle d'autres microorganismes augmente ; ou (iii) au couplage des deux phénomènes.

Récemment, Chen et al. (2021b) ont observé que l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par le butyrate était associée à une diminution de la croissance de *Clostridium sp.* et à une augmentation de l'abondance de bactéries non productrices d'H<sub>2</sub>, telles que *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter sp.* et *Bacillus sp.* au cours de fermentations de glucose à divers pH : 5,5 ; 6,0 ; 6,5 et 7,0. Dans cette étude, l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> a donc résulté d'un changement populationnel défavorable aux bactéries productrices d'H<sub>2</sub>. Cependant, l'analyse des communautés microbiennes réalisée par les auteurs était limitée, les répliques des fermentations ne sont pas présentés et seul l'effet du butyrate a été étudié.

Dans des conditions comparables, *i.e.* à pH 6 et avec du glucose comme substrat, Noblecourt et al. (2017) ont observé qu'un mélange de 191 mM de butyrate et de 80 mM d'acétate produits par les microorganismes diminuait la vitesse de production d'H<sub>2</sub> sans impacter la composition de la communauté microbienne. Cette dernière était néanmoins hautement enrichie en une seule espèce de *Clostridium sp.*. Dans ce cas, l'inhibition de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> a donc été attribuée à un effet métabolique.

A notre connaissance, la littérature sur les effets des acides sur les communautés microbiennes en fermentation sombre se limite à ces deux références.

- Conclusion sur les apports de la littérature en culture mixte

En conclusion, de nombreuses études ont porté sur l'inhibition de l'activité microbienne et la production d'H<sub>2</sub> par l'acétate et le butyrate, notamment en culture mixte. Les auteurs ont rapporté des effets modérés des acides sur **la dégradation du substrat**, avec un ralentissement de la dégradation du substrat sans baisse majeure de l'efficacité de dégradation à la plupart des concentrations évaluées. Les seuils d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> ont été très variables, allant de < 10 mM à 100 mM pour l'acétate et le butyrate. Certains auteurs ont suggéré de considérer la **concentration en acides non dissociés**, car seule cette dernière serait inhibitrice, avec des seuils d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> à ~ 15 mM d'acétate et ~ 5 mM de butyrate. Néanmoins, certaines espèces sont connues pour être inhibées par les acides *via* une **augmentation de la pression osmotique**, et la considération de la concentration en acides non dissociés seule apparaît donc insuffisante. Les auteurs ont rapporté une **inhibition du rendement en H<sub>2</sub> dose-dépendante**, associée à des **modifications de la production de métabolites**. Toutefois, peu de publications ont présenté une analyse des communautés microbiennes, il n'est donc pas possible de savoir actuellement si les effets inhibiteurs sur la production d'H<sub>2</sub> décrits sont dus à **des effets métaboliques ou populationnels**. De plus, la variabilité des effets inhibiteurs documentés a probablement été liée à la communauté microbienne cultivée, mais le manque d'analyse de ces communautés ne permet pas d'évaluer l'influence de ce facteur. Il est donc actuellement difficile de prédire les effets inhibiteurs des acides en fermentation sombre.

De plus, une régulation insuffisante du pH de fermentation a potentiellement été liée à la détermination par un ensemble d'auteurs de seuils inhibiteurs très faibles (< 10 mM). Dans ces cas, il est probable qu'un **effet pH** ait été combiné à l'effet acide.

Les effets des **mélanges d'acides** ont également été **peu étudiés**, avec une seule étude ayant évalué l'influence de mélanges de différents ratio Acétate / Butyrate en comparaison avec leur ajout isolé, et suggérant que l'effet des mélanges n'était pas trivial.

Aussi, des **effets distincts** sur la production d'H<sub>2</sub> ont été rapportés (i) en fonction du **moment d'ajout** des acides au milieu de culture (au début ou lors de la production d'H<sub>2</sub>) et (ii) en fonction de « **l'origine** » **des acides** : produits par les microorganismes ou ajoutés par l'expérimentateur.

Enfin, **l'effet du lactate** en tant qu'inhibiteur a également été **peu étudié**, avec des effets dépendant de son énantiométrie suggérés.

### 1.5.3.2. Stratégies de levée d'inhibition

Différentes stratégies ont été proposées pour diminuer l'inhibition de la production d' $H_2$  par les acides organiques. Dans cette partie, un recensement non exhaustif de stratégies de levées d'inhibition par les acides est présenté. Les articles présentent parfois des concentrations totales en acides en gramme par litre, sans en détailler la composition, ce qui ne permet pas de convertir les concentrations en moles par litres.

- **Dilution du milieu de culture**

La dilution du milieu de culture est une stratégie simple pour réduire l'inhibition par les produits de fermentation (Chen et al., 2021a). Par exemple, la production d' $H_2$  en batch à partir de glucose ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) s'est arrêtée suite à la chute du pH du milieu fermentaire de 7 à 5,1 et à l'accumulation de  $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acides, malgré 50 % de glucose résiduel (Srikanth and Venkata Mohan, 2014). La production a pu redémarrer suite au remplacement de 25 % et 50 % du milieu fermentaire avec du substrat frais (sans remontée de pH), correspondant à une diminution de la concentration en acides à  $\sim 1,3$  et  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivement (Srikanth and Venkata Mohan, 2014). Avec un remplacement de près de 50 % du milieu, le rendement en  $H_2$  a été amélioré de  $\sim 1,48$  à  $1,95 \text{ mol}_{H_2}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  par rapport au contrôle.

Mıynat and Argun (2020) ont également évalué les effets d'une dilution du milieu de culture pour améliorer la production d' $H_2$  lors de la fermentation de molasses à pH 6,8 inoculée avec une boue provenant d'un étang. Une dilution du milieu fermentaire de 130 % au bout de 3 h de fermentation avec de l'eau, couplé à l'ajustement de la concentration en molasses initiale de 95 à  $85 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$  ont permis d'améliorer la production d' $H_2$  de 304 mL à 694 mL, sans toutefois améliorer le rendement en  $H_2$ , qui a évolué de  $\sim 1,36$  à  $1,29 \text{ mol}_{H_2}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  (Mıynat and Argun, 2020). Avec et sans dilution, le pH suivait la même évolution, diminuant de 6,7 à 5,1, mais la dilution a permis de restreindre la concentration en acides à  $\sim 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  contre  $\sim 15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sans dilution (Mıynat and Argun, 2020).

Dans ces deux études, la composition du mélange d'acides produit n'est cependant pas indiquée. La différence entre les concentrations en acides stoppant la production d' $H_2$  dans ces deux études, *i.e.*,  $1,8$  et  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  est très importante. L'évolution du pH dans les deux études était néanmoins similaire (de 6,7-7 à 5,1). Dans l'étude Mıynat and Argun (2020), la concentration initiale en acides dans le milieu de culture était d'environ  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sans dilution et d'environ  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  avec dilution, en lien avec l'utilisation de molasses industrielles comme substrat. Potentiellement, la flore microbienne utilisée dans leur étude a été pré-exposée à des concentrations stressantes en acides, suscitant son adaptation.

La dilution simple et le remplacement du milieu de culture contribuent également à diminuer les concentrations en gaz dissous. Par exemple, si l'on considère un fermenteur agité idéal dans lequel le transfert de gaz est à l'équilibre, dont la pression est de 1 bar avec 50 % d' $H_2$  dans l'espace de tête, remplacer la moitié du milieu fermentaire par de l'eau ou du milieu de culture frais comme l'ont fait Srikanth and Venkata Mohan (2014) revient à abaisser la pression dans le fermenteur à 0,5 bar (il y a deux fois moins d' $H_2$  dissous dans le milieu de culture). Effectuer une dilution du milieu de culture de 130 % telle que l'ont fait Mıynat and Argun (2020) est instantanément équivalent à abaisser la pression à 0,43 bar. Or, d'après les résultats précédemment présentés, une telle baisse de pression peut être associée à une amélioration de la production d' $H_2$ . Une part des améliorations décrites dans les études de remplacement / dilution du milieu fermentaire est donc probablement liée à la dilution des concentrations en gaz dissous, bien que ces dernières ne soient à notre connaissance jamais mesurées / discutées.

- **Extraction des inhibiteurs du milieu de culture**

Hassan et al. (2021) ont appliqué une électrodialyse pour extraire en continu les acides produits dans le milieu réactionnel lors de la fermentation de déchets alimentaires (CSTR, continu avec TSH de 2 jours, pH 5,5). La stratégie a permis d'améliorer le rendement en  $H_2$  de  $17 \text{ mL}_{H_2} \cdot \text{g}_{MV}^{-1}$  à  $34 \text{ mL}_{H_2} \cdot \text{g}_{MV}^{-1}$  (soit  $0,31 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$  à  $0,60 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{\text{hexose}}^{-1}$ ). De manière plutôt surprenante, l'extraction des acides du milieu fermentaire par électrodialyse a induit une augmentation de la production d'acides et de leurs concentrations dans le milieu, passant de 1,6 ; 2,0 et 0,7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acétate, butyrate et propionate (27 ; 23 et 9 mM) respectivement à 2,5 ; 2,4 et 1,2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (42 ; 27 et 16 mM).

D'autre part, Noblecourt et al. (2017) ont identifié un seuil d'inhibition de la vitesse de production d' $H_2$  à  $12,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acides (113 mM butyrate et 42 mM acétate) et ont cherché à maintenir la concentration en acides sous ce seuil *via* l'extraction des acides par microfiltration. La culture était réalisée dans un bioréacteur à membrane immergée qui permettait d'éliminer les produits de fermentation régulièrement tout en retenant la biomasse (en remplaçant les volumes extraits par une solution d'alimentation). La stratégie a bien permis de retarder l'augmentation de la concentration en acides, ce qui a augmenté la vitesse maximale de production d' $H_2$  de 524 à 751  $\text{mL}_{H_2} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$  et le rendement de 1,42 à 1,58  $\text{mol}_{H_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ .

L'inconvénient des stratégies d'extractions des acides par membrane est principalement le phénomène de colmatage qui complexifie la conduite des fermentations sur des durées prolongées (Aslam et al., 2018; Noblecourt, 2017). Notons que ces stratégies d'extraction ne changent potentiellement pas uniquement les concentrations en acides dans le milieu de

culture mais augmentent aussi la quantité de biomasse retenue, l'agitation du milieu de culture et réduisent les concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dans la phase liquide également.

- **Modification des paramètres opératoires**

L'augmentation du pH de culture peut augmenter les seuils inhibiteurs de la production d'H<sub>2</sub> par les acides. Nous avons précédemment cité une étude qui a montré l'augmentation du seuil inhibiteur par le butyrate de 6 mM à pH 5,5 à 227 mM à pH 7, associé à un changement populationnel (Chen et al., 2021b).

D'une autre manière, les changements opérationnels peuvent modifier les produits métaboliques et ainsi contribuer à restreindre une inhibition. Notamment, la diminution du TSH, le sparging à l'N<sub>2</sub>, l'augmentation de la température ou encore la réduction du pH ont été des stratégies fructueuses pour réduire l'inhibition causée par le propionate (Sivagurunathan et al., 2016). Par exemple, l'augmentation de la température de 37 à 45 °C pendant 8 heures lors d'une fermentation en continu (TSH = 8 h, pH 5,5, 20 g<sub>hexoses eq</sub>·L<sup>-1</sup>) a induit un changement populationnel en défaveur des bactéries productrices de propionate et a réduit la concentration en propionate de 2,36 à 0,7 g·L<sup>-1</sup>, améliorant le rendement en H<sub>2</sub> de 1,04 à 1,68 mol·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup>.

- **Ajout d'additifs adsorbants**

L'ajout de charbon actif à une culture inoculée par l'effluent d'un UASB en présence de 20 g·L<sup>-1</sup> de sucrose, à pH 5,5 a permis d'augmenter le rendement en H<sub>2</sub> de 1,2 ± 0,1 à 6,3 ± 0,2 mol·mol<sub>sucrose</sub><sup>-1</sup>. L'amélioration a notamment été attribuée à la capacité d'adsorption de butyrate par le charbon actif, de 8 mM·g<sub>charbon</sub><sup>-1</sup>, diminuant la concentration en butyrate dans le milieu fermentaire d'un facteur 3, de 22 à 7 mM (Wimonsong and Nitorisavut, 2014). Notons que l'effet positif du charbon actif peut être attribuable à d'autres effets, comme l'immobilisation de la biomasse, l'incorporation des éléments traces, le tamponnage du milieu et un transfert d'électrons entre espèces favorisé (Bu et al., 2021).

- **Bioaugmentation avec des souches sélectionnées pour leur résistances au stress acide**

Il a été suggéré que la bioaugmentation de cultures mixtes (*i.e.*, l'ajout spécifique d'un microorganisme à cette culture) pouvait être une stratégie efficace pour améliorer la production d' $H_2$  en condition d'accumulation d'acides. Goud et al. (2014) ont progressivement augmenté la concentration en biodéchets alimentant un ASBR de 5 à 50  $g_{COD}\cdot L^{-1}$  (TSH 48 h, pH variant de 6 à 4-4,5, inoculum : effluent de réacteur anaérobie traitant des eaux usées). L'augmentation de 30 à 50  $g_{COD}\cdot L^{-1}$  a été associée à un effondrement de la production d' $H_2$  de 1,8  $L_{H_2}$  par cycle à une production nulle. Cet arrêt de la production d' $H_2$  est attribuée par les auteurs à une inhibition par les produits de fermentation, avec une concentration en acides de  $\sim 7,5 g\cdot L^{-1}$ . La bioaugmentation avec *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri* ou *Lysinibacillus fusiformis*, trois microorganismes isolés par les auteurs de réacteurs producteurs d' $H_2$ , a permis de restaurer la production d' $H_2$ , qui augmenta progressivement au fil des cycles, de 0,25 L jusqu'à 1 à 2 L par cycle en fonction de la souche ajoutée. La production d' $H_2$  restaurée a été associée à des concentrations en acides de 7,5 à 9  $g\cdot L^{-1}$ .

- **Adaptation d'une communauté microbienne à un stress acide**

Alternativement à la bioaugmentation, il a été suggéré d'adapter des communautés microbiennes à un stress acide pour augmenter les performances de production d' $H_2$  de ladite communauté. Zhao et al. (2010) ont cherché à améliorer la tolérance aux acides d'une culture mixte par incubation de sept jours en présence de butyrate et en absence de substrat. Après cette période d'adaptation, la culture de l'inoculum stressé en mode batch a permis une amélioration de la production d' $H_2$  à partir de déchets alimentaires de 114 % ( $64 mL\cdot g_{MV}^{-1}$ ) par rapport à l'inoculum non pré-stressé. Cette amélioration a été associée à une augmentation d'activité enzymatique d'hydrolyse. La même stratégie a été appliquée en pré-stressant l'inoculum avec de l'acétate (Zhao and Ruan, 2014) et a permis d'améliorer la production d' $H_2$  à partir de déchets alimentaires de 209 %. Dans ce cas, l'amélioration de la production a été notamment attribuée à l'augmentation de 45 % de l'activité d'une pompe à protons ( $H^+ATPase$ ) pendant la fermentation par rapport à l'inoculum non stressé. Les auteurs ont justifié que l'augmentation de l'activité de cette enzyme était une réponse au stress acide *via* le pompage des protons du cytoplasme vers la membrane cellulaire externe, diminuant l'acidification intracellulaire (Zhao and Ruan, 2014). Dans ces deux études, les auteurs ont pré-stressé l'inoculum avec des concentrations en butyrate et en acétate de 34 à 57 mM et de 33 à 167 mM respectivement. Dans les deux cas, la variation de la concentration en acide durant la période de stress a impacté la production d' $H_2$  et de co-produits de la communauté pré-

stressée. L'optimum de production d'H<sub>2</sub> par la communauté pré-stressé a ainsi été atteint à 45 et 100 mM de butyrate et d'acétate, respectivement.

Dans une autre étude, Huang et al. (2012) ont souhaité stimuler la tolérance aux acides d'une culture mixte par son exposition à une concentration croissante de butyrate dans un réacteur continu alimenté en glucose à pH 5,5. La production d'H<sub>2</sub> n'a pas été suivie pendant la culture en continu, mais l'effluent stressé a été prélevé et utilisé comme inoculum pour la production d'H<sub>2</sub> en batch, avec 30 g·L<sup>-1</sup> de glucose. La production d'H<sub>2</sub> avec l'inoculum pré-stressé a atteint 2,25 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>, soit une augmentation de 56 % en comparaison avec l'inoculum non stressé (1,43 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>). Les auteurs ont suggéré que cette amélioration était due à un enrichissement de la communauté microbienne en bactéries tolérantes à l'acide *via* une évolution adaptative, mais aucune analyse microbienne n'a été effectuée.

Dans ces études d'adaptation des inocula au stress acide, il n'est pas évident que l'augmentation de la production d'H<sub>2</sub> soit due à une augmentation de la résistance aux acides de la communauté entrant en croissance sans pré-stress. En effet, l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> a pu résulter d'un changement populationnel. Par ailleurs, lors des stress effectués en batch (Zhao et al., 2010; Zhao and Ruan, 2014), les auteurs ne précisent pas le pH appliqué pendant la phase de stress. Par conséquent, il n'est pas possible de savoir si l'effet décrit découle d'un changement de pH et / ou à l'exposition à la molécule inhibitrice.

- **Co-culture avec un microorganisme photosynthétique**

Laurinavichene et al. (2018) ont cocultivé *C. butyricum* avec *Rhodobacter sphaeroides* à partir d'amidon et d'extraits de levures. Le rôle du microorganisme photosynthétique dans ce système était de consommer les acides organiques afin de réduire l'inhibition qu'ils exerçaient sur la bactérie fermentaire tout en produisant de l'H<sub>2</sub> supplémentaire. Cette co-culture a permis d'augmenter le rendement en H<sub>2</sub> de 1,5 à 5,2 mol·mol<sup>-1</sup>. De la même manière, Chandra and Mohan (2014) ont réalisé une culture « hydride » photofermentation / fermentation sombre en mélangeant un consortium acidogène avec un consortium photosynthétique. La croissance des organismes photosynthétiques a permis de diminuer de 40 % la concentration en acide et d'augmenter de 40 % la production d'H<sub>2</sub> en comparaison avec la fermentation sombre menée seule. Néanmoins, dans ces systèmes, l'augmentation de la production d'H<sub>2</sub> n'est pas nécessairement due à une réduction de l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre mais peut se restreindre à la production d'H<sub>2</sub> supplémentaire apportée par l'organisme photosynthétique. Des inhibitions de la croissance du microorganisme fermentaire ont notamment été rapportées (Laurinavichene et al., 2018). Dans une autre étude impliquant la co-culture de *Clostridium cellulolyticum* et de *Rhodospseudomonas*



*palustris* à partir de cellulose, les auteurs ont montré que la co-culture améliorait la dégradation de la cellulose par rapport à la monoculture, passant de 73% à 100%, et que le taux de croissance de *C. cellulolyticum* était doublé dans ce système.

## 2. Matériel et Méthodes

---

Ce chapitre présente la démarche, les méthodes et le matériel employés au cours de cette thèse. Les expériences ont porté sur la fermentation de deux substrats, du glucose et une soupe de déconditionnement reconstituée, dans deux types de dispositifs, des fioles et des bioréacteurs instrumentés. Les conditions de fermentation ont différé afin de modifier les concentrations en produits métaboliques, *i.e.*, en acides organiques et en gaz de fermentation. Une partie du Matériel et Méthodes est également présentée dans les articles scientifiques des chapitres de résultats.

## 2.1. Substrats et milieux de culture

### 2.1.1. Glucose et milieu de culture défini

Des fermentations ont été réalisées avec du glucose déshydraté (D-(+)-Glucose, Sigma Aldrich, Etats Unis) utilisé comme substrat afin d'étudier les mécanismes d'inhibition par les acides tout en bouclant les bilans matières plus aisément qu'avec un substrat complexe non défini.

Lors de la fermentation de glucose en fiole de 600 mL, le milieu de culture était composé de 2 mL de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\geq 99,5\%$ , Sigma Aldrich, Etats Unis), 2 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, Etats Unis), 20 mL de tampon 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid 1M ( $\geq 99,5\%$ , Sigma Aldrich, Etats Unis,  $\text{pKa} = 6,15$ ), 1 mL de solution d'oligoéléments (Tableau 2-1),  $10 \text{ g}_{\text{DCO glucose}}\cdot\text{L}^{-1}$  (*i.e.*  $9,4 \text{ g}_{\text{glucose}}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0,18 \text{ g}_{\text{vs}}$  d'inoculum (*i.e.* un rapport substrat / inoculum,  $S/X$ , de  $10 \text{ g}_{\text{vs}}/\text{g}_{\text{vs}}$ ), et de l'eau osmosée (QSP 200 mL). La concentration résultante en chaque élément dans le milieu de culture est présentée en Tableau 2-1. La composition de ce milieu a été ajustée pour optimiser la production d' $\text{H}_2$  (Carrillo-Reyes et al., 2019; Guo, 2012).

**Tableau 2-1 : Composition du milieu de culture défini utilisé lors de la fermentation du glucose**

Composant	Concentration dans le milieu de culture ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Source
MES	20	Sigma Aldrich
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,8	Sigma Aldrich
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5	Sigma Aldrich
$\text{FeCl}_2$	$4,8 \times 10^{-3}$	Sigma Aldrich
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$3,0 \times 10^{-4}$	Sigma Aldrich
$\text{MnSO}_4$	$5,2 \times 10^{-4}$	Sigma Aldrich
$\text{CoCl}_2$	$1,3 \times 10^{-4}$	Sigma Aldrich
$\text{ZnCl}_2$	$3,5 \times 10^{-4}$	Sigma Aldrich
$\text{NiCl}_2$	$6,8 \times 10^{-5}$	Sigma Aldrich
$\text{CuCl}_2$	$5,9 \times 10^{-5}$	Sigma Aldrich
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	$1,1 \times 10^{-4}$	Roth
Glucose	9,4	Sigma Aldrich
Inoculum	0,9	Sigma Aldrich

## 2.1.2. Soupe de déconditionnement

### 2.1.2.1. *Enjeux de la reconstitution du substrat*

Une soupe de déconditionnement reconstituée en laboratoire a été utilisée comme modèle de substrat complexe. La reconstitution de ce substrat permet de s'affranchir : (i) de la variabilité de sa composition en fonction de la source et du temps dans le cas d'un substrat industriel, (ii) de l'éventuelle hétérogénéité du substrat industriel, (iii) de toute pré-fermentation non contrôlée lors du stockage et du transport. Son utilisation permet ainsi d'utiliser un substrat homogène, présentant des caractéristiques identiques au cours de la thèse.

### 2.1.2.2. *Déchet reconstitué : recette et caractérisation*

Le Tableau 2-2 présente (i) la composition alimentaire et nutritive du mélange d'ingrédients reconstitué, (ii) la composition nutritive de la soupe de déconditionnement préparée par dilution à partir de ce mélange alimentaire, et (iii) la composition nutritive du milieu de culture et des solutions d'alimentation préparés par dilution à partir de la soupe de déconditionnement reconstituée. La composition de la soupe de déconditionnement a été déterminée afin de présenter des proportions en lipides, glucides et protéines comparables à celles dans la fraction fermentescible des ordures ménagères, en excluant le carton (Dauplain, 2022).

La reconstitution du mélange alimentaire a été effectuée à partir d'aliments achetés au supermarché. Des aliments « industriels » ont été sélectionnés afin de garantir la disponibilité de l'ingrédient dans le temps, de connaître leur composition grâce aux informations indiquées sur l'emballage et de limiter la variabilité dans leur composition. La composition de chaque ingrédient (pour 100g) en lipides, glucides, fibres, protéines et sel détaillée en Tableau 2-2 provient des données accessibles en ligne sur le site du supermarché ("Casino drive," 2022). Tous les ingrédients sont stockés, congelés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant utilisation, à l'exception des biscottes stockées à l'abri de la lumière à température ambiante. Le mélange alimentaire reconstitué a été caractérisé (Tableau 2-3).

**Tableau 2-2 : Composition nutritionnelle du mélange alimentaire reconstitué, de la soupe de déconditionnement reconstituée, du milieu de culture utilisé et des solutions d'alimentation**

Ingrédient	Quantités pour 100 grammes d'ingrédient						Proportion dans le mélange alimentaire (%MB)
	Lipides	Glucides	dont sucres	Fibres	Protéines	Sel	
Viande	15	0	0	0	19	0,16	15
Yaourt	1	4,6	4,6	0	3,6	0,13	10
Fruits rouges	0	5,9	4,8	3,4	0,7	0	15
Poissons pané	14	20	0,7	0,8	11	1,1	10
Frites	4,2	21	0	2,4	2,2	0,39	20
Mélange de légumes	1,8	5,4	3,15	3	1,55	0,4	15
Pain	7	73	7	3	11	1	15
Proportion dans le mélange alimentaire brut (% MB)	6,0	19	2,8	2,0	6,7	0,5	
Proportion dans le mélange alimentaire sec (% MS)	16,0	51,8	7,5	5,4	18,1	1,2	
Proportion dans le mélange alimentaire organique (% MV)	17,5	56,8	8,2	5,9	19,8	1,4	
Concentration dans la soupe de déconditionnement reconstituée (g·L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	17,0	55,2	8,0	5,8	19,3	1,3	
Concentration dans le milieu de culture à 10g <sub>DCO</sub> ·L <sup>-1</sup> (g·L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	1,4	4,5	0,6	0,5	1,6	0,1	
Concentration dans l'alimentation à 30 gMV·L <sup>-1</sup> (g·L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	5,3	17,0	2,5	1,8	5,9	5,3	
Concentration dans l'alimentation à 15 gMV·L <sup>-1</sup> (g·L <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	2,6	8,5	1,2	0,9	3,0	2,6	

<sup>a</sup> Le mélange alimentaire est dilué avec de l'eau du robinet pour atteindre 0,10 g<sub>MS</sub>·g<sub>MB</sub><sup>-1</sup> avant une étape d'hygiénisation. Ce mélange dilué constitue la soupe de déconditionnement.

<sup>b</sup> Milieu fermentaire utilisé lors de la fermentation en mode batch en partie 4.2

<sup>c</sup> Solution d'alimentation utilisée lors de la fermentation en mode continu partie 3.4

<sup>d</sup> Solution d'alimentation utilisée lors de la fermentation en mode continu partie 4.3

**Tableau 2-3 : Caractérisation physico-chimiques du mélange alimentaire**

Caractéristique du mélange alimentaire	Valeur
Taux de matière sèche du mélange brut mesuré (%MS)	34,8 ± 0,1
Taux de matière volatile du mélange brut mesuré (%MV)	33,7 ± 0,1
Taux de matière sèche du mélange brut théorique (%MS) <sup>a</sup>	37,3
BMP (mLCH <sub>4</sub> ·gVS <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	451 ± 6
Ratio DCO/VS théorique (g <sub>DCO</sub> biodégradable·gVS <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	1,28 ± 0,02
Ratio DCO/VS mesuré (g <sub>DCO</sub> ·gVS <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	1,26
Biodégradabilité (%)	100

<sup>a</sup> D'après la composition nutritionnelle indiquée sur les emballages présentée en Tableau 2-2

<sup>b</sup> Mesure effectuée *via* méthode infrarouge et méthode de détermination de BMP classique.

<sup>c</sup> Calculé à partir du BMP en considérant 350mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>·g<sub>DCO</sub><sup>-1</sup>.

<sup>d</sup> Mesure effectuée en utilisant un kit DCO (COD Reagent Vario MR, Lovibond, Allemagne)

### *2.1.2.3. Protocole de préparation de la soupe de déconditionnement reconstituée*

Les quantités d'ingrédients nécessaires ont été décongelées le jour de la préparation du substrat. Elles ont été pesées avec une balance XT 1220M (Precisa, Suisse, précision à 1 mg), puis un volume d'eau du robinet a été ajouté pour abaisser le taux de matière sèche du mélange à 10 %. L'homogénéisation du mélange eau – ingrédients a été réalisée avec un mixeur Mini pro MX400 (Dynamic, France). La soupe ainsi constituée a été par la suite hygiénisée thermiquement à 70 °C pendant une heure dans un bain thermostaté par un circulateur à immersion Polystat 24 (Fisher Scientific, Etat Unis). La soupe prétraitée a été ensuite tamisée à 2 mm. La Figure 2-1 illustre en photos le protocole de préparation.



**Figure 2-1 : Illustration du protocole de préparation de la soupe de déconditionnement reconstituée. 1 : Pesée des ingrédients congelés. 2 : Dilution de manière à atteindre 10% de MS par ajout d'eau du robinet et mixage du mélange. Cette préparation est ensuite hygiénisée thermiquement. 3 : Après hygiénisation, le mélange est filtré manuellement. 4 : La matière retenue par le tamis est jetée.**

Lors des fermentations en batch (fiolle et réacteurs), le substrat était préparé le jour du démarrage de l'expérimentation. Lors des fermentations en continu, le substrat était préparé tous les quatre jours et stocké dans un frigo dont la température est réglée à  $4 \pm 3$  °C.

## 2.2. Inoculation des milieux de culture

### 2.2.1. Origine de l'inoculum

L'inoculum microbien utilisé était une boue aérobie originaire de la station d'épuration de Narbonne, prélevée dans le réservoir de traitement biologique. Ce choix a été basé sur une étude antérieure menée au laboratoire mettant en évidence une meilleure production d'H<sub>2</sub> avec cet inoculum en comparaison avec un digestat de méthaniseur voie solide traitant du fumier (Chatellard, 2016). Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec des inocula prélevés à trois dates différentes (Tableau 2-4).

### 2.2.2. Conditionnement et stockage de l'inoculum

**Tableau 2-4 : Inocula utilisés au cours de cette thèse**

Identifiants des inocula	Date de prélèvement	Volume de boues prélevé (L)	Masse stockée lyophilisée (g)	Protocole de conservation	Expériences inoculées
A	03/01/2020	20	/	Prélèvement des boues, centrifugation, congélation des culots, lyophilisation, mixage, <b>stockage en bouteille inertée à l'abri de la lumière à température ambiante</b>	Partie 3.3
B	01/07/2020	20	125	Prélèvement des boues, centrifugation, congélation des culots, lyophilisation, mixage, <b>stockage en aliquots dans flacons en verre à -80°C.</b>	Partie 3.2
C	05/11/2020	60	440	Prélèvement des boues, centrifugation, congélation des culots, lyophilisation, mixage, <b>stockage en aliquots dans flacons en verre à -80°C.</b>	Partie 3.3 ; 4.2 et 4.3.

Après prélèvement, la boue de station d'épuration a été centrifugée à 16 800 g durant 5 min à 20 °C afin d'éliminer la plus grande partie de l'eau contenue dans la boue. Les culots ont ensuite été disposés dans des plateaux en aluminium avec une hauteur de boue maximale de 2 cm pour assurer une lyophilisation adéquate. Les plateaux ont été recouverts d'une feuille d'aluminium et stockés au minimum 48 heures à -20°C. Les plateaux ont ensuite été placés dans un lyophilisateur Cosmos 20k (Cryotech) pour réaliser une sublimation à -85°C sous une atmosphère sous vide (pression résiduelle  $\geq 2 \mu\text{bar}$ ). La vitesse du front de lyophilisation étant de 1 cm/jour (CRYOTEC, n.d.), la lyophilisation a été réalisée pendant trois jours. Après lyophilisation, la boue déshydratée issue de l'ensemble des plateaux a été mélangée et mixée avec une Pulvérisette 11 (Fritsch, France) afin d'assurer une homogénéisation de l'inoculum. La poudre résultante a été stockée différemment en fonction de la date d'échantillonnage.

L'inoculum A a été stocké dans une bouteille de 1 L en verre inertée à l'azote et stockée à l'abri de la lumière à température ambiante. Les inocula B et C ont été aliquotés dans des flacons pyrolysés en verre stockés à -80°C. Ces modifications des conditions de stockage ont été réalisées suite à un constat d'évolution du rendement en H<sub>2</sub> à partir de glucose après deux mois de stockage en bouteille inertée stockée à l'abri de la lumière et à température ambiante. Le stockage à -80°C a été préféré au stockage à température ambiante ou à -20°C puisque une activité microbienne peut persister à ces températures (Nikrad et al., 2016) et donc potentiellement altérer l'inoculum stocké. De plus, le stockage en *aliquot* a été favorisé au détriment du stockage en bouteille, l'ouverture régulière de la bouteille pouvant provoquer une réhydratation de l'inoculum lyophilisé, favoriser une activité microbienne, et donc l'évolution des communautés microbiennes stockées.

### 2.2.3. Prétraitement de l'inoculum

Avant chaque expérience, l'inoculum a été réhydraté dans 200 mL d'eau osmosée puis prétraité thermiquement 15 minutes à 90 °C avec un agitateur chauffant CMAG H57 (IKA, Allemagne) connectée à une sonde de température ETS D5 (IKA, Allemagne), à une vitesse d'agitation d'environ 500 RPM. La température de consigne de l'agitateur-chauffant a été fixée à 90 °C initialement. Quinze minutes ont été requises pour que la température de l'inoculum réhydraté atteigne 90 °C. Les quinze minutes de prétraitement étaient décomptées dès lors que les 90 °C étaient atteints (soit une durée de chauffage totale de 30 minutes). Ce prétraitement a été conduit afin d'enrichir l'inoculum en microorganismes sporulant et d'éliminer notamment les archées méthanogènes hydrogénotrophes non sporulantes (Wang and Yin, 2017). Le prétraitement thermique est la stratégie la plus utilisée pour enrichir les inocula en bactéries productrices d'H<sub>2</sub>, utilisé dans 49 % des publications de la synthèse bibliographique réalisée par Wang and Yin (2017). Le temps de traitement et la température employée varient selon les études de 10 min à 10 h et de 65 à 121°C (Wang and Yin, 2017). Il



est à noter que le processus de stockage de l'inoculum appliqué au cours cette thèse (centrifugation, congélation et lyophilisation) a également participé à la sélection de microorganismes sporulants (Wang and Yin, 2017).

## 2.3. Dispositifs expérimentaux utilisés pour les fermentations

### 2.3.1. Fioles de fermentation

Des fioles de  $590 \pm 13$  mL possédant un volume utile de 200 mL ont été utilisées pour réaliser des fermentations. Les fermentations ont été réalisées en batch, sans agitation et en conditions mésophiles à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  dans des bains thermostatés par un circulateur à immersion Polystat 24 (Fisher Scientific, Etat Unis). Quatre répliques ont été effectués pour chaque condition de fermentation. Après ajout du milieu de fermentation, le pH a été ajusté à  $6,0 \pm 0,2$  avec une solution de NaOH à 8 M ou de HCl à 8 M *via* un pH mètre inoLab 7110 (WTW 1AA110, Etats Unis) et une sonde SenTix 41 (WTW, Etats Unis). Les fioles ont ensuite été fermées par un bouchon en caoutchouc fixé par une vis en aluminium puis flushées à l'azote pendant 15 min afin d'éliminer l' $\text{O}_2$  résiduel.

Les fioles étaient connectées à un micro-chromatographe en phase gazeuse ( $\mu\text{CPG}$ ) couplé à un module de régulation de pression servant à (i) analyser la composition du gaz produit, à (ii) quantifier la production de biogaz et à (iii) réguler la pression dans les fioles. Le module de régulation de pression était notamment équipé d'un manomètre et d'une vanne de mise à pression atmosphérique. L'utilisateur définissait préalablement à l'expérience un seuil de pression bas ( $S_B$ ) et un seuil de pression haut ( $S_H$ ). Toutes les deux heures, la pression dans le dispositif de fermentation était mesurée. Trois cas de figures se présentaient :

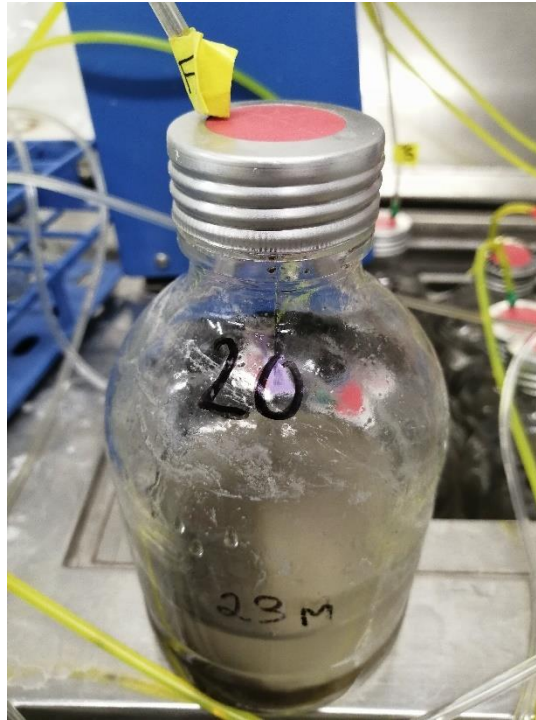
- Si la pression était supérieure à  $S_H$ , elle était automatiquement abaissée par ouverture de la vanne de mise à pression atmosphérique durant 10 secondes. Cette étape était répétée jusqu'à ce que la pression soit inférieure à  $S_H$ . Lorsque la pression était inférieure à  $S_H$  et supérieure à  $S_B$ , le  $\mu\text{CPG}$  effectuait une analyse de la composition du gaz produit. Les pressions avant relargage de pression (P1) et après analyse de la composition du gaz (P2) étaient enregistrées automatiquement et récupérables par l'utilisateur en utilisant le logiciel SILEX.

- Si la pression était comprise entre  $S_B$  et  $S_H$ , le  $\mu\text{CPG}$  effectuait une analyse de la composition du gaz produit directement, et P1 correspondait à la pression avant analyse de la composition du gaz.

- Si la pression était inférieure à  $S_B$ , l'appareil relevait la pression sans effectuer d'analyse de la composition du gaz (dans ce cas,  $P1 = P2$ ).

Les seuils  $S_B$  et  $S_H$  ont été fixés à 0,99 bar et 1,2 pour toute expérience en fiole. Les fermentations ont été suivies durant 2 à 14 jours en fonction des conditions expérimentales.

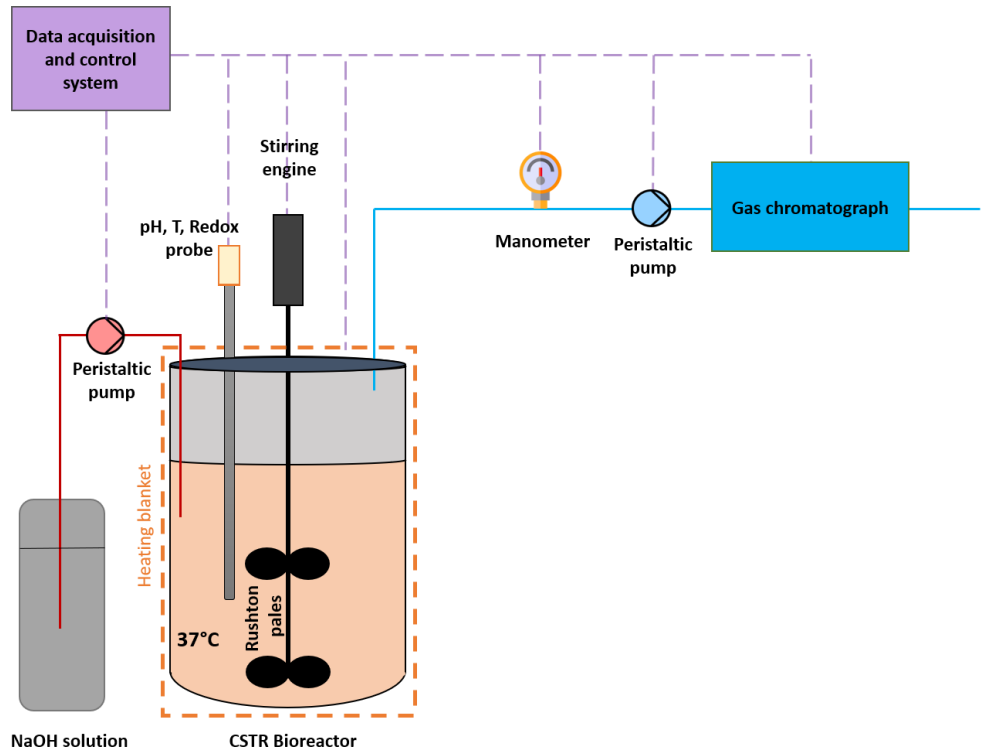
Des prélèvements liquides ont été effectués pendant ces fermentations, en homogénéisant préalablement manuellement le milieu de culture, et en utilisant des seringues Terumo Syringue 5 mL (Terumo, Japon) et des aiguilles Sterican (B Braun, Allemagne) de 0,8 mm de diamètre interne et de longueur 12 cm. A chaque série de prélèvements liquides, toutes les fioles ont été agitées. Le type de fioles utilisées est présenté en Figure 2-2.



**Figure 2-2 : Photographie d'une fiole de 600 mL utilisée pour réaliser des fermentations**

### 2.3.2. Réacteurs instrumentés

Des réacteurs instrumentés Applikon Bio 3L (Getinge, Suède) ont été utilisés pour conduire les expériences (Figure 2-3). Les réacteurs étaient constitués d'une cuve en verre surmontée d'une platine en acier inoxydable.



**Figure 2-3 : Photo d'un réacteur instrumenté Applikon Bio 3L et schéma simplifié du dispositif expérimental lors des fermentations en mode batch.**

Les réacteurs ont été instrumenté avec les éléments qui suivent (Figure 2-3) :

- Une sonde pH, Redox et température InPro 325Xi (Mettler Toledo, Etats-Unis).
- Un doigt de gant rempli d'eau dans lequel était inséré une sonde de température connectée à un régulateur de température PID AC1-5 (LAE electronic, Italie ; paramètres : P = 1,1°C ; I = 231s ; D = 46s ; Action intégrale = 90% ; Temps de cycle = 30s).
- Un régulateur de température contrôlant le fonctionnement d'une couverture chauffante qui entourait le réacteur.
- Un agitateur à entraînement magnétique assurant une étanchéité aux gaz au niveau de l'axe d'agitation. Sur cet axe étaient fixées 2 turbines : une rushton à six pales et une rushton à quatre pales. L'agitation a été fixée à 180 RPM.
- Trois contre pales optimisant l'efficacité du mélange du milieu fermentaire.
- Une canule utilisée pour réguler le pH par ajout de base (NaOH 1 M ou 3 M en fonction des conditions expérimentales), avec une pompe (Masterflex L/S 754206, Cole Parmer, Etats-Unis) délivrant le liquide à un débit entre 1 et 2 mL·min<sup>-1</sup>. Le fonctionnement de cette pompe a été contrôlé par un transmetteur M300 (Mettler Toledo, Etats-Unis). Le transmetteur a été paramétré pour actionner le fonctionnement de la pompe d'ajout de base dès que le pH

atteint 5,49 (paramétrage PID automatique). Un tuyau a été fixé sur la canule à l'intérieur du réacteur et immergé dans le milieu fermentaire afin d'éviter l'obstruction de la canule suite à la cristallisation du NaOH au contact du CO<sub>2</sub> de l'espace de tête.

- Une canule de diamètre 4 mm immergée dans le milieu fermentaire utilisée pour des prélèvements liquides manuels.
- Un septum de 20 mm d'épaisseur (modèle 2048-11800A, Bellco Glass, Inc., Etats-Unis) utilisé pour des prélèvements gazeux dans l'espace de tête du réacteur.
- Une sortie gaz surmontée d'un condensateur dans lequel a été recirculée de l'eau à  $4 \pm 3$  °C lors des fermentations conduites à pression inférieure à 1 bar.
- Un manomètre LEO3 Mano 2000 (Keller, Suisse) qui permet de connaître la pression dans l'enceinte du réacteur.

La sortie gaz a été connectée à une pompe (Masterflex L/S 7554-164 85, Cole Parmer, Etats-Unis) dont le fonctionnement a été contrôlé par la plateforme ODIN (Logiciel d'acquisition de données et de contrôle / commande de systèmes d'instrumentation développé par l'INRIA). L'actionnement de la pompe dépendait de la pression dans l'enceinte du réacteur, d'un seuil bas de pression ( $S_B$ ) et d'un seuil haut de pression ( $S_H$ ) déterminés par l'expérimentateur. Lorsque la pression dans le réacteur excédait  $S_H$ , la pompe de régulation de pression était actionnée, évacuant une partie du gaz et diminuant la pression. Lorsque la pression dans l'enceinte était inférieure à  $S_B$ , le fonctionnement de pompe de régulation de pression était arrêté.

Lors de fermentations en mode continu, l'instrumentation du réacteur a été complétée avec les éléments suivants (Figure 2-4) :

- Une canule d'alimentation de diamètre 4 mm, reliée à une pompe programmable Masterflex L/S® (Digital Drive, 600 rpm; Cole Parmer, Etats-Unis) par un tuyau dit d'alimentation. Le tuyau d'alimentation rejoint à l'extérieur du fermenteur une canule rigide plongée dans un bidon d'alimentation de 20 L placé dans un frigo dont la température a été réglée à  $4 \pm 3$  °C et dont la solution a été constamment agitée à 100 RPM *via* un agitateur Euro-ST PCV (IKA, Allemagne).
- Une canule de soutirage du milieu fermentaire de diamètre 4 mm permettant de garder un niveau constant dans le réacteur et de collecter l'effluent de fermentation.
- Un capteur de niveau composé d'une tige métallique entouré d'un matériau isolant sur toute sa longueur à l'exception de ses extrémités, dont l'extrémité basale a été placée à la surface du milieu fermentaire et dont l'extrémité haute a été connectée à un câble métallique relié à la platine et à un relais. Lorsque le liquide entrait en contact avec la sonde de niveau, un courant alternatif de faible intensité y circulait et actionnait le relais actionnant une pompe

de soutirage du milieu fermentaire (Masterflex L/S 7554-85, Cole Parmer, Etats-Unis) fonctionnant à environ 190 mL·min<sup>-1</sup>. Cette pompe entraînait le liquide par un tuyau connecté à la canule de soutirage du milieu fermentaire.

Toutes les pompes utilisées étaient des pompes péristaltiques. Lors des expériences conduites avec une pression de 1 bar<sup>9</sup> dans l'enceinte du réacteur, les tuyaux utilisés ont été de type Norprene™ L/S™ 06404. Les diamètres internes des tuyaux ont varié selon leur fonction : 7,9 mm (*i.e.* taille 18) pour l'alimentation et le soutirage ; 1,6 mm (*i.e.* taille 14) pour l'ajout de base ; 3,1 mm (*i.e.* taille 16) pour les prélèvements liquides et la sortie gaz (Tableau 2-5). Lors des fermentations réalisées à pression réduite (0,5 bar), les tuyaux de soutirage du gaz et de soutirage d'effluent ont été de type Tygon™ L/S™ 06404 de 4,8 et 9,7 mm de diamètre interne (*i.e.* modèle 24 et 36) respectivement, ces derniers procurant de meilleures performances pour le pompage de liquide et gaz à pression réduite (leur diamètre externe est supérieur à ceux des modèles 14, 16 et 18). Les têtes de pompes utilisées étaient de type L/S en polycarbonate avec rotor en acier.

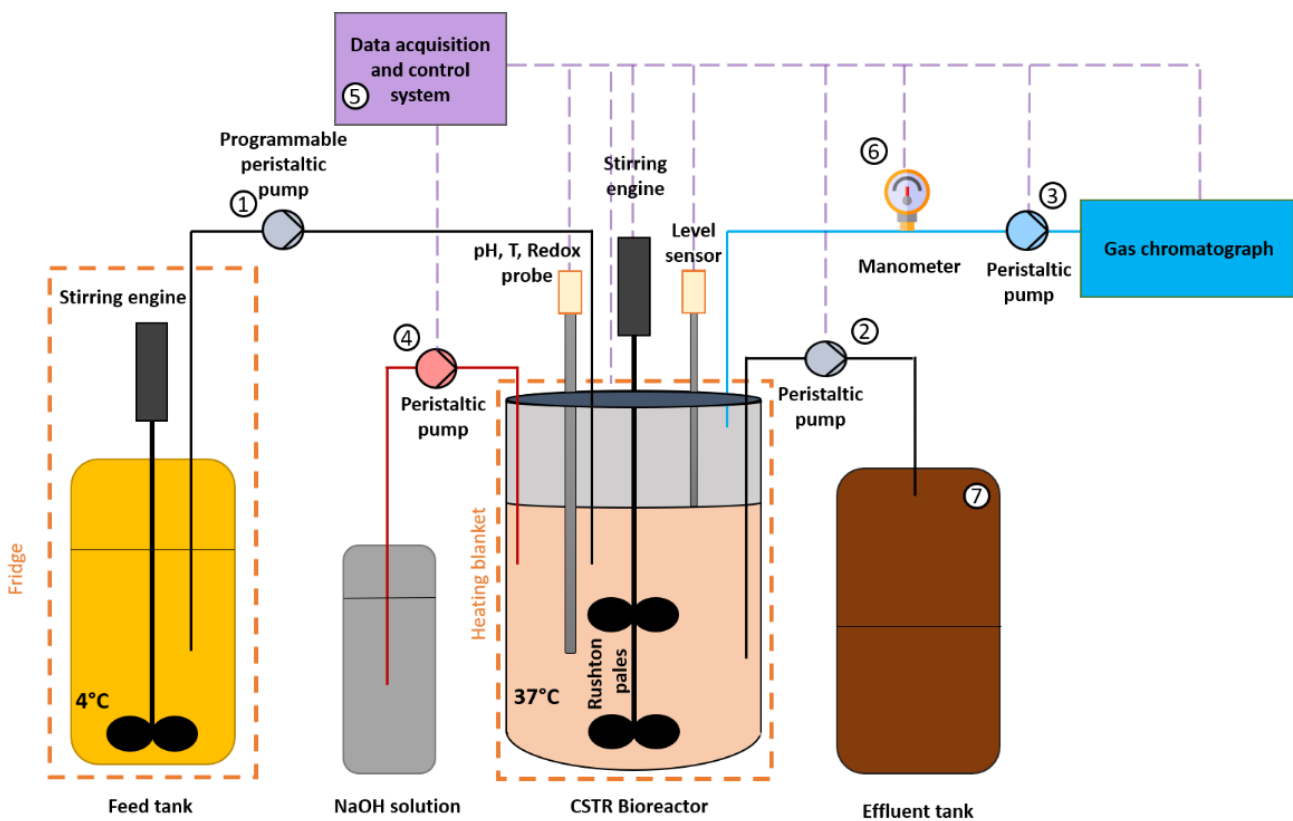
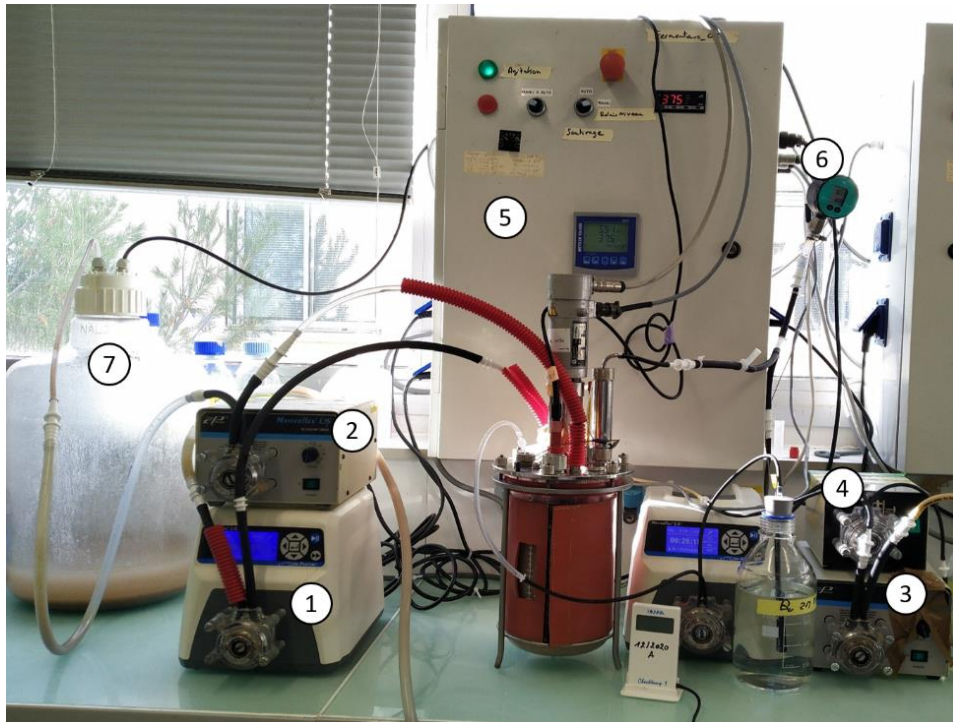
**Tableau 2-5 : Pressions minimales tolérées en fonction du modèle. Données fournisseur (Masterflex, 2022).**

Modèle de tuyau	Diamètre interne (mm)	Pression minimale absolue (bar)	Usage
<b>NORPRENE® 14</b>	1,6	0,26	Ajout de base
<b>NORPRENE® 16</b>	3,1	0,26	Prélèvements liquides et sortie gaz
<b>NORPRENE® 18</b>	7,9	0,46	Ajout d'alimentation, soutirage d'effluent
<b>TYGON® 24</b>	4,8	0,26	Sortie gaz
<b>TYGON® 36</b>	9,7	0,31	Soutirage d'effluent

Les données de fermentation mesurées en continu, *i.e.* pH, température du milieu fermentaire, déclenchement de la pompe de soutirage du biogaz, pression à l'intérieur du réacteur et potentiel redox du milieu fermentaire ont été collectées toutes les 30 secondes *via* le logiciel ODIN. Elles étaient récupérables par l'utilisateur *via* le logiciel SILEX (système d'information pour l'expérimentation).

---

<sup>9</sup> Dans tout le manuscrit, les pressions sont indiquées en valeurs absolues et non relatives, *i.e.* 1,013 bar correspond approximativement à la pression atmosphérique.



**Figure 2-4 : Photo et schématisation simplifiée du dispositif expérimental utilisé lors des fermentations en mode continu. 1 : pompe d'alimentation, 2 : pompe de soutirage, 3 : Pompe de régulation de la pression, 4 : pompe de régulation du pH, 5 : Module de contrôle et d'acquisition, 6 : manomètre, 7 : bidon d'effluent.**

La composition du gaz produit lors des fermentations a été analysée soit automatiquement par  $\mu$ CPG lors des fermentations en batch, soit manuellement par prélèvement gazeux dans l'espace de tête et analyse de la composition du gaz par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

## 2.4. Analyses physico-chimiques

### 2.4.1. Matière sèche, matière volatile, matière en suspension

La détermination de la quantité de matière sèche (MS) et volatile (VS) a été effectuée selon une méthode standard (APHA, 2017). La matière à analyser a été placée dans un creuset pesé avant et après ajout. Le creuset a été placé dans une étuve à 105 °C jusqu'à ce que la masse du creuset soit stable, *i.e.*, jusqu'à totale évaporation de l'eau contenu dans la matière analysée. Le creuset a ensuite été placé dans un four à 550 °C durant trois heures afin de brûler toute matière volatile et que seule la matière minérale ne soit retenue dans le creuset. Le creuset a alors de nouveau été pesé. Les creusets ont été placés dans des dessiccateurs en sortie d'étuve et de four jusqu'à ce que leur température s'abaisse à la valeur ambiante. Les mesures ont été effectuées en triplicat. La matière organique correspond à la différence de masse du creuset avant et après combustion. La matière sèche correspond à la masse de matière ajoutée à laquelle est soustraite l'eau évaporée lors du séchage en étuve.

La matière volatile en suspension (MES) a été déterminée afin de quantifier la concentration de biomasse microbienne en fin de fermentation. Le milieu fermentaire a été centrifugé à 11 900 g pendant 20 minutes à 20°C, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans de l'eau osmosée. Enfin, le protocole de mesure de MS et MV a été appliqué. La MES correspond à la matière volatile quantifiée dans le culot. La formule de la biomasse microbienne a été considérée comme étant  $C_5H_7NO_2$  (soit  $1,42g_{DCO} \cdot g_{biomasse}^{-1}$ ) (Lakatos, 2018).

### 2.4.2. Acides gras volatils

Les prélèvements de milieu fermentaire ou de solution d'alimentation ont été centrifugés à 13 000 g pendant 15 min puis stockés à -20 °C. Ils ont été décongelés puis filtrés à 0,2  $\mu$ m avant analyse. Les acides gras volatils (AGV), c'est-à-dire acétate (C2), propionate (C3), butyrate (C4), isobutyrate (iC4), valérate (C5), isovalérate (iC5), caproate (C6) et isocaproate (iC6) ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) Perkin Elmer Clarus 580. La CPG était équipé d'une colonne semi-capillaire FFAP 1000 (15 m  $\times$  0,53 mm  $\times$  1  $\mu$ m, PerkinElmer cat No. N9316357) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) réglé à 210 °C. Du  $N_2$  a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 3 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Le four suivait le



profil de température suivant : (i) 80 °C 0,5 min, (ii) 10 °C·min<sup>-1</sup> jusqu'à 130 °C 9,5 min, (iii) 10 °C·min<sup>-1</sup> jusqu'à 150 °C 1 min. Le logiciel TotalChrom Workstation a été utilisé pour le traitement des chromatographes. La limite de quantification de l'appareil était de 0,2 g·L<sup>-1</sup> et sa précision était de 2 %.

#### 2.4.3. Sucres et autres métabolites

Les autres métabolites (éthanol, succinate, lactate, formate, 1,3-propanediol, butanol) et les sucres résiduels (glucose, xylose, fructose, arabinose) ont été analysés par une chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Dionex Ultimate 3000). L'HPLC a été équipée d'une précolonne de protection (Microguard cation H refill catbridges Cat No. 125-0129, Biorad) et d'une colonne Aminex HPX-87H (BioRad Cat No. 125-0140) chauffées à 45 °C. Un échantillonneur (Waters 717 plus) permettait un prélèvement automatique des échantillons et leur introduction dans l'éluant (4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pompé à une vitesse de 0,3 mL·min<sup>-1</sup>. Les métabolites étaient détectés par un réfractomètre (Waters R410) fonctionnant à 45 °C. Le logiciel Empower 3 était utilisé pour analyser les chromatographes. La limite de quantification de l'appareil était de 0,2 g·L<sup>-1</sup> et sa précision était de 2 %. Les échantillons ont préalablement été centrifugés à 13 000 g pendant 15 min et filtrés à 0,2 µm.

#### 2.4.4. Cas particulier de l'éthanol

Le temps de rétention de l'éthanol et du butyrate dans la colonne de l'HPLC étaient similaires, ce qui a provoqué un recouvrement des pics sur les chromatographes. La concentration en éthanol a donc été calculée en retranchant l'aire correspondant à la concentration en butyrate (obtenue par CPG) à l'aire du pic regroupant éthanol et butyrate (obtenu à l'HPLC).

#### 2.4.5. Analyse de la composition du gaz de fermentation

##### *2.4.5.1. Analyse automatisée par micro chromatographie en phase gazeuse*

Un micro-chromatographe en phase gazeuse (µCPG SRA I-GC R3000) couplé à un module de régulation de pression a été utilisé pour l'analyse en ligne de la composition du biogaz en fiole et en bioréacteur instrumenté. Le µCPG a été équipé de deux colonnes : une colonne Molesieve 5A de 10 m fonctionnant à 80 °C, 30 PSI avec de l'argon comme gaz porteur (canal A) pour les analyses de H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et une colonne PoraPlot U (PPU) de 8 m fonctionnant à



70 °C, 20 PSI avec de l'hélium comme gaz porteur (canal B) pour l'analyse du CO<sub>2</sub>. Les deux canaux étaient équipés d'un détecteur de conductivité microthermique (TCD) réglé à 90 °C. Le seuil de détection de l'appareil est de 0,3 %, sa précision est de 2 %.

Lors des fermentations en fiole, le  $\mu$ CPG assurait l'analyse automatique de la composition du gaz et la régulation de pression dans la fiole selon la procédure décrite en partie 2.8.1.1.

Lors des fermentations en réacteurs instrumentés, Le gaz soutiré du fermenteur par la pompe de régulation de la pression (Figure 2-4) passait continuellement par une vanne trois voies du  $\mu$ CPG et était aspiré pour évacuation. Le  $\mu$ CPG a été programmé pour analyser le gaz toutes les deux heures. Toutes les deux heures, le positionnement de la vanne trois voies changeait afin de couper la connexion entre le gaz issu du fermenteur et l'évacuation du gaz. Le gaz était alors pompé par le  $\mu$ CPG et sa composition était analysée. Après analyse, la vanne trois voie rebasculait pour permettre de nouveau l'évacuation continue du gaz issu du fermenteur. Avec ce dispositif, le module de régulation de pression du  $\mu$ CPG n'a donc pas été utilisé, ce dernier n'étant pas adapté aux débits de gaz de l'ordre de 300 mL·h<sup>-1</sup> générés lors de ces fermentations.

#### *2.4.5.2. Analyse manuelle par chromatographie en phase gazeuse*

Au cours (i) des tests d'activité homoacétogène (protocole partie 2.5.5), (ii) des mesures de concentrations en gaz dissous et (iii) lors des fermentations en mode continu, la composition en gaz a été analysée par CPG à partir d'un prélèvement manuel de 200  $\mu$ L. Le CPG (Perkin Elmer Clarus 580) était équipé d'une colonne (R-Q bond – 30 m x 0,32mm) pour la séparation du CO<sub>2</sub> et des autres gaz (H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) et d'une colonne (Rt-Molsieve 5A – 30 m x 0,32 mm) pour la séparation de l'H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>. Le gaz vecteur utilisé était de l'argon (350 kPa, 34 mL·min<sup>-1</sup>). La température de l'injecteur était fixée à 250 °C. Les gaz étaient détectés avec un détecteur de conductivité thermique (TCD) dont la température est fixée à 150 °C. Le seuil de détection de l'appareil était de 0,03 %, sa précision est de 1 %.

### *2.5. Mesure des concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dissous et estimation des sursaturations en gaz du milieu fermentaire*

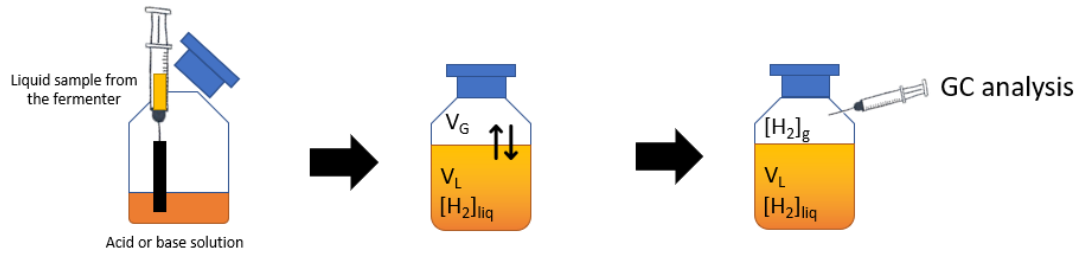
Deux méthodes de quantification de l'H<sub>2</sub> dissous et une méthode de quantification du CO<sub>2</sub> dissous ont été développées au cours de cette thèse. La première méthode repose sur le prélèvement du milieu fermentaire, son introduction dans un flacon et l'analyse de la composition de l'espace de tête de ce flacon par CPG après établissement d'un équilibre des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> entre les phases gazeuses et liquides. La méthode permet de

déterminer la concentration en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> dissous. La seconde méthode de mesure de l'H<sub>2</sub> dissous repose sur l'utilisation d'une sonde ampérométrique. Cette dernière méthode est présentée en Annexe 1 avec les résultats associés.

#### 2.5.1. Principe de la mesure d'H<sub>2</sub> dissous par chromatographie statique de l'espace de tête

Les concentrations en H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> dissous ont été estimées par la méthode de chromatographie statique de l'espace de tête (CS-ET ; *Headspace gas chromatography*, HS-GC). L'analyse CS-ET a été réalisée de deux étapes (Figure 2-5). Un échantillon liquide a d'abord été inséré dans un flacon, tout en conservant dans le flacon un volume de ciel gazeux connu. Le flacon a été scellé et stocké à une température constante jusqu'à ce que l'équilibre entre les phases gazeuse et liquide soit atteint. Un prélèvement de l'espace de tête du flacon a ensuite été analysé par CPG. À l'équilibre, une relation existe entre la concentration de l'analyte dans l'espace de tête, la concentration de l'analyte dans l'échantillon original et les volumes des phases liquide et gazeuse du flacon (Kolb and Ettre, 2006). Ici, un protocole modifié de Kraemer and Bagley (2006) utilisant la technique de CS-ET a été développé.

20 mL de milieu fermentaire ont été échantillonnés par seringue et injectés dans un flacon de 25 ml contenant soit 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%), soit 3 ml de NaOH (18,4 M). L'intérêt de l'acide ou de la base était de créer des conditions de pH extrêmes pour stopper l'activité biologique et donc empêcher une production de gaz. L'acide a été utilisé pour estimer la concentration en CO<sub>2</sub> dissous. Le flacon a ensuite été rapidement scellé avec un septum (modèle 2048-11800A, Bellco Glass, Inc., Etats-Unis) et une bague en aluminium. Les flacons ont été stockés à l'envers afin de réduire les risques de fuites de gaz et pendant 24 h à température ambiante. La composition de l'espace de tête a ensuite été analysée par CPG. Chaque analyse par CPG a été effectuée en triplicat. Les volumes de l'échantillon liquide, de l'acide et de la base ont été estimés par pesée.



**Figure 2-5 : Schématisation de la procédure de mesure de concentration en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dissous par CS-ET. Adapté à partir du rapport de Lucie Perat. Photo d'illustration des flacons utilisés, issu du rapport de Lucie Perat.**

### 2.5.2. Calcul de la concentration en H<sub>2</sub> et en carbonates dissous

Les concentrations en H<sub>2</sub> ([H<sub>2</sub>]<sub>aq</sub>, mol·L<sup>-1</sup>) et en carbonate ([C<sub>T</sub>]<sub>aq</sub>, mol·L<sup>-1</sup>) dissous dans le fermenteur ont été définies par les Equation 2-1 et Equation 2-2 :

$$[H_2]_{aq} = \frac{n_{H_2(g)} \times (1 + H_{H_2}^{cp} \times R_1 \times T \times \frac{V_L}{V_G})}{V_{sample}} \quad \text{Equation 2-1}$$

$$[C_T]_{aq} = \frac{n_{C_T(g)} \times (1 + H_{CO_2}^{cp} \times R_1 \times T \times \frac{V_L}{V_G})}{V_{sample}} \quad \text{Equation 2-2}$$

avec  $V_{sample}$  le volume de milieu fermentaire introduit dans le flacon (L),  $n_{H_2(g)}$  la quantité d'H<sub>2</sub> en phase gazeuse dans le flacon à l'équilibre,  $n_{C_T(g)}$  la quantité de carbonates en phase gazeuse dans le flacon à l'équilibre,  $H_{H_2}^{cp}$  la constante de Henry pour l'H<sub>2</sub> à 20 °C ( $8.026 \cdot 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>·atm<sup>-1</sup> (Sander, 2015)),  $H_{CO_2}^{cp}$  la constante de Henry pour le CO<sub>2</sub> à 20 °C ( $3,9 \cdot 10^{-2}$  mol·L<sup>-1</sup>·atm<sup>-1</sup>, à 20 °C (Sander, 2015)),  $R_1$  la constante des gaz parfaits ( $0.08206$  L·atm·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup>),  $T$  la température de la pièce où est effectuée l'analyse de la composition de la phase gazeuse

du flacon (en Kelvin),  $V_L$  le volume de phase liquide dans le flacon (*i.e.* le volume de milieu fermentaire additionné au volume d'acide ou de base, en litre) et  $V_G$  le volume de phase gazeuse dans le flacon (en litre).

$n_{H_2(g)}$  et  $n_{CT(g)}$  ont été calculés à partir des pressions partielles dans la phase gazeuse des flacons (mesurée par CPG et avec un manomètre), selon l'Equation 2-3 et l'Equation 2-4 :

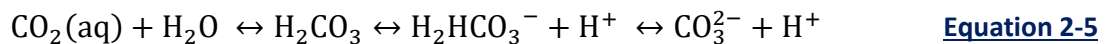
$$n_{H_2(g)} = \frac{P_{H_2} * V_G}{RT} \quad \text{Equation 2-3}$$

$$n_{CT(g)} = \frac{P_{CO_2} * V_G}{RT} \quad \text{Equation 2-4}$$

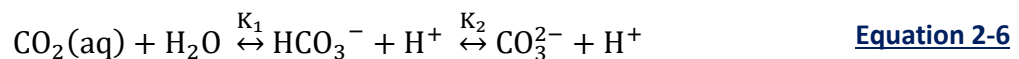
avec  $P_{H_2}$  et  $P_{CO_2}$  les pressions partielles en  $H_2$  et en  $CO_2$  respectivement mesurée dans les flacons (en Pascal), R constante des gaz parfait ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

### 2.5.3. Calcul de la concentration en $CO_2$ dissous

Pour estimer la concentration de  $CO_2$  dissous, 3 ml de  $H_2SO_4$  ont été ajoutés dans le flacon de test de 25 ml à la place du NaOH. La concentration en  $CO_2$  dissous s'équilibre sous différentes formes en fonction du pH du milieu. Avec un pH acide ( $\text{pH} < 4$ ), l'équilibre carbonique reste sous la forme aqueuse de  $CO_2$  au lieu des formes carbonatées ( $HCO_3^-$  ou  $CO_3^{2-}$ ). Les différents équilibres sont décrits comme suit (Equation 2-5).



La forme acide carbonique ( $H_2CO_3$ ) est généralement négligeable car elle est immédiatement transformée en carbonate ou en  $CO_2$  (Stumm and Morgan, 1996). L'équilibre peut être réécrit comme suit (Equation 2-6).



avec  $K_1$ , constante d'équilibre pour les deux réactions d'hydratation et de décomposition du  $H_2CO_3$  ( $K_1 = 10^{-6,38}$  à  $20^\circ\text{C}$  (Stumm and Morgan, 1996)) et  $K_2$  constante d'équilibre pour la lyse de  $HCO_3^-$  ( $K_2 = 10^{-10,38}$  à  $20^\circ\text{C}$  (Stumm and Morgan, 1996)).

Le pH dans les flacons a été mesuré inférieur à 1. Dans ces conditions, tous les carbonates sont sous la forme de  $CO_2$ . Lorsque l'équilibre entre les phases liquides et gazeuses était atteint, la concentration en  $CO_2$  mesurée dans le milieu fermentaire prélevé correspondait

donc à la concentration totale en carbonate dissous dans le fermenteur ( $C_T$ ) (Equation 2-7). La concentration en  $H_2CO_3$  a été supposée négligeable (Kraemer and Bagley, 2006).

$$C_T = [CO_2]_{aq} + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] \quad \text{Equation 2-7}$$

Enfin, dans le milieu fermentaire à l'intérieur du réacteur, la distribution de  $C_T$  sous les formes  $HCO_3^-$  et  $CO_3^{2-}$  est définie par l'Equation 2-8 et l'Equation 2-9.

$$[HCO_3^-] = C_T \times \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad \text{Equation 2-8}$$

$$[CO_3^{2-}] = C_T \times \frac{1}{\frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[H^+]}{K_2} + 1} \quad \text{Equation 2-9}$$

avec  $[H^+] = 10^{-pH}$  où pH était le pH mesuré dans le milieu fermentaire au moment du prélèvement liquide et  $C_T$  la concentration en carbonate totale dans le flacon. La concentration en  $CO_2$  dissous a été calculée par différence entre la concentration en carbonates totale et les concentrations en  $HCO_3^-$  et  $CO_3^{2-}$ .

#### 2.5.4. Validation de la méthode

La mesure de concentration en  $H_2$  dissous a été validée en l'appliquant à une l'eau enrichie en  $H_2$  et sans ajout d'acide ou de base. Une bouteille de 620 ml a été remplie de 400 ml d'eau. La bouteille a été scellée et dépressurisée pour atteindre 0,5 bar ( $P_1$ ). De l' $H_2$  a été ajouté à l'aide d'une seringue jusqu'à atteindre une pression de 1 bar ( $P_2$ ). La quantité d' $H_2$  injectée dans la bouteille a été déterminée par la différence de pression dans la bouteille. La bouteille a été placée sur un agitateur magnétique pendant 24 heures jusqu'à atteindre l'équilibre entre les phases gazeuse et liquide. Ensuite, le protocole décrit précédemment a été suivi : (i) un échantillon de liquide a été prélevé dans la bouteille et introduit dans un flacon puis (ii) le flacon a été rapidement scellé et stocké à l'envers à température ambiante pendant 24 heures. La composition de la phase gazeuse a ensuite été analysée par CPG. La concentration en  $H_2$  dissous dans l'eau a été calculée comme décrit précédemment.

Cette concentration a été comparée à concentration en  $H_2$  théorique ( $C_{H_2(aq)}$ ) selon la loi de Henry (Equation 2-10).

$$C_{H_2(aq)} = H_{H_2}^{cp} \times P_{H_2} \quad \text{Equation 2-10}$$

avec  $H_{H_2}^{cp}$  la constante de Henry de l' $H_2$  à 20°C et  $P_{H_2}$  la pression partielle en  $H_2$  dans la bouteille. De cette manière, la précision de la méthode a été évaluée à  $95 \pm 5 \%$ .

#### 2.5.5. Sursaturation en gaz dissous

L'état de sursaturation du milieu fermentaire en  $H_2$  and  $CO_2$  dissous a été estimé par un facteur de sursaturation (Sf) (Pauss et al., 1990). Pour un composé X dissous, l'Equation 2-11 s'applique.

$$S_f^X = \frac{C_{aq}^X}{H_X^{cp} P_p^X} \quad \text{Equation 2-11}$$

avec  $C_{aq}^X$  la concentration du composé X dissoute ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $P_p^X$  la pression partielle du gaz X (en atm) et  $H_X^{cp}$  la constante de Henry pour le composé X à 37 °C ( $H_{CO_2}^{cp} = 2,49\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$  et  $H_{H_2}^{cp} = 7,3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$ ).

#### 2.6. Protocole de mesure de l'activité homoacétogène par prélèvement de milieu fermentaire et suivi de la vitesse de consommation d' $H_2$ *ex situ*

Une méthode de mesure d'activité homoacétogène a été développée. Le protocole a reposé sur la quantification de l'activité consommatrice d' $H_2$  du milieu fermentaire en dehors des réacteurs de fermentation (*i.e.* activité dite *ex situ*). Ce test a été réalisé en prélevant le milieu de culture et en l'introduisant dans une fiole inertée à l' $N_2$  dans laquelle des quantités connues d' $H_2$  et de  $CO_2$  ont été initialement injectées. La fiole a été mise sous agitation sur une table agitante et incubée à 35°C. Des mesures de pression et de la composition du gaz au cours du temps ont permis de suivre l'évolution de la quantité d' $H_2$  dans la fiole.

Pour chaque test d'activité homoacétogène réalisé, six fioles de 60 mL ont été flushées à l'azote pendant 10 min. Ensuite, 20 mL de milieu fermentaire prélevés dans le réacteur ont été introduits dans chaque fiole, en évitant au maximum tout contact avec l'air ambiant (pour limiter tout stress de la biomasse dû à  $O_2$ ). Par la suite, ces fioles ont été fermées par un septum fixé par une bague métallique puis flushées à nouveau à l'azote pendant 5 min. Dans trois des six fioles, un mélange d' $H_2/CO_2$  à 50/50 (v/v) a été ajouté jusqu'à ce que la pression dans la fiole atteigne 1,5 bar. Les six fioles ont ensuite été mises sous agitation à une température de 35 °C. Un premier prélèvement gazeux (désigné  $T_0$ ) a été réalisé après 30 min d'incubation et analysé par CPG. Ensuite, toutes les deux heures et jusqu'à 5 – 6h après  $T_0$ , la composition et la pression du ciel gazeux des fioles ont été analysés pour suivre l'évolution

des concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Une dernière analyse de la composition de la phase gazeuse des fioles couplée à une mesure de pression a été réalisée 24 h après T<sub>0</sub>. En fin de test, le milieu fermentaire de chaque fiole a été prélevé pour analyses. Ce test a été réalisé lors des cultures en mode continu de la partie 4.3.

## 2.7. Analyses microbiologiques

### 2.7.1. Séquençage et affiliation taxonomique

Le milieu de fermentation a tout d'abord été échantillonné dans un tube Eppendorf de 2 mL, puis centrifugé à 13 000 g pendant 15 min. Les culots ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

Ensuite, une extraction de l'ADN a été réalisée comme décrit par Saur et al. (2016) avec un kit d'échantillonnage pour l'isolement de l'ADN PowerSoil™ (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) conformément aux instructions du fabricant. Le culot congelé a été remis en suspension dans un tube composé de 500 µL d'un tampon phosphate 0,1 M à pH 8, contenant 5 % (m/v) de N-lauroyl sarcosine (Sigma). Les tubes ont ensuite été incubés à 70 °C pendant 1 h. Après un ajout de 500 µL d'un mélange de billes de silice. (matrice de lyse E, MP biomedical), les tubes ont été mélangés dans un batteur à billes FastPrep-24 (MPbiomedicals) pendant 30 s à 6,5 m·s<sup>-1</sup>. De la polyvinylpolypyrrolidone (15 mg) a été ajoutée au tube, suivie d'une homogénéisation par vortex et une centrifugation à 12 000 g pendant 3 min. Après récupération du surnageant, le culot a été lavé avec 500 µL d'un mélange composé de 20 mM EDTA (pH 8), 50 mM TriseCl (pH 8), 100 mM NaCl et 1% de polyvinylpolypyrrolidone (m/v). Le mélange a été à nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 3 minutes. Le surnageant obtenu a été ajouté au précédent. Les étapes de lavage et de récupération du surnageant ont été effectuées une seconde fois. Les particules ont ensuite été éliminées par centrifugation à 12 000 g pendant 3 min. La précipitation des acides nucléiques a été réalisée grâce à l'addition d'isopropanol (qualité moléculaire) d'un volume égal à celui contenu dans le tube. Le mélange a ensuite été incubé pendant 10 min à température ambiante et centrifugé à 12 000 g pendant 15 min. Le culot restant a été remis en suspension dans 200 µL d'eau stérile. Ensuite, 20 µL de RNase (>70 kU/mL, R6513, Sigma) a été ajouté et les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 10 min. Enfin, l'ADN total a été purifié à l'aide du minikit QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. L'ADN purifié a été remis en suspension dans 50 µL d'eau stérile. La quantité et la pureté de l'ADN ont ensuite été mesurées par spectrophotométrie (Infinite NanoQuant M200, Tecan). L'ADN extrait a été ensuite stocké à -20 °C avant d'être utilisé.

La région V3 des gènes de l'ARNr 16S a été amplifiée à l'aide d'amorces universelles pour les bactéries sur 30 cycles d'amplification à une température de 65 °C, comme indiqué par Carmona et al. (2015). Les séquences :

CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTACGGRAGGCAGCAG et  
GGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT

ont été utilisées comme amorces sens direct et inverse. Ensuite, une séquence d'index a été ajoutée au cours de PCR sur 12 cycles d'amplification, en utilisant les amorces :

AATGTACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTCCCTACACGAC et  
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT.

Les produits PCR ont été purifiés et séquencés par Illumina MiSeq au réseau des sciences de la vie Genotoul à Toulouse, France ([get.genotoul.fr](http://get.genotoul.fr)). Toutes les séquences ont été obtenues après avoir appliqué une procédure bioinformatique telle que décrite par Carmona et al. (2015). Mothur version 1.39.5 a été utilisé pour assembler les séquences sens direct et sens inverse selon une méthode légèrement modifiée de la procédure d'opération standardisée pour les données MiSeq donnée par Kozich et al. (2013).

L'alignement et l'affiliation taxonomique des séquences d'ARNr 16S ont été réalisés en utilisant l'alignement SILVA release 128 tel qu'indiqué par Schloss et al. (2009). Les séquences ont été regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) avec 97 % de similarité. Les séquences ont été soumises à GenBank, avec le numéro d'accèsion PRJNA785481.

L'intégralité de ces opérations ont été prises en charge par Gaëlle Santa-Catalina, assistante ingénieur en biologie moléculaire.

L'affiliation taxonomique réalisée permet de différencier des microorganismes jusqu'au rang du genre. Au cours de cette thèse, des séquences des OTUs ont pu être soumises à une recherche de type blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) afin de les affilier aux espèces bactériennes les plus proches.

### 2.7.2. Quantification d'ADN par PCR quantitative

Des analyses PCR quantitatives (PCRq) ont été effectuées pour estimer la quantité de bactéries totales, de bactéries homoacétogènes et de bactéries productrices d'H<sub>2</sub> dans les milieux de culture et les inocula. La région V3 du gène de l'ARN<sub>r</sub> 16S bactérien, le gène *hydA* (codant pour une hydrogénase [Fe-Fe]) et le gène *FTHFS* (codant pour une enzyme impliquée dans la voie de Wood-Ljungdahl) ont respectivement été ciblés. Le colorant fluorescent intercalaire SYBR Green a été utilisé. Un thermocycleur BioRad 191 CFX96 Real-Time Systems C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-rad, Etats Unis) a été utilisé pour tous les programmes de PCRq. Les gènes ciblés, la composition du mélange de PCRq, les amorces et les cycles de PCRq sont détaillés dans le Tableau 2-6.



**Tableau 2-6 : Protocole de réalisation des PCRq en fonctions des régions ciblées.**

Cible	Composition du mélange	Description des cycles PCR	Références pour les amorces
Region V3 du gène de l'ARN, 16S bactérien	6 µL de Sybr Green, 1 µL de chaque amorce (200 nM), 2 µL d'ADN et de l'eau pour un volume total de 12 µL	40 cycles : activation de l'enzyme à 95°C pendant 2 min, dissociation à 95°C pendant 10 s et hybridation à 61°C pendant 20 s.	(Braun et al., 2011)
hydA [Fe Fe]-hydrogenases	12.5 µL de Sybr Green, 1 µL de chaque amorce (250 nM), 5 µL d'ADN et 5.5µL d'eau pour un volume total de 25 µL	40 cycles : activation de l'enzyme à 98 °C pendant 2 min, dissociation à 98 °C pendant 15 s et hybridation à 60 °C pendant 1 min.	(Quéméneur et al., 2011)
FTHFS (formate:tetrahydrofolate ligase (ADP-forming, EC 6.3.4.3; FTHFS))	SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, 500 nM d'amorce sens direct et sens inverse, 5 µL d'ADN et d'eau pour un volume final de 25 µL	2 min à 98 °C puis 9 cycles à 98 °C pendant 45 s et à 63 °C pendant 45 s, chaque cycle étant suivi d'une diminution de 1 °C de la température de la seconde série. Enfin, 30 cycles à 98 °C pendant 45 s, hybridation à 55 °C pendant 45 s et élongation à 72 °C pendant 1 min.	(Xu et al., 2009)

## 2.8. Traitements de données

### 2.8.1. Quantification des volumes de gaz produit au cours des fermentations

#### 2.8.1.1. Fermentation en fiole

Le débit de production de gaz en fiole a été déterminé grâce à la loi des gaz parfaits, *via* l'Equation 2-12 :

$$\Delta V_{normalisé} = \left( \frac{P_{i+1}V}{RT_{i+1}} - \frac{P_iV}{RT_i} \right) \times \frac{R \times T_{ref}}{P_{ref}} \quad \text{Equation 2-12}$$

avec  $\Delta V_{normalisé}$  le volume de gaz normalisé produit entre  $t_i$  et  $t_{i+1}$  (en m<sup>3</sup>), P la pression dans la fiole (en Pa), V le volume d'espace de tête du réacteur (en m<sup>3</sup>), R constante des gaz parfait (8,314 J·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>), T la température dans le réacteur (en Kelvin), T<sub>ref</sub> et P<sub>ref</sub> la température et la pression en conditions normales (CNTP, *i.e.* 0 °K et 10<sup>5</sup> Pa).

#### 2.8.1.2. Fermentation en réacteur instrumenté

Lors des fermentations en réacteur instrumenté, la pression dans l'enceinte du réacteur était régulée par la commande automatisée d'une pompe qui évacuait le gaz du réacteur. L'utilisateur définissait préalablement à l'expérience un seuil de pression bas (S<sub>B</sub>) et un seuil de pression haut (S<sub>H</sub>) (voir détail partie 2.3.2). Le débit de production de gaz a été mesuré de deux manières différentes lors des fermentations en réacteur instrumenté :

- En considérant l'évolution de la pression dans l'enceinte du réacteur, c'est-à-dire de la même façon qu'en fiole. Pendant les fermentations en réacteurs, la pression et la température

ont été enregistrées automatiquement toutes les 30 secondes par le logiciel ODIN. Les valeurs enregistrées et accessibles sur SILEX par l'utilisateur correspondent à des moyennes de six valeurs toutes les trois minutes.

- En considérant le temps de fonctionnement de la pompe de régulation de la pression. Cette pompe a été calibrée en fonction des paramètres  $S_H$  et  $S_B$ . Grâce à son temps de fonctionnement, enregistré toutes les 30 secondes, et son débit de gaz, la production de gaz a été calculée (Equation 2-13).

$$\Delta V_{normalisé} = (F_{i+1} - F_i) \times Q \times \frac{T}{T_{ref}} \quad \text{Equation 2-13}$$

avec  $\Delta V_{normalisé}$  le volume de gaz normalisé produit entre  $t_i$  et  $t_{i+1}$  (en mL),  $(F_i - F_{i+1})$  le temps de fonctionnement de la pompe entre  $t_i$  et  $t_{i+1}$  (en minutes),  $Q$  son débit (en mL·min<sup>-1</sup>),  $T$  la température dans le réacteur (en Kelvin),  $T_{ref}$  la température en conditions normales (CNTP, *i.e.* 0 °K).

Les deux méthodes ont systématiquement été appliquées et comparées dans une démarche de consolidation des données.

## 2.8.2. Traitement des données de séquençage

### 2.8.2.1. Formatage des données issues du séquençage 16S

Un formatage des données issues du séquençage 16S des bactéries a été réalisé avec le package phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) sous R. Un objet « phyloseq » a été créé. Ce type d'objet contenait :

- Une table d'abondance, c'est-à-dire un tableau avec en ligne les OTUs et en colonne les échantillons. En fonction du traitement de données appliqué, cette table contenait soit les abondances relatives des OTUs (c'est-à-dire, la proportion de séquences ADN affiliées à un OTU par rapport à l'ensemble des séquences ADN amplifiées), soit les abondances absolues des OTUs (après multiplication de chaque abondance relative par la concentration en copies 16S de chaque échantillon respectif, mesurée par PCRq)
- Une table de taxonomie, c'est-à-dire, un tableau avec en ligne les OTUs et en colonne leur classification taxonomique (domaine, phylum, classe, ordre, famille et genre).
- Une table de métadonnées, c'est-à-dire un tableau avec en lignes les échantillons et en colonne les variables utilisées pour caractériser chaque échantillon (exemple : temps de prélèvement, substrat, condition expérimentale, etc.).

- Un arbre phylogénétique, c'est-à-dire, un fichier encodant la proximité phylogénétique des différents OTUs, d'après leur séquence 16S. Pour générer cet arbre, un alignement des séquences 16S des OTUs a été réalisé avec l'outil en ligne Clustal Omega de l'Institut européen de bioinformatique (EMBL – EBI, <https://www.ebi.ac.uk/>) (Madeira et al., 2022).

Le package microbiome a ensuite été utilisé pour visualiser l'abondance des OTUs en fonction des conditions expérimentales. La fonction `aggregate_top_taxa` a été utilisée pour agréger les OTUs selon un rang taxonomique spécifié, et la fonction `plot_composition` a été utilisée pour exécuter la visualisation.

### 2.8.2.2. Calcul de la concentration cellulaire en bactéries

Le séquençage 16S permet d'accéder à l'abondance relative de chaque OTU. Cette abondance correspond au nombre de séquences attribuées à un OTU par rapport à la somme de toutes les séquences amplifiées. Cette mesure est toutefois biaisée par l'existence d'un nombre variable de copies du gène 16S dans le génome bactérien en fonction du genre et de l'espèce considérée. Pour corriger ce biais, les abondances relatives ont d'abord été transformées en abondances absolues grâce aux mesures du nombre de copies de gène 16S dans les échantillons (par PCRq) (Equation 2-14).

$$Ab_{\text{absolue}} = Ab_{\text{relative}} \times C_{16S} \quad \text{Equation 2-14}$$

avec  $Ab_{\text{absolue}}$  l'abondance absolue d'un OTU (en copies·mL<sup>-1</sup>),  $Ab_{\text{relative}}$  l'abondance relative d'un OTU (sans unité),  $C_{16S}$  la concentration en séquences 16S totale dans l'échantillon (résultat de la PCRq, en copies·mL<sup>-1</sup>).

Puis, les abondances absolues ont été converties en concentrations cellulaires, grâce au nombre de copies 16S par cellule (Equation 2-15).

$$C_{\text{cellulaire}}^{\text{OTU } i} = \frac{Ab_{\text{absolue}}^{\text{OTU } i}}{Nb_{16S}^{\text{OTU } i}} \quad \text{Equation 2-15}$$

avec  $C_{\text{cellulaire}}^{\text{OTU } i}$  la concentration cellulaire d'un OTU  $i$  dans un échantillon (en cellules·mL<sup>-1</sup>),  $Ab_{\text{absolue}}^{\text{OTU } i}$  l'abondance absolue d'un OTU  $i$  (en copies·mL<sup>-1</sup>) et  $Nb_{16S}^{\text{OTU } i}$  le nombre de copies 16S par cellule pour l'OTU  $i$  (copies 16S·cellule<sup>-1</sup>).

Le nombre de copies 16S par cellule a été déterminé en utilisant la base de données rrnDB (*ribosomal RNA operon copy number*, <https://rrnodb.umms.med.umich.edu/about/>) (Stoddard et al., 2015). Cette base de données rassemble le nombre de copies du gène ribosomal 16S dans le génome bactérien pour un grand nombre d'espèces. Les données sont issues des

génomés bactériens séquencés et publiés. Le Tableau 2-7 présente le nombre de copies 16S pour un ensemble d'OTUs ayant présenté une abondance relative supérieure à 20 % dans cette thèse.

**Tableau 2-7 : Nombre de copies 16S par cellule pour les OTUs majoritaires identifiés au cours de cette thèse**

<b>OTU / Espèce / Famille</b>	<b>Nombre de copies 16S par cellule</b>
<i>Clostridium diolis</i>	14
<i>Clostridium butyricum</i>	12
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	11
<i>Clostridium perfringens</i>	10
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	6
<i>Clostridium sp.</i>	9
<i>Weizmannia coagulans</i>	10
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	5
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	9
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	7
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	7
<i>Bifidobacterium sp.</i>	4
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	7
<i>Streptococcus sp.</i>	6
<i>Enterococcus hirae</i>	6
<i>Enterococcus sp.</i>	6
<i>Ruminococcaceae</i>	3

A partir de la concentration cellulaire totale d'un OTU dans un échantillon, des concentrations cellulaires relatives ont pu être calculées, correspondant à la concentration cellulaire de cet OTU par rapport à la concentration cellulaire totale dans l'échantillon.

Dans ce manuscrit, lorsque l'abondance relative d'un OTU était de 0 %, *i.e.* lorsque sa quantification était sous le seuil de détection lors du séquençage 16S, la concentration cellulaire dudit OTU a été approximée inférieure à 100 cellules·mL<sup>-1</sup>. Cette approximation est issue de l'observation que, dans toute cette thèse, les concentrations cellulaires les plus

faibles calculées à partir des abondances relatives étaient de l'ordre de grandeur de 100 cellules·mL<sup>-1</sup>.

### 2.8.2.3. *Evaluation de la diversité*

- **Diversité  $\alpha$**

La diversité  $\alpha$  est une mesure de la diversité d'un échantillon donnée. Elle est d'autant plus élevée que le nombre d'OTUs qui la compose est élevé, et que la proportion de ces OTUs la composant est équilibrée. Plusieurs indicateurs ont été utilisés dans cette thèse pour la caractériser.

- **La richesse spécifique**

Il s'agit du nombre d'OTUs identifiés dans un échantillon donné.

- **L'indice de Shannon**

L'indice de Shannon estime la diversité spécifique d'un échantillon, c'est-à-dire le nombre d'OTUs de ce milieu (richesse spécifique) et la répartition de ces OTUs (équirépartition). L'indice a été calculé selon l'Equation 2-16.

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log(p_i) \quad \text{Equation 2-16}$$

avec H la diversité de Shannon, i un OTU, S la richesse spécifique,  $p_i$  la proportion d'un OTU i par rapport au nombre total d'OTUs identifiés dans l'échantillon. L'indice de Shannon est d'autant plus élevé que le nombre d'OTUs est élevé et que l'abondance de ces OTUS est équilibrée.

- **L'indice de Pielou**

L'indice de Pielou mesure l'équitabilité de la répartition des OTUs, c'est-à-dire l'écart entre la distribution observée et une distribution uniforme. Il est indépendant de la richesse spécifique. Cet indice est calculé à partir de l'indice de Shannon et varie entre 0 (la diversité la plus faible, une seule espèce représente 100 % de l'abondance) et 1 (la diversité la plus élevée, toutes les espèces ont la même proportion). L'indice a été calculé selon l'Equation 2-17.

$$J = \frac{H}{\log(S)}$$

**Equation 2-17**

avec J, l'indice de Pielou et log(S) la valeur maximale de l'indice de Shannon pour un échantillon donné.

- **Diversité β**

La diversité β mesure la similarité ou de la dissimilarité de diversité entre deux échantillons. Une faible diversité β suggère que les communautés microbiennes des échantillons comparés sont similaires, et à l'inverse, une diversité β élevée suggère que les communautés microbiennes des échantillons sont différentes.

Lors de l'évaluation de la diversité β dans un ensemble d'échantillons, une distance est calculée pour chaque paire d'échantillons. L'ensemble des distances résultantes sont regroupées dans une matrice qui comporte les échantillons en ligne et en colonne. On parle de matrice de distance ou de dissimilarité. A partir de cette matrice, les distances entre les échantillons sont visualisables.

Différentes méthodes sont applicables pour calculer les distances entre chaque échantillon. Dans cette thèse, la méthode UniFrac a été appliquée (fonction UniFrac du package phyloseq). La spécificité de cette méthode est qu'elle intègre la distance phylogénétique entre les OTUs dans l'analyse. Pour calculer la distance UniFrac entre les communautés microbiennes de deux échantillons, les OTUs retrouvés dans les deux échantillons ainsi que ceux retrouvés dans un seul échantillon uniquement sont placés sur un arbre phylogénétique. Une branche de cet arbre menant à un OTU retrouvé dans les deux échantillons est définie comme branche partagée et, à l'inverse, une branche menant à un OTU retrouvé dans un seul des deux échantillons est définie comme branche non partagée. Deux versions de la méthode Unifrac existent, une ne prenant pas en compte l'abondance des OTUs dans les échantillons (*Unweighted UniFrac*, distance nommée U, Equation 2-18) et une prenant en compte leur abondance (*Weighted UniFrac*, distance nommée W, Equation 2-19). Dans cette thèse, la version de la méthode UniFrac prenant en compte l'abondance des OTUs a été utilisée (Equation 2-19).

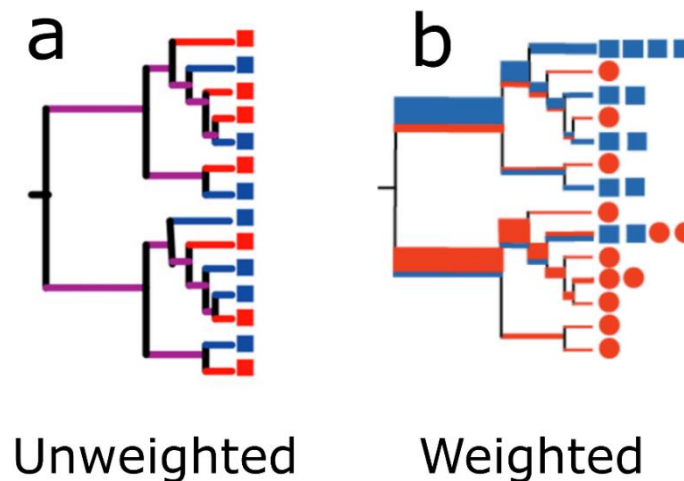
$$U = \frac{\sum_{i=1}^N l_i |A_i - B_i|}{\sum_{j=1}^N l_j \max(A_j, B_j)}$$

**Equation 2-18**

$$W = \frac{\sum_{i=1}^N l_i \left| \frac{A_i}{A_t} - \frac{B_i}{B_t} \right|}{\sum_{j=1}^S L_j}$$

**Equation 2-19**

avec  $N$  le nombre de nœuds de l'arbre,  $S$  le nombre d'OTUs représentés sur l'arbre,  $l_i$  la longueur entre le nœud  $i$  et son parent,  $L_j$  la longueur de la branche totale de la racine de l'arbre à l'extrémité de l'arbre pour l'OTU  $j$ ,  $A_i$  et  $B_i$  le nombre d'OTUs des communautés A et B associées au nœud  $i$ , et  $A_t$  et  $B_t$  le nombre total d'OTUs des communautés A et B. La méthode est illustrée en Figure 2-6.



**Figure 2-6 : Schématisation des méthodes *Unweighted Unifrac* (a) et *Weighted Unifrac* (b) utilisées pour calculer la distance entre les communautés microbiennes de deux échantillons. Les cercles ou carrés bleu ou rouge représentent des OTUs retrouvés dans l'échantillon X (en rouge) et l'échantillon Y (en bleu). En (a), les distances violettes correspondent aux branches partagées. En (b), l'épaisseur des branches est dépendante de l'abondance des OTUs. Figure adaptée (Québec, n.d.).**

A partir de la matrice de distance calculée par la méthode *Weighted Unifrac*, un arbre a été construit avec la méthode UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). Une version modifiée de la fonction `pvclust` sous R a été utilisée pour appliquer la méthode UPGMA à la matrice de dissimilarité<sup>10</sup> et évaluer l'incertitude de la classification des OTUs dans l'arbre créé (Cope et al., 2017). A partir de multiples rééchantillonnage ( $n=10\,000$ ), une  $p$ -value a été calculée pour chaque nœud de l'arbre (Suzuki and Shimodaira, 2006). La fonction `pvpick` a été utilisée pour identifier les échantillons clusterisés avec une  $p$ -value inférieure à 0,05. Un dendrogramme a été représenté à partir de l'arbre construit avec la fonction `plot.pvclust` du package `pvclust`.

<sup>10</sup> La fonction `pvclust` de base du package `pvclust` ne permet pas d'appliquer la méthode UPGMA à une matrice de dissimilarité UniFrac.

### 2.8.3. Détermination des paramètres cinétiques de la production d'H<sub>2</sub>

Les paramètres cinétiques de la production d'H<sub>2</sub> au cours du temps de fermentation ont été déterminés en appliquant soit le modèle de Gompertz, soit une modélisation polynomiale (*spline fit*), dans les cas où le modèle de Gompertz ne procurait pas une modélisation satisfaisante des données.

#### 2.8.3.1. Modèle de Gompertz

Le modèle de Gompertz a été utilisé pour déterminer la production cumulée d'H<sub>2</sub> par gramme de substrat ajouté sous forme de matière volatile (H<sub>max</sub> en mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>), la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> (HPR, en mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>) et la latence avant production d'H<sub>2</sub> (λ, jours), selon l'Equation 2-20:

$$H(t) = H_{max} \times e^{-e^{HPR \times e^{\lambda - t} + 1}} \quad \text{Equation 2-20}$$

où H(t) est le volume d'H<sub>2</sub> produit au cours du temps, par gramme de matière volatile de substrat (mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>). Le modèle a été appliqué avec le logiciel R, en utilisant le package *grofit* (Kahm et al., 2010).

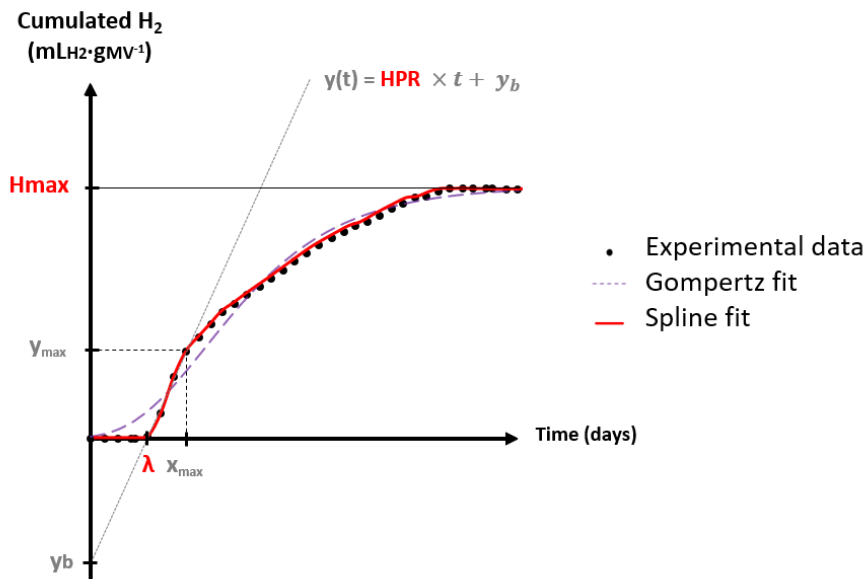
#### 2.8.3.2. Modèle polynomial

Une modélisation polynomiale de la cinétique de production d'H<sub>2</sub> par gramme de matière volatile de substrat ajouté a été réalisée lorsque le modèle de Gompertz se révélait visuellement inadéquat (voir Figure 2-7). La modélisation a été réalisée à l'aide de la fonction *grofit* du package *grofit* sous R (Kahm et al., 2010). La fonction retournait les paramètres H<sub>max</sub>, HPR et λ, comme le modèle de Gompertz. Ces trois paramètres ont été déduits de l'ajustement comme suit (Figure 2-7) : HPR était la pente maximale de la cinétique de production d'H<sub>2</sub>, H<sub>max</sub> était le volume d'H<sub>2</sub> produit cumulé par gramme de matière volatile de substrat le plus élevé et λ correspondait à l'ordonnée à l'origine de la droite de pente HPR qui passe par le point d'inflexion (Equation 2-21).

$$\lambda = \frac{HPR \times x_{max} - y_{max}}{HPR} \quad \text{Equation 2-21}$$

Avec x<sub>max</sub> et y<sub>max</sub>, les coordonnées du point d'inflexion.





**Figure 2-7 : Représentation schématique de la détermination des paramètres cinétiques de production d'H<sub>2</sub> suite à la modélisation polynomiale.**

#### 2.8.4. Paramètres cinétiques d'inhibition

L'impact inhibiteur des acides sur HPR a été évalué avec l'équation d'inhibition non compétitive suivante (Equation 2-22) (Y. Wang et al., 2008) (partie 3.2) :

$$\text{HPR}(C) = \frac{\text{HPR}_{\text{ctrl}}}{1 + (C/K_c)^n} \quad \text{Equation 2-22}$$

avec HPR(C) la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> en fonction de la concentration en acide ajouté, HPR<sub>ctrl</sub> la valeur d'HPR sans ajout d'acide, C la concentration initiale en acide ajouté (mM), n le degré de l'inhibition et K<sub>c</sub> la constante d'inhibition (mM) qui représente la concentration en acide à laquelle HPR<sub>ctrl</sub> est inhibé de 50 %. Les paramètres HPR<sub>ctrl</sub>, n et K<sub>c</sub> ont été estimés par la méthode des moindres carrés avec la fonction nls du package stats sous R.

### 2.8.5. Analyses statistiques

- **ANOVA, kruskal wallis**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les tests de Shapiro et Barlett ont été réalisés pour confirmer les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité de la distribution des résidus. L'analyse des variances (ANOVA) a été calculée à l'aide de la fonction aov. L'ANOVA a été réalisée en cas de validation des hypothèses associées au test, sinon un test de Kruskal wallis a été effectué. Le test de Kruskal wallis a été réalisé en utilisant la fonctions kruskal.test.

- **Corrélations**

Les tests de corrélation ont été réalisés à l'aide de la fonction cor.test du package stats du logiciel R.

- **Analyses multivariées**

Les analyses en composantes principales ont été réalisées avec le logiciel R et le package Factoshiny, en utilisant la fonction PCA (Lê et al., 2008). La fonction dimdesc de ce package a été utilisée pour obtenir les scores de corrélations entre les variables et les composantes principales ainsi que les p-values associées.

### 2.9. Synthèse des expériences de la thèse

Le Tableau 2-8 récapitule les différentes expériences conduites au cours de cette thèse. Les résultats issus de cinq expériences sont présentés dans ce manuscrit. Dans ces cinq expériences, la concentration initiale en substrat ( $10 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), le ratio S/X ( $10 \text{ g}_{\text{VS}}/\text{g}_{\text{VS}}$ ), la température ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) et la source d'inoculum étaient identiques.

**Tableau 2-8 : Synthèse des expériences présentées dans ce manuscrit.**

<b>Intitulé de l'expérience</b>	<b>Dispositif expérimental</b>	<b>Mode</b>	<b>Substrat</b>	<b>Charge organique <math>\text{g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}</math></b>	<b>pH</b>	<b>Durée (jours)</b>	<b>Section</b>
<b>Impact des concentrations en acides sur la fermentation sombre et la production d'H<sub>2</sub></b>	Fioles	Batch	Glucose	/	6,0	4	3.2
<b>Fermentations secondaires productrices d'H<sub>2</sub> en condition de stress acide</b>	Fioles	Batch	Glucose résiduel, acides ajoutés, métabolites issus de la fermentation primaire	/	6,0	8	3.3
<b>Evaluation de l'influence d'un pré-stress acide au butyrate</b>	Réacteur instrumenté	Continu	Soupe de déconditionnement reconstituée	60	5,5	13	3.4
<b>Influence de la modification de la pression et de la teneur en CO<sub>2</sub></b>	Réacteur instrumenté	Batch	Soupe de déconditionnement reconstituée	/	5,5	2	4.2
<b>Influence de la modification de la pression et de la teneur en CO<sub>2</sub></b>	Réacteur instrumenté	Continu	Soupe de déconditionnement reconstituée	30	5,5	12	4.3



## 3. Influence des acides sur la fermentation sombre et la production d'H<sub>2</sub>

---

### 3.1. Résumé du chapitre

Les principaux acides produits lors de la fermentation sombre sont l'acétate, le butyrate et le lactate. L'accumulation de ces derniers dans le milieu fermentaire a été associée à une inhibition de la production d'H<sub>2</sub> en cultures pures et en cultures mixtes (Bundhoo and Mohee, 2016). La revue de la littérature a mis en évidence une diversité importante de leurs effets inhibiteurs<sup>11</sup>. Notamment, les seuils d'inhibition du rendement en H<sub>2</sub> par l'acétate et le butyrate varient largement en cultures mixtes, allant de < 10 mM à 98 mM et de < 10 mM à 227 mM, respectivement. L'effet inhibiteur du lactate, présent à des concentrations élevées dans des substrats (Noblecourt et al., 2018) ou s'accumulant pendant la fermentation, est également variable, avec des seuils d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> variant de < 44 mM à > 300 mM (Noblecourt et al., 2018). Cette variabilité complexifie à la fois la prédiction des effets inhibiteurs et l'application des stratégies de levée de ces inhibitions. Ainsi, les travaux présentés dans ce chapitre visent à améliorer la compréhension des mécanismes d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques en culture mixte et à étudier des stratégies de réduction de ces inhibitions.

Tout d'abord, les effets de l'acétate, du butyrate et du lactate sur la production d'H<sub>2</sub> ont été évalués (partie 3.2) en s'intéressant aux changements métaboliques et populationnels qu'ils pouvaient engendrer au cours de fermentations réalisées en utilisant un substrat simple, le glucose. L'étude a mis en évidence un seuil d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> à 50 mM quel que soit l'acide ajouté. En revanche, la nature de l'acide a influencé l'étendue de l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub>. Une inhibition totale de la production d'H<sub>2</sub> a été observée à une concentration de 200 mM, 300 mM et 400 mM de butyrate, d'acétate et de lactate, respectivement. A ces concentrations, l'analyse des communautés microbiennes a révélé des changements populationnels substantiels, avec une diminution de l'abondance de *Clostridiaceae* en faveur de *Lactobacillaceae* ou de *Bacillaceae*. A des concentrations en acides moins élevées, l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> résultait de combinaisons d'effets dose-dépendants et acide-dépendants sur (i) les performances de dégradation du substrat, (ii) les rendements de production de métabolites et (iii) les communautés microbiennes.

Après quatre jours de fermentation en présence d'acétate, de butyrate ou de lactate, le débit de production d'H<sub>2</sub> était généralement nul, malgré la présence de substrat résiduel sous

---

<sup>11</sup> Pour rappel, le terme « inhibition » est utilisé dans toute cette thèse au sens large.

forme de glucose ou de lactate dans de nombreuses conditions de culture. Les effluents de fermentation ont alors été cultivés jusqu'à neuf jours supplémentaires, afin d'étudier le développement de microorganismes résistants au stress acide (partie 3.3). La culture prolongée a révélé la croissance de deux microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> : *C. tyrobutyricum* et *C. guangxiense*, à des concentrations élevées en acides de 200 mM d'acétate ou de butyrate et 300 mM de lactate, et ce malgré la croissance de microorganismes potentiellement antagonistes de la famille des *Lactobacillaceae*.

Cette émergence de microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> résistants au stress acide suggère que l'adaptation des communautés microbiennes pourrait être une stratégie pertinente pour améliorer la production d'H<sub>2</sub> de réacteurs subissant un stress acide. Une stratégie d'adaptation de consortium microbien au stress acide a donc été développée, *via* l'incubation de cultures mixtes en présence de butyrate, acide le plus inhibiteur, afin d'améliorer la production d'H<sub>2</sub> lors de la fermentation d'un substrat complexe, des soupes de déconditionnement reconstituées (partie 3.4). Une stratégie de stress initial par 100 mM de butyrate d'un réacteur continu en surcharge organique a permis d'améliorer la production d'H<sub>2</sub> de 48 %, en lien avec l'augmentation de l'abondance de *C. guangxiense*, de 22 % à 52 %.

Les principaux résultats des parties 3.2 et 3.4 de ce chapitre sont présentés sous la forme de deux articles publiés dans les journaux « *International Journal of Hydrogen Energy* » et « *Energies* ». Des résultats complémentaires aux articles sont présentés après ces derniers afin d'approfondir la discussion. La partie 3.3 est présentée de manière conventionnelle, en français.

### 3.2. Changements populationnels et métaboliques induits par l'ajout d'acétate, de butyrate ou de lactate

#### 3.2.1. Avant-propos

La synthèse bibliographique a mis en évidence des effets dose-dépendants de l'acétate, du butyrate et du lactate sur la dégradation du substrat, la croissance microbienne, la latence avant production d'H<sub>2</sub>, la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> et le rendement en H<sub>2</sub>. Il a été suggéré que la grande variabilité des effets inhibiteurs décrits puisse être associée aux paramètres opérationnels appliqués lors de la fermentation. Par exemple, la hausse du pH de 5,5 à 7 a été associée à une diminution de l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides (Chen et al., 2021b) et inversement, la baisse du pH de 5,5 à 5,0 a été associée à une augmentation de l'inhibition (S. Van Ginkel and Logan, 2005). Néanmoins, la connaissance de ces paramètres reste insuffisante pour prédire *a priori* les effets inhibiteurs de ces acides, et la prise en compte d'autres paramètres apparaît indispensable.

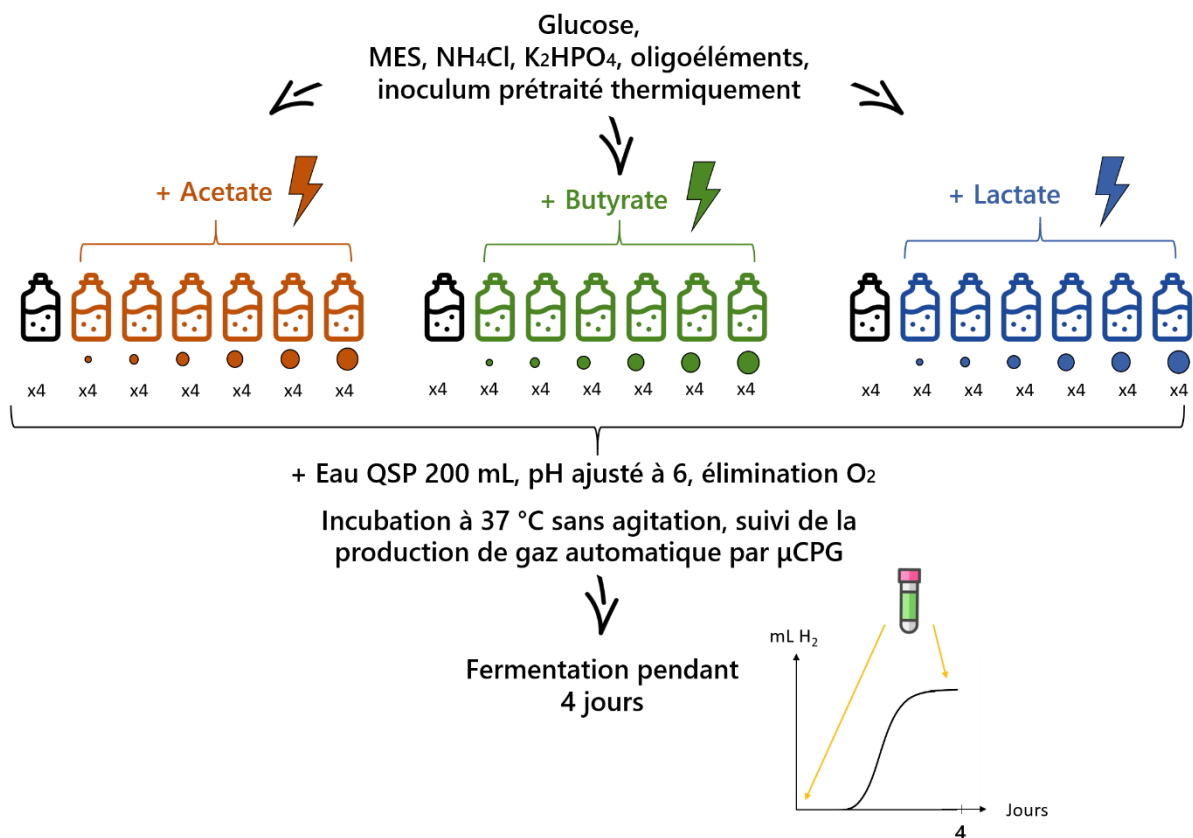
Un de ces paramètres supplémentaires est la composition de la communauté microbienne. En particulier, l'étude des effets inhibiteurs des acides en culture pure révèle une résistance variable des microorganismes en fonction des espèces microbiennes. Or, les communautés microbiennes initiales (inocula) utilisées pour la production d'H<sub>2</sub> en culture mixte sont d'origines diverses, cultivées dans des conditions variables (température, pH, substrat, configuration du réacteur), et ces facteurs influencent la composition de la communauté microbienne en croissance (Etchebehere et al., 2016). Dès lors, l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides serait probablement liée à la composition de la communauté microbienne cultivée. Néanmoins, les études de l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides en culture mixte sont très rarement associées à une analyse de la composition des communautés microbiennes, et la part de la variabilité des effets inhibiteurs attribuable à ce facteur reste encore méconnue.

Par ailleurs, la composition de la communauté microbienne peut évoluer à cause d'une exposition à un stress acide<sup>12</sup>. En effet, il est incertain que les changements métaboliques en présence d'acides décrits en culture pure soient directement transposables en culture mixte, les effets populationnels pouvant être prépondérants. La caractérisation de l'évolution d'une communauté microbienne en fonction du stress acide pourrait améliorer notre compréhension des mécanismes d'inhibition en culture mixte, et aider au choix d'une stratégie de réduction de l'inhibition.

---

<sup>12</sup> Rappel : dans cette thèse, l'expression « stress acide » désigne le stress causé par l'élévation des concentrations en acides organiques, à pH constant.

L'objectif de cette partie a donc été de caractériser l'effet de différents stress acides sur la production d'H<sub>2</sub> et les communautés microbiennes en fermentation sombre. Plus précisément, l'effet de l'acétate, du butyrate ou du lactate a été étudié en réalisant des fermentations en mode batch avec un ajout initial de ces acides à des concentrations variables (de 0 à 400 mM), à un pH tamponné de 6, et à partir de glucose comme substrat. Un substrat simple a été choisi pour cette étude afin de pouvoir discuter les voies métaboliques empruntées avec une précision difficilement accessible lors de la dégradation d'un substrat complexe. Les concentrations en acide ont été sélectionnées en considérant leurs effets inhibiteurs d'après la littérature. Les paramètres clés de la fermentation dont l'inhibition par chaque acide a été discutée sont : le volume d'H<sub>2</sub> cumulé produit, la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub>, la latence avant production, le taux de dégradation du substrat, les rendements de production des métabolites, l'abondance relative des OTUs aux niveaux de la famille, du genre et de l'espèce ainsi que la diversité des communautés microbiennes. La Figure 3-1 illustre le plan expérimental appliqué.



**Figure 3-1 : Illustration du plan expérimental appliqué pour évaluer l'influence de l'acétate, du butyrate et du lactate sur la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre à partir de glucose.**

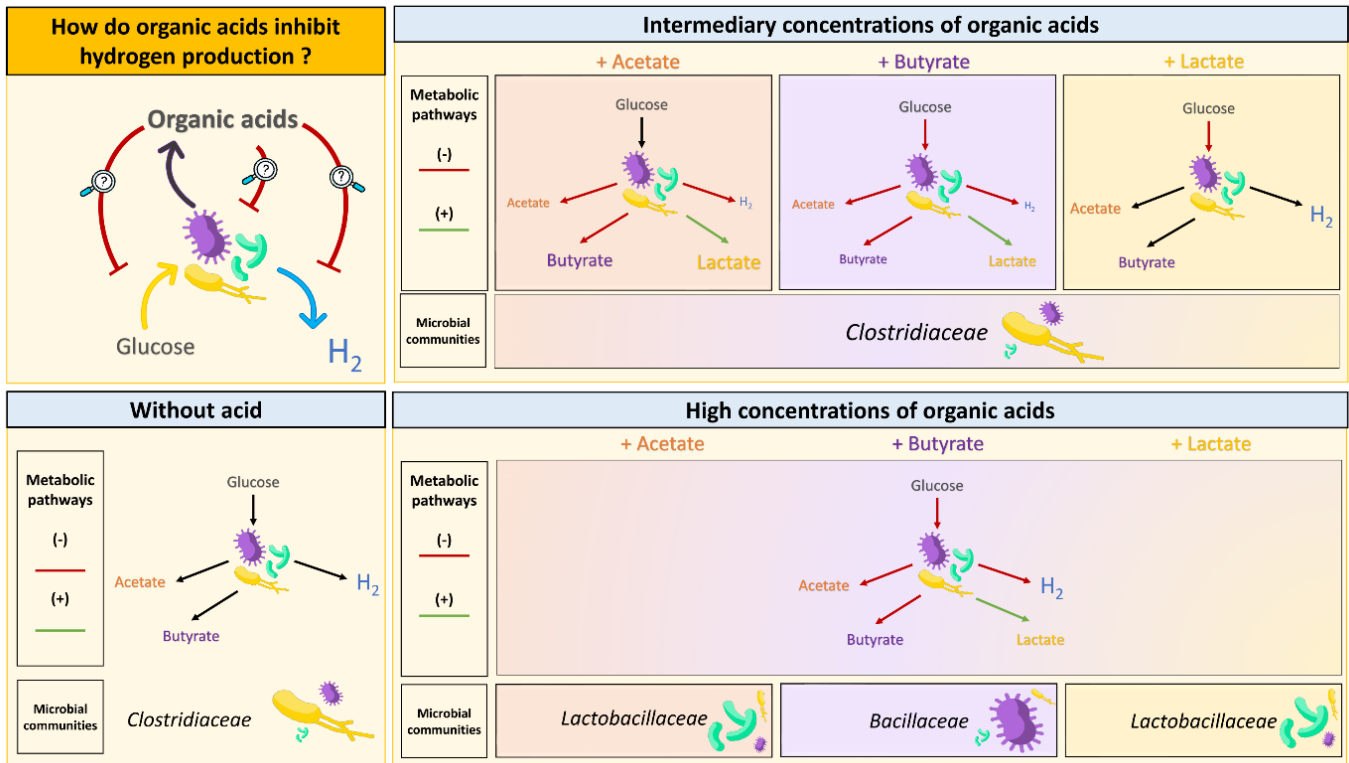
Ces travaux ont fait l'objet de la publication d'un article scientifique dans la revue *International Journal of Hydrogen Energy*, acceptée le 18 juin 2022 et intitulé « *Populational and metabolic shifts induced by acetate, butyrate and lactate in dark fermentation* » (Noguer et al., 2022).



## Populational and metabolic shifts induced by acetate, butyrate and lactate in dark fermentation

Noguer M., Escudie R., Bernet N., Trably E.\*

INRAE, Univ Montpellier, LBE, 102 Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France



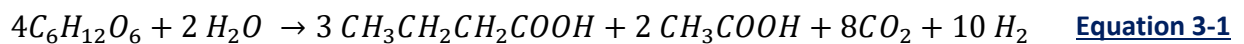
**Figure 3-2 : Graphical abstract**

Dark fermentation is subject to inhibition by end products. In this study, the effects of acetate, butyrate and lactate on fermentation routes of glucose were investigated for concentrations ranging from 25 to 400 mM. Whatever the acid considered, an inhibition threshold of hydrogen production was observed at acid concentration as low as 50 mM. 300 mM of acetate, 200 mM of butyrate and 400 mM of lactate were critical concentrations resulting exclusively in lactate production. At these high concentrations, bacterial communities shifted from *Clostridiaceae* to *Lactobacillaceae* family after acetate or lactate addition, and to *Bacillaceae* after butyrate addition. At lower acid concentrations, the nature and the concentration of the added acid shaped metabolic and populational changes. Specifically, *Clostridium butyricum* was able to grow up to 250 mM, 150 mM and 300 mM of acetate, butyrate and lactate respectively, but was suspected to shift its metabolism towards lactate production.

**Keywords:** acid inhibition, biohydrogen, microbial diversity, undissociated acid

### 3.2.3. Introduction

Low carbon footprint hydrogen (H<sub>2</sub>) could play a major role in the future to reduce carbon dioxide emissions and prevent global warming. Among the existing green H<sub>2</sub> production technologies, biological production by dark fermentation (DF) presents one of the lowest global warming potentials (Dincer and Acar, 2014). When performed with mixed cultures, DF presents also the advantages of being light-independent, having high H<sub>2</sub> production rates and using various low-cost raw materials and waste as feedstocks (Łukajtis et al., 2018). This promising biological process relies on the degradation of carbohydrate-rich organic matter by H<sub>2</sub>-producing bacteria in anaerobic conditions. Efficient H<sub>2</sub> production in DF is mostly associated to acetate and butyrate metabolic pathways with the stoichiometry from Equation 3-1 (Hawkes et al., 2007), together with the dominance of species belonging to the *Clostridiaceae* family.



Although the microbial diversity in mixed cultures can provide robustness and function redundancies, it could also disfavour the H<sub>2</sub> production by introducing microorganisms engaged in substrate competition (*Lactobacillus* sp.), in the release of inhibitory co-products (bacteriocins, lactate) or in H<sub>2</sub> consumption (bacteria with homoacetogenic activities or hydrogenotrophic methanogens) (Castelló et al., 2020).

The effects of end-products accumulation on H<sub>2</sub> production have been widely studied in mixed cultures (Chen et al., 2021a). Overall, acetate, butyrate, propionate and ethanol were found to have inhibitory effects on H<sub>2</sub> yields, hydrogen production rates (HPR) and substrate degradation (Chen et al., 2021a). Inhibitory threshold for H<sub>2</sub> yield (the lowest concentration that does not result in a significant reduction in H<sub>2</sub> yield) by butyrate varies from < 10 mM in batch at pH 7 using heat-treated digested sludge and glucose as substrate (B. Wang et al., 2008) to 38 mM in continuous reactor at pH 5.5 from glucose using baked agricultural soil as inoculum (S. Van Ginkel and Logan, 2005). Similarly, inhibition threshold for H<sub>2</sub> yield by acetate was reported to vary from < 10 mM (B. Wang et al., 2008) to 98 mM (S. Van Ginkel and Logan, 2005).

Furthermore, the activity of lactic acid producing bacteria (LAB) was associated with DF instability (García-Depraect et al., 2021b). Regarding the specific effect of lactate, Baghchehsaraee et al. (2009) showed that up to 55 mM of lactate did not inhibit H<sub>2</sub> production. Consistently, Noblecourt et al. (2018) did not observe a negative impact of 300 mM endogenously produced lactate during the DF of pre-fermented food wastes. However, the latter observed that 44 mM of exogenously added L-lactate induced a 35 % decrease in H<sub>2</sub>

production, highlighting that enantiomeric form of lactate plays a key role in its inhibitory effect. In addition, T. H. Kim et al. (2012) observed that 178 mM of lactate (unknown enantiomeric form) induced a 40 % increase in lag phase. Therefore, the different results and conclusions found in literature concerning inhibition by acetate, butyrate and lactate are very dependent on the experimental conditions as well as the reactor feeding modes applied, hindering efficient prevention of end-products inhibition.

The cellular mechanisms of such end-products inhibition on the microbial activity was deeply studied with pure cultures. Past experiments showed that organic acids can affect the bacterial activity and thus inhibit H<sub>2</sub> production by various means. In their undissociated form, the organic acids can freely cross the cytoplasmic membranes and easily dissociate inside the cell, thus acidifying the cytoplasm and dissipating the proton motive force (Baronofsky et al., 1984). Active proton extrusion by ATPases counteracts this effect, but at the expense of the energy available for growth. In their dissociated form, the organic acids can increase the ionic strength, triggering cell lysis, and thus reducing the microbial activity (Russell, 1992; van Niel et al., 2003). Furthermore, depending on the microorganism studied, the impact of the undissociated form compared to the dissociated form may vary, as well as the extent of the inhibition (Eklund, 1983; Kovanda et al., 2019).

Therefore, in mixed cultures, it can be hypothesised that the variable resistance of the microorganisms to end-products would cause microbial communities shifts, but the knowledge in the literature on this subject is rather poor. Recently, Chen et al. (2021b) studied the impact of butyrate from 6 to 284 mM on microbial communities with glucose as substrate and at pH 5.5, 6, 6.5 and 7. They showed that H<sub>2</sub> production reduction was associated with a decrease in the proportion of H<sub>2</sub>-producing microorganisms, such as *Clostridium* sp. (*Clostridiaceae*), and an increase in the proportion of other bacteria, including *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonadaceae*), *Klebsiella* sp. (*Enterobacteriaceae*), *Acinetobacter* sp. (*Moraxellaceae*), and *Bacillus* sp. (*Bacillaceae*). However, the analysis of the microbial communities conducted by the authors was limited, replicates of the trials are not presented and only the effect of butyrate was studied. In contrast, under comparable conditions, *i.e.*, at pH 6 with glucose as substrate, Noblecourt et al. (2017) observed that an endogenously produced mixture of 191 mM butyrate and 80 mM acetate decreased H<sub>2</sub> production rate but had no impact on the composition of the highly enriched microbial communities from sewage sludge. These results show that H<sub>2</sub> production inhibition by end-products could result from populational changes as well as from metabolic changes. However, the conditions that lead to either of these phenomena are unknown.

A deeper understanding of the mechanisms of end-product inhibition in mixed culture could then contribute to a more effective prevention of these inhibitions.

The objective of this work was to provide further insights on populational and metabolic mechanisms behind the impact of end-products on H<sub>2</sub> fermentation routes in a mixed culture.

More specifically, the novelty of this investigation is attributed to the qualitative and quantitative comparison of bacterial communities through a beta diversity analysis to distinguish between metabolic inhibition (*i.e.* within the same community, changes in metabolic activity are responsible for reduced H<sub>2</sub> production) from populational inhibition (*i.e.* changes in the bacterial community are responsible for reduced H<sub>2</sub> production). For that, the impact of the addition of acetate (from 0 to 300 mM), butyrate (from 0 to 250 mM) and lactate (from 0 to 400 mM) on DF of glucose was investigated.

### 3.2.4. Material and Methods

#### 3.2.4.1. Seed sludge

Activated sludge was used as inoculum. The sludge was collected from an aerobic tank at the wastewater treatment plant (WWTP) of Narbonne (France). pH of the freshly collected sludge was 6.9. The sludge was first centrifuged 10 minutes at 16,800 g (20 °C), frozen, freeze-dried, mixed, aliquoted and stored at - 80 °C before use. Freeze-drying storage was selected as it has recently been shown to be an effective strategy for preserving the H<sub>2</sub> production potential of WWTP sludge (Dauptain et al., 2021). After storage, the sludge was composed of  $0.96 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{TS}} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.75 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Prior to the experimental procedures, the sludge was rehydrated in 200 mL of osmosed water and pre-treated by heating at 90°C for 15 min to select spore forming organisms, as heat-treatment was reported as a great strategy to achieve this purpose (Bundhoo et al., 2015).

#### 3.2.4.2. Experimental setup

Experiments were performed in 600 mL bottles with a 200 mL working volume. The medium was composed of  $9.34 \pm 0.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (*i.e.*,  $10.0 \pm 0.3 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) glucose, 100 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES buffer) (pKa = 6.15),  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$  and 1 mL of a micronutrient solution (in  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ : FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O: 1500; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 60; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 117; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 25; ZnCl<sub>2</sub>: 70; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 25; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 15; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O: 25; HCl: 1750). The glucose-to-inoculum ratio ( $\text{g}/\text{g}_{\text{VS}}$ ) was set at 10, by adjusting the amount of inoculum. The effects of acetate, butyrate and lactate addition were separately evaluated, in three distinct experiments. Sodium acetate ( $\geq 99 \%$ , Sigma Aldrich) was added at 0, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM; sodium butyrate (98 %, Sigma Aldrich) was added at 0, 25, 50, 100, 150, 200 and 250 mM and L (+) sodium lactate ( $> 99 \%$ , PanReac AppliChem) was added at 0, 50, 100, 150, 250, 300 and 400 mM. The concentration ranges evaluated for each acid were chosen based on their inhibitory effects reported in the literature (B. Wang et al., 2008; Wang et al., 2010; Y. Wang et al., 2008). Temperature was maintained at  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  by means of a water bath with

no stirring. As the H<sub>2</sub> yield in the present study were similar to the yield obtained under similar conditions with stirring ( $1.56 \pm 0.19 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  in the present study and  $1.4 \pm 0.1 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  with glucose as substrate, pH 6, 250 mL working volume, 300 RPM (Park et al., 2005)), it was considered that stirring was not essential in the present study.

Each condition was carried out in quadruplicate. pH was initially adjusted at  $6.0 \pm 0.2$  with 8 M NaOH or 8 M HCl. Finally, bottles were sealed with a rubber stopper, locked with an aluminium screw, and purged with N<sub>2</sub> to ensure anaerobic conditions. 2 mL samples were manually taken from each bottle at the beginning, after 2 days and after 4 days of fermentation. Samples were centrifuged at 13,000 g for 15 min. Supernatant and pellet were separated and stored at -20 °C prior to metabolite, glucose and microbial analysis.

#### *3.2.4.3. Analytical procedures*

Composition of the headspace was analysed every two hours with an automatic sampler coupled to a micro-gas chromatograph (SRA I-GC R3000) equipped with a Molsieve 5A 10 m column running at 80 °C, 30 PSI with argon as carrier gas for H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> analysis and a PoraPlot U (PPU) 8 m column running at 70 °C, 20 PSI with helium as carrier gas for CO<sub>2</sub> analysis. Component detection was realised with a micro-thermal conductivity detector (TCD) set at 90 °C. The volume of gas was estimated every two hours by automatic measurement of the total pressure. The pressure was automatically controlled in each bottle to not exceed 1.2 bar in order to restrain inhibition by gaseous products (Chang et al., 2012). Data were automatically stored in dedicated internal database.

Volatile fatty acids were measured by gas chromatography (GC) while glucose and other metabolites (i.e., lactate, formate, ethanol, butanol) were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Samples were filtrated through 0.2 µm prior to analysis. The Perkin Elmer Clarus 580 GC was equipped with an Alltech-FFAP EC™1000 column coupled to a flame ionization detector (FID) set at 280 °C. N<sub>2</sub> was used as carrier gas with a flow of 6 mL·min<sup>-1</sup>. The HPLC was equipped with a protective precolumn (Microguard cation H refill catbridges, Biorad) and an HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Biorad) running at 45 °C, with a 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution as eluent at a flow of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. Component detection was carried out with a refractive index detector (Waters 2414) running at 45 °C.

At the end of the experiment, the fermentation medium of each bottle was collected to assess the amount of biomass produced. Medium was centrifuged at 11,900 g for 20 minutes at 20 °C. Supernatant was removed and the pellet was resuspended in deionized water to eliminate liquid metabolic products and retain biomass. Total dry mass and volatile solids analysis were performed according to the APHA standard methods (APHA, 2017). Biomass formula was considered to be C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> and  $1.42 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{g}_{\text{biomass}}^{-1}$ . (Lakatos, 2018).

#### 3.2.4.4. Microbial community analyses and sequencing

Microbial communities were analysed at start and at the end of the fermentation. At start, three samples were randomly selected for microbial community analyses, for each of the three experiments (one per type of acid addition). At the end of the fermentation, if significant H<sub>2</sub> production was observed, at least two samples were analysed, for a total of 51 samples. More samples were analysed in case of significant variability in H<sub>2</sub> production per replicate. DNA extraction was made with a FastDNA™ SPIN kit (MP biomedical) following the manufacturer's instructions. Bacterial members identification was carried out by amplification of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene as reported by Braga Nan et al. (2020). Sequences were grouped in operational taxonomic units (OTUs) having 98 % similarity. Sequences were submitted to GenBank, under the accession number PRJNA785481.

Beta diversity analysis was conducted after rarefying the samples at the smallest number of reads (21340). A multiple sequence alignment was performed using the Clustal Omega online tool from the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/>).

#### 3.2.4.5. Modelling and statistical data analysis

The most common Gompertz model did not fit the experimental data (Figure 2-7). Therefore, H<sub>2</sub> production was modelled using a spline fit with the `grofit()` function of the `grofit` package in R (Kahm et al., 2010). The function returned the maximal H<sub>2</sub> production rate (HPR, mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>), the maximal volume of cumulated H<sub>2</sub> per gram of glucose added (Hc, mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>) and the lag time before H<sub>2</sub> production starts (λ, days). These three parameters were deduced from the fit as follows: HPR was the maximal slope, Hc was the highest cumulated volume of H<sub>2</sub> per gram of glucose added and λ corresponded to the x-intercept of the line of slope HPR that passes through the inflection point (Figure 2-7).

Modelling of the inhibitory impact of acetate, lactate, butyrate on HPR was performed with the following non-competitive inhibition equation (Equation 3-2) (Y. Wang et al., 2008) :

$$HPR = \frac{HPR_{ctrl}}{1 + (C/K_c)^n} \quad \text{Equation 3-2}$$

where HPR<sub>ctrl</sub> is HPR without acid addition, C is the concentration of the added acid (mM), n is the degree of inhibition and K<sub>c</sub> is the inhibition constant (mM).

Statistical analysis of the data was performed with R software. Differences in bacterial community composition were assessed using average linkage cluster analysis (UPGMA) and

the weighted UniFrac distance metric (Lozupone and Knight, 2005). An edited version of *pvclust* was used (Cope et al., 2017) to assess the uncertainty in hierarchical cluster analysis through a multiscale bootstrap resampling ( $n = 10,000$ ). The bootstrap probability value (BP) and approximately unbiased probability values (AU) were also calculated. Nine clusters showing a AU > 95 % were considered as relevant.

Visual representation of bacterial relative abundance was done with phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). Analysis of variance (ANOVA) and Kruskal wallis tests were performed using *aov* and *kruskal.test* function in R software, respectively. ANOVA was performed in case of validation of the assumptions associated with the test, otherwise a Kruskal wallis test was performed.

### 3.2.5. Results

#### 3.2.5.1. *Adverse effect of acid addition on biohydrogen production*

Fermentation was monitored over a period of 4 days, after which a plateau in H<sub>2</sub> production was reached in all conditions (Figure 3-3). No methane production was observed in all experiments. H<sub>2</sub> production was modelled with a spline fit used to estimate the volume of cumulated H<sub>2</sub> produced per gram of glucose added (Hc, mL<sub>H2</sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>), the maximal H<sub>2</sub> production rate (HPR, mL<sub>H2</sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) and the lag phase before H<sub>2</sub> production starts ( $\lambda$ , days) as reported in Tableau 3-1. Without acid addition, Hc reached  $193 \pm 23$  mL<sub>H2</sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup> ( $1.56 \pm 0.19$  mol<sub>H2</sub>·mol<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>), HPR  $248 \pm 47$  mL<sub>H2</sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> ( $2.0 \pm 0.4$  mol<sub>H2</sub>·mol<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) and  $\lambda$   $0.56 \pm 0.13$  day. Less than 20 % variability was observed between the replicates for Hc, HPR and  $\lambda$  in each condition, exception made for 300 mM of lactate, 200 mM and 250 mM of acetate.

#### **Cumulated hydrogen production - Hc**

A significant inhibition threshold for Hc was observed at 50 mM when acetate (ANOVA,  $p = 0.0005$ ), butyrate (ANOVA,  $p = 0.047$ ) and lactate (Kruskal Wallis,  $p = 0.0400$ ) were individually added. From this threshold, Hc declined progressively until it reached 0 at different concentrations depending on the acid added: 400 mM for lactate addition, 300 mM for acetate addition and 200 mM for butyrate addition. This result shows that acetate, butyrate and lactate can inhibit the total volume of H<sub>2</sub> produced and that this inhibitory effect is dose dependent.

Consistently, inhibitory threshold lower than 83 mM of acetate was observed at pH 5.5 with sucrose ( $25$  g<sub>COD</sub>·L<sup>-1</sup>) at 37 °C with a seed sludge obtained from a full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating citrate-producing wastewater (Y. Wang et al., 2008). Thresholds lower than 10 mM were found at pH 6 (Siqueira and Reginatto, 2015) and 7 (B.

Wang et al., 2008) but in these study, pH was unregulated; and potentially insufficiently buffered (48 mM NaHCO<sub>3</sub> as buffer with 10 g·L<sup>-1</sup> glucose), respectively.

Concerning butyrate, the inhibitory threshold observed here is consistent with the 71 mM threshold found by Zheng and Yu (2005) in similar conditions, *i.e.*, at pH 6 with 10 g·L<sup>-1</sup> glucose and 37 °C (with an anaerobic sewage treatment plant stored 6 months). Again, lower thresholds of 17 mM and < 10 mM found by Chen et al. (2021b) (pH 6, 10g·L<sup>-1</sup> glucose) and B. Wang et al. (2008) (pH 7, glucose) were obtained with potentially insufficient buffering (48 mM NaHCO<sub>3</sub> as buffer with 10 g·L<sup>-1</sup> glucose again) and no buffering of the fermentation medium, respectively.

With regards to lactate, Noblecourt et al. (2018) found a lower inhibitory threshold of < 44 mM of L-lactate at pH 6. In contrast, T. H. Kim et al. (2012) found that lactate addition from 11 to 178 mM at pH 4.5 improved or did not affect the overall H<sub>2</sub> production. Finally, the 24h pre-treatment of the inoculum at pH 2 carried by T. H. Kim et al. (2012) selected acid-resistant strains, which would explain the high tolerance to lactic acid.



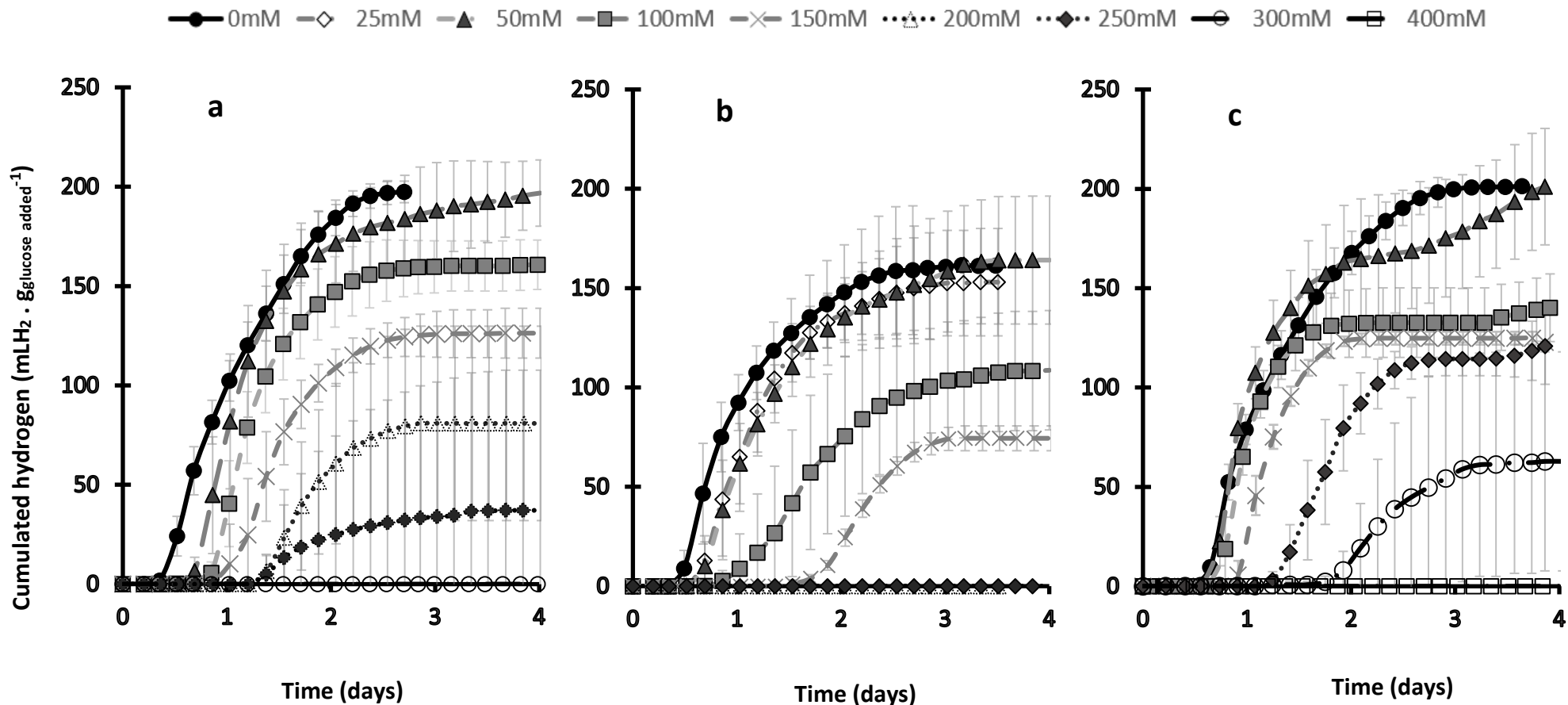


Figure 3-3 : Effects of acetate (a), butyrate (b) and lactate (c) on mean cumulative hydrogen production  $\pm$  standard deviation (mLH<sub>2</sub>·gglucose<sup>-1</sup>)

**Tableau 3-1 : Kinetic constants describing H<sub>2</sub> production: maximal H<sub>2</sub> production Hc (mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>), maximal H<sub>2</sub> production rate HPR (mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) and lag phase λ (days) at different concentrations of acetate, butyrate and lactate. The data are shown for the different groups of quadruplicates (mean values and standard deviation). NA: not applicable.**

Concentration of added acid (mM)	LACTATE			ACETATE			BUTYRATE		
	Hc (mL·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> )	HPR (mL·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> )	λ (days)	Hc (mL·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> )	HPR (mL·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> )	λ (days)	Hc (mL·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> )	HPR (mL·g <sub>glucose added</sub> <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> )	λ (days)
0	201 ± 7	279 ± 18	0.62 ± 0.03	197 ± 5	240 ± 50	0.42 ± 0.04	162 ± 30	278 ± 36	0.50 ± 0.1
25	/	/	/	/	/	/	153 ± 27	242 ± 29	0.70 ± 0.14
50	203 ± 30	412 ± 19	0.69 ± 0.02	197 ± 17	327 ± 50	0.74 ± 0.1	164 ± 32	223 ± 11	0.70 ± 0.12
100	141 ± 18	336 ± 18	0.73 ± 0.05	161 ± 12	297 ± 27	0.88 ± 0.08	109 ± 30	136 ± 43	1.28 ± 0.39
150	134 ± 22	243 ± 46	0.88 ± 0.23	126 ± 13	219 ± 18	1.09 ± 0.17	75 ± 6	92 ± 4	1.78 ± 0.04
200	/	/	/	81 ± 49	137 ± 89	1.42 ± 0.11	0 ± 0	0 ± 0	NA
250	123 ± 23	172 ± 16	1.37 ± 0.17	37 ± 71	57 ± 95	2.24 ± 1.37	0 ± 0	0 ± 0	NA
300	63 ± 55	92 ± 70	2.31 ± 0.56	0 ± 0	0 ± 0	NA	/	/	/
400	0 ± 0	0 ± 0	NA	/	/	/	/	/	/

Interestingly, comparing the different studies, inhibitory thresholds for H<sub>2</sub> production do not increase with an increase in pH. Also, in this study, inhibitory threshold for H<sub>2</sub> production were 50 mM for acetate, butyrate and lactate, although these acids present variable p<sub>ka</sub> (4.76, 4.82 and 3.86, resp.). This may be surprising as some authors have stated that the undissociated form of the acid was the main cause of inhibition of H<sub>2</sub> production (Chen et al., 2021b; S. Van Ginkel and Logan, 2005). However, in Chen et al. (2021b) and S. Van Ginkel and Logan (2005) studies, the coefficient of determination associated with the linear regression between H<sub>2</sub> yield and undissociated butyric acid concentration were quite low, achieving 0.54 and 0.04 (calculated from the data shown in the article). Furthermore, the inhibition thresholds found in the two studies were also different, reaching 6 mM (S. Van Ginkel and Logan, 2005) and less than 2 mM of undissociated butyric acid (Chen et al., 2021b). Considered as a whole, this suggests that considering undissociated acid concentrations alone is insufficient to explain inhibitions in mixed cultures. The extent of inhibition is probably also related to the different operational parameters applied and the microbial communities used as inoculum.

#### **Hydrogen production rate – HPR**

Inhibitory threshold values of HPR were estimated at 200 mM for acetate (ANOVA, p = 0.007), 50 mM for butyrate (ANOVA, p = 0.00223), and 250 mM for lactate (ANOVA, p = 0.00011). Thus, acetate, butyrate and lactate exhibit an inhibitory activity on H<sub>2</sub> production rate, which could be related either to metabolic disruption or to changes in microbial communities. In addition, this result highlights that butyrate showed the strongest inhibitory effect on HPR, and lactate the lowest.

In comparison, the threshold values for HPR inhibition for acetate and butyrate were lower at < 83 mM in Y. Wang et al. (2008) experiment and < 48 mM in Zheng and Yu (2005) experiment. The higher HPR inhibitory threshold reported in the present study could be interestingly attributed to the unstirred fermentation. Indeed, flocculation was observed and extracellular polymeric substances surrounding the cells in biofilms and flocs are known to protect them from toxic substance (Suresh et al., 2018). Thus, flocculation may have been associated with a higher resistance of bacteria to organic acids.

In addition, 50 mM of acetate induced a significant 36 % improvement of HPR (ANOVA, p = 0.0367). Similarly, Colin et al. (2001) observed that acetate addition up to 210 mM induced an increase in *Clostridium butyricum* growth rate. This effect and associated increase in the production of H<sub>2</sub> in presence of acetate was also observed by Heyndrickx et al. (1991) with *C. butyricum* and *Clostridium pasteurianum*. These authors suggested that acetate was used as an indirect proton and electron acceptor, stimulating substrate fermentation by providing intermediate acetyl-CoA.

Interestingly, 50 mM and 100 mM of lactate induced in this study significant improvements of the HPR of 48 % and 20 % compared to HPR without lactate (ANOVA, p =

0.00005 and 0.004 respectively). This result could be attributed to the simultaneous consumption of glucose and lactate to produce H<sub>2</sub>. Consistently, T. H. Kim et al. (2012) also reported HPR increase after lactate addition from 11 to 178 mM.

### **Lag phase – $\lambda$**

Inhibitory threshold of lag phase was < 50 mM for the three acids (ANOVA,  $p = 0.0003$ ,  $0.039$ ,  $0.0097$  for acetate, butyrate and lactate addition, respectively). Butyrate caused the highest lag phases, with a 3.5-fold increase from 0 to 250 mM, compared to a 2.6- and a 1.4-fold increase with the addition of 250 mM of acetate and lactate, respectively. Consistently, Siqueira and Reginatto (2015) found an inhibitory threshold value for lag phase of 42 mM of acetate and Y. Wang et al. (2008) reported a value lower than 83 mM. Concerning butyrate and lactate, inhibitory threshold of lag phase was estimated at 95 mM and 89 mM, respectively (T. H. Kim et al., 2012; Zheng and Yu, 2005). In conclusion, the present results are consistent with an inhibitory threshold of the lag phase below 100 mM in batch for acetate, butyrate and lactate.

#### *3.2.5.2. Hydrogen production rate inhibition modelling*

Inhibition thresholds indicate the concentrations at which acids have an effect on bacterial physiology. However, they do not provide information on the extent of the inhibitory effect as a function of acid concentration. To access this information, HPR modelling was performed according to Equation 3-2.

Results of the inhibition modelling from this study and from literature data in mixed cultures are presented in Tableau 3-2. Inhibition of HPR by 50 % (half maximal inhibitory concentration,  $K_c$ ) was achieved for 209 mM of acetate, 104 mM of butyrate and 273 mM of lactate. Again, butyrate shows the highest inhibitory impact, and acetate the lowest. Total inhibition of HPR and H<sub>2</sub> production was achieved at values named  $C_{max}$  shown in Tableau 3-2 (*i.e.*, at 300 mM of acetate, 200 mM of butyrate and 400 mM of lactate).

To the authors knowledge,  $K_c$  of 209 mM of acetate found in the present study is the highest value found in the literature for mixed cultures. Siqueira and Reginatto (2015), B. Wang et al. (2008) and Y. Wang et al. (2008) found  $K_c$  of 86, ~ 80 mM and 157 mM of acetate at pH 6, 7 and 5.5, respectively. Unfavourable pH conditions (Siqueira and Reginatto, 2015; B. Wang et al., 2008) and the use of sucrose as a substrate (Y. Wang et al., 2008), a sugar which requires hydrolytic activities for its degradation and therefore a more diverse microbial community than for glucose degradation, could explain the differences observed.

The higher inhibitory impact on HPR of butyrate with regards to acetate found in this study, is consistent with the study conducted by S. Van Ginkel and Logan (2005), Zhang et al., (2012). In contrast,  $K_c$  of 104 mM of butyrate was 2-fold lower than the  $K_c$  of ~ 225 mM estimated

from B. Wang et al. (2008). The latter is close to the  $K_c$  of 220 mM estimated from Zheng and Yu (2005), although initial pH varied, set at 6 and 7, respectively. Chen et al. (2021b) observed a lower  $K_c$  of 17 mM of butyrate at pH 6, but, again, pH may have been potentially insufficiently buffered (48 mM  $\text{NaHCO}_3$  with 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose). Somehow, the microbial community composition may affect resistance to organic acids, as suggested by Chen et al. (2021b) who investigated the impact of butyric acid in two studies; indeed, under the same operating conditions, a distinct inhibition of the  $\text{H}_2$  production is reported (Chen et al., 2021b; B. Wang et al., 2008). Regarding lactate, 44 mM of L-Lactate addition by Noblecourt et al. (2018) resulted in a reduction of 41 % of HPR, decreasing from 2.36  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  to 1.39  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Such effect of lactate is much more detrimental than the effect reported in the present study, as 250 mM of lactate was needed to lower the HPR by 39 %.

#### 3.2.5.3. *Glucose removal*

Glucose removal, an indicator of microbial activity, was calculated as a ratio of glucose consumed to initial glucose, in percentage, and presented in Figure 3-4-a. Without acid addition, glucose consumption was complete, as it reached  $100 \pm 0$  %.

Acetate concentrations from 50 to 250 mM did not influence glucose removal, which was only slightly affected at 300 mM ( $89 \pm 2$  %). This fact suggested that the global microbial activity was only slightly affected by acetate. In contrast, Y. Wang et al. (2008) reported a threshold value for the reduction of sucrose removal estimated at  $< 83$  mM acetate. B. Wang et al. (2008) found an inhibitory threshold of glucose removal at a concentration of acetate lower than 10 mM.

Regarding butyrate, a concentration of 100 mM was estimated as the threshold value for inhibition of glucose removal (ANOVA,  $p = 0.0233$ ). Above this concentration, a linear dose-dependent inhibition of glucose removal was observed, reaching  $16 \pm 3$  % at 250 mM. Consistently, Zhang et al. (2012) showed that in presence of 250 mM butyrate, glucose removal was only 18 % while it was still 76 % in the presence of 250 mM acetate.

**Tableau 3-2 : Inhibition parameters of maximum HPR by acids and associated initial pH of fermentation in this study and in the literature**

Inhibitor	Inoculum	HPR max	Kc (mM)	Cmax (mM)	n	Initial pH - Regulation	Reference
<b>Acetate</b>	Freeze-dried activated sludge	93 mL·h <sup>-1</sup>	209	300	7.56	6 – Buffered with 100mM MES	This study
	Sludge from UASB treating vinasse	8.7 ± 0.3 mL·h <sup>-1</sup>	86	167	/	6 - None	(Siqueira and Reginatto, 2015)
	Sludge from USAB treating citrate-producing wastewater	222 mL·gVSS <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	157	>833	1.52	5.5 - Regulated	(Y. Wang et al., 2008)
	<i>Clostridium bifermentans</i> , cultivated with 30g·L <sup>-1</sup> NaCl, isolated from anaerobic digester of WWTP	58 mL·L·h <sup>-1</sup>	/	502	0.52	7 - None	(Zhang et al., 2012)
	Anaerobic sludge adapted for cultivation at 70°C	~ 70 mL·L·h <sup>-1</sup>	/	>200	/	7, Buffered with 20 mM MOPS	(Liu et al., 2008)
	Anaerobic sludge	12.9 mL·h <sup>-1</sup>	~80	471	2.9	7 - 48mM NaHCO <sub>3</sub>	(B. Wang et al., 2008)
<b>Butyrate</b>	Freeze-dried activated sludge	100 mL·h <sup>-1</sup>	104	200	3.07	6– Buffered with 100mM MES	This study
	Anaerobic sludge from WWTP	61.5 mL·gVSS <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	220	291	0.34	6 – Buffered with 59 mM H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> and HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	(Zheng and Yu, 2005)
	Sludge from anaerobic digester	112 mLH <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	~225	306	0.6	7 - 48mM NaHCO <sub>3</sub>	(B. Wang et al., 2008)
	Sludge from anaerobic digester	42 mLH <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	~284	>284	/	7 - 48mM NaHCO <sub>3</sub>	(Chen et al., 2021b)
	<i>Clostridium bifermentans</i>	60.1mL·L·h <sup>-1</sup>	/	334	2.35	7	(Zhang et al., 2012)
	Sludge from anaerobic digester	27mLH <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	~17	~34	/	6 - 48mM NaHCO <sub>3</sub>	(Chen et al., 2021b)
<b>Lactate</b>	Freeze-dried activated sludge	102 mL·h <sup>-1</sup>	273	400	7.58	6 – Buffered with 100mM MES	This study
	Derived mix of thermophilic sludge and sludge from WWTP, enriched with <i>Clostridium cellulolyticum</i>	2360mL·h <sup>-1</sup>	~50	>50	/	6 - Regulated	(Noblecourt et al., 2018)

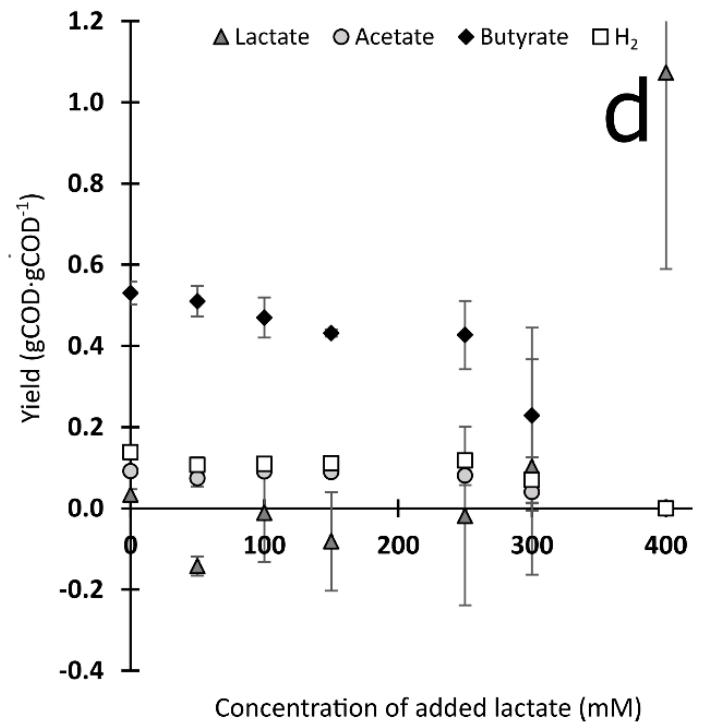
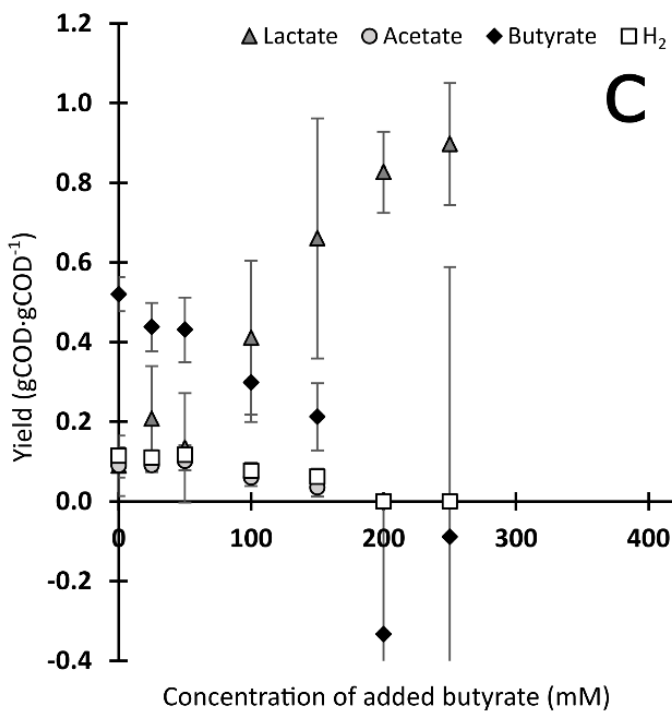
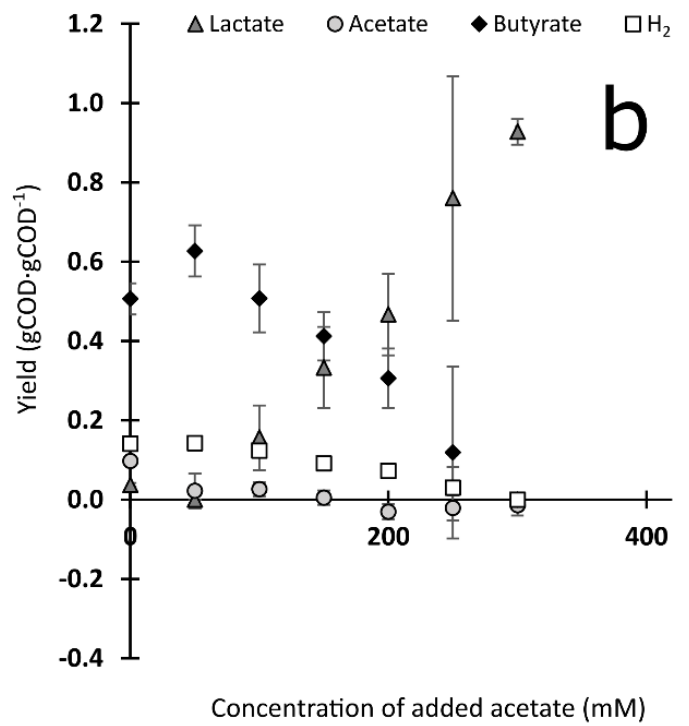
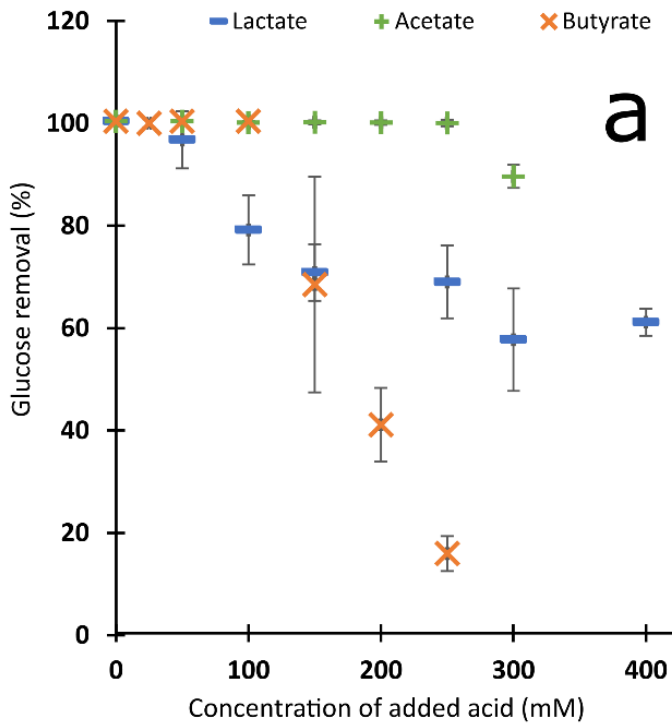
In contrast, Chen et al. (2021b) showed that at pH 6, the inhibitory threshold for glucose removal with butyrate was as low as 6 mM, but glucose removal was already low in control conditions, reaching ~ 45 %. B. Wang et al. (2008) also found a low inhibitory threshold for glucose removal at a concentration of butyrate < 10 mM, but the extent of the inhibition was far lower than in the present study, since more than 70 % of the substrate was still consumed in presence of 300 mM of butyrate. Conversely, Zheng and Yu (2005) assessed this threshold around 190 mM.

Finally, the threshold for glucose removal inhibition by lactate was 50 mM (ANOVA,  $p = 0.000747$ ), with  $79 \pm 6$  % at 100 mM and  $44 \pm 7$  % at 400 mM. Similarly, the addition of 222 mM lactate also reduced glucose degradation by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* from 85 % to 47.5 % (Oshiro et al., 2010). In comparison, T. H. Kim et al. (2012) did not find any effect of lactate on glucose removal up to 178 mM.

#### 3.2.5.4. Metabolic pathways

For each flask, a COD mass balance was performed at the end of the H<sub>2</sub> production phase, and varied between 94 and 115 %, with an average of  $100 \pm 5$  % or  $93 \pm 6$  % considering or not the estimated biomass, respectively (Annexe 2). These results clearly show that all major metabolites were considered in the analysis.

Considering the concentrations of acetate, butyrate and lactate at the end of the experiment, it was observed that a partial consumption of the added acids occurred during the fermentation. It was not surprising to observe lactate (García-Depraect et al., 2021b) and acetate (Colin et al., 2001; Siqueira and Reginatto, 2015) consumption, but the decrease in butyrate concentration was more surprising, although Chen et al. (2021b) also observed it. Metabolic pathways were investigated taking into account the consumption of glucose and of the exogenously added acid and calculating yields in  $\text{gCOD}\cdot\text{gCOD}^{-1}$  (Figure 3-4 b - d). Without acid addition (*i.e.*, glucose is the only source of substrate), H<sub>2</sub> yield reached  $0.13 \pm 0.02$   $\text{gCOD}\cdot\text{gCOD}^{-1}$  ( $1.6 \pm 0.2$   $\text{mol}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) and acetate and butyrate were the major products, with  $0.09 \pm 0.02$   $\text{gCOD}\cdot\text{gCOD}^{-1}$  ( $14 \pm 3$  mM,  $0.28 \pm 0.05$   $\text{mol}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) and  $0.52 \pm 0.04$   $\text{gCOD}\cdot\text{gCOD}^{-1}$  ( $30 \pm 3$  mM,  $0.59 \pm 0.06$   $\text{mol}\cdot\text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ), respectively. Other metabolites were notably produced but in smaller quantities: lactate, formate, propionate, succinate and butanol.



**Figure 3-4 : Effects of acetate, butyrate and lactate on metabolic activity. (a) mean glucose removal (%)  $\pm$  standard deviation. Mean yields of products  $\pm$  standard deviation as a function of acetate (b), butyrate (c) and lactate (d) concentrations. Yields were calculated in COD of products (H<sub>2</sub>, acetate, butyrate and lactate) per COD of consumed glucose and consumed exogenous added acid (viz. glucose + acetate consumed, glucose + butyrate consumed and glucose + lactate consumed for (b), (c) and (d) respectively).**



Metabolic pathways were greatly influenced by acid addition. A same trend was observed for increasing addition of acetate and butyrate, with a progressive decline of acetate and butyrate pathways in favour of lactate pathway, associated with a decrease in H<sub>2</sub> yield. Ultimately, for the three acids, increasing concentration resulted in a total shift from acetate/butyrate to lactate fermentation, *i.e.*, at 300 mM of acetate, 200 mM of butyrate and 400 mM of lactate, which coincides with the previously reported concentration associated with a total inhibition of H<sub>2</sub> production in this study.

Acetate addition induced a specific decrease of acetate production pathway. Indeed, butyrate-to-acetate (B/A, mol/mol) ratio was 2.1 without acid addition, and increased up to 31 at 100 mM. Above 100 mM acetate, no more acetate was produced. This specific inhibition of acetate pathway and its consumption was already observed elsewhere (Colin et al., 2001; Siqueira and Reginatto, 2015; B. Wang et al., 2008). Such total inhibition of the acetate pathway (Figure 3-4 - b) was not linked with a total inhibition of the butyrate pathway.

Butyrate addition caused a reduction of the butyrate pathway, but less selective as B/A decreased from 2.2 to 1.5 at 150 mM butyrate. Above 150 mM butyrate, no more butyrate was produced. Interestingly, when butyrate pathway was totally inhibited, acetate pathway was also totally suppressed. This observation is consistent with the idea supported by S. Van Ginkel and Logan (2005) suggesting that the reduction of butyrate pathway is more deleterious for the cell due to the reduction of NAD<sup>+</sup> regenerating pathways. Indeed, butyrate production allows the regeneration of NAD<sup>+</sup> through Crotonyl coA reduction, Acetoacetyl coA reduction and H<sub>2</sub> production while acetate production allow this regeneration only through H<sub>2</sub> producing pathways. To ensure adequate regeneration of NAD<sup>+</sup> when butyrate pathway is thermodynamically restricted due to an excess of butyrate, electrons are likely redirected towards the production of solvent, lactate or propionate (S. Van Ginkel and Logan, 2005). Some of the lactate observed in presence of acids could be produced through this mechanism.

Conversely, lactate from 0 to 250 had a low impact on metabolic spectrum as it reduced only slightly the butyrate yield from  $0.53 \pm 0.03$  gCOD·gCOD<sup>-1</sup> to  $0.43 \pm 0.08$  gCOD·gCOD<sup>-1</sup> and the H<sub>2</sub> yield from  $0.14 \pm 0$  gCOD·gCOD<sup>-1</sup> to  $0.12 \pm 0.0$  gCOD·gCOD<sup>-1</sup>. However, above 250 mM of lactate, H<sub>2</sub>, butyrate and acetate yield decreased as lactate yield increased, as for acetate and butyrate addition.

In addition, endogenous lactate production and lactate yields at 200 mM of acetate and 100 mM of butyrate, *i.e.* at concentrations close to the K<sub>c</sub> of 209 mM of acetate and 104 mM of butyrate, were  $50 \pm 12$  mM,  $0.47 \pm 0.1$  gCOD·gCOD<sup>-1</sup> and  $42 \pm 20$  mM,  $0.41 \pm 0.19$  gCOD·gCOD<sup>-1</sup>, respectively. In other words, 50 % inhibition of HPR in presence of acetate and butyrate was associated with a similar lactate production induction.

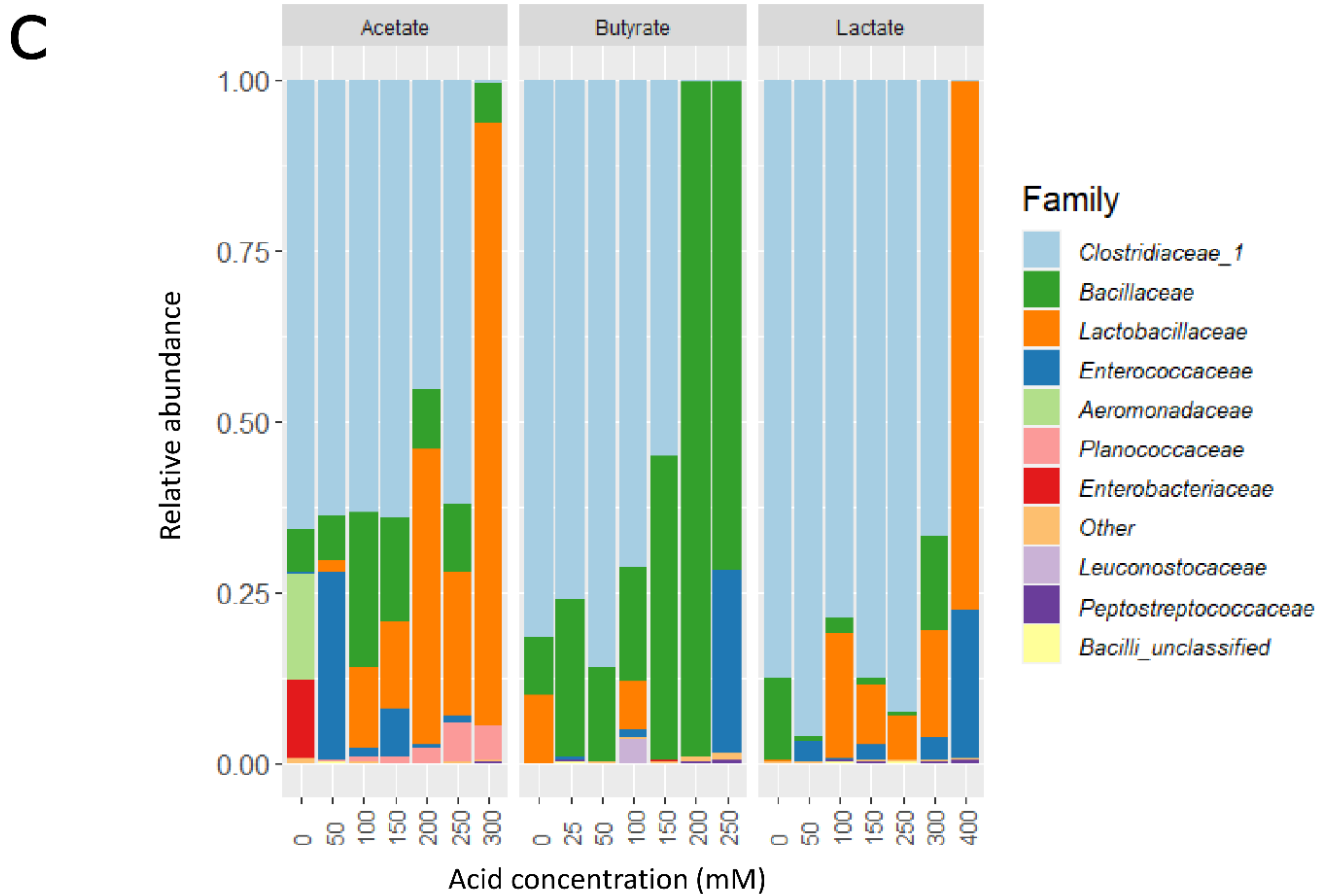
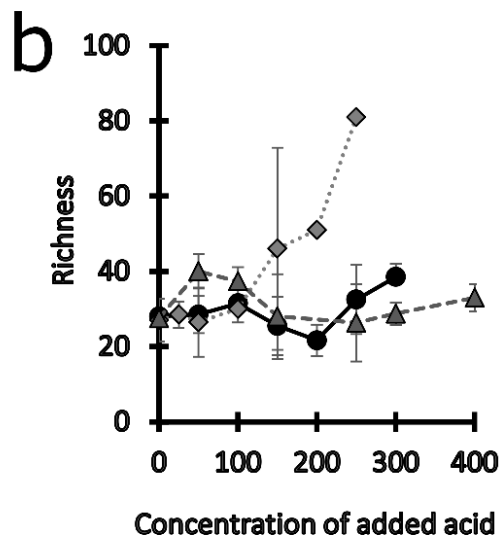
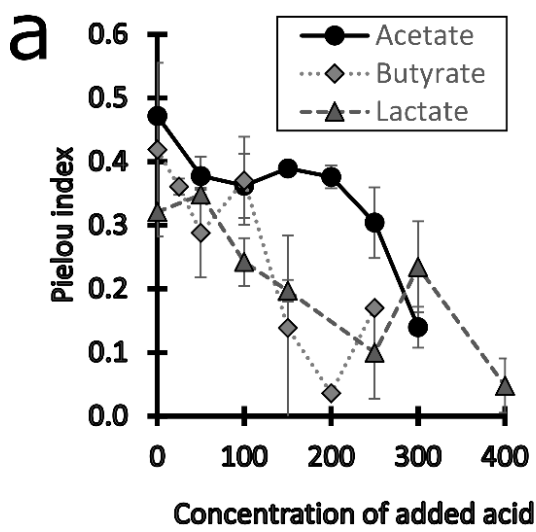
In conclusion, metabolic pathways were significantly affected by the addition of organic acids, and the inhibition was strongly related to the nature and concentration of the added acid. This result shows that inhibition by organic acids in mixed culture cannot be explained

solely by undissociated acid concentrations. Analyses of bacterial communities was then performed to distinguish cellular metabolic pathways alteration and microbial communities alteration caused by organic acids, which is currently poorly understood.

#### 3.2.5.5. *Bacterial communities*

2714 OTUs were identified in all the experiments and grouped in 33 phyla, 70 classes, 153 orders, 310 families and 657 genera. Only three classes showed a relative abundance higher than 1 %: Clostridia, Bacillii and Gammaproteobacteria. Among them, 12 genera showed a relative abundance higher than 1 % and only 9 genera showed a relative abundance higher than 10 %. After rarefaction, 477 OTUs were kept, grouped in 12 phyla, 28 classes, 63 orders, 127 family and 198 genera.

Acid concentration had a significant negative effect on sample evenness (Kruskal Wallis,  $p = 0.002$  for pielou index) and an insignificant effect on sample richness ( $32 \pm 11$  species considering all samples, Kruskal Wallis,  $p = 0.27$ ) (Figure 3-5). This result means that acid addition did not reduce the number of species in the microbial community, but favoured an uneven growth of the species present. In comparison Chen et al. (2021b) found that inhibition of  $H_2$  production by butyrate was associated with an increase in microbial diversity but a decrease in richness. These differences can be explained by the higher richness in Chen et al. (2021b) experiments, which they estimated with the Chao1 index to be  $132 \pm 28$  in the control conditions, whereas we estimate Chao1 to be  $32 \pm 5$  in the control experiments of this study. The lower richness in the present study might be due to the combination of inoculum storage process (freeze-drying and storage at  $-80$  °C) and of the pretreatment (15 min at  $90$  °C) carried, while Chen et al. (2021a) only performed a 15 min pretreatment at  $100$  °C.



**Figure 3-5 : Bacterial community analysis. Effects of acetate, butyrate and lactate on pielou (a) and richness (b) indexes. Mean relative abundance of bacteria at family level depending on the concentration of added acetate, butyrate and lactate (c).**

Microbial diversity at family level is presented in Figure 3-5-c, depending on the nature and the concentration of added acid. With no acid addition, *Clostridiaceae* family represented  $78 \pm 11$  % of the microbial community. This is consistent with high abundances of the Firmicutes phylum and *Clostridiaceae* family in high-yielding H<sub>2</sub> producing reactor as reported by Etchebehere et al. (2016). In addition to the strong dominance of *Clostridiaceae* family, bacteria from the *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae* and *Aeromonadaceae* families are also emerging in a variable extent, from 4 to 13 %, 0 to 17 % and 0 to 19 %, respectively. Such variability in minor OTUs is not unusual in mixed culture (Poirier et al., 2020) and is not associated in this study with significant differences in metabolic products.

At a concentration at which a total inhibition of H<sub>2</sub> production was observed, i.e., 300 mM, 200 mM and 400 mM for acetate, butyrate and lactate addition respectively, the microbial community analysis revealed a drastic shift in families relative abundances. 300 mM of acetate resulted in  $87 \pm 3$  % *Lactobacillaceae*. 200 mM of butyrate led to 98 % *Bacillaceae* while 250 mM of butyrate led to 71 % *Bacillaceae* and 27 % *Enterococcaceae*. 400 mM of lactate induced the selection of  $98.9 \pm 0.1$  % *Lactobacillaceae* in 3 flasks and the growth of 89 % *Enterococcaceae* in one flask.

Below C<sub>max</sub>, trends at family level are not fully clear, as *Clostridiaceae* accounted in average for more than 50 % of the bacterial community, in all conditions excepted at 200 mM of acetate. Therefore, the impact of acid addition was investigated at genus level (Tableau 3-3). Addition of acetate, butyrate or lactate below C<sub>max</sub> inhibited *Clostridium\_sensu\_stricto\_11* abundance (OTU 4, *Clostridium neuense* / *acetobutylicum* / *hydrogeniproducens*, 99.5 % identity), as it decreased from  $29 \pm 8$  % in control conditions to  $2 \pm 3$  %. Also, *Bacillus* sp. abundance (OTU 10, *Bacillus thuringiensis* 99.3% identity) was inhibited by the addition of acetate, butyrate or lactate as it decreased from  $8 \pm 4$  % to 0 % below C<sub>max</sub>. In contrast, *Rumeliibacillus* (OTU 12, *Rummeliibacillus pycnus* 99.8 % identity) abundance increased as acetate concentration increased, from 0 % to 8 % below C<sub>max</sub>. Interestingly, acetate, butyrate and lactate addition did not inhibit the emergence of *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* (OTU 1, *C. butyricum*, 98.5 % identity) as its abundance reached  $45 \pm 8$  % in control conditions and varied between 0.1 % and 83.4 % at 250 mM of acetate, 150 mM of butyrate and 300 mM of lactate. Acid addition could even favour the abundance of *C. butyricum* as it reached 57 % for 150 mM of acetate, 66 % for 50 mM of butyrate and 91 % for 250 mM of lactate. *Bacillus* sp. and *Lactobacillus* sp. were favoured in presence of high concentration of acids and were identified as *Weizmannia coagulans* (100 % identity) and *Lactobacillus plantarum* (97.9 % identity), respectively.

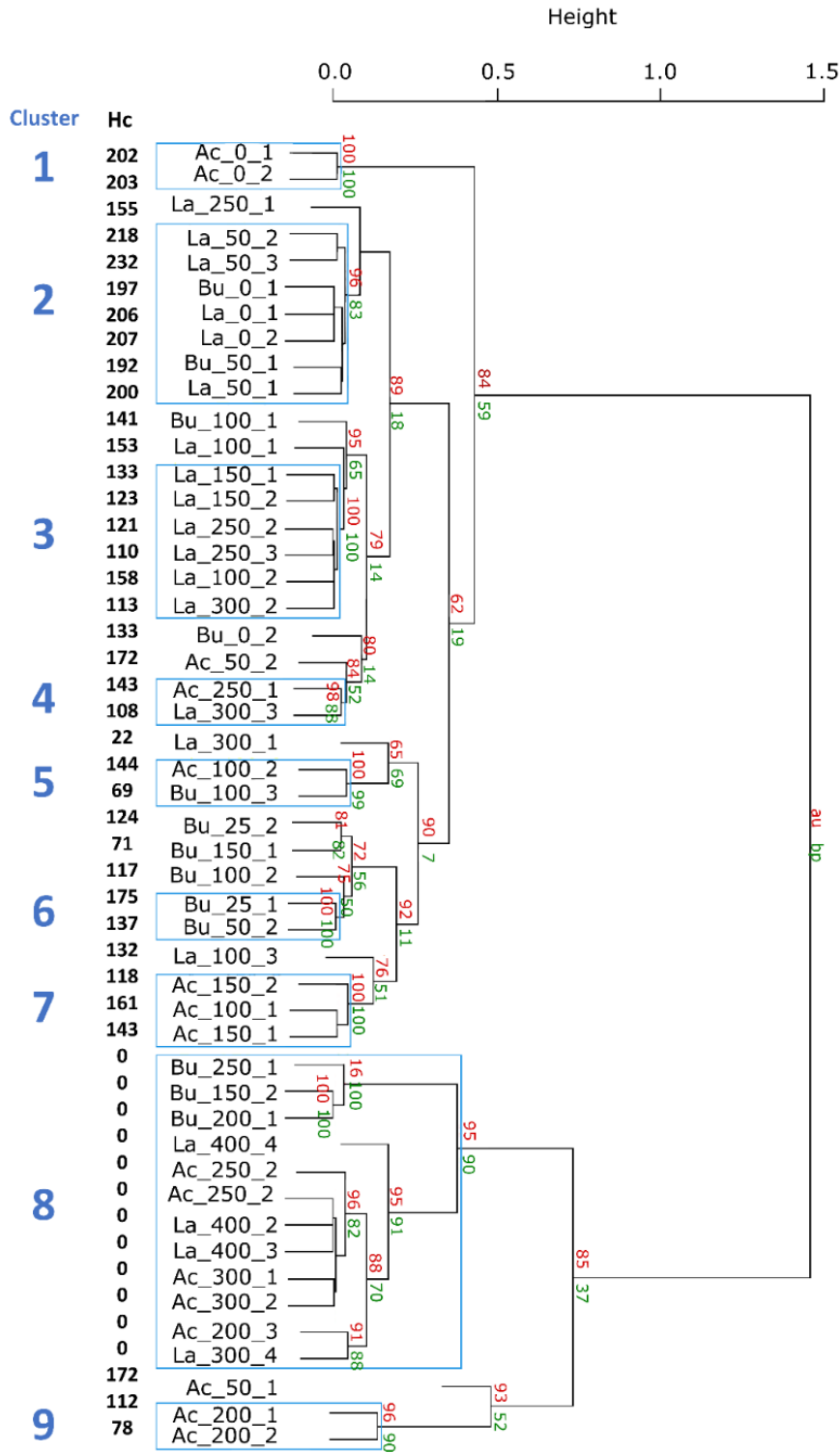
From these results, it was hypothesised that the diminution in abundance of *Clostridium* sp. (OTU 4) and the emergence of *L. plantarum* and *W. coagulans* were responsible for the diminution of the H<sub>2</sub> yield at concentrations below C<sub>max</sub>. Globally, the increased abundance of *C. butyricum* below C<sub>max</sub>, did not permit to maintain H<sub>2</sub> yield although the abundance in *Clostridiaceae* was stable.

**Tableau 3-3 : Relative abundance of bacteria at genus or species level (%) of most represented OTUs depending on the concentration of acetate, butyrate and lactate. For each condition, all replicates for which a microbial community analysis was conducted are presented and separated by a vertical line.**

Concentration of added acid (mM)	<i>Clostridium butyricum</i> (%)	<i>Clostridium</i> sp. (OTU 4) (%)	<i>Clostridium</i> sp. (%)	<i>Weizmannia coagulans</i> (%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (%)	<i>Enterococcus hirae</i> (%)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (%)	<i>Rummeliibacillus pycnus</i> (%)	Others (%)	
<b>Acetate</b>	0	35 43	29 22	65 66	1 1	0 0	0 0	3 7	0 0	32 26
	50	39 59	7 9	49 73	0 11	0 3	49 12	0 0	0 0	2 1
	100	49 63	7 4	58 67	29 17	9 14	3 0	0 0	1 1	1 1
	150	52 61	12 1	65 63	19 12	14 12	0 12	0 0	1 1	1 0
	200	51 11 41	1 2 0	52 29 42	10 8 8	35 60 48	0 0 1	0 0 0	3 2 2	0 0 0
	250	68 0	8 1	76 1	8 20	10 67	1 0	0 0	5 11	0 1
	300	0 0	0 0	1 0	5 7	91 84	0 0	0 0	3 8	1 1
<b>Butyrate</b>	0	37 53	17 35	74 88	4 1	17 0	0 0	4 9	0 0	0 2
	25	53 55	23 2	77 72	21 24	0 0	1 0	0 1	0 0	1 2
	50	61 71	14 21	76 92	23 6	0 0	0 0	0 0	0 0	1 2
	100	70 40 56	16 3 19	86 53 75	1 35 13	6 8 5	1 3 0	0 0 0	0 0 0	5 1 6
	150	0 65	0 3	0 69	98 31	0 0	0 0	0 0	0 0	2 0
	200	0	0	0	98	0	0	0	0	1
	250	0	0	0	71	0	27	0	0	2
<b>Lactate</b>	0	54 48	32 40	86 88	0 0	0 0	0 0	13 11	0 0	1 1
	50	38 52 55	29 28 25	97 95 89	0 0 0	0 0 0	0 2 10	0 1 1	0 0 0	2 2 1
	100	77 77 61	3 0 6	84 78 67	0 0 0	14 18 29	0 0 0	1 3 2	0 0 0	1 1 2
	150	84 84	3 0	89 86	0 0	9 8	0 4	1 1	0 0	0 1
	250	86 86 99	0 0 0	87 86 99	1 1 0	12 13 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 0
	300	0 18 83 78	0 0 0 0	68 19 83 79	31 27 1 7	0 54 15 4	0 0 0 9	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 1 0
	400	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	99 99 9 99	0 0 89 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 1 1 1

Interestingly, H<sub>2</sub> yield reached 0.11 gCOD·gCOD<sup>-1</sup> when the community was composed of 53 % *C. butyricum* and 26 % *Clostridium* sp. (OTU 4) (at 50 mM of lactate) and when the community was composed of 84 % *C. butyricum* and 1 % *Clostridium* sp. (OTU 4) (at 150 mM of lactate). This suggests that, in some cases, similar H<sub>2</sub> yield can be reached with *C. butyricum*, without *Clostridium* sp. (OTU 4) and with *Clostridium* sp. (OTU 4). In addition, 25 mM of butyrate resulted in the selection of 21 % *W. coagulans* and 53 % *C. butyricum* with a lactate yield of 0.07 gCOD·gCOD<sup>-1</sup> (producing 7 mM of lactate), while at 100 mM of butyrate, 13 % *W. coagulans*, 5 % *L. plantarum* and 55 % *C. butyricum* with a lactate yield of 0.44 gCOD·gCOD<sup>-1</sup> (producing 44 mM of lactate) was observed. As it is hardly possible that 5 % *L. plantarum* would be responsible for the 6-fold improvement in lactate concentration and yield, this result suggests that some lactate was produced by *C. butyricum*. Considered all together, these results suggest that *C. butyricum* shifted its metabolism from acetate/butyrate pathway to lactate pathway in presence of acids. The comparison of spearman correlation coefficient between H<sub>2</sub> yield and *Clostridium* sp. (OTU 4) abundance ( $\rho = 0.59$ , p-value =  $6.53 \times 10^{-5}$ ) on one hand and between H<sub>2</sub> yield and *C. butyricum* abundance ( $\rho = 0.16$ , p-value = 0.32) in another hand reinforced this hypothesis. This metabolic shift could be explained by the perturbation of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio after acid addition (Srikanth and Venkata Mohan, 2014). This hypothesis is consistent with the findings of Payot et al. (1999), who showed that *Clostridium cellulolyticum* shifted its metabolism from acetate-butyrate pathways to lactate in case of accumulation of intracellular NADH.

To decipher the impact of acid addition at populational or metabolic levels, bacterial communities of each sample were compared qualitatively (*i.e.* considering which species grew) and quantitatively (*i.e.* at what relative abundance). This beta diversity analysis was performed by calculating the distance between microbial communities at genus level in pairs (UniFrac distance metric) and then by applying a hierarchical clustering method to the distance matrix (Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA). The result is presented as a dendrogram in Figure 3-6. Nine clusters were distinguished and bootstrapping (n=10,000) revealed that these clusters were strongly supported by the data (approximately unbiased probability value > 95 %). In this figure, the distance between two microbial communities is represented by the height of the dendrogram.



**Figure 3-6 : Bootstrapped dendrogram of Beta-diversity. Bootstrap probability value (BP) and approximately unbiased probability values (AU) appear in green and red respectively above each node. Clusters associated with an AU > 95 % circled in blue and numbered from 1 to 9. The maximal volume of cumulated H<sub>2</sub> per gram of glucose added (H<sub>c</sub>, mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>) measured in each condition are presented. For each sample, the added acid is abbreviated as “La”, “Bu” and “Ac” for lactate, butyrate and acetate respectively. The initial concentration of the added acid is indicated between two underscores. The end number, from 1 to 4, is used to distinguish the replicates.**

All conditions for which no H<sub>2</sub> production was observed are grouped in the cluster 8. This cluster 8 is subdivided in two clusters, with samples associated to butyrate addition on one side, and samples associated to acetate or lactate addition on the other side. This observation is consistent with the observations of populational shifts above C<sub>max</sub>. In addition, samples with no acid addition or in presence of 50 mM butyrate and 50 mM lactate were grouped in cluster 2. The operating conditions of the communities grouped in this cluster are those associated with the highest H<sub>2</sub> production performances, with  $207 \pm 13 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1} \text{ added}$ . Thus, for the extreme conditions of high H<sub>2</sub> production and total inhibition of H<sub>2</sub> production, the performances were clearly associated to populational shifts with clear and selection of distinct microbial communities.

Interestingly, almost all samples with an exogenous addition of lactate at 100 to 300 mM and with H<sub>2</sub> production between  $110 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{glucose added}}^{-1}$  and  $158 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{glucose added}}^{-1}$  ( $0.09 - 0.12 \text{ gCOD}_{\text{H}_2} \cdot \text{gCOD}^{-1}$ ) are grouped in cluster 3, with a low height between each sample ( $< 0.1$ ). Therefore, it was concluded that the inhibition of H<sub>2</sub> production by adding lactate from 100 mM to 300 mM was mostly related with substrate degradation than population changes. In addition, clusters 4, 5 and 7 do not group samples sharing a similar metabolic activity. For example, cluster 5 groups two samples in presence of 100 mM of acetate and butyrate, although H<sub>2</sub> and lactate yields vary from 0.05 to 0.12  $\text{gCOD} \cdot \text{gCOD}^{-1}$  ( $118$  to  $161 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{glucose added}}^{-1}$ ) and from 0.23 to 0.37  $\text{gCOD} \cdot \text{gCOD}^{-1}$ , resp. within these conditions. Thus, the differences in H<sub>2</sub> production within these conditions are more probably due to changes in metabolic pathways than changes in populations. These results support the conclusion that below C<sub>max</sub>, a combination of metabolic shifts and populational changes explained the observed reduction in H<sub>2</sub> yield, and that in some cases, metabolic shifts may be predominant.

Inhibition by organic acids is one of the main causes of low H<sub>2</sub> production during DF in mixed cultures (Chen et al., 2021a) and a deeper understanding of the mechanisms behind these inhibitions will contribute to select appropriate solutions to relieve this inhibition. Indeed, inhibition associated with metabolic shifts within a bacterial community could be addressed with acid tolerance response induction (Huang et al., 2012) or with organic acids extractions.

However, the latter, although often chosen, can be a major source of process failure due to the formation of cake layer or fouling and increase the energy and financial input (Tharani and Ananthasubramanian, 2021). Alternatively, inhibition associated with a populational shift could be mitigated at a lower cost and more easily through operational parameters modification (pH, temperature, organic loading rate) to disfavour the undesirable bacteria or with bioaugmentation with H<sub>2</sub>-producing strains. Thus, the present study highlights that above 250 mM of acetate, 150 mM of butyrate and 300 mM of lactate, the strategies implemented to alleviate inhibition must address the finding that populational change is the main factor responsible for a decrease in H<sub>2</sub> production.



### 3.2.6. Conclusions

In this study, the initial addition of acetate, butyrate and lactate in DF was investigated. A significant reduction on H<sub>2</sub> production was shown. Butyrate and lactate affected glucose removal, whereas 100 % glucose degradation efficiency was observed at high acetate concentration of 250 mM. For all acids, significant diminution of bacterial diversity was observed when increasing the concentration. 300 mM of acetate, 200 mM of butyrate and 400 mM of lactate resulted in total community shift through the reduction of *Clostridiaceae* abundance in favour of *Lactobacillaceae* and *Bacillaceae*. Below these concentrations, combination of metabolic and populational changes were probably responsible of the decrease in H<sub>2</sub> production performances. More specifically, *C. butyricum* was suspected to shift its metabolism towards lactate production. Overall, this work shows that both the nature and the concentration of the inhibitors should be considered, as well as the microbial communities involved in the process. These new insights on the mechanisms of inhibition by end-products in mixed culture can be useful to efficiently select strategies for overcoming inhibition.

### 3.2.7. Acknowledgements

The research was supported by the PROBHYM project (n° ANR-18-CE43-0012-01) financed by National Research Agency (ANR) in France. The authors are very grateful for the biomolecular analysis performed by Gaëlle Santa-Catalina and to José Antonio Magdalena for his review and kind advices.

### 3.2.8. Résultats complémentaires

#### 3.2.8.1. Croissance bactérienne en fonction du stress appliqué

L'analyse des communautés microbiennes en abondance relative présentée précédemment (Figure 3-5) ne permet pas d'accéder à la croissance microbienne globale ou à la croissance des OTUs identifiés, mais seulement à leur abondance parmi l'ensemble des OTUs. Ainsi, dans un second temps, et pour accéder à la croissance des OTUs, une quantification du nombre de cellules bactériennes a été nécessaire. La concentration en copies 16S par volume de milieu de culture (C16S) a été mesurée par PCRq sur un ensemble d'échantillons dont l'ADN extrait a été séquencé.

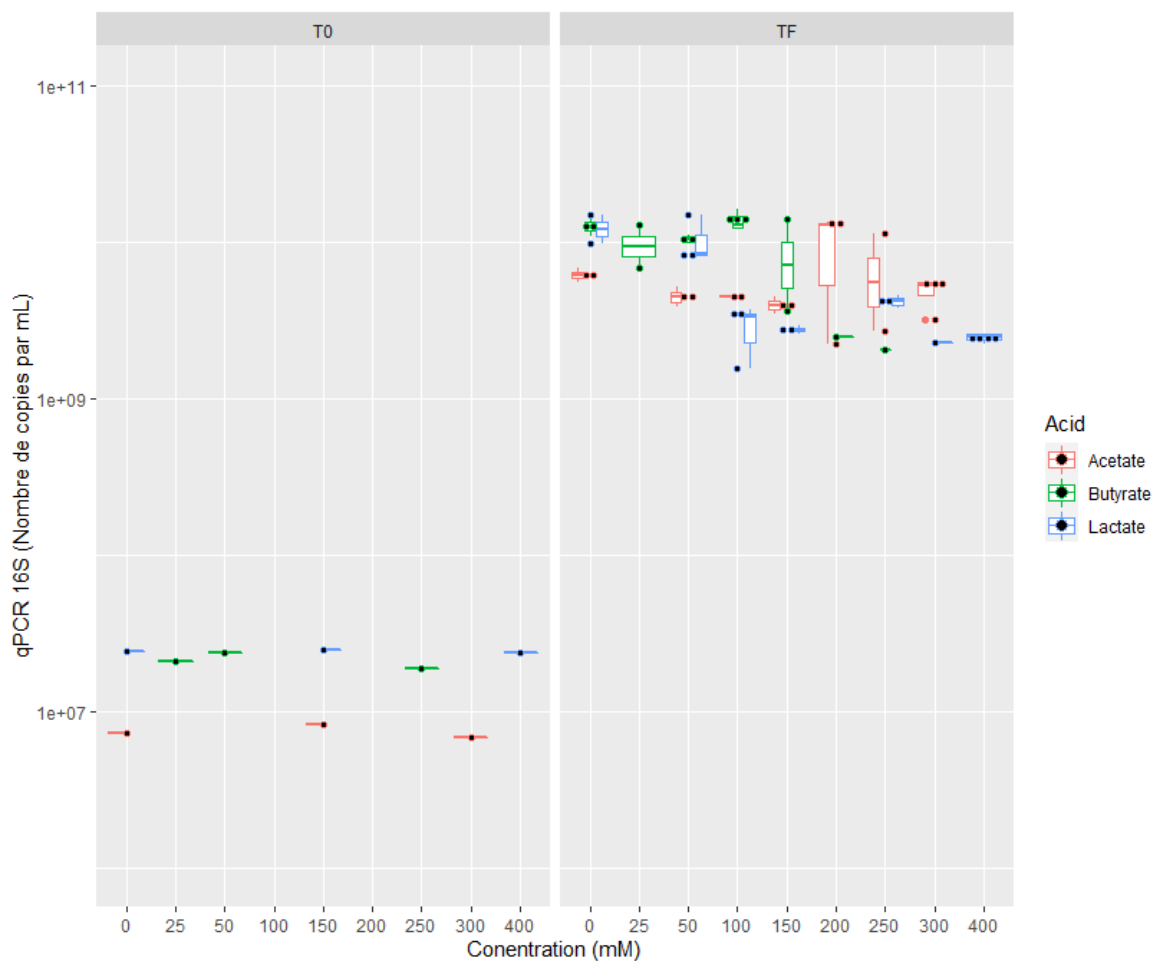
La Figure 3-7 présente le facteur C16S en échelle logarithmique (nombre de copies·mL<sup>-1</sup>) en fonction de l'acide ajouté, de la concentration en acide et du temps de fermentation (« T0 » correspond au début de la fermentation et « TF » à quatre jours de fermentation). Au début de l'expérience avec ajout d'acétate (Figure 3-7, à T0), C16S était en moyenne de  $7 \cdot 10^6 \pm 10^5$  copies·mL<sup>-1</sup>), soit trois fois moins que C16S au début des expériences réalisées avec un ajout de lactate ou de butyrate ( $2 \cdot 10^7 \pm 10^6$  copies·mL<sup>-1</sup>), alors que la même quantité d'inoculum a été initialement introduite. Les extractions d'ADN des trois expériences (ajout d'acétate, de butyrate et de lactate) ayant été effectuées à des moments différents, un biais de l'extraction d'ADN sur les échantillons de l'expérience avec un ajout d'acétate pourrait expliquer cette différence. Pour cette raison, ces mesures n'ont pas été prises en compte lors de la comparaison des effets des acides ajoutés en partie 3.2.1.5.5. Néanmoins, les expériences peuvent être considérées indépendamment.

Ainsi, et globalement, aucune concentration en acide n'a entraîné une inhibition totale de la croissance bactérienne. Par exemple, parmi les valeurs de C16S les plus faibles mesurées à TF, le facteur C16S a augmenté de  $2 \cdot 10^7$  à  $2 \cdot 10^9$  copies·mL<sup>-1</sup> à 250 mM de butyrate.

L'ajout d'acétate de 50 mM à 300 mM n'a pas eu d'impact significatif sur C16S, qui a varié de  $2 \cdot 10^9$  à  $1 \cdot 10^{10}$  copies·mL<sup>-1</sup> à TF (p-value = 0,577, ANOVA). Ce résultat est cohérent avec le faible effet de l'acétate sur la dégradation du substrat et confirme que son ajout affecte peu la croissance bactérienne.

L'ajout de butyrate de 25 à 250 mM n'a pas non plus induit une diminution significative du C16S à TF (p-value = 0,106, ANOVA), qui varie de  $2 \cdot 10^9$  à  $2 \cdot 10^{10}$  copies·mL<sup>-1</sup>. Néanmoins, les valeurs de C16S les plus faibles sont celles mesurées à 200 et 250 mM de butyrate, et sont 6 fois moins élevées que les C16S en conditions non inhibitrices (0 à 100 mM de butyrate, 9 échantillons,  $10^{10} \pm 0,3 \cdot 10^{10}$  copies·mL<sup>-1</sup>). Cette absence d'effet significatif de la concentration en butyrate sur le C16S malgré son effet significatif sur la consommation du glucose peut être liée au faible nombre de mesures de C16S aux concentrations élevées (une à 200 mM et une à 250 mM).

La concentration en lactate a induit une diminution dose-dépendante significative du facteur C16S (p-value = 0,001, ANOVA), de  $10^{10} \pm 0,3 \cdot 10^{10}$  copies·mL<sup>-1</sup> à TF en conditions non inhibitrices de la consommation du glucose (0 – 50 mM, cinq échantillons) à  $2 \cdot 10^9 \pm 10^8$  copies·mL<sup>-1</sup> à 400 mM, soit cinq fois moins. L'application d'un test de Tukey montre que des différences significatives ont été retrouvées entre le facteur C16S sans lactate et à toute concentration supérieure à 50 mM (p-value entre 0,004 et 0,04, ANOVA) et entre le facteur C16S à 50 mM de lactate et à 100, 150 et 400 mM de lactate (p-value = 0,02 ; 0,03 et 0,008, resp.). Ces résultats sont cohérents avec la réduction significative de la dégradation du glucose en présence de lactate au-delà de 50 mM et confirme que la concentration en lactate affecte de façon dose-dépendante la croissance bactérienne.



**Figure 3-7 : Concentration en copies 16S en fonction de la concentration en acide ajouté, pour les trois acides ajoutés, au début de la fermentation (T0) et à quatre jours de fermentation (TF).**

En calculant la concentration cellulaire à partir de ces PCRq, de l'abondance relative des quinze OTUs majoritaires (représentant en moyenne  $98 \pm 3$  % de l'abondance bactérienne) et du nombre de copies 16S par génome pour ces quinze OTUs (voir méthodologie en partie 2.8.2), les mêmes conclusions ont été tirées (données non présentées). En conclusion, aucune

des concentrations en acide ajouté n'a induit une inhibition totale de la croissance bactérienne, l'ajout d'acétate jusqu'à 300 mM n'a pas altéré la croissance bactérienne globale, tandis que l'ajout de lactate l'a diminuée de façon dose dépendante et significative dès 100 mM. Une concentration en butyrate supérieure à 150 mM tend également à diminuer la croissance cellulaire globale.

De plus, l'analyse de la bêta-diversité précédemment présentée (Figure 3-6) a permis de conclure que la composition de la communauté microbienne à TF variait distinctement entre les fermentations sans acide ajouté et celles à fortes concentration en acide ajoutée. Aux concentrations intermédiaires en acide, l'analyse a montré que la composition de la communauté microbienne était semblable à la communauté microbienne en absence d'acide (hauteur du dendrogramme  $\leq 0,4$ ), tout en s'en distinguant puisque différents clusters ont pu être identifiés. Des changements populationnels, moins drastiques qu'à concentration inhibant totalement la production d' $H_2$ , ont donc eu lieu. De plus, certains clusters, *i.e* des communautés microbiennes semblables, regroupent des fermentations possédant des rendements métaboliques différents, suggérant que les microorganismes les constituant ont eu des métabolismes variables. Afin de caractériser plus clairement les changements populationnels aux concentrations intermédiaires en acide, les concentrations cellulaires des quatre OTUs majoritaires, représentant  $85 \pm 19$  % de l'abondance en fin de fermentation toutes conditions confondues (*C. butyricum*, *L. plantarum*, *W. coagulans* et *Clostridium sp.* (OTU 4)) ont été calculés. La Figure 3-8-b, c, d présente leurs concentrations cellulaires après quatre jours de fermentation (TF) en fonction de l'acide ajouté et de sa concentration. Les concentrations cellulaires à T0 (9 échantillons) sont présentées en Figure 3-8-a.

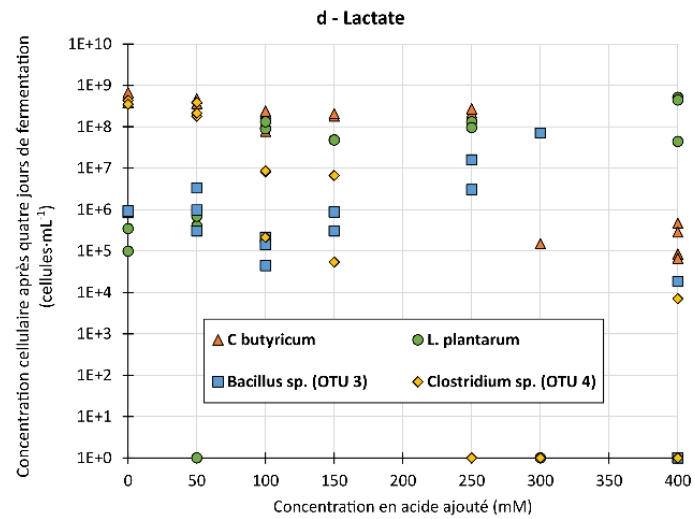
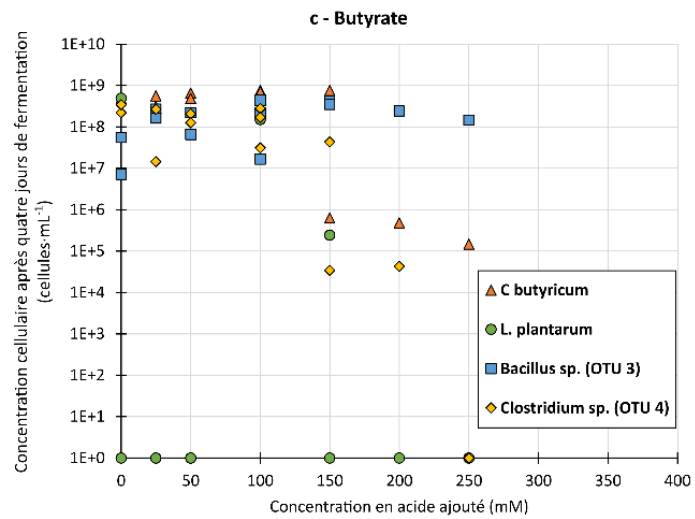
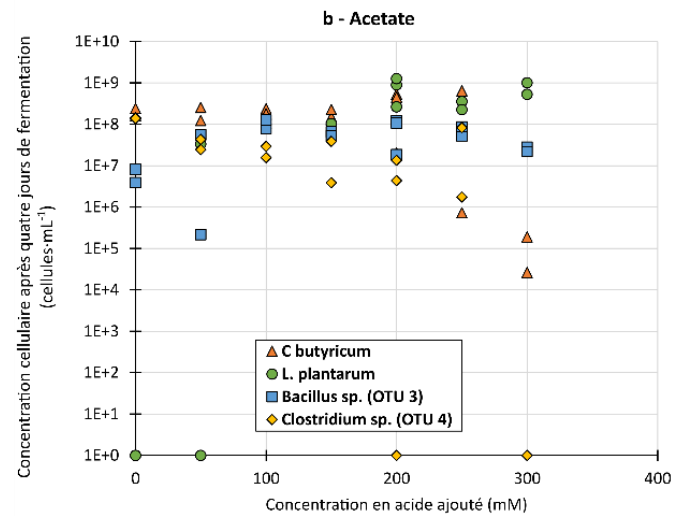
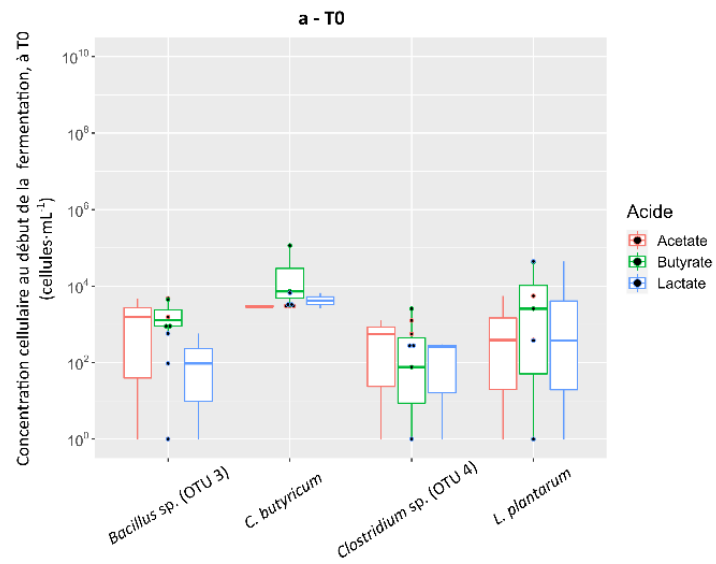
A des concentrations en acides inférieures à 200 mM d'acétate, 250 mM de lactate ou 100 mM de butyrate, la concentration cellulaire de *C. butyricum* à TF a été systématiquement supérieure à  $10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>. A des concentrations supérieures en acide, la concentration cellulaire de *C. butyricum* à TF chute à  $10^5 - 10^6$  cellules·mL<sup>-1</sup>. Les seuils d'inhibition de la croissance de *C. butyricum*, *i.e* les concentrations au-delà desquelles sa concentration cellulaire à TF est substantiellement réduite, ont donc été de 200 mM d'acétate, 250 mM de lactate et 100 mM de butyrate. Sa concentration cellulaire à T0 variant de  $3 \cdot 10^3$  à  $10^5$  cellules·mL<sup>-1</sup>, les acides ont inhibé sa croissance d'un facteur  $\sim 300$  ( $10^6/3 \cdot 10^3$ ) voire l'ont totalement inhibée ( $10^5/10^5$ ).

La concentration en acétate tend à avoir modérément affecté la concentration cellulaire de *Clostridium sp.* (OTU 4), de façon dose-dépendante, diminuant sa concentration cellulaire de  $1 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup> à TF sans acétate à  $2 \cdot 10^6 - 8 \cdot 10^7$  cellules·mL<sup>-1</sup> à 250 mM d'acétate. Entre 100 et 300 mM de lactate, la concentration cellulaire de *Clostridium sp.* (OTU 4) a été réduite et a varié sans tendance nette entre moins de 100 cellules·mL<sup>-1</sup> et  $8 \cdot 10^6$  cellules·mL<sup>-1</sup>. Entre 25 et 100 mM de butyrate, sa concentration cellulaire est restée élevée, variant entre  $10^7$  et  $3 \cdot 10^8$

cellules·mL<sup>-1</sup> à TF, alors que 200 mM de butyrate réduisent sa concentration à 4·10<sup>4</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF. Enfin, sa concentration cellulaire a été inférieure à 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à 300 mM d'acétate, 250 mM de butyrate, 250 et 300 mM de lactate. Sa croissance était donc probablement totalement inhibée à ces concentrations élevées. Les seuils d'inhibition de la croissance de *Clostridium sp.* (OTU 4) ont donc été estimés à < 50 mM d'acétate, 50 mM de lactate et 100 mM de butyrate.

De plus, la concentration cellulaire de *W. coagulans* a augmenté de 4·10<sup>6</sup> – 6·10<sup>6</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF sans acétate à 2·10<sup>7</sup> – 1·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF en présence de 50 à 300 mM d'acétate (à l'exception d'une fermentation à 50 mM où sa concentration atteint seulement 2·10<sup>5</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>). L'ajout de butyrate de 50 à 250 mM tend également à augmenter sa concentration cellulaire, qui évolue de 7·10<sup>6</sup> – 6·10<sup>7</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF sans butyrate à 2·10<sup>7</sup> – 4·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF. Enfin, sa concentration cellulaire a varié entre 4·10<sup>4</sup> et 3·10<sup>6</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF entre 0 et 150 mM de lactate, augmenté à 7·10<sup>7</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à 300 mM de lactate et a été de nouveau restreinte à 2·10<sup>4</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à 400 mM de lactate. Sa concentration cellulaire initiale variant de moins de 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à 5·10<sup>3</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>, il peut être considéré que la croissance de *W. coagulans* n'a jamais été inhibée dans les conditions évaluées. En conclusion, sa croissance a été positivement affectée lors de l'ajout d'acétate et de butyrate en comparaison avec l'absence d'acide, et l'impact du lactate ne semble globalement pas négatif sur sa croissance, hormis à 400 mM.

Enfin, la croissance de *L. plantarum* a été globalement favorisée dès 50 mM d'acétate ou de lactate, augmentant de moins de 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à TF sans acétate à 3·10<sup>7</sup> - 1·10<sup>9</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF entre 50 et 300 mM d'acétate et de 10<sup>5</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF sans lactate à 4·10<sup>5</sup> - 5·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à TF entre 50 et 400 mM de lactate (à l'exception d'une concentration inférieure à 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à 50 mM de lactate). A l'inverse, sa croissance tend à être défavorisée en présence de butyrate, la plupart des concentrations cellulaires mesurées étant inférieures à 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à TF ou du même ordre de grandeur que sa concentration cellulaire à T0, à savoir entre moins de 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à 4·10<sup>4</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>.



**Figure 3-8 : Concentration cellulaire (cellules·mL<sup>-1</sup>) à T0 en fonction de l'OTU considéré, pour les différents acides ajoutés (a). Concentrations cellulaires à TF en fonction de la concentration en acétate ajouté (b), en butyrate ajouté (c) et en lactate ajouté (d), pour les quatre OTUs majoritaires. Les axes des ordonnées sont représentés en échelle logarithmique. Les concentrations cellulaires inférieures au seuil de détection, i.e. ~100 cellules·mL<sup>-1</sup> sont ramenées à 1 sur ce graphique.**

En conclusion, la croissance bactérienne a été affectée de manière distincte en fonction de l'OTU considéré, de l'acide ajouté et de sa concentration, et ce, à des concentrations inférieures à celles préalablement associées à une inhibition totale de la production d'H<sub>2</sub>. Le Tableau 3-4 synthétise les effets des différents acides sur la croissance de ces OTUs. Globalement, la croissance des bactéries identifiées comme productrices d'H<sub>2</sub> tend à avoir été inhibée en présence d'acides, à l'exception de *W. coagulans*, mais sa croissance n'a pas été clairement associée à une production d'H<sub>2</sub> dans les conditions expérimentales étudiées. Notamment, sa croissance à 200 et 250 mM de butyrate (> 10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>) n'a été associée qu'à une production de lactate.

**Tableau 3-4 : Synthèse des effets des acides sur la croissance des OTUs majoritaires identifiés au cours de la fermentation en fonction de l'acide ajouté initialement.**

OTU	Effet sur la croissance (seuil inhibiteur)			Fonction dans l'écosystème
	Acétate	Butyrate	Lactate	
<i>C. butyricum</i>	- (200)	- (100)	- (250)	Production d'H <sub>2</sub>
<i>L. plantarum</i>	++	- / ?	++	Hydrolyse, production de lactate, production de bactériocines
<i>W. coagulans</i> (OTU 3)	++	++	+	Hydrolyse, production d'H <sub>2</sub>
<i>Clostridium</i> sp. (OTU 4)	- (<50)	- (100)	- (50)	Production d'H <sub>2</sub>

« - » = croissance inhibée, « + » = croissance non affectée, « ++ » = croissance stimulée, « ? » = effet non dose-dépendant

### 3.2.8.2. Discussions et conclusions étendues

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser les effets de différents stress acides sur l'activité microbienne, la production d'H<sub>2</sub> ainsi que les communautés microbiennes afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> en culture mixte.

Un seuil d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides a été relevé à 50 mM, quelle que soit la nature de l'acide ajouté. En revanche, l'étendue de l'inhibition était dépendante de l'acide ajouté, avec une diminution de 50 % de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> à 209 mM d'acétate, 104 mM de butyrate ou 273 mM de lactate. Plus globalement, les résultats ont mis en évidence une influence de la **nature de l'acide** (acétate, butyrate ou lactate) sur la consommation du glucose, les rendements en métabolites (dont l'H<sub>2</sub>), la croissance des OTUs et donc la structure de la communauté microbienne. En particulier, l'acétate a faiblement affecté la dégradation du glucose, alors que le butyrate et le lactate l'ont inhibée de façon dose-dépendante à partir de 100 et 50 mM, respectivement. De plus, une inhibition totale de la production d'H<sub>2</sub> a été atteinte à des concentrations distinctes, à savoir à 200, 300 et 400

mM de butyrate, acétate ou lactate, respectivement. Le butyrate a ainsi présenté un effet plus toxique que les autres acides. Dès lors, si la nature de l'acide a une influence sur l'inhibition, la considération de la concentration en acide non dissociée seule pour prédire l'inhibition par les acides en culture mixte (suggérée par plusieurs auteurs) apparaît inadaptée.

L'inhibition totale de la production d'H<sub>2</sub> à une concentration élevée en acide a été associée à une augmentation de la croissance de *L. plantarum* et/ou de *W. coagulans* au détriment des bactéries productrices d'H<sub>2</sub> de la famille des *Clostridiaceae*. La croissance de *C. butyricum* et de *Clostridium* sp. (OTU 4) a été fortement limitée, avec une concentration cellulaire finale inférieure à 10<sup>6</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>, soit 100 fois moins qu'en absence d'acides. Ce changement populationnel a été associé à une production de lactate uniquement. Khor et al. (2016) ont également observé que l'ajout d'acétate à une culture d'un liquide de rumen induisait une sélection de *Lactobacillaceae* et une production de lactate à partir d'amidon ou d'herbe, mais les auteurs n'ont cependant pas étudié la production d'H<sub>2</sub>. En comparaison, Chen et al. (2021b) ont également étudié l'influence du butyrate sur les communautés microbiennes et la production d'H<sub>2</sub> à partir de glucose et à divers pH. A pH 5,5, l'ajout de 80 mM de butyrate a induit une diminution de la production d'H<sub>2</sub> associée à une diminution de l'abondance relative de *Clostridium* sp. et, comme dans la présente étude, une augmentation de l'abondance relative de *Bacillus* sp. mais également d'*Acinetobacter* sp.. A pH 6,5 et 170 mM de butyrate, l'abondance de *Clostridium* sp. a de nouveau diminué, mais au profit de l'abondance de *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. et, de nouveau d'*Acinetobacter* sp.. Les changements populationnels induits par la présence des acides sont donc probablement dépendants de la diversité bactérienne du milieu fermentaire et des conditions de culture, comme le pH. Il est à noter que des souches de *W. coagulans* ont été identifiées comme productrices d'H<sub>2</sub> (Kotay and Das, 2007; Lertsriwong and Glinwong, 2020). Plus spécifiquement, une culture de *W. coagulans* (15 g·L<sup>-1</sup> sucrose, pH 7,2) a été associée à un rendement de 1,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup>. Néanmoins, la production d'H<sub>2</sub> par *W. coagulans* était très dépendante de la composition du milieu de culture (Lertsriwong and Glinwong, 2020) et les gènes responsables de la production d'H<sub>2</sub> chez cette bactérie n'ont pas été clairement identifiés (Lertsriwong and Glinwong, 2020). Eventuellement, lors d'un stress acide, l'ajustement des conditions de fermentation de manière à favoriser la production d'H<sub>2</sub> par *W. coagulans* permettrait de limiter l'effet inhibiteur décrit.

De plus, l'ajout d'acide a diminué la diversité des communautés microbiennes. Plus précisément, la richesse, *i.e.* le nombre d'espèces, n'a pas significativement changé avec l'ajout d'acide, mais la distribution de l'abondance des différents OTUs a été significativement perturbée, *i.e.*, l'abondance des différents OTUs est devenue plus inégale. En fermentation sombre, le lien entre la diversité d'une communauté microbienne, la stabilité de l'écosystème et la production d'H<sub>2</sub> est encore mal compris (Vasconcelos et al., 2016). L'augmentation de la diversité a parfois été associée à la diminution de la production d'H<sub>2</sub> et inversement, à son augmentation (Vasconcelos et al., 2016).



A des concentrations en butyrate ou en acétate inférieures à 200 et 300 mM, resp., les rendements en H<sub>2</sub>, en butyrate et en acétate ont diminué au profit d'une augmentation du rendement en lactate. L'analyse des communautés microbiennes au niveau de la famille n'a pas permis de distinguer de changement populationnel, avec une abondance relative des *Clostridiaceae* restant supérieure à 50 %. En revanche, au niveau de l'espèce (ou du genre, à défaut), une inhibition de la croissance de *Clostridium sp.* (OTU 4) dès 50 mM d'acétate et 150 mM de butyrate a été observée. La croissance de *C. butyricum* a également été affectée, dans une moindre mesure, à 250 mM d'acétate et 150 mM butyrate. Le changement d'activité métabolique observé pourrait donc être attribué non seulement à une limitation de la croissance de *Clostridium sp.* (OTU 4) et de *C. butyricum*, mais également à l'augmentation de la croissance de *W. coagulans* ou *L. plantarum*. Toutefois, l'analyse de la  $\beta$ -diversité a suggéré que des rendements métaboliques distincts ont pu être obtenus avec des communautés microbiennes très similaires, suggérant que des OTUs pouvaient avoir changé de métabolisme en fonction des conditions. Plus précisément, le métabolisme de *C. butyricum* a été suspecté de changer en faveur de la production de lactate en fonction du stress acide appliqué. En résumé, **pour des concentrations intermédiaires en acétate et en butyrate, une combinaison de changements non seulement populationnels mais aussi métaboliques semble être à l'origine de la diminution du rendement en H<sub>2</sub>.**

De 50 à 250 mM de lactate, les rendements métaboliques ont globalement peu évolué, et les analyses d'abondance relative et de  $\beta$ -diversité, à l'échelle de la famille et du genre, ont suggéré que les communautés microbiennes ont également été peu affectées par l'augmentation de la concentration en lactate. L'analyse de la croissance bactérienne des OTUs majoritaires a néanmoins montré une croissance de *L. plantarum* favorisée et une diminution de la croissance de *Clostridium sp.* (OTU 4) à partir de 100 mM. La concentration en lactate en fin de fermentation ayant été inférieure à la concentration ajoutée à plusieurs reprises lors des fermentations en présence de 50 - 150 mM de lactate, *C. butyricum* a potentiellement consommé le lactate ajouté initialement, voire le lactate produit par *L. plantarum*. Cette production d'H<sub>2</sub> à partir de lactate a contribué à maintenir le rendement en H<sub>2</sub>, contrairement à ce qui a été observé en présence d'acétate ou de butyrate. En conclusion, **avec ajout initial de lactate, jusqu'à 250 mM, les changements populationnels à l'échelle de l'espèce n'ont pas induit de diminution des rendements en H<sub>2</sub>, et la diminution de la production en H<sub>2</sub> serait donc principalement attribuable à une diminution de la consommation du glucose.**

Concernant la consommation des acides organiques, l'acétate a également parfois été utilisé comme substrat lors de la fermentation. De plus, une augmentation d'HPR, de  $279 \pm 18$  à  $412 \pm 19$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> et de  $240 \pm 50$  à  $327 \pm 50$  mL·g<sub>H<sub>2</sub>glucose added</sub><sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> en présence de 50 mM de lactate ou d'acétate, respectivement, a été mesurée. Potentiellement, la présence de ces acides dans le milieu de culture **à faible concentration (0 – 50 mM) pourrait impacter positivement l'activité productrice d'H<sub>2</sub>.** Cette observation est cohérente avec l'observation

d'interactions positives entre la production d'H<sub>2</sub> et la croissance de LAB par plusieurs auteurs (García-Depraect et al., 2021a). En effet, ces dernières pourraient produire du lactate et/ou de l'acétate (*Bifidobacterium* sp.), utilisé comme co-substrat par les HPB et améliorant la production d'H<sub>2</sub> (Colin et al., 2001; Heyndrickx et al., 1991; T. H. Kim et al., 2012).

Enfin, parmi les études portées sur l'impact des acides sur la production d'H<sub>2</sub> et la production d'acides en culture mixte, les travaux présentés ici sont les seuls à décrire une augmentation de la concentration en lactate lors d'ajout d'acide. A l'inverse, Zheng and Yu (2005) et Siqueira and Reginatto (2015) ont observé une diminution de la production de butyrate en ajoutant butyrate ou acétate, respectivement. Y. Wang et al. (2008), en ajoutant de l'acétate, ont observé une augmentation de la production de butyrate et une diminution de la production d'acétate. Ces études ont été réalisées à pH 6, 6 et 5,5, respectivement, à partir de glucose (10, 40 et 10 g·L<sup>-1</sup>, par ordre d'apparition dans le texte). Néanmoins, il est possible que, dans certaines études, du lactate ait été produit sans avoir été quantifié, une chromatographie gazeuse ayant parfois été seulement utilisée pour quantifier les acides organiques. La production de lactate non quantifiée serait également cohérente avec la DCO manquante en fin de fermentation dans certaines études (non présentée, mais calculé à partir des données fournies). Alternativement, les conditions de fermentation appliquées dans cette thèse peuvent avoir involontairement favorisé la production de lactate. Par exemple, la culture de *C. acetobutylicum* en carence de Fer (Bahl et al., 1986) a induit un changement métabolique en faveur de la production de lactate. Néanmoins, ce changement a été relevé en diminuant la concentration en Fer de 3,0 à 0,58 mg·L<sup>-1</sup>, et la concentration en Fer dans notre étude s'élevait à 4,8 mg·L<sup>-1</sup>.

### 3.3. Fermentations secondaires productrices d'H<sub>2</sub> en conditions de stress acide

#### 3.3.1. Avant-propos

La partie 3.2 a permis de montrer qu'au cours d'une fermentation en batch à partir de glucose, la présence d'acides favorise les voies de production de lactate au détriment des voies de production d'H<sub>2</sub>, inhibe la consommation du substrat et modifie les communautés microbiennes. Ces perturbations de la fermentation se sont donc traduites par la production d'un effluent dont la composition se distingue de celle d'un effluent issu d'une fermentation sans inhibition. Ainsi, en présence d'acides, après quatre jours de fermentation, les effluents de fermentation contenaient :

- des substrats fermentescibles résiduels : glucose, lactate et acétate ;
- d'autres molécules pouvant exercer des effets inhibiteurs tels que du butyrate, du butanol, du propionate, du formiate, ou du valérate ;
- une biomasse microbienne (entre 10<sup>9</sup> et 10<sup>10</sup> copies 16S·mL<sup>-1</sup>) composée principalement de microorganismes de la famille des *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae* ou *Bacillaceae*.

Des bactériocines, molécules inhibitrices sécrétées principalement par les bactéries lactiques, ont également pu s'accumuler dans le milieu de culture. L'arrêt de la production d'H<sub>2</sub> (et l'absence de production d'H<sub>2</sub>, à concentration élevée en acide) au bout de quatre jours et ce, malgré la présence de substrat fermentescible résiduel, peut donc être associable soit à la présence d'acides inhibiteurs, soit à la croissance de microorganismes antagonistes (par exemple, *via* la production de bactériocines).

Malgré ces conditions, une fermentation secondaire productrice d'H<sub>2</sub> est possible. Par exemple, lors de l'ensilage de matières végétales, une instabilité de la fermentation lactique peut conduire à des fermentations secondaires productrices d'H<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> et de butyrate (Kung et al., 2018). Ces fermentations secondaires se réalisent à un pH entre 4 et 5, en présence de *Lactobacillaceae* et de fortes concentrations en lactate, c'est-à-dire dans des conditions comparables à celles des effluents de fermentation considérés. De même, certains substrats initialement riches en sucres accessibles mais ayant subi une fermentation lactique (désirée ou non), telles que les soupes de déconditionnement, présentent également une composition comparable aux effluents décrits ici, et peuvent néanmoins être utilisés comme substrat pour la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre.

Les objectifs de cette étude ont donc été (i) d'investiguer la production d'H<sub>2</sub> à partir d'effluents de fermentations affectées par un ajout initial d'acétate, de butyrate ou de lactate et (ii) d'identifier les microorganismes / consortia microbiens associés à la production d'H<sub>2</sub> dans ces conditions défavorables ainsi que leur métabolisme.

L'intérêt de l'expérience menée est double : évaluer (i) l'intérêt d'une incubation prolongée en présence d'acides pour faire émerger des microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> résistants et évaluer (ii) l'efficacité de production d'H<sub>2</sub> par lesdits microorganismes.

### 3.3.2. Mise en œuvre expérimentale

#### 3.3.2.1. Protocole

De la même manière qu'au cours de la partie 3.2, une fermentation du glucose a été conduite avec ajout initial de 25 à 250 mM de butyrate, de 50 à 300 mM d'acétate ou de 50 à 400 mM de lactate. Chaque fermentation a été conduite en *quadruplicata*. Contrairement à la partie précédente où les fermentations ont duré quatre jours, les expériences ont été suivies durant neuf à treize jours, *i.e.*, jusqu'à arrêt de la production d'H<sub>2</sub> dans la plupart des fermentations<sup>13</sup>. La fermentation primaire dure, au maximum, les quatre premiers jours, et la fermentation secondaire dure les cinq à neuf jours suivants. Le protocole reste inchangé : la fermentation a été réalisée dans des fioles de 600 mL, avec 10g<sub>D<sub>CO</sub></sub>·L<sup>-1</sup> de glucose, en présence tampon MES, d'une solution de macro et d'oligoéléments, à pH initial 6 et inoculée *via* une boue aérobie de la station d'épuration de Narbonne lyophilisée. Aucun transfert de récipient n'a été effectué entre la fermentation primaire et la fermentation secondaire. La production de biogaz a été mesurée toutes les deux heures par  $\mu$ -CPG et les milieux de culture ont été échantillonnés tous les deux jours pour l'analyse des métabolites produits, PCRq et le séquençage 16S. Seules les fioles pour lesquelles une production d'H<sub>2</sub> a été relevée entre quatre et treize jours sont considérées dans l'analyse.

La succession de deux métabolismes producteurs d'H<sub>2</sub>, définis ici comme « fermentation primaire » et « fermentation secondaire » est illustrée en Figure 3-9. Le début des fermentations secondaires (désigné TI) correspond au temps auquel le débit de production d'H<sub>2</sub> augmente, après quatre jours de fermentation. La production d'H<sub>2</sub> mesurée pendant la fermentation primaire ainsi que la latence entre les fermentations primaires et secondaires ne sont pas présentées dans cette partie. La démarche expérimentale est illustrée en Figure 3-10.

---

<sup>13</sup> Les fermentations secondaires avec ajout initial d'acétate ou de butyrate présentées dans cette partie ne sont pas celles consécutives aux fermentations primaires présentées en partie précédente (3.2), les fermentations ayant été stoppées au bout de quatre jours. En revanche, les fermentations secondaires avec ajout initial de lactate sont consécutives aux fermentations primaires présentées en partie 3.2.

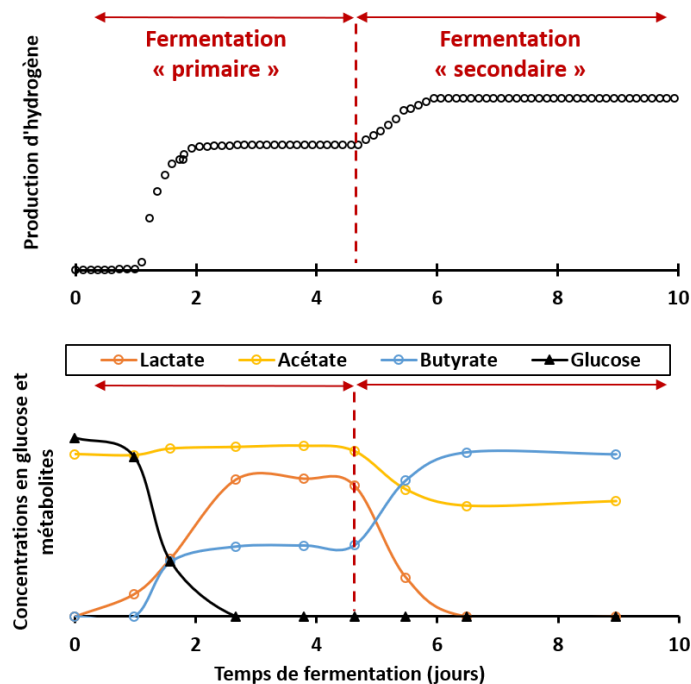


Figure 3-9 : Illustration de la succession d'une fermentation primaire et d'une fermentation secondaire.

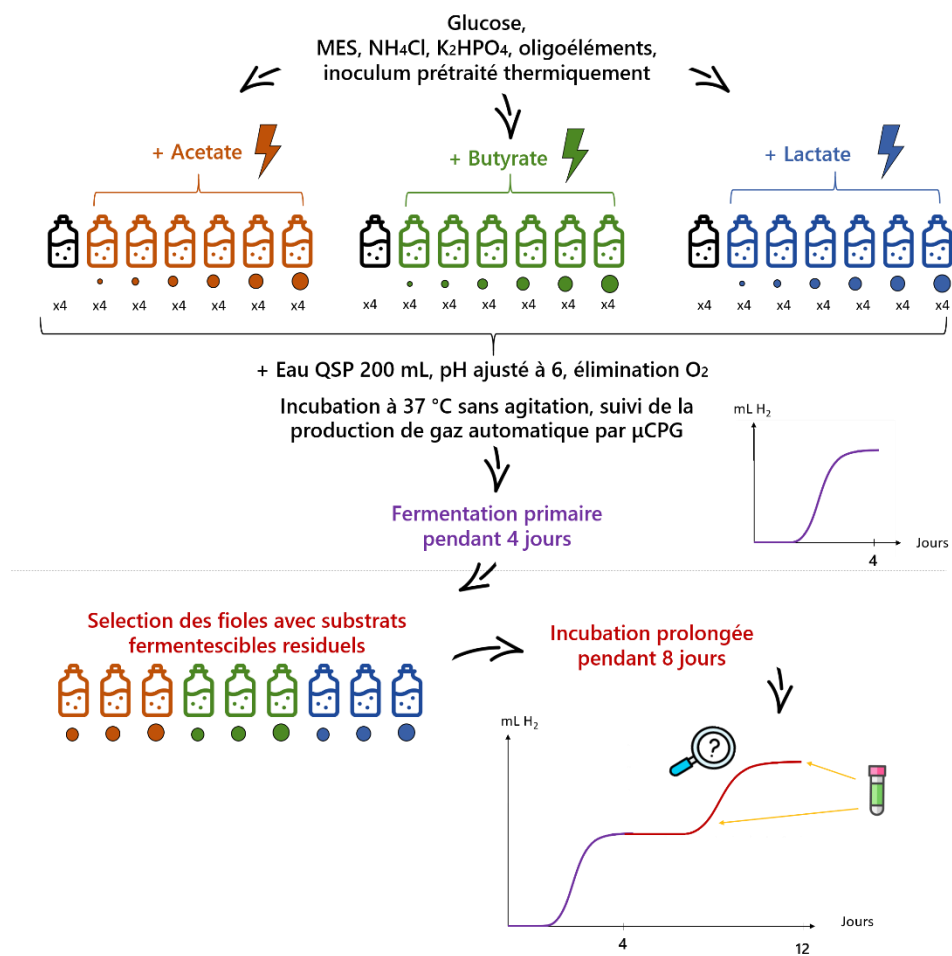


Figure 3-10 : Illustration du protocole expérimental mis en place pour étudier la fermentation sombre secondaire productrice d' $H_2$  en conditions de stress acide

### 3.3.2.2. Caractérisation des effluents de fermentation en début de fermentation secondaire

Plusieurs molécules présentes au début de la fermentation secondaire peuvent servir de substrat pour la production d'H<sub>2</sub> : le glucose résiduel ainsi que le lactate, et l'acétate comme co-substrat. Les effluents de fermentation primaire ont donc été caractérisés pour identifier les substrats potentiels pour la production d'H<sub>2</sub>. La Figure 3-11-a présente la répartition de la DCO disponible en début de fermentation secondaire sous forme de glucose, de lactate et d'acétate dans les différents effluents de fermentation considérés, en fonction de l'acide ajouté initialement. Au total, la somme de la DCO du glucose résiduel, du lactate et de l'acétate ( $DCO_{ALG}$ ) a fortement varié, entre 4 et 35 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup>. La répartition de la DCO fermentescible a de plus varié en fonction de l'ajout initial d'acide et des performances de la fermentation primaire.

- Plus précisément, l'ajout initial d'acétate a généré des effluents contenant principalement de l'acétate (50 - 73 %  $DCO_{ALG}$ ), mais également du lactate (27 - 50 %  $DCO_{ALG}$ ) et dans une moindre mesure, du glucose résiduel (0 - 12 %  $DCO_{ALG}$ ).
- L'ajout initial de butyrate a été associé à une présence de glucose résiduel représentant de 20 à 80 % de  $DCO_{ALG}$ , associée à du lactate (20 - 77 %  $DCO_{ALG}$ ) et dans une moindre mesure, de l'acétate (0 - 5 %  $DCO_{ALG}$ ).
- Enfin, l'ajout initial de lactate a généré des effluents contenant du lactate (64 - 95 %  $DCO_{ALG}$ ), mais également du glucose (0 - 26 %  $DCO_{ALG}$ ) et de l'acétate (0 - 24 %  $DCO_{ALG}$ ).

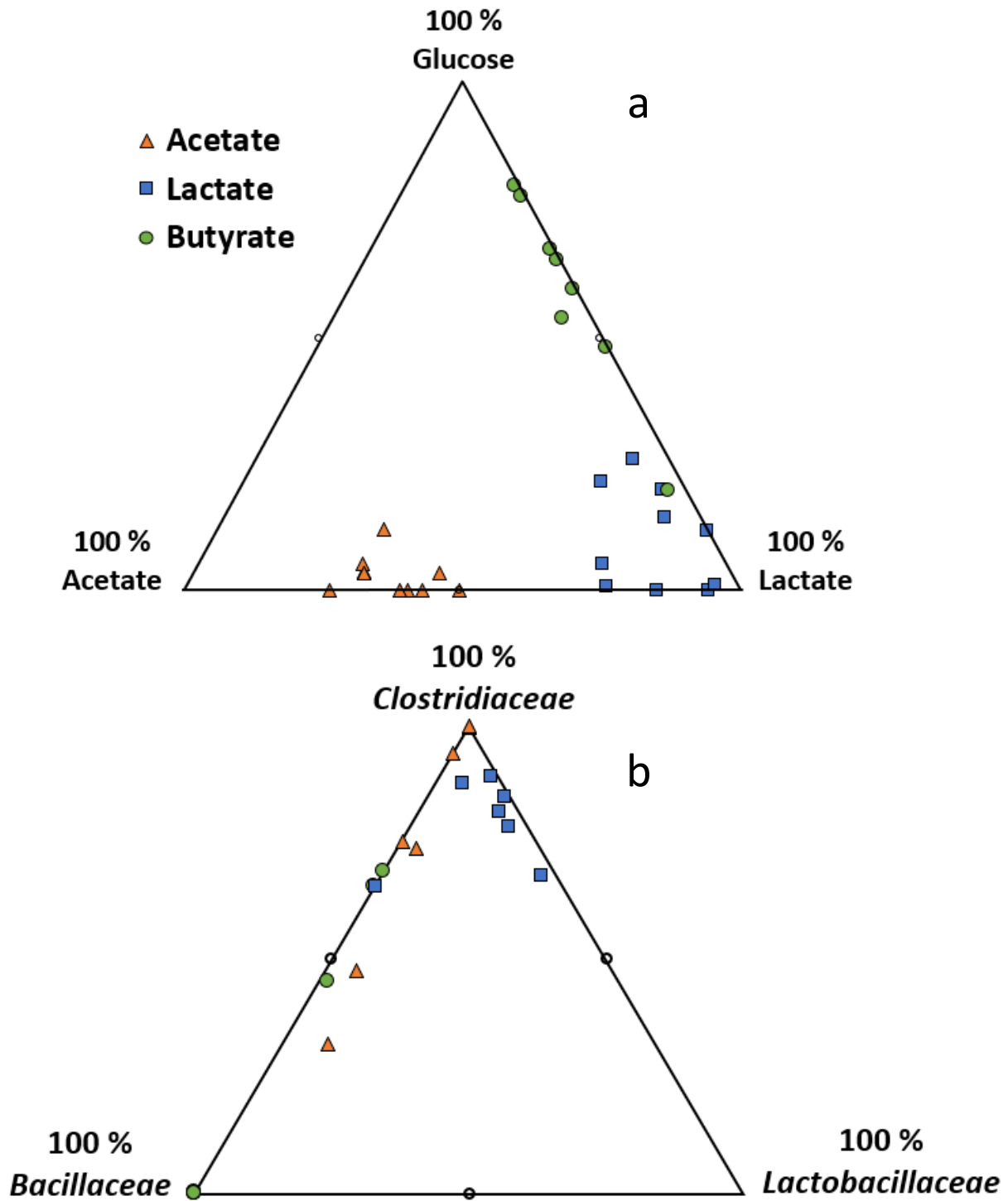
De plus, un ensemble de séquençages des milieux fermentaires ont été réalisés en début et en fin de fermentation secondaire. Ces séquençages ont été réalisés sur une sélection de fioles, de façon à pouvoir décrire les communautés microbiennes entrées en croissance à différentes concentrations en acide initialement ajoutées, et en présence d'acétate, de butyrate ou de lactate ajouté initialement. La Figure 3-11-b présente au début de la fermentation secondaire la répartition en *Clostridiaceae*, *Bacillaceae* et *Lactobacillaceae* en pourcentage de la concentration cellulaire dans les différents effluents de fermentation primaire considérés, en fonction de l'acide ajouté initialement. Un séquençage 16S a été effectué sur une sélection de fermentations secondaires. Globalement, les effluents contenaient au démarrage de la fermentation secondaire de  $4 \cdot 10^5$  à  $3 \cdot 10^9$  cellules<sub>*Clostridiaceae*</sub>·mL<sup>-1</sup>, < 100 à  $9 \cdot 10^8$  cellules<sub>*Lactobacillaceae*</sub>·mL<sup>-1</sup>) et  $1 \cdot 10^6$  à  $6 \cdot 10^9$  cellules<sub>*Bacillaceae*</sub>·mL<sup>-1</sup>. Aussi, la composition de la communauté microbienne a varié en fonction de l'ajout initial d'acide :

- l'ajout initial d'acétate a été associé à la croissance de  $75 \pm 26$  % de *Clostridiaceae*,  $3 \pm 3$  % de *Lactobacillaceae* et 0 à 60 % de *Bacillaceae* ( $23 \pm 23$  %).

- L'ajout initial de butyrate a été associé à la croissance de 0 à 69 % de *Clostridiaceae*, 0 à 1,6 % de *Lactobacillaceae* et 31 à 99 % de *Bacillaceae*.
- Enfin, l'ajout initial de lactate a été associé à la croissance de  $79 \pm 9$  % *Clostridiaceae*,  $13 \pm 9$  % de *Lactobacillaceae* et 1 à 34 % de *Bacillaceae*.

Ainsi, les conditions initiales de ces fermentations secondaires diffèrent par l'acide ajouté initialement et sa concentration, ainsi que par la fermentation primaire qui en a résulté. L'objectif de l'étude étant d'identifier des microorganismes producteurs d' $H_2$  résistants en conditions de stress acide ainsi que leur métabolisme, cette diversité de conditions de culture peut être considérée comme un avantage, puisqu'elle augmente la probabilité de formuler une condition de culture permettant à ces microorganismes de croître, mais également en simulant une large gamme de fermentations sombres dysfonctionnelles.

Dans cette partie, les différentes conditions de fermentation seront distinguées par la nature de l'acide ajouté initialement (*i.e.*, au début de la fermentation primaire), sa concentration initiale ajoutée et un identifiant permettant de distinguer les répliques. Par exemple, la fermentation conduite avec 100 mM d'acétate initialement ajouté en fiole 10 sera dénommée : Ac\_100mM\_10. La concentration dudit acide au début de la fermentation secondaire ( $CF_i$ ) peut être distincte de sa concentration appliquée initialement ( $C_0$ ), à cause de la production supplémentaire de cet acide ou bien de sa consommation. Néanmoins, une régression linéaire de  $CF_i$  en fonction de  $C_0$  indique que ces concentrations sont généralement proches (Pour le butyrate, l'acétate et le lactate,  $CF_1 = 0,92 C_i$ ,  $CF_1 = 0,90 C_i$  et  $CF_1 = 0,83 C_i$ , resp.  $R^2=0,97$  ; 0,90 et 0,83, resp.).



**Figure 3-11 : Composition des effluents en début de fermentations secondaires en acétate, butyrate et lactate en pourcentage de la concentration en acétate, butyrate et lactate totale (a) ; et en *Clostridiaceae*, *Bacillaceae* et *Lactobacillaceae*, en pourcentage de la concentration en copies 16S totale (b). Les cercles noirs non remplis représentent les positions en lesquelles l'effluent est composé d'un mix de 50 % de chaque couple.**



### 3.3.3. Résultats

#### 3.3.3.1. Production d'H<sub>2</sub>

La production d'H<sub>2</sub> au cours des fermentations secondaires a tout d'abord été comparée en fonction de l'acide initialement ajouté et de sa concentration. La Figure 3-12 a-c présente l'évolution du volume cumulé d'H<sub>2</sub> (mL) lors des fermentations secondaires en fonction du temps de fermentation, avec ajout initial d'acétate (a), de butyrate (b), ou de lactate (c). A partir des volumes cumulé d'H<sub>2</sub> obtenus en fin de chaque fermentation, la Figure 3-12-d a été construite. Les productions d'H<sub>2</sub> en fermentation primaire et les latences entre les fermentations primaires et secondaires ne sont pas représentées.

Quel que soit l'acide ajouté, des fermentations secondaires productrices d'H<sub>2</sub> ont pu être observées. Jusqu'à 273 mL d'H<sub>2</sub> ont été produits en présence d'acétate (Ac\_250mM\_25), 171 mL en présence de butyrate (Bu\_100mM\_15) et 650 mL en présence de lactate (La\_300mM\_26). En comparaison, en absence d'acide, lors des fermentations primaires, la production d'H<sub>2</sub> cumulée s'élevait en moyenne à 361 ± 43 mL d'H<sub>2</sub>. Les productions d'H<sub>2</sub> au cours de ces fermentations secondaires ont donc été significatives, atteignant jusqu'à 180 % de la production d'H<sub>2</sub> primaire en absence d'acide. Plus précisément, en comparant pour chaque fermentation la production d'H<sub>2</sub> en phase secondaire à la production d'H<sub>2</sub> totale de la même fermentation (*i.e.* les productions d'H<sub>2</sub> en phase primaire et en phase secondaire cumulées), la production d'H<sub>2</sub> en phase secondaire a alors représenté entre 11 et 100 % de la production totale d'H<sub>2</sub> au cours des deux phases et 69 ± 33 % en moyenne (en excluant les cas où aucune fermentation secondaire productrice d'H<sub>2</sub> n'a été détectée). Il apparaît donc que ces métabolismes peuvent constituer une piste d'intérêt pour augmenter la production d'H<sub>2</sub> en condition de stress acide.

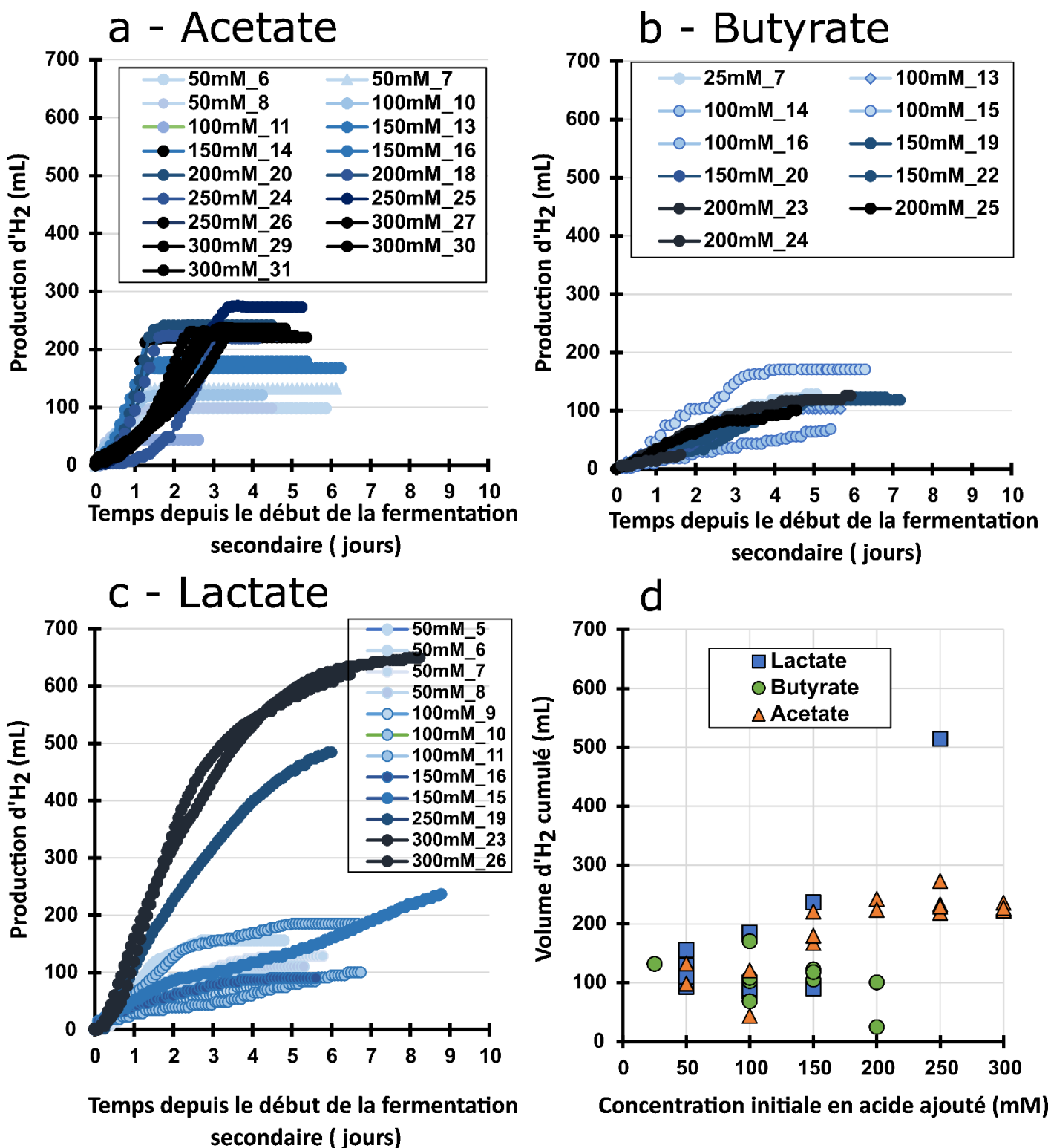
Lors de l'ajout initial d'acétate, une augmentation de la production d'H<sub>2</sub> avec la concentration en acétate ajouté a été observée. Seule la production d'H<sub>2</sub> lorsque 300 mM d'acétate ont été initialement ajoutés est inférieure à la production relevée à 250 mM (Figure 3-12-a-d). Le volume cumulé d'H<sub>2</sub> a ainsi augmenté de 110 ± 20 mL pour 50 mM d'acétate initialement ajouté à 239 ± 24 mL d'H<sub>2</sub> avec 250 mM d'acétate initialement ajoutés.

Lors de l'ajout initial de lactate (Figure 3-12-c-d), la même tendance a été observée qu'en présence d'acétate, *i.e.* la production d'H<sub>2</sub> a augmenté avec la concentration initiale en acide ajouté, et ce jusqu'à une concentration de 300 mM ajoutés. Seules les fermentations avec 400 mM de lactate initialement ajoutés n'ont pas mené à une production d'H<sub>2</sub>. Le volume cumulé d'H<sub>2</sub> a ainsi augmenté de 122 ± 27 mL avec 50 mM de lactate initialement ajouté à 620 – 650 mL d'H<sub>2</sub> pour 300 mM de lactate initialement ajoutés.

Enfin, lors de l'ajout initial de 50 à 200 mM de butyrate (Figure 3-12-b-d), la production d'H<sub>2</sub> a varié entre 65 et 171 mL, sans lien avec la concentration en butyrate initiale ajouté. En revanche, aucune production d'H<sub>2</sub> n'a été observée à 250 mM de butyrate initial ajouté.

En conclusion, jusqu'à 300 mM de lactate, 250 mM d'acétate ou 200 mM de butyrate initial ajouté, la concentration en acide ajouté n'a pas exercé d'inhibition sur les volumes cumulés d'H<sub>2</sub> lors de ces fermentations secondaires. En revanche, une inhibition de la production d'H<sub>2</sub> a été relevée à 250 mM de butyrate initial et à 400 mM de lactate initial.

En comparaison, au cours d'une fermentation de glucose (10 g·L<sup>-1</sup>) à pH 7 et à 35 °C en batch, l'ajout initial de 200 mM ou 300 mM d'acétate par B. Wang et al. (2008) a été associé à la production de 55 et 41 mL d'H<sub>2</sub>, respectivement, soit 20 et 15 % de la production d'H<sub>2</sub> observée dans leur étude sans ajout d'acide (*i.e.* 275 mL d'H<sub>2</sub>). Dans la présente étude, l'ajout initial de 200 ou 300 mM d'acétate a été associé, lors de cette fermentation secondaire, à une production de 239 ± 24 et 227 ± 6 mL d'H<sub>2</sub>, respectivement. L'activité productrice d'H<sub>2</sub> observée paraît donc intéressante et présente une certaine résilience aux conditions stressantes appliquées, *i.e.* l'ajout d'acide, la production de métabolites lors de la fermentation primaire et la biomasse microbienne associée.



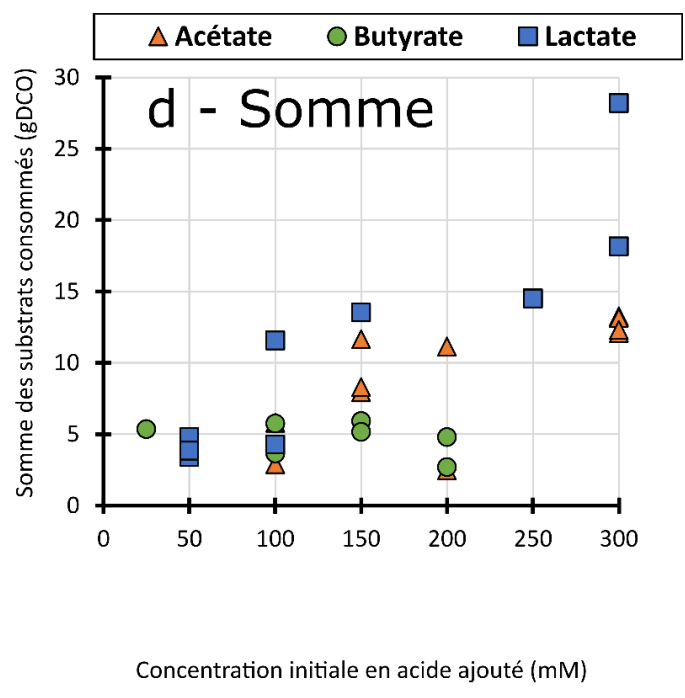
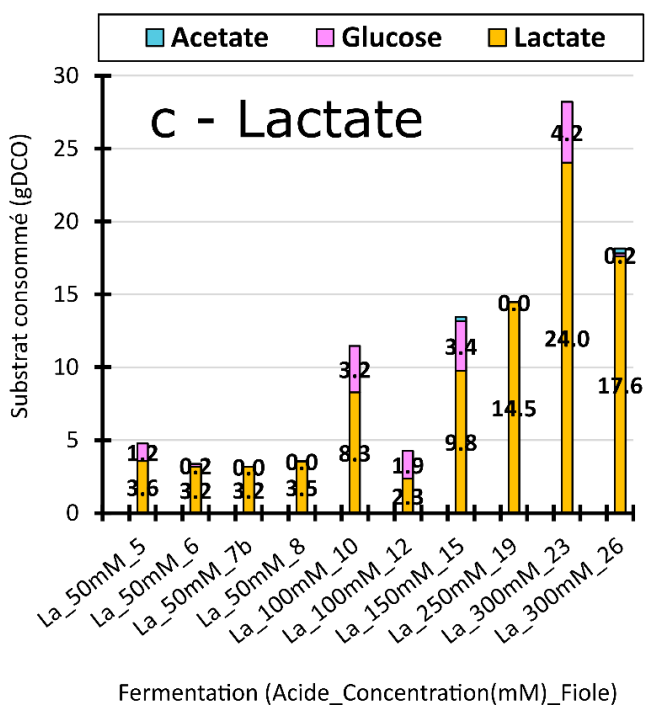
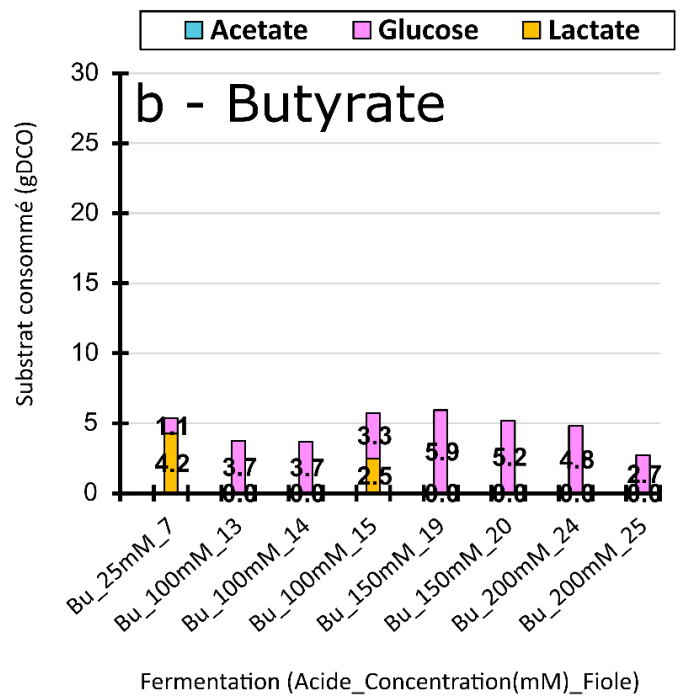
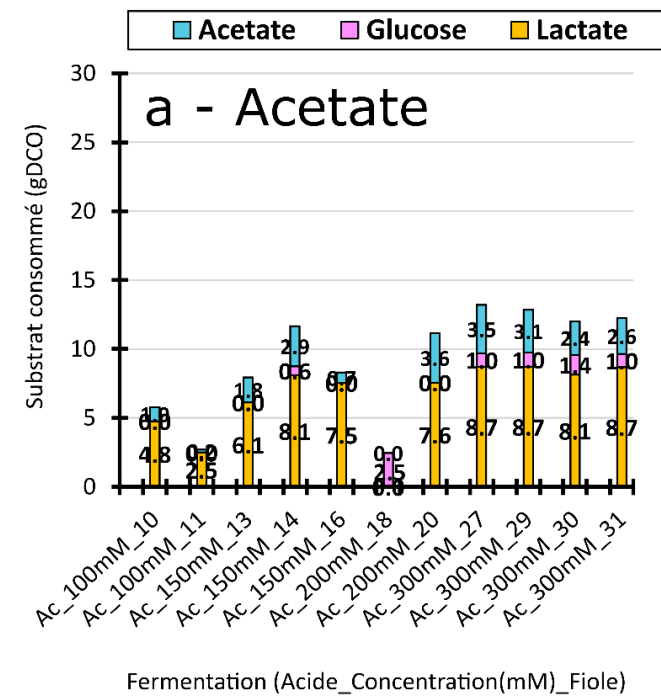
**Figure 3-12 : Production d'H<sub>2</sub> au cours des fermentations secondaires en fonction du temps de fermentation secondaire, pour les différentes fermentations suivies et lors d'ajout initial d'acétate (a), de butyrate (b) et de lactate (c). Les volumes cumulés d'H<sub>2</sub> obtenus en fin de chaque fermentation sont représentés en fonction de la concentration initiale en acide ajouté, pour l'ajout initial d'acétate, de butyrate ou de lactate (d).**

### 3.3.3.2. Consommation des substrats

Puisque des productions d'H<sub>2</sub> intéressantes ont été mesurées au cours de ces fermentations secondaires, la consommation de substrat au cours de ces fermentations a été mesurée. La Figure 3-13 présente les concentrations en substrats consommés au cours de la fermentation secondaire, en fonction de l'acide ajouté initialement et de sa concentration initiale.

En présence d'acétate ajouté initialement (Figure 3-11-a), le substrat principal a été le lactate produit au cours de la fermentation primaire, représentant  $74 \pm 9$  % de la DCO consommée, à l'exception d'une fermentation avec 200 mM d'acétate ajoutés initialement (Ac\_200mM\_18), au cours de laquelle seul du glucose a été consommé, malgré la présence de lactate. La consommation du lactate a été accompagnée de la consommation d'acétate, avec un ratio Acétate/Lactate (en DCO) variant entre 0,08 et 0,5 (entre 0,12 et 1 mol<sub>acétate</sub>/mol<sub>lactate</sub>). Le lactate a été systématiquement intégralement consommé, et a donc potentiellement été un substrat limitant pour la production d'H<sub>2</sub>. Dans une moindre mesure, du glucose a également été consommé et a représenté, en excluant la fermentation Ac\_200mM\_18, 0 à 12 % de la DCO consommée. La quantité de substrat consommée a augmenté avec l'augmentation de la concentration initiale en acétate, passant de 3,2 g<sub>DCO</sub> à 100 mM d'acétate ajoutés initialement à 13,6 g<sub>DCO</sub> à 300 mM d'acétate ajoutés initialement (de nouveau à l'exception de la fermentation Ac\_200mM\_18, pour laquelle seuls 2,5g de DCO ont été consommés). Cette augmentation de la quantité de DCO consommée avec l'augmentation de la concentration initiale en acétate est liée à l'augmentation de la quantité de lactate produite (entre 26 et 91 mM) lors de la fermentation primaire avec l'augmentation de la concentration en acétate ajouté. Dans une moindre mesure, la quantité de glucose résiduel a également augmenté avec l'augmentation de la concentration en acétate ajouté initialement, passant de 3 à 7,5 mM (à l'exception de 12,8 mM en Ac\_200mM\_18).

En présence de butyrate ajouté initialement (Figure 3-11-b), le glucose résiduel a été le principal substrat, représentant 100 % de la DCO consommée dans les fermentations considérées, à l'exception des fermentations Bu\_25mM\_7 et Bu\_100mM\_15, pour lesquelles du lactate a également été consommé, diminuant la part du glucose consommé à 21 et 57 % de la DCO consommée totale, respectivement. L'absence de consommation de lactate n'a pas été pas attribuable à son absence, sa concentration en début de fermentation secondaire s'élevant à  $37 \pm 10$  mM en moyenne, et représentant 20 – 77 % de  $DCO_{ALG}$ . La quantité de  $DCO_{ALG}$  disponible a peu varié avec la quantité de butyrate ajoutée initialement, avec en moyenne  $8,0 \pm 1,5$  g<sub>DCO</sub>. La quantité de substrat consommée (gDCO) a quant à elle varié de 2,7 g<sub>DCO</sub> à 5,9 g<sub>DCO</sub>, sans tendance en fonction de la concentration en butyrate initiale ajoutée et avec en moyenne  $4,6 \pm 1,1$  gDCO consommés.



**Figure 3-13 : Quantité de substrats consommées (acétate, lactate et glucose) au cours des fermentations secondaires, avec ajout initial d'acétate (a), de butyrate (b) et de lactate (c). Les quantités totales de substrat consommées en fonction de la concentration initiale en acide ajouté, pour les trois différents acides ajoutés sont représentées en (d).**

En présence de lactate ajouté initialement (Figure 3-11-b), le substrat principal était le lactate, représentant en moyenne  $83 \pm 14$  % de la DCO consommée (*i.e.* de 72 à 100 %). Du glucose résiduel a été consommé dans une moindre mesure, représentant  $15 \pm 16$  % de la DCO consommée, *i.e.* de 0 à 45 % en fonction de la fermentation. Le glucose résiduel a systématiquement été intégralement consommé, alors que du lactate résiduel a été mesuré en fin de fermentation. Le suivi des fermentations ayant été stoppé avant arrêt de la production d' $H_2$  dans ces cas où du lactate subsistait (pour raison de contrainte technique), ce dernier aurait potentiellement été épuisé tout en conduisant à une production d' $H_2$  supplémentaire si la fermentation avait perduré. La quantité de substrat consommée a augmenté avec l'augmentation de la concentration en lactate ajouté initialement, évoluant de 3,4  $g_{DCO}$  avec 50 mM de lactate initial ajouté à 28,2  $g_{DCO}$  avec 300 mM de lactate initial ajouté. Ceci est lié à l'augmentation de  $DCO_{ALG}$  avec l'augmentation de la concentration en lactate initial ajouté, directement *via* la quantité de lactate ajouté mais également dans une moindre mesure *via* l'inhibition de la dégradation du glucose en fermentation primaire. Avec l'augmentation de la concentration en lactate ajouté initialement de 50 à 300 mM,  $DCO_{ALG}$  a ainsi augmenté de 3,8  $g_{DCO}$  à 35,1  $g_{DCO}$ .

Ainsi, une augmentation de la concentration en acide initialement ajouté, quel qu'il soit, n'a pas été pas associée à une diminution de conversion de DCO au cours des fermentations secondaires considérées, contrairement à ce qui avait été observé lors de la fermentation primaire en présence de butyrate et de lactate. La quantité de substrat consommée a même eu tendance à augmenter avec l'augmentation de la concentration en acétate ou en lactate initialement ajouté, mais a peu évolué en fonction de la concentration en butyrate initialement ajouté (Figure 3-13-d). La prolongation du temps de fermentation de quatre jours à entre neuf et treize jours a donc bien permis d'observer une activité microbienne dont l'activité de consommation du substrat a été davantage résistante au stress acide que l'activité microbienne décrite en fermentation primaire.

### 3.3.3.3. Rendements métaboliques

L'activité métabolique associée aux consommations de substrats précédemment décrites a ensuite été analysée. Les bilans de matière (en DCO) des fermentations secondaires, prenant en compte l'ensemble des métabolites quantifiés ainsi que le glucose, sans comptabiliser la biomasse, varient entre 68 et 116 %, avec en moyenne  $100 \pm 13$  %, suggérant que la majeure partie des métabolites a été correctement identifiée. Pour certaines fermentations (Ac\_200mM\_2, Ac\_300mM\_27, Ac\_300mM\_29, Ac\_300mM\_30, Ac\_300mM\_31) dont les bilans DCO sont faibles (68 – 89 %), un pic non identifié a été décelé à l'HPLC, pouvant être une explication à la DCO manquante.

La Figure 3-14-a-c présente les rendements en métabolites majoritaires identifiés (butyrate, lactate, acétate, H<sub>2</sub>, butanol, valérate et isobutyrate), en fonction des fermentations, pour l'ajout initial d'acétate (Figure 3-14-a), de butyrate (Figure 3-14-b) et de lactate (Figure 3-14-c). Ces rendements sont exprimés en  $\text{gDCO}_{\text{produite}} \cdot \text{gDCO}_{\text{consommée}}^{-1}$ , la DCO consommée étant la somme des quantités de molécules fermentescible dont la concentration a diminué pendant la fermentation secondaire (glucose, lactate, acétate et dans une moindre mesure, formiate et propionate). La DCO produite d'un métabolite correspond à la différence entre sa concentration en fin de fermentation secondaire et en début de la fermentation secondaire. A partir des rendements en H<sub>2</sub> de chaque fermentation (en  $\text{gDCO}_{\text{H}_2} \cdot \text{gDCO}_{\text{consommée}}^{-1}$ ), les rendements en H<sub>2</sub> ont été exprimés en  $\text{mL} \cdot \text{gDCO}_{\text{consommée}}^{-1}$  et présentés en fonction de la concentration en acide initialement ajouté (acétate, butyrate ou lactate) en Figure 3-14-d.

Avec un ajout initial d'acétate, du butyrate et de l'H<sub>2</sub> ont été principalement produits. Le rendement moyen en H<sub>2</sub> était de  $0,07 \pm 0,01 \text{ gDCO}_{\text{H}_2} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  (soit  $95 \pm 16 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ) tandis que le rendement en butyrate a diminué avec l'augmentation de la concentration en acétate, de  $0,7 - 1,1 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  entre 100 et 200 mM d'acétate ajoutés initialement à  $0,3 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  à 300 mM d'acétate ajouté initialement, au bénéfice d'un métabolite non identifié (Figure 3-14-a). La fermentation Ac\_200mM\_18 a fait figure d'exception, avec un rendement de  $0,5 \text{ gDCO}_{\text{Lactate}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  et  $0,1 \text{ gDCO}_{\text{Acetate}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ . Cette exception s'explique par la concentration en glucose résiduel non négligeable disponible (13 mM), en comparaison avec les  $2,6 \pm 2,9 \text{ mM}$  de glucose résiduel disponible en moyenne dans les autres fermentations.

Avec un ajout initial de butyrate, les voies métaboliques ont été plus hétérogènes (Figure 3-14-c). Le butyrate était le métabolite majoritaire, avec  $0,7 \pm 0,3 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  suivi par le lactate ( $0,3$  à  $1,1 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ), le butanol ( $0$  à  $0,4 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ), l'acétate ( $0$  à  $0,2 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ) puis l'H<sub>2</sub>. Le rendement en H<sub>2</sub> a fortement varié, de  $0,02$  à  $0,14 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  avec  $0,08 \pm 0,03 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  en moyenne, soit  $128 \pm 33 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ . Nous estimons que lors de l'ajout initial de butyrate, la présence d'éthanol non quantifié en début de fermentation secondaire a conduit à une sous-estimation de la DCO initialement présente et donc à une surestimation des rendements visualisables au travers du dépassement des  $1 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  (Figure 3-14-b, ligne rouge ; voir méthode de calcul de la concentration en éthanol en partie 2.4.4). Etant données ces surestimations, ces rendements ne sont pas davantage discutés.

Enfin, avec ajout initial de lactate (Figure 3-14-c), les rendements métaboliques ont été similaires à ceux observés en présence d'acétate, avec une production principale de butyrate (de  $0,5$  à  $1 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ) et d'H<sub>2</sub> (de  $0,03$  à  $0,12 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ,  $0,07 \pm 0,03 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$  en moyenne, soit  $95 \pm 39 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ). Dans une moindre mesure, de l'acétate ( $0$  à  $0,1 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ), du valérate ( $0$  à  $0,6 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ) et de l'isobutyrate ( $0$  à  $0,2 \text{ gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ ) ont également été produits.

Ainsi, quel que soit l'acide ajouté, le rendement en H<sub>2</sub> était en moyenne  $106 \pm 32$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·gDCO<sub>consommée</sub><sup>-1</sup>, soit  $8 \pm 2$  % de la DCO consommée, et n'a pas diminué avec l'augmentation de la concentration initiale en acide ajoutée, et ce jusqu'à 200 mM de butyrate, 300 mM de lactate et 300 mM d'acétate (Figure 3-14-d). En comparaison, lors des fermentations primaires, le rendement sans stress acide, avec comme substrat le glucose, s'établissait en moyenne à  $181 \pm 22$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·gDCO<sub>consommée</sub><sup>-1</sup>, soit  $13 \pm 2$  % de la DCO consommée. Le rendement en H<sub>2</sub> lors de ces fermentations secondaires a donc été réduit de 41 % par rapport au rendement atteint en conditions non-inhibitrices. La diminution de la proportion de la DCO convertie en H<sub>2</sub> a été associée, de manière variable en fonction des fermentations, à une augmentation de la proportion du butyrate, du butanol, d'acétate, du valérate, de l'isobutyrate ou du lactate produit.

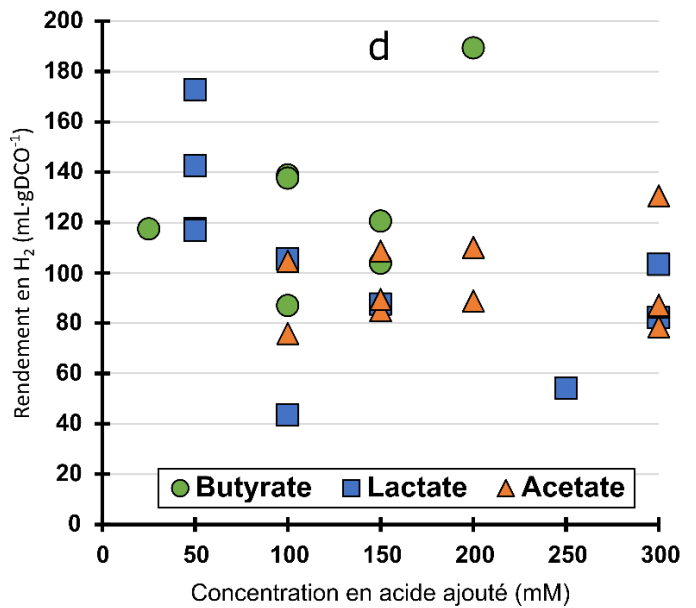
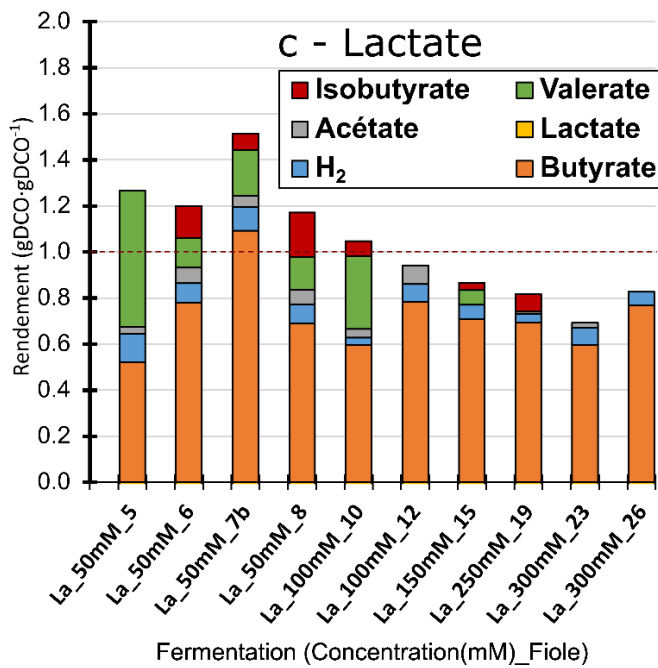
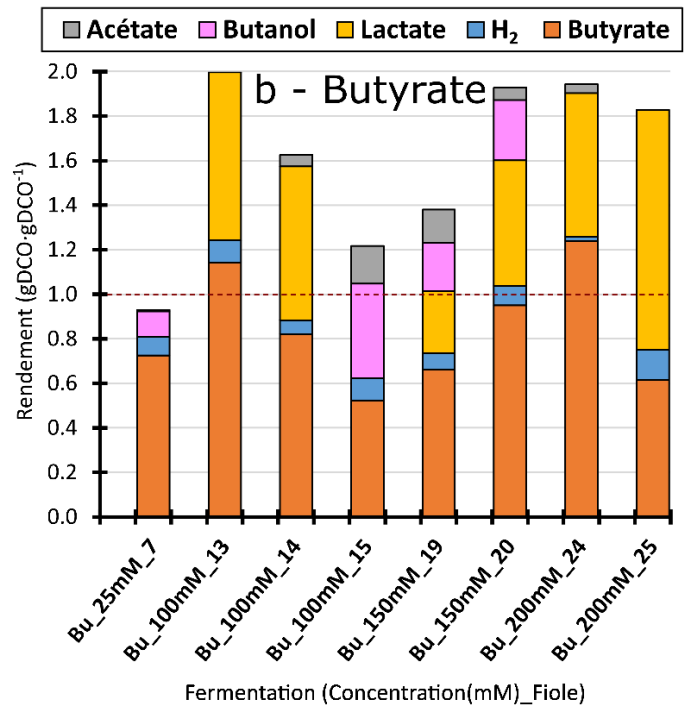
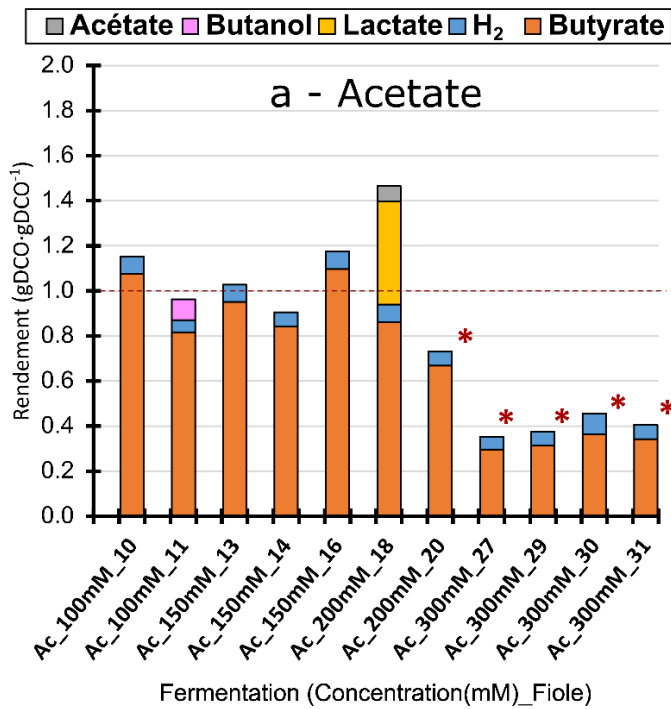
Les rendements en métabolites ont ensuite été convertis afin de les distinguer en fonction du substrat consommé ainsi que pour les comparer avec ceux de la littérature. A partir des rendements métaboliques dont les bilans matières bouclaient à  $\pm 20$  %, des voies métaboliques ont été déterminées (en considérant les concentrations en mole) et ont été présentées en Tableau 3-5. Ce tableau présente également un ensemble non exhaustif de voies métaboliques productrices d'H<sub>2</sub> issues de la littérature pour comparaison. Les voies métaboliques observées dans cette étude ont été classées en quatre types en fonction des substrats consommés :

- (i) les voies consommatrices de glucose ([Equation 3-3-c,d](#))
- (ii) les voies consommatrices de lactate et de glucose ([Equation 3-3-v](#))
- (iii) les voies consommatrices de lactate, de formiate et de glucose ([Equation 3-3-w](#))
- (iv) les voies consommatrices de lactate et d'acétate ([Equation 3-3-x](#))

Par rapport à la Figure 3-14, les rendements en H<sub>2</sub> présentés en Tableau 3-5 ont donc été exprimés, plus spécifiquement, par mole de glucose ou de lactate consommés.

Les rendements en H<sub>2</sub> mesurés spécifiquement lors de la dégradation de glucose au cours des fermentations secondaires (mesurés à 100 – 150 mM de butyrate et 200 mM d'acétate ajoutés initialement) ont varié de 0,4 à 1,0 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>, ce qui était nettement inférieur au rendement de 1,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> mesuré sans inhibition en fermentation primaire. Au cours de ces fermentations secondaires, l'efficacité de production d'H<sub>2</sub> à partir du glucose a donc été réduite, de 37,5 à 75,0 % par rapport aux fermentations primaires en conditions non inhibitrices.





**Figure 3-14 : Rendements métaboliques lors de fermentations secondaires en présence d'acétate initialement ajouté (a), de butyrate initialement ajouté (b), de lactate initialement ajouté (c). Rendement en H<sub>2</sub> en fonction de la concentration initiale en acide ajouté pour les trois types d'acides ajoutés (d). La ligne rouge en pointillé représente le seuil du rendement cible de 1,0 gDCO·gDCO<sup>-1</sup> assurant un bouclage correct du bilan DCO.**

En revanche, lors des fermentations primaires en conditions inhibitrices, comme par exemple à 150 mM de butyrate, le rendement en H<sub>2</sub> était réduit à  $0,74 \pm 0,25 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ . En comparaison, en fermentation secondaire, en présence de la même concentration en butyrate, le rendement en H<sub>2</sub> a été mesuré entre 0,90 et 1,04  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ . De même, avec 200 mM d'acétate ajoutés initialement lors des fermentations primaires, le rendement en H<sub>2</sub> était réduit à  $0,90 \pm 0,20 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ , et a été mesuré à  $0,95 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  en présence de la même concentration en acétate en fermentation secondaire. Ainsi, même si les métabolismes au cours des fermentations secondaires se sont avérés moins efficaces pour produire de l'H<sub>2</sub> à partir de glucose que les métabolismes en absence d'inhibition par les acides, ils ont pu être autant voire plus efficaces que ceux mesurés lors des fermentations primaires, en présence d'acide ajouté. De nouveau, ces résultats suggèrent que l'activité microbienne observée au cours de ces fermentations secondaires présente une résistance aux acides supérieure à celle des *Clostridiaceae* producteurs d'H<sub>2</sub> entrés en croissance en fermentation primaire.

D'autre part, les rendements en H<sub>2</sub> mesurés lors de la consommation de lactate principalement, et dans une moindre mesure de glucose et de formiate, au cours des fermentations secondaires (mesurés à 50 – 150 mM de lactate ou 25 mM de butyrate ajoutés initialement) ont varié de 0,3 à 0,8  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{lactate}}^{-1}$ . En comparaison, les rendements en H<sub>2</sub> lors de la consommation de lactate relevés dans la littérature ont varié majoritairement de 0,6 à 1,0  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{lactate}}^{-1}$  (Tableau 3-5). Bhat and Barker (1947) ont mesuré un rendement bien plus faible de 0,1  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{lactate}}^{-1}$  et Flores et al. (2017) un rendement plus élevé, de 2  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{lactate}}^{-1}$ . Enfin, les rendements en H<sub>2</sub> obtenus à partir de lactate et d'acétate au cours des fermentations secondaires (mesurés à 100 – 200 mM d'acétate ajoutés initialement) ont varié de 0,5 à 0,6  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{lactate}}^{-1}$ . Les rendements en H<sub>2</sub> lors de la consommation de lactate et d'acétate relevés dans la littérature ont varié majoritairement dans le même ordre de grandeur, de 0,4 à 0,6  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{lactate}}^{-1}$ . L'ajout d'acide initialement ne semble donc pas avoir drastiquement impacté l'efficacité de production d'H<sub>2</sub> à partir de lactate ou de lactate et d'acétate au cours de ces fermentations secondaires.

**Tableau 3-5 : Voies métaboliques de production d'H<sub>2</sub> à partir de glucose, de lactate ou de lactate et d'acétate, dans la littérature et dans cette étude. Les équations de réactions dans ce tableau sont référencées avec des lettres, de Equation 3-3-a à Equation 3-4-x »**

Inoculum	Conditions de fermentation	Réaction	Rendement H <sub>2</sub> mol <sub>H<sub>2</sub></sub> ·mol <sup>-1</sup>	Référence Equation	Référence
Culture mixte	/	1 Glucose → 0,75 Butyrate + 0,55 Acétate + 2 CO <sub>2</sub> + 2,5 H <sub>2</sub>	2,5**	a	(Hawkes et al., 2007)
Culture mixte	/	1 Glucose → 0,5 Butyrate + 0,2 Acétate + 0,1 Lactate + 0,1 Formate + 1,2 CO <sub>2</sub> + 1,6 H <sub>2</sub>	1,6**	b	F1
Culture mixte	100 mM Bu, 200 mM Ac	1 Glucose → 0,9 – 1,5 Lactate + 0,2 Acétate + 1,0 – 1,4 Butyrate + 0,4 – 1 H <sub>2</sub>	0,4 – 1**	c	<b>F2</b>
Culture mixte	150 mM Bu	1 Glucose → 0,6 Lactate + 0,5 Acétate + 0,8 Butyrate + 0,9 – 1,0 H <sub>2</sub> + 0,2 Isobutyrate + 0,2 Butanol	0,9 – 1,0**	d	<b>F2</b>
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	136 µM DL – lactate pH > 4	Lactate → 0,4 – 0,5 Acétate + 0,5 – 0,6 EtOH + 0,5 – 0,6 H <sub>2</sub> + 0,6 CO <sub>2</sub>	0,6*	e	(Kandler et al., 1983)
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	/	Lactate → 0,5 Acétate + 0,5 EtOH + H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	1*	f	(BEYNUM, 1943)
<i>Clostridium</i> sp.	111 mM lactate, pH 7	Lactate → 0,5 Acétate + 0,35 Butyrate + 0,1 H <sub>2</sub> + 0,55 CO <sub>2</sub>	0,1*	g	(Bhat and Barker, 1947)
Culture mixte	/	Lactate → 0,6 Ac + 0,5 Bu + 0,55 H <sub>2</sub> + 0,2 Propionate	0,6*	h	(Noblecourt, 2017)
<i>Clostridium termitidis</i> + <i>Clostridium beijerinckii</i>	/	Lactate → 2H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> + Acétate	2,0*	i	(Flores et al., 2017)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	/	Lactate → 0,8 H <sub>2</sub> + 1,16 CO <sub>2</sub> + 0,12 Acétate + 0,26 Butyrate	0,8*	j	(Prabhu et al., 2012)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> P262	/	Lactate + 0,4 Acétate → 0,6 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> + 0,7 Butyrate	0,6*	k	(Diez-Gonzalez et al., 1995)
<i>Clostridium diolis</i> JPCC H-3	/	Lactate + 0,5 Acétate → 0,5 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> + 0,75 Butyrate	0,5*	l	(Matsumoto and Nishimura, 2007)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	/	Lactate + 0,37 Acétate → 0,53 H <sub>2</sub> + 0,97 CO <sub>2</sub> + 0,63 Butyrate	0,5*	m	(Bryant and Burkey, 1955)

<i>Clostridium beijerinckii</i>	111 mM lactate and 133 mM acetate, pH 7	Lactate + 0,48 Acetate → 0,59 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> + 0,65 Butyrate	0,6*	n	(Bhat and Barker, 1947)
<i>Clostridium sp. BPY5 This</i>	/	Lactate + 0,27 Acetate → 0,47 H <sub>2</sub> + 0,52 CO <sub>2</sub> + 0,66 Butyrate	0,5*	o	(Tao, 2016)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	/	Lactate + 0,27 Acetate → 0,09 H <sub>2</sub> + 0,36 CO <sub>2</sub> + 0,65 Butyrate	0,1*	p	(Wu et al., 2012)
	/	Lactate + 0,28 Acetate → 0,16 H <sub>2</sub> + 0,43 CO <sub>2</sub> + 0,69 Butyrate	0,2*	q	
	/	Lactate + 0,42 Acetate → 0,47 H <sub>2</sub> + 0,7 CO <sub>2</sub> + 0,71 Butyrate	0,5*	r	
	/	Lactate + 0,42 Acetate → 0,47 H <sub>2</sub> + 0,7 CO <sub>2</sub> + 0,71 Butyrate	0,5*	s	
	/	Lactate + 0,16 Acetate → 0,21 H <sub>2</sub> + 0,51 CO <sub>2</sub> + 0,66 Butyrate	0,2*	t	
Culture mixte	/	Lactate + 0,28 Acetate → 0,39 H <sub>2</sub> + 0,67 Butyrate	0,4*	u	(Blanco et al., 2019)
Culture mixte	25 mM Bu & 100mM La	1 Lactate + 0,1 – 0,4 Glucose → 0 – 0,2 Acétate + 0,5 – 0,9 Butyrate + 0,1 – 0,4 Propionate + 0,6 – 0,8 H <sub>2</sub> + 0 – 0,1 Butanol	0,6 - 0,8 *	v	<b>F2</b>
Culture mixte	La 50 – 150 mM	1 Lactate + 0,1 – 0,4 Formate + 0 – 0,4 Glucose → 0 – 0,1 Acétate + 0,5 – 0,6 Butyrate + 0 – 0,1 Isobutyrate + 0 – 0,2 Valérate + 0 – 0,2 Propionate + 0,3 – 0,6 H <sub>2</sub>	0,3 - 0,6 *	w	<b>F2</b>
Culture mixte	Ac 100 – 200 mM	1 Lactate + 0,1 – 0,7 Acétate → 0,6 – 0,8 Butyrate + 0,5 – 0,6 H <sub>2</sub>	0,5 - 0,6*	x	<b>F2</b>

F1 = cette étude, fermentation primaire, F2 = cette étude, fermentation secondaire. \* mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>lactate</sub><sup>-1</sup>, \*\* mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>

### 3.3.3.4. Communautés microbiennes

Afin d'identifier les microorganismes impliqués dans ces fermentations secondaires, un séquençage 16S associé à des PCRq ont été réalisés en début et en fin de fermentation secondaire pour 23 fermentations (7 en présence d'acétate, 9 en présence de butyrate, 7 en présence de lactate).

Seuls neufs OTUs ont représenté  $98 \pm 3$  % de l'abondance totale bactérienne pour tous les échantillons, à l'exception d'un échantillon (La\_300mM\_23\_TI, pour lequel un dixième OTU a représenté 58 % de l'abondance totale. Etant donnée que l'abondance absolue de cet OTU a diminué au cours de la fermentation secondaire, il n'a pas été pris en compte. Les neuf OTUs majoritaires ont été identifiés au niveau du genre et de l'espèce quand cela était possible (Tableau 3-6).

**Tableau 3-6 : Identification des OTUs majoritaires entrés en croissance en fermentation secondaire et caractéristiques de ces OTUs d'après la littérature.**

OTU	Famille - Genre	Espèce	% identité	Produits majoritaires _ caractéristiques	Références
1	<i>Clostridiaceae</i> - Clostridium_sensu_stricto_1	<i>butyricum</i>	99,25	Butyrate, Acétate, H <sub>2</sub>	(Masset et al., 2010)
2	<i>Bacillaceae</i> - Bacillus	<i>coagulans</i>	99,53	Lactate / butyrate, acétate, éthanol et H <sub>2</sub>	(De Clerck et al., 2004; Kotay and Das, 2007)
3	<i>Lactobacillaceae</i> - Lactobacillus	<i>Plantarum / pentosus / argentoratensis</i>	96,94	Lactate_ hétérofermentaire facultatif, producteur d'EPS*, producteur de bactériocines	(Morra et al., 2014; Tohno et al., 2012)
4	<i>Clostridiaceae</i> - Clostridium_sensu_stricto_11	<i>guangxiense / acetobutylicum</i>	99,25	Butyrate, H <sub>2</sub> , acétate, solvants_Production d'H <sub>2</sub> à partir de lactate et d'acétate	(Wang and Yin, 2021; Zhao et al., 2017)
5	<i>Carnobacteriaceae</i> - Carnobacterium	<i>viridans / inhibens / jeotgali</i>	100	Lactate, acétate_ LAB, « hétérofermentaire facultatif », bactériocines	(Collins et al., 1987; Drider and Dalgaard, 2007)
6	<i>Clostridiaceae</i> - Clostridium_sensu_stricto_12	<i>tyrobutyricum</i>	98,75	Butyrate, H <sub>2</sub> , acétate_ Production d'H <sub>2</sub> à partir de lactate et d'acétate	(Wang and Yin, 2021)
7	<i>Peptostreptococcaceae</i> - Romboutsia	<i>sedimentorum</i>	99,25	Acétate, formate, lactate, H <sub>2</sub> .	(Gerritsen, n.d.)
8	<i>Lactobacillaceae</i> - Lactobacillus	<i>Lactacaseibacillus rhamnosus / paracasei /</i>	98,11	Lactate_bactériocines	(Hamad et al., 2020)
11	<i>Clostridiaceae</i> - Clostridium_sensu_stricto_12	<i>luticellarii</i>	100	Butyrate_ Corré à la production de caproate et valérate, hydrogénotrophe	(Carlos A. Contreras-Dávila, Johan Esveld, 2021; García-Depraect et al., 2020; Lmg and Soby, 2009; Wang et al., 2015)

\*EPS : exopolysaccharides

Quatre membres de la famille des *Clostridiaceae* ont été identifiés. Il s'agit de *Clostridium butyricum*, *Clostridium guangxiense*, *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium luticellarii*. Ces espèces ont été associées dans la littérature à la production d'H<sub>2</sub> et de butyrate, à l'exception de *C. luticellarii*, qui posséderait une activité hydrogénotrophe, et qui a été corré à

l'accumulation de caproate et de valérate (Baleeiro et al., 2021; Carlos A. Contreras-Dávila, Johan Esveld, 2021). Un membre des *Peptostreptococcaceae*, *Romboutsia sedimentorum* a également été identifié. Cette espèce, proche des *Clostridiaceae*, peut produire de l'acétate, du formiate, du lactate et de l'H<sub>2</sub>. *Weizmannia coagulans* (*Bacillaceae*) et *Lactobacillus plantarum* (*Lactobacillaceae*) sont également retrouvés, favorisés en fermentation primaire par l'ajout d'acide. *Lacticaseibacillus rhamnosus*, également membre des *Lactobacillaceae* a été identifié. Il s'agit d'une espèce productrice de lactate et de bactériocines. Enfin, un membre des *Carnobacteriaceae*, *Carnobacterium* sp. a été retrouvé. Il s'agit d'une espèce productrice de lactate, pouvant produire des bactériocines, mais également qualifiée « d'hétérofermentaire facultatif » pour sa capacité à produire de l'acétate et du formiate.

La concentration cellulaire de ces neuf OTUs a ensuite été calculée en début et en fin de fermentation secondaire afin d'évaluer s'ils sont entrés en croissance ou bien si leur concentration cellulaire a régressé. La Figure 3-15 présente la concentration cellulaire de ces neuf OTUs au début (« TI ») et à la fin (« TF ») de chaque fermentation secondaire considérée, pour l'ajout initial d'acétate (Figure 3-15-a), de butyrate (Figure 3-15-b), ou de lactate (Figure 3-15-c), après normalisation par le nombre de copies 16S par génome (voir méthodologie partie 2.8.2). Les concentrations cellulaires ont fortement varié en fonction des conditions expérimentales, avec entre  $9 \cdot 10^6$  et  $4 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup> (TI et TF confondus), avec en particulier des concentrations cellulaires plus faibles relevées en présence de lactate ajouté initialement. Les échelles des concentrations cellulaires en Figure 3-15 sont donc différentes en fonction de l'acide ajouté initialement.

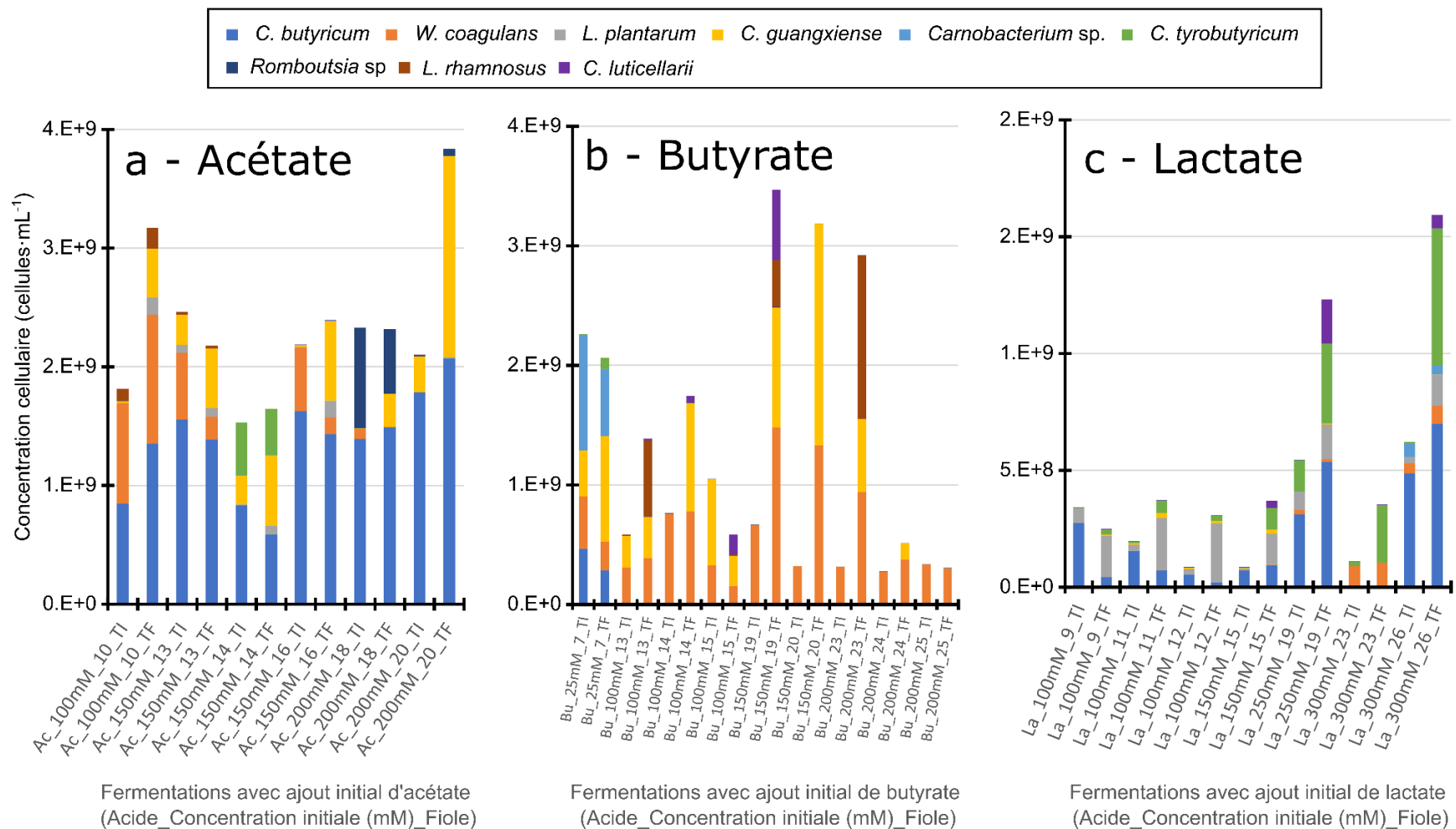
Les espèces majoritaires au début des fermentations secondaires (à TI) lors de l'ajout initial d'acétate étaient *C. butyricum*, *W. coagulans* et *C. guangxiense*, représentant respectivement  $63 \pm 16$  %, jusqu'à 44 % ( $16 \pm 17$  %) et jusqu'à 13 % ( $6 \pm 6$  %) de la concentration cellulaire. Avec l'ajout initial de butyrate, *W. coagulans* et *C. guangxiense* étaient les espèces les plus abondantes à TI, avec  $78 \pm 34$  % et jusqu'à 68 % de la concentration cellulaire. Enfin, avec l'ajout initial de lactate, *C. butyricum*, *W. coagulans* et *L. plantarum* étaient les espèces les plus abondantes, avec respectivement  $53 \pm 26$  %, jusqu'à 74 % ( $12 \pm 27$  %) et jusqu'à 46 % ( $21 \pm 14$  %) de la concentration cellulaire. Les différences entre ces communautés microbiennes et celles analysées en fin de phase primaire (3.2.5.5) peuvent s'expliquer par la latence entre les deux périodes, variant de moins de un jour à huit jours. De plus, les prélèvements de milieu fermentaire à « TI » peuvent avoir été réalisés plusieurs heures après le début de la production d'H<sub>2</sub> en phase secondaire, les communautés microbiennes productrices d'H<sub>2</sub> ont donc pu entrer en croissance.

En fin des fermentations secondaires (à TF), lors de l'ajout initial d'acétate, les espèces majoritaires étaient *C. butyricum* et *C. guangxiense*, avec  $53 \pm 15$  % et  $23 \pm 11$  % de la concentration bactérienne, respectivement. Lors de l'ajout initial de butyrate, *W. coagulans*,

*C. guangxiense* et *L. rhamnosus* étaient les plus abondants, avec respectivement  $42 \pm 28$  % (de 10 à 98 %),  $28 \pm 18$  % (de 0 à 56 %) et jusqu'à 65 % ( $17 \pm 18$  %). Enfin, lors de l'ajout initial de lactate, *L. plantarum*, *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum* étaient les espèces les plus abondantes, avec respectivement  $45 \pm 35$  % (jusqu'à 88 %),  $15 \pm 13$  % (jusqu'à 34 %) et  $31 \pm 26$  % (jusqu'à 79 %) de la concentration cellulaire. Enfin, la concentration cellulaire totale a évolué de manière très variable entre TI et TF, allant d'une diminution d'un facteur 0,6 à une augmentation d'un facteur 13,5.

Pour identifier clairement quels OTUs sont entrés en croissance au cours des fermentations secondaires, une représentation de la croissance cellulaire en fonction de la fermentation considérée est présentée, pour l'ajout initial d'acétate (Figure 3-16, panneau de gauche), de butyrate (Figure 3-16, panneau central), ou de lactate (Figure 3-16, panneau de droite). Pour aboutir à cette représentation, pour chaque OTU de chaque fermentation, la différence entre sa concentration cellulaire à TF et sa concentration cellulaire à TI a été calculée. Dans les cas où cette différence était négative, *i.e.*, lorsque l'OTU n'est pas entré en croissance, la valeur zéro a été assignée à sa croissance. La croissance des OTUs a été représentée en pourcentage de la croissance totale pour chaque fermentation considérée.

Lors de l'ajout initial d'acétate, la croissance bactérienne a été dominée par *C. guangxiense* à des concentrations supérieures à 100 mM, représentant  $74 \pm 11$  % de la croissance totale. Avec 100 mM d'acétate initialement ajouté, la croissance de *C. guangxiense* représentait 22 à 40 % de la croissance totale, et deux cas se sont distingués. En fermentation Ac\_100mM\_10, la croissance bactérienne a été dominée par *C. butyricum*, *L. plantarum* et *W. coagulans*, avec respectivement 30 %, 18 % et 14 % de la croissance totale, alors qu'en fermentation Ac\_100mM\_11, *Rumeliibacillus* sp. (OTU 14) représentait 59 % de la croissance totale. *Rumeliibacillus* sp. avait déjà été identifié en fermentations primaires. Son abondance augmentait alors avec la concentration en acétate ajouté. Son activité métabolique a peu été décrite dans la littérature, mais il a été identifié au cours de fermentation en culture mixte avec du glucose comme substrat, et son abondance corrélait négativement avec la production d' $H_2$  et positivement avec la production de butyrate (Marcelo Navarro-Díaz a, c, Valeria Aparicio-Trejo a, Idania Valdez-Vazquez b, Julián Carrillo-Reyes b, 4 Morena Avitia a, 2022). *C. butyricum*, espèce dont de fortes abondances ont été mesurées lors des fermentations primaires, a également montré une croissance en présence de 200 mM d'acétate ajouté initialement, mais à hauteur de 18 % et 28 % de la croissance totale seulement. Enfin, *L. plantarum* est entré en croissance, représentant 30 % de la croissance totale à 150 mM d'acétate ajouté (Ac\_150mM\_14 et Ac\_150mM\_16).



**Figure 3-15 : Concentration cellulaire (nombre de cellules·mL<sup>-1</sup>) des neuf OTUs majoritaires en début (TI) et en fin (TF) des fermentations secondaires considérées, en présence d'acétate ajouté initialement (a), de butyrate ajouté initialement (b) et de lactate ajouté initialement (c). La fermentation Ac 100mM 11 a été exclue de cette représentation à cause d'une concentration trop élevée. L'échelle des ordonnées diffère en (c) par rapport à (a) et (b).**

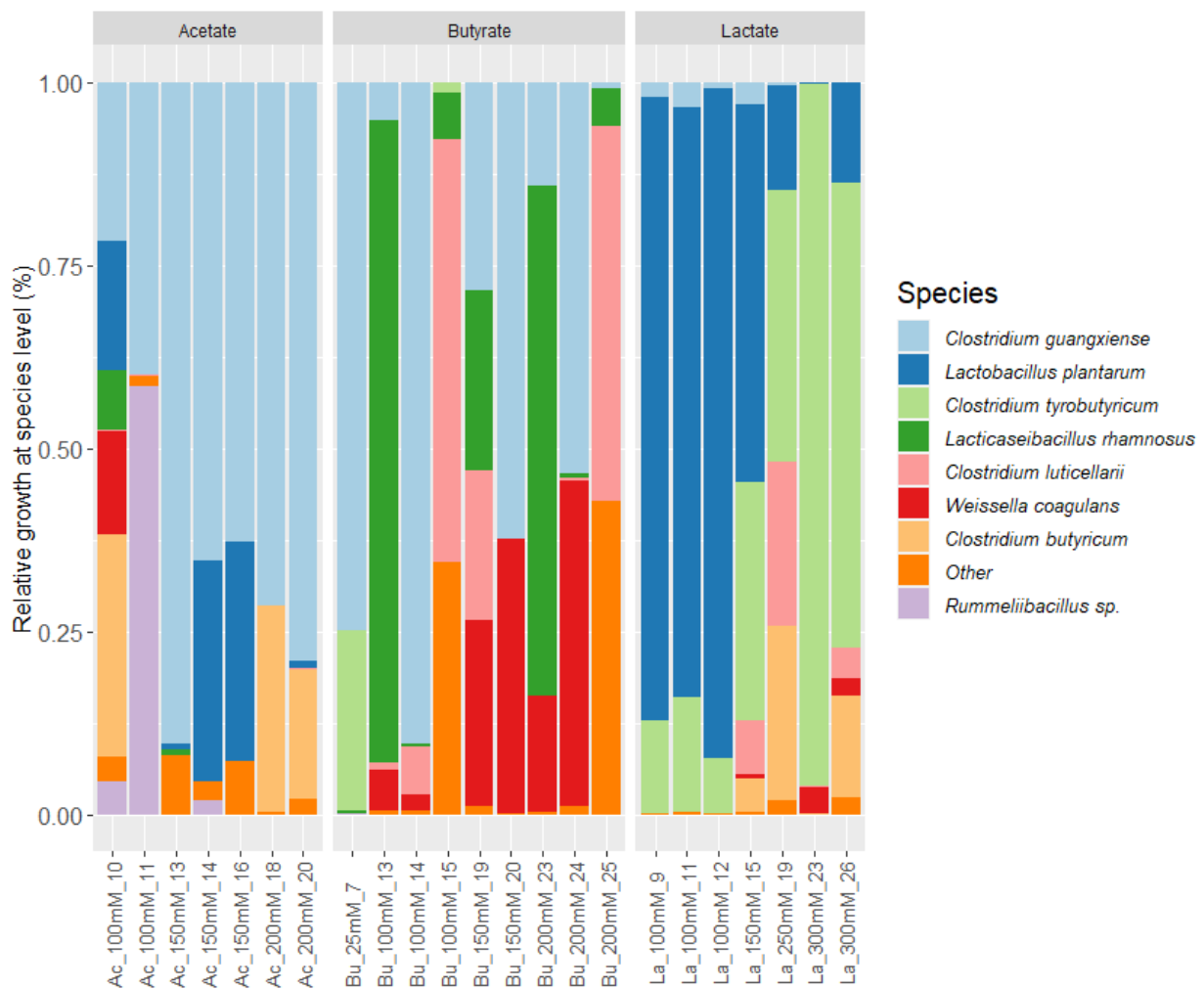


Ainsi, parmi les OTUs ayant montré une croissance en présence d'acétate initialement ajouté, *Rummelibacillus sp.* n'a pas été identifié à notre connaissance comme producteur d'H<sub>2</sub> et *L. plantarum* a été identifié comme producteur de lactate (Tohno et al., 2012). La croissance de *C. butyricum* restant limitée, *C. guangxiense* apparaît donc comme l'espèce la plus probablement responsable de la production d'H<sub>2</sub> au cours de ces fermentations secondaires en présence d'acétate ajouté initialement. *C. guangxiense* a été isolée en 2017 et identifiée comme productrice d'H<sub>2</sub> à partir de glucose, mais a été peu décrite dans la littérature (Zhao et al., 2017). Cette espèce est proche de *Clostridium acetobutylicum*, qui possède la capacité de produire de l'H<sub>2</sub>, notamment à partir de lactate et d'acétate (Diez-Gonzalez et al., 1995). De plus, Cho et al. (2012) ont observé que la croissance (mesurée par densité optique à 600 nm) de *C. acetobutylicum* à partir de glucose augmentait de 1,4 à 2,1 avec l'ajout de 145 mM d'acétate. Potentiellement, *C. guangxiense* serait également capable de produire de l'H<sub>2</sub> à partir de lactate et d'acétate, et pourrait présenter une certaine résistance à l'acétate.

Lors de l'ajout initial de butyrate, *C. guangxiense*, *C. luticellarii*, *L. rhamnosus* et *W. coagulans* ont principalement montré une croissance, représentant respectivement jusqu'à 90 %, 58 %, 88 % et 44 % de la croissance totale. Toutefois, aucune tendance entre la croissance relative des différents OTUs et la concentration en butyrate ajouté initialement n'a pu être relevée. La croissance de *C. butyricum*, principal producteur d'H<sub>2</sub> lors des fermentations primaires, a été totalement inhibée lors de ces fermentations secondaires en présence de butyrate ajouté (visualisable *via* la Figure 3-15 précédente). *C. luticellarii* est une espèce proche de *Clostridium ljungdahlii*, bactérie homoacétogène, et possède les gènes nécessaires pour réaliser la voie de Wood-Ljungdahl, ce qui suggère qu'il posséderait également une activité homoacétogène (Lmg and Soby, 2009). Par ailleurs, la culture de *C. luticellarii* en présence de rhamnose a été associée à la production de butyrate (Wang et al., 2015) et son abondance a été corrélée à la production de caproate et de valérate en culture mixte (Carlos A. Contreras-Dávila, Johan Esveld, 2021). Enfin, *L. rhamnosus* est connu pour sa production de lactate et de bactériocine (Hamad et al., 2020). Concernant *W. coagulans*, son activité métabolique est questionnable, étant donné qu'il est connu comme producteur de lactate principalement (De Clerck et al., 2004) mais que certaines souches ont été utilisées pour produire de l'H<sub>2</sub> (Kotay and Das, 2007; Lertsriwong and Glinwong, 2020). Pour rappel, en fermentation primaire, sa croissance a été associée à une production de lactate uniquement. Enfin, uniquement en fermentation Bu\_100mM\_15, la croissance de deux OTUs à hauteur de 13 % de la croissance totale chacun a été observée. Ces deux OTUs ont été identifiés en tant que membres des *Clostridiaceae*, mais ne sont pas identifiables au niveau de l'espèce.

Finalement, parmi les OTUs montrant une croissance en présence de butyrate initialement ajouté, *C. guangxiense* semble de nouveau avoir été le principal producteur d'H<sub>2</sub>, et semble présenter une résistance, jusqu'à 200 mM de butyrate. Dans une moindre mesure, *C. tyrobutyricum* a également dû être à l'origine d'une production d'H<sub>2</sub> au cours de la

fermentation Bu\_25mM\_7, sa croissance relative s'élevant à 25 % (avec 75 % de *C. guangxiense*). Au cours de cette fermentation, du lactate a été consommé, ce qui est cohérent avec la capacité de production d'H<sub>2</sub> de *C. tyrobutyricum* à partir de lactate (García-Depraect et al., 2021a; Jo et al., 2008; Wu et al., 2012).



**Figure 3-16 : Croissance relative des OTUs majoritaires en fonction de l'acide exogène ajouté et de sa concentration. La croissance relative d'un OTU représente l'augmentation de sa concentration cellulaire par rapport à l'augmentation totale de la concentration cellulaire. Ac = acétate, Bu = butyrate, La = lactate.**

Enfin, avec ajout initial de lactate, la croissance bactérienne a été partagée entre *L. plantarum*, et *C. tyrobutyricum* principalement, avec un effet de la concentration en lactate ajouté. En effet, *L. plantarum* a dominé la croissance cellulaire à 100 et 150 mM de lactate ajouté, représentant  $86 \pm 5$  % et 52 % de la croissance totale, respectivement, mais n'a représenté que 0 % à 14 % de la croissance totale à 250 et 300 mM de lactate ajouté. À l'inverse, la croissance de *C. tyrobutyricum* a représenté  $12 \pm 5$  % et 33 % de la croissance totale à 100 et 150 mM de lactate ajouté, respectivement, et 37 % à 96 % de la croissance totale à 250 et 300 mM de lactate. Dans une moindre mesure, *C. luticellarii* et *C. butyricum*

ont également montré une croissance, représentant 5 % à 24 % et 4 % à 22 % de la croissance totale respectivement, à des concentrations en lactate supérieures à 100 mM.

La croissance relative de *C. guangxiense* a donc été faible en présence de lactate initialement ajouté, représentant au maximum 0,03 % de la croissance totale, malgré sa présence détectée dans les milieux de culture à TI et à TF. Potentiellement, *C. guangxiense* ne posséderait pas la capacité de métaboliser le L-Lactate, principal substrat lors des fermentations en présence de lactate ajouté. Néanmoins, le gène codant pour une L-Lactate déshydrogénase (locus tag : LQK79\_RS20615) a été identifié dans le génome de *C. guangxiense* (Accession : NZ\_JAJNKE010000081.1). Alternativement, son absence de croissance peut avoir été liée à une inhibition par le lactate à 100 mM.

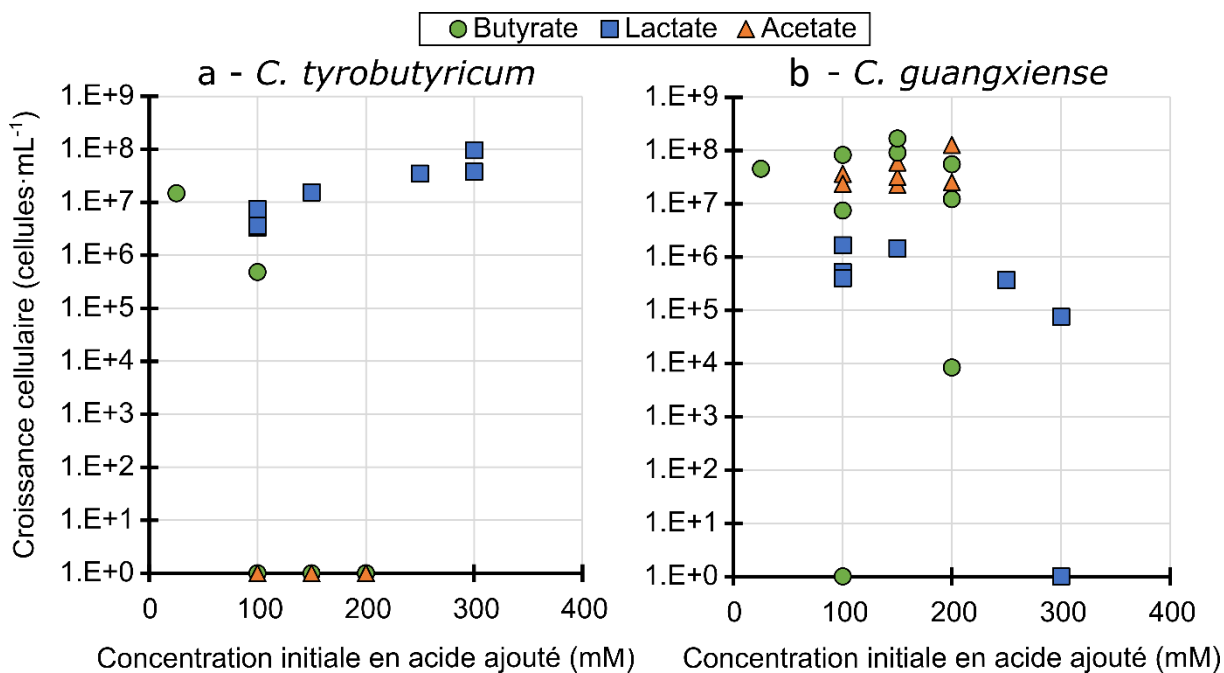
La production d'H<sub>2</sub> en présence de lactate ajouté initialement semble donc avoir été principalement attribuée à la croissance de *C. tyrobutyricum*, producteur d'H<sub>2</sub> à partir de lactate, d'acétate et de glucose (Marchal and Vandecasteele, 1990; Zhu and Yang, 2003). Concernant la résistance aux acides de cette espèce, Marchal and Vandecasteele (1990) ont observé une inhibition de sa croissance (un lessivage) lors de sa culture en continu à partir de glucose à pH 5,8, lors de l'ajout de 167 mM d'acétate ou de 113 mM de butyrate. Néanmoins, l'augmentation de la charge organique de 2,0 à 5,0 g<sub>glucose</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> a réduit l'effet inhibiteur du butyrate, puisque son ajout n'a pas induit de lessivage. Potentiellement, la moindre croissance de *C. tyrobutyricum* avec ajout initial d'acétate ou de butyrate peut avoir été due à l'inhibition de sa croissance par l'acétate ou le butyrate ajoutés.

Afin d'approfondir la tolérance aux acides de *C. guangxiense* et *C. tyrobutyricum*, la Figure 3-17 présente leur croissance en fonction de la concentration en l'acide ajouté initialement et pour les différents types d'acides ajoutés.

La croissance de *C. tyrobutyricum* a augmenté en présence de L-lactate proportionnellement à la concentration ajoutée, de 3·10<sup>6</sup> - 7·10<sup>6</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> jusqu'à 4·10<sup>7</sup> - 1·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>. L'augmentation de sa croissance s'explique par la consommation du lactate ajouté initialement comme substrat. Néanmoins, *C. tyrobutyricum* n'a pas montré de croissance en présence d'acétate ajouté, et seulement dans des cas isolés à 25 mM et 100 mM de butyrate ajoutés, atteignant 1·10<sup>7</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> avec 25 mM de butyrate initialement ajouté et 5·10<sup>5</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> avec 100 mM. Du lactate était présent en ces conditions d'ajout initial de butyrate ou d'acétate, respectivement à hauteur de 37 ± 10 mM et 73 ± 20 mM. Il est néanmoins possible que ce lactate ait été au moins partiellement du D-Lactate. La capacité de *C. tyrobutyricum* à le métaboliser a donc été questionnée. Dans son génome (NZ\_CP014170.1), des L-lactate déshydrogénases ont été identifiées (locus tag : CTK\_RS03605, CTK\_RS05715), mais pas de D-lactate déshydrogénase. Néanmoins, le génome de *C. tyrobutyricum* contient des lactates racémase dépendantes au nickel (Locus tag : CTK\_RS02450, CTK\_RS07575). Comme leur nom l'indique, les lactate racémases permettent

aux microorganismes pourvus d'une seule version (L ou D) des lactate-déhydrogénases stéréospécifiques d'isomériser le lactate disponible pour pouvoir le métaboliser (Desguin et al., 2014). Cette enzyme n'était peut-être pas active dans nos conditions de culture, restreignant la croissance de *C. tyrobutyricum*. La quantité de Ni disponible, de 0,53  $\mu\text{M}$ , a éventuellement pu être limitante.

*C. guangxiense* a globalement été peu affecté par 50 à 200 mM de butyrate puisque sa croissance cellulaire s'est élevée entre  $1 \cdot 10^7$  et  $2 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup> à deux exceptions près (Seulement  $1 \cdot 10^3$  et  $7 \cdot 10^6$  cellules·mL<sup>-1</sup> en Bu\_200mM\_25 et Bu\_100mM\_13, respectivement). Sa croissance a également été peu affectée par la concentration en acétate, jusqu'à 200 mM, avec entre  $2 \cdot 10^7$  et  $1 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>. *C. guangxiense* a également montré une croissance en présence de lactate, avec jusqu'à  $2 \cdot 10^6$  cellules·mL<sup>-1</sup>, mais cette croissance diminue avec l'augmentation de la concentration en lactate, atteignant de moins de 100 cellules·mL<sup>-1</sup> à  $8 \cdot 10^4$  cellules·mL<sup>-1</sup> avec 300 mM de lactate ajouté initialement. *C. guangxiense* était donc visiblement moins compétitif que *C. tyrobutyricum* lors d'ajout initial de lactate.



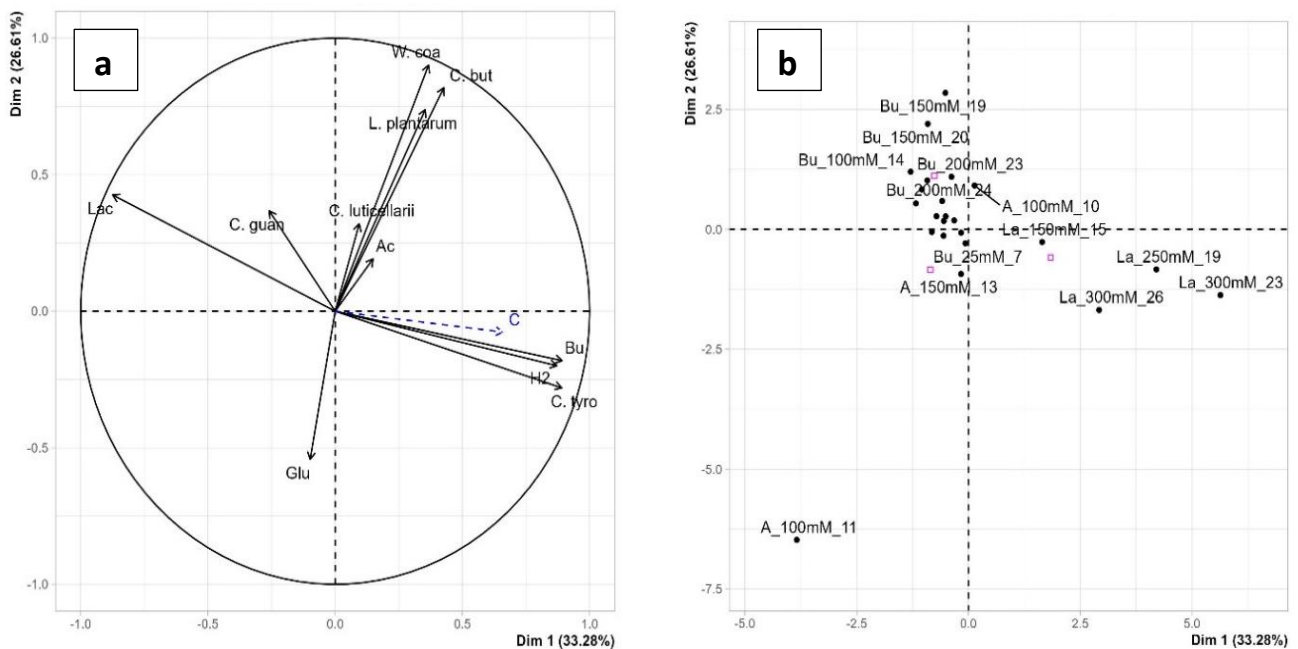
**Figure 3-17 : Croissance de *C. tyrobutyricum* (a) et de *C. guangxiense* (b) en fonction de la concentration initiale en acide ajouté et de l'acide ajouté.**

### 3.3.3.5. Analyse multivariée

Afin d'explorer les liens entre la croissance microbienne, les activités métabolites, la nature des acides ajoutés initialement et leurs concentrations, une analyse en composantes principales a été réalisée. La Figure 3-18-a-b présente les graphiques des individus et des variables, respectivement.

Les variables introduites dans l'analyse étaient :

- les différences de concentrations entre la fin des fermentations secondaires et leur début : en glucose (Glu), acétate (Ac), butyrate (Bu) et lactate (Lac),
- les différences de concentrations cellulaires, entre la fin des fermentations secondaires et leur début : de *W. coagulans* (*W. coa*), *L. plantarum*, *C. guangxiense* (*C. guan*), *C. tyrobutyricum* (*C. tyro*), *C. butyricum* (*C. but*) et *C. lenticellarii*,
- Les différences de volume d'H<sub>2</sub> cumulé produit (en mL) entre la fin des fermentations secondaires et leur début.



**Figure 3-18 : Analyse en composantes principale. Graphique des variables de l'ACP (a), Graphique des individus de l'ACP (b).**

La variance expliquée par les dimensions 1 et 2 s'est élevée à 23 % et 34 % respectivement, soit un total de 57 % de la variance expliquée. La première dimension corrélait significativement avec la production de butyrate (coefficient de corrélation  $\rho = 0,88$ , p-value =  $10^{-8}$ ), d'H<sub>2</sub> ( $\rho = 0,86$ , p-value =  $10^{-7}$ ), la croissance de *C. tyrobutyricum* ( $\rho = 0,83$ , p-value =  $10^{-6}$ ) et avec la consommation de lactate ( $\rho = -0,94$ , p-value =  $10^{-11}$ ). Ce résultat tend à confirmer la production d'H<sub>2</sub> et de butyrate à partir de lactate par *C. tyrobutyricum* suggérée précédemment. La dimension 2 corrèle significativement avec la croissance de *W. coagulans* ( $\rho = 0,76$ , p-value =  $10^{-5}$ ), la croissance de *C. lenticellarii* ( $\rho = 0,64$ , p-value =  $10^{-3}$ ), la production d'acétate ( $\rho = 0,67$ , p-value =  $10^{-4}$ ) et la consommation de glucose ( $\rho = 0,85$ , p-value =  $10^{-7}$ ). Ce résultat peut suggérer que *W. coagulans* n'exerçait potentiellement pas une fermentation homolactique, mais produisait de l'acétate, comme cela a déjà été observé dans la littérature (Kotay and Das, 2007). Enfin, la troisième dimension, non représentée et représentant 13 %

de la variance, corrélait significativement avec *C. guangxiense* ( $\rho = 0,76$ ,  $p\text{-value} = 10^{-5}$ ) et avec la consommation d'acétate ( $\rho = 0,63$ ,  $p\text{-value} = 10^{-3}$ ). Ceci tend à confirmer l'hypothèse suggérant que, comme *C. acetobutylicum*, *C. guangxiense* utiliserait l'acétate comme co-substrat, lors de la consommation du glucose ou du lactate.

Etonnamment, *C. guangxiense* n'est pas apparu corrélé significativement avec la production d' $H_2$  dans cette analyse. Cela pourrait être attribué aux faibles quantités d' $H_2$  qui lui ont été associées en comparaison avec les productions d' $H_2$  relevées dans l'expérience avec l'ajout de lactate lors de la croissance de *C. tyrobutyricum*, à savoir jusqu'à 315 mL et 649 mL, respectivement. Néanmoins, en prenant en compte les rendements en métabolites dans l'analyse en remplacement des quantités produites / consommées de métabolites (pour l' $H_2$ , l'acétate, le butyrate et le lactate), *C. guangxiense* n'est de nouveau pas apparu corrélé significativement avec ces facteurs. Eventuellement, la multiplicité des métabolismes simultanés, voire l'interdépendance des métabolismes, comme la production potentielle d' $H_2$  à partir de lactate produit par dégradation du glucose, complexifient l'identification des activités de chaque OTU.

Par ailleurs, en comparant les rendements en métabolites ainsi que les substrats consommés dans les conditions où la croissance de *C. guangxiense* a été prépondérante, comme par exemple, en conditions Ac\_150mM\_13 et Bu\_100mM\_14, conditions dans lesquelles sa croissance représentait 90 % de la croissance totale, de grandes distinctions ont été notables. En effet, la fermentation Ac\_150mM\_13 a été associée à une consommation principale de lactate (6,1  $g_{DCO}$ ) et d'acétate dans une moindre mesure (1,3  $g_{DCO}$ ) ainsi qu'à une production exclusive de butyrate (1,0  $g_{DCO} \cdot g_{DCO}^{-1}$ ) et d' $H_2$  (85  $mL \cdot g_{DCO}^{-1}$ ). En comparaison, la fermentation Bu\_100mM\_14 a été associée à une consommation de glucose uniquement (3,7  $g_{DCO}$ ), ainsi qu'à une production de butyrate (0,8  $g_{DCO} \cdot g_{DCO}^{-1}$ ), d' $H_2$  (87  $mL \cdot g_{DCO}^{-1}$ ), d'acétate (0,1  $g_{DCO} \cdot g_{DCO}^{-1}$ ) et de lactate (0,7  $g_{DCO} \cdot g_{DCO}^{-1}$ ) (La surestimation du bilan DCO total provient sans doute de la sous-estimation voire de la non identification d'un substrat). Ainsi, soit la croissance cellulaire des différents OTUs n'est pas corrélable linéairement avec les productions métaboliques, soit *C. guangxiense* change de métabolisme en fonction de paramètres non différenciables dans nos conditions expérimentales, comme les substrats disponibles et éventuellement le stress acide.

#### 3.3.4. Conclusion

En conclusion, le prolongement de l'incubation de communautés microbiennes en présence d'acétate, de butyrate ou de lactate, pendant une durée de cinq à neuf jours, a permis d'observer la croissance de bactéries productrices d' $H_2$ . Lors de ces fermentations secondaires, les productions d' $H_2$  ont atteint jusqu'à 273, 171 et 650 mL avec un ajout initial d'acétate, de butyrate ou de lactate, sans diminution du volume d' $H_2$  produit avec la

concentration initiale en acide ajouté. Cette production d'H<sub>2</sub> représentait jusqu'à 180 % des 361 ± 43 mL d'H<sub>2</sub> produits en fermentation primaire, en absence d'acides ajoutés. Principalement, du lactate et de l'acétate ont été consommés lors de l'ajout initial d'acétate ; du glucose a été consommé lors de l'ajout initial de butyrate ; et enfin, du lactate a été consommé principalement lors de l'ajout initial de lactate.

Les rendements en H<sub>2</sub> à partir de lactate, et de lactate couplé à de l'acétate, ont été similaires à ceux recensés dans la littérature, variant respectivement de 0,3 à 0,8 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>lactate</sub><sup>-1</sup> et de 0,5 à 0,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>lactate</sub><sup>-1</sup>, suggérant que les métabolismes observés n'étaient pas drastiquement affectés par les conditions expérimentales, et notamment les concentrations en acide. En revanche, les rendements en H<sub>2</sub> obtenus à partir de glucose se sont élevés entre 0,4 et 1,0 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> et ont donc été restreints en comparaison avec le rendement de 1,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> atteint en fermentation primaire, sans inhibition.

Les microorganismes entrés en croissance au cours de ces fermentations secondaires n'avaient pas été identifiés au cours des fermentations primaires. *C. guangxiense* a été identifié comme potentiel producteur d'H<sub>2</sub> jusqu'à 200 mM d'acétate ou de butyrate, tandis que la croissance de *C. tyrobutyricum* a été associée à la production d'H<sub>2</sub> jusqu'à 300 mM de lactate. Au cours de ces fermentations dites secondaires, l'activité microbienne, tous substrats confondus, a été associée à un rendement en H<sub>2</sub> de 106 ± 32 mLH<sub>2</sub>·gDCO<sub>consommée</sub><sup>-1</sup>, indépendamment de la concentration en acide ajouté ou de sa nature, soit 59 % du rendement en H<sub>2</sub> obtenu sans inhibition en fermentation primaire. La croissance de *C. guangxiense* n'a pas été négativement affectée par la concentration initiale en acide ajouté jusqu'à 200 mM d'acétate et 100 – 200 mM de butyrate, mais a présenté une croissance réduite de façon dose-dépendante en lien avec l'augmentation des concentrations initiales en lactate ajouté de 100 mM à 300 mM. A l'inverse, la croissance de *C. tyrobutyricum* a augmenté de façon dose-dépendante avec l'ajout initial de 100 à 300 mM de lactate, a été totalement inhibée avec ajout initial d'acétate dès 100 mM, et totalement inhibée avec ajout de butyrate, dès 150 mM.

De plus, la croissance de ces espèces a été observée malgré la croissance préalable ou concomitante d'espèces potentiellement antagonistes telles que *W. coagulans* et *L. plantarum*. *C. guangxiense* et *C. tyrobutyricum* présentent donc potentiellement une résistance au stress induit par la croissance de bactéries lactiques. Cette caractéristique peut être un avantage d'intérêt dans le contexte d'instabilité des réacteurs de fermentation, en lien avec l'installation progressive des bactéries lactiques dans l'écosystème.

### 3.4. Adaptation de consortium microbien à un stress acide

#### 3.4.1. Avant-propos

La présence d'acides organiques a induit une réduction de la production d'H<sub>2</sub> en affectant (i) la structure de la communauté microbienne, (ii) la consommation du substrat disponible par cette communauté, ainsi que (iii) les rendements métaboliques, notamment en favorisant la production de lactate. Néanmoins, la prolongation de l'incubation de la culture microbienne pendant neuf jours en présence d'acides organiques et de substrats résiduels a permis de mettre en évidence une production d'H<sub>2</sub> secondaire assurée par un écosystème microbien distinct de l'écosystème producteur d'H<sub>2</sub> lors des fermentations primaires. La prolongation de l'incubation en présence d'acides a ainsi permis d'observer une « adaptation » de l'écosystème microbien, et a favorisé une dégradation plus poussée des substrats en H<sub>2</sub>. Les stratégies d'adaptation de consortia microbiens aux stress acides sont donc apparues comme des pistes d'intérêt afin de réduire l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides organiques. L'objectif de cette partie a donc été d'investiguer l'intérêt d'une stratégie d'adaptation d'un consortium microbien au stress acide pour l'optimisation de la production d'H<sub>2</sub>.

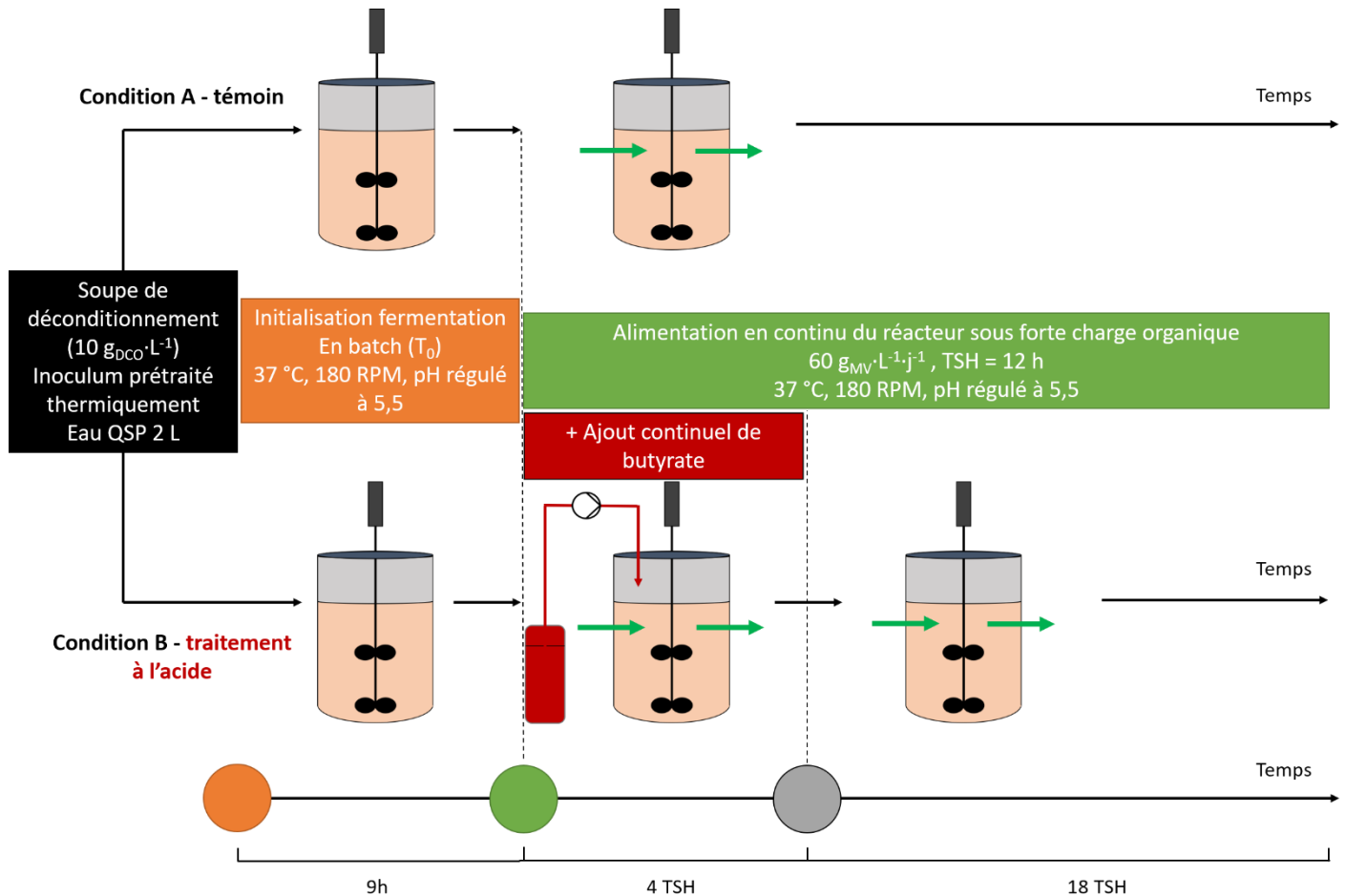
Par ailleurs, lors de la fermentation d'un substrat complexe, la présence d'une flore indigène au substrat, compétitrice avec l'inoculum exogène a été préalablement mise en évidence (Dauplain, 2022). Cette flore indigène a pu entrer en croissance et ainsi être à l'origine d'une activité délétère ou au contraire positive pour la production d'H<sub>2</sub> (Dauplain, 2022). Dans le contexte de l'adaptation d'un inoculum au stress acide avec alimentation par un substrat complexe, le développement de microorganismes compétiteurs, provenant notamment de la flore indigène du substrat, apparaît comme un paramètre pouvant fortement impacter le succès de la stratégie d'adaptation. L'expérience d'adaptation présentée dans ce chapitre a donc été réalisée en utilisant un substrat complexe, une soupe de déconditionnement reconstituée, afin de tenir compte de ces effets de compétitions, majeurs pour une application à plus grande échelle.

D'autre part, le butyrate a été identifié comme l'acide inhibant le plus fortement la production d'H<sub>2</sub>. La stratégie appliquée a donc visé à sélectionner des microorganismes résistants à cet acide. Pour ce faire, du butyrate a été progressivement ajouté durant 48 h à une culture microbienne réalisée en mode continu, et ce jusqu'à atteindre 100 mM de butyrate dans le milieu de culture. La concentration de 100 mM a été choisie de manière à susciter un effet inhibiteur, sans toutefois lessiver le réacteur. La durée de 48 h a été choisie considérant qu'il fallait 24 à 48 h d'incubation en présence de butyrate, en fiole et en batch, pour voir émerger une activité microbienne productrice d'H<sub>2</sub>.

Plus précisément, la fermentation a été conduite avec un temps de séjour de 12 h, un pH de 5,5 et à 37 °C afin de produire des résultats comparables avec la littérature et de procurer des conditions de fermentation *a priori* propices à la production d'H<sub>2</sub> (Huang et al., 2012). La



charge appliquée de  $60 \text{ g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}_{\text{réacteur}}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$  a été calculée suite à des batch préliminaires qui ont indiqué (en extrapolant d'après la production d' $\text{H}_2$ ) que le substrat était consommé à une vitesse maximale approximative de  $20 \text{ g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}_{\text{réacteur}}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ . La surcharge appliquée a eu pour but de générer une forte activité microbienne productrice d'acides, et donc de se placer en conditions de stress acide endogène.



**Figure 3-19 : Illustration de la procédure expérimentale appliquée pour évaluer l'effet d'un stress initial au butyrate sur la production d' $\text{H}_2$  par fermentation sombre en mode continu**

Ces travaux ont fait l'objet de la publication d'un article scientifique dans la revue *Energie*, acceptée le 27 mai 2022 et intitulé « *Enhanced fermentative hydrogen production from food waste in continuous reactor after butyric acid treatment* ».

### 3.4.2. Abstract

## Enhanced fermentative hydrogen production from food waste in continuous reactor after butyric acid treatment

Marie Céline Noguier<sup>1,\*</sup>, Jose Antonio Magdalena<sup>1,2</sup>, Nicolas Bernet<sup>1</sup>, Renaud Escudie<sup>1</sup> and Eric Trably<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRAE, Univ Montpellier, LBE, 102 Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France ; marie.noguier@inrae.fr

<sup>2</sup> Vicerrectorado de Investigacion y Transferencia de la Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid

End-products accumulation during dark fermentation leads to process instability and hydrogen production inhibition. To overcome this constraint, microbial community adaptation to butyric acid can induce acid tolerance and thus enhance the hydrogen yields. However, adaptation and selection of appropriate microbial communities remains uncertain when dealing with complex substrates in a continuous fermentation mode. To address this question, a reactor fed in continuous mode with food waste (organic loading rate of 60 g<sub>VS</sub>.L.d<sup>-1</sup> ; 12 h hydraulic retention time) was first stressed for 48 h with increasing concentrations of butyric acid (up to 8.7 g.L<sup>-1</sup>). Performances were compared to a control reactor (unstressed) for 13 days. During 6-days steady-state, the pre-stressed reactor produced 2.2 ± 0.2 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> which was 48 % higher than in the control reactor (1.5 ± 0.2 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup>). The pretreatment also affected the metabolites distribution. The pre-stressed reactor presented a higher production of butyric acid (+ 44 %) achieving up to 3.8 ± 0.3 g.L<sup>-1</sup>, a lower production of lactic acid (- 56 %) and an enhancement of substrate conversion (+ 9 %). The performance improvement was attributed to the promotion of *Clostridium guangxiense*, a hydrogen -producer, with a relative abundance increasing from 22 % in the unstressed reactor to 52 % in the stressed reactor.

**Keywords:** biohydrogen, butyric acid, dark fermentation, inhibition, microbial communities, start-up

### 3.4.3. Introduction

Hydrogen (H<sub>2</sub>) has gained a considerable interest in the recent years in the biofuel field due to its high energy content and clean combustion (Singh et al., 2015). However, current H<sub>2</sub> production from natural gas through steam reforming and partial oxidation is associated with

high CO<sub>2</sub> emissions (Nikolaidis and Poullikkas, 2017). Development of innovative H<sub>2</sub> production from renewable resources with low greenhouse gases footprint is therefore mandatory. On the one hand, water splitting is carried by an endothermic process *via* thermolysis, electrolysis or photo-electrolysis (Karatza et al., 2021; Nikolaidis and Poullikkas, 2017). On the other hand, biomass such as forestry, industrial, agricultural or municipal residues can also be breakdown to produce H<sub>2</sub>, *via* thermochemical and biological processes (Singh et al., 2021). Of all the processes developed to produce green H<sub>2</sub>, dark fermentation (DF) presents one of the lowest global warming potential (Dincer and Acar, 2014) and has been identified as a promising biological process for industrial development (Chen et al., 2021a). DF is based on the degradation of organic matter into H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and organic acids by anaerobic microorganisms. It is a very flexible process as it has the ability to degrade multiple wastes such as agricultural residues, waste water or food waste (FW) (Ghimire et al., 2015). However, stoichiometric constraints imply that a maximum of 33 % of the converted substrate (in the form of chemical oxygen demand, COD) can theoretically be converted into H<sub>2</sub>. To optimize waste carbon recovery, effluents from DF might be subsequently used to produce other value-added molecules in a second-step process such as anaerobic digestion, for instance, to produce methane (CH<sub>4</sub>) (Liu et al., 2013).

Valorization of FW into H<sub>2</sub> is attracting a growing interest (Jarunglumert et al., 2018). Many authors studied the impact of various DF parameters such as pH (D.-H. Kim et al., 2011), substrate pretreatment (Kim et al., 2014) or temperature (D. H. Kim et al., 2011) to enhance H<sub>2</sub> production from FW. Most of the studies have often been conducted in batch conditions, although continuous fermentation is important for scaling-up the process as it reduces the initial investment in bioreactors, limits the operating costs and increases the overall economical productivity (Jarunglumert et al., 2018). One of the main drawbacks of continuous experiments is the instability of the H<sub>2</sub> production which has often been reported and reviewed (Bakonyi et al., 2014). This instability is mainly due to the growth of undesirable microorganisms that either compete for the substrate or consume H<sub>2</sub>, or end-products accumulation (Castelló et al., 2020). Often, end-products inhibitions are induced by H<sub>2</sub> accumulation and the two main co-produced organic acids: acetic and butyric acids (Chen et al., 2021a; S. Van Ginkel and Logan, 2005). Multiple mechanisms are involved in the inhibition by organic acids. Indeed, at a cellular scale, their accumulation can affect the microorganism physiology through (i) the disruption of the proton gradient of the membrane ( $\Delta\text{pH}$ ), (ii) ribosomal RNA and DNA damages due to free protons presence and (iii) an alteration of the enzymatic activities (Nicolaou et al., 2010). At population scale, organic acids can also induce a microbial community shift in favor of acid-resistant species that could favor or disfavor H<sub>2</sub> production (Chen et al., 2021b).

Butyric acid is often the most abundant organic acid produced during high H<sub>2</sub>-producing DF (S. Van Ginkel and Logan, 2005). It has been identified as the most toxic metabolic product among the main metabolic products in DF (Hüsemann and Papoutsakis, 1988; S. Van Ginkel

and Logan, 2005). Its higher toxicity in comparison with acetic acid has been attributed, with respect to H<sub>2</sub> production, to a higher restriction in NAD<sup>+</sup> regeneration pathways during its accumulation (S. Van Ginkel and Logan, 2005). Therefore, there is a need to develop strategies to alleviate organic acids and especially butyric acid inhibition. The extraction of organic acids through the use of a membrane has been conclusive to reach high H<sub>2</sub> production (Akca et al., 2021; Noblecourt et al., 2017) although membranes clogging remains an unresolved issue (Noblecourt et al., 2017).

Alternatively, strategies were developed to increase the tolerance of microbial communities to high butyric acid concentrations in order to enhance H<sub>2</sub> production. Zhao et al. (2010) intended to enhance butyric acid tolerance of microbial community from urban sludge through a 7-days incubation with butyric acid. After this period of adaptation to a butyric acid stress, H<sub>2</sub> production from kitchen waste in batch significantly increased (64 mL.g<sub>VS</sub><sup>-1</sup>, a 114 % increase) using the stressed sludge. This improvement was associated with an increase in the hydrolysis enzymatic activities. Alternatively, Huang et al. (2012) stimulated acid tolerance of a sludge through its exposure to increasing butyric acid concentration in a continuous reactor fed with glucose. H<sub>2</sub> production was not monitored during the continuous experiment but the stressed sludge was sampled and used as inoculum for H<sub>2</sub> production in batch conditions, with 30 g.L<sup>-1</sup> of glucose. As a result, H<sub>2</sub> production of the stressed sludge was enhanced by 56 % (2.25 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>glucose</sub>) in comparison with the unstressed sludge (1.43 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>glucose</sub>). The authors suggested that this improvement was due to an enrichment of the microbial community in acid tolerant bacteria *via* adaptative evolution, but no microbial analysis was carried out.

In this way, it has been shown that pre-stressing an inoculum with butyric acid constitutes a possible strategy to improve the performance of H<sub>2</sub> production. Previous investigations were carried out under batch conditions, and partly with model substrates (*i.e.* glucose). Therefore, the behavior of a microbial community pre-adapted to high organic acid concentrations and then operated in a continuous mode on complex substrate (FW) is uncertain. Such information is essential for developing adaptive method at larger scale.

The aim of this study was to investigate the effect of initial butyric acid stress on microbial community and investigate the H<sub>2</sub> production performances in a bioreactor continuously fed with FW. The butyric acid stress applied resulted in an increase in H<sub>2</sub> yield, linked to an increase in the abundance of H<sub>2</sub> producers.

### 3.4.4. Materials and Methods

#### 3.4.4.1. *Microbial inoculum preparation*

The seed inoculum corresponded to an activated aerobic sludge collected from the waste water treatment plant in Narbonne (France). The sludge was centrifuged, and the biomass freeze-dried and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in aliquots. Measurements of total solids (TS) and VS were performed according to the APHA standard methods (APHA, 2017). The inoculum was composed of  $750 \pm 1\text{ mg}_{\text{VS}}\cdot\text{g}^{-1}$  (VS = volatile solids). Before inoculation, the freeze-dried powder was rehydrated in 200 mL of water and thermally pre-treated to remove methanogenic archaea and non-sporulating microbes that could potentially hamper the  $\text{H}_2$  production. Heat-shock pretreatment was carried out at  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes (Parthiba Karthikeyan et al., 2018) with a hot plate (CMAG H57, IKA, Germany) and a temperature probe (ETS D5, IKA, Germany) at constant stirring rate.

#### 3.4.4.2. *Feedstock Composition*

The substrate consisted of a reconstituted depackaging food waste soup prepared from frozen food (Tableau 3-7). The composition was inspired from an average biowaste composition of major food retailers in France. This substrate was composed of  $348 \pm 1\text{ mg}_{\text{TS}}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $337 \pm 1\text{ mg}_{\text{VS}}\cdot\text{g}^{-1}$ . Biochemical methane potential of the feedstock was determined through direct measurement and near infrared spectroscopy (Lesteur et al., 2011). The resulting BMP amounted to  $451 \pm 6\text{ mL}_{\text{CH}_4}\cdot\text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ . From this value, and considering that 350 mL of  $\text{CH}_4$  can be theoretically recovered from one gram of biodegradable COD (chemical oxygen demand), the amount of biodegradable COD per gram of VS was estimated at  $1.28 \pm 0.02\text{ g}_{\text{biodegradableCOD}}\cdot\text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ . Total COD of the substrate was measured directly using a COD measuring kit (COD Reagent Vario MR, Lovibond, Germany). The resulting value was  $1.26\text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{g}_{\text{VS}}^{-1}$  showing that the entire COD of the substrate was accessible for microorganisms. Before its use, the substrate was grinded and diluted with tap water to reach  $100\text{ mg}_{\text{TS}}\cdot\text{g}^{-1}$ . Subsequently, a thermal hygienisation took place for 1 h at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  by means of a water bath. Both dilution and hygienisation processes were carried out to fulfil European law requirements for biowaste (The European commission, 2011) and to mimic industrial procedures to eliminate pathogens that might exist in food waste. The resulting mixture was sieved through a 2 mm mesh sieve and diluted again with tap water, reaching  $26 \pm 4\text{ g}_{\text{VS}}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 3-7), prior fermentation. The feedstock solution was stored in a fridge at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and prepared every four days.

**Tableau 3-7 : Feedstock Characterization**

<b>Composition</b>	<b>Concentration (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Minced beef</b>	13 ± 0
<b>Yogurt</b>	9 ± 0
<b>Red berries</b>	13 ± 0
<b>Breaded fish</b>	9 ± 0
<b>French fries</b>	17 ± 0
<b>Mix of vegetables</b>	13 ± 0
<b>Bread</b>	13 ± 0
<b>Total solids (gTS.L<sup>-1</sup>)</b>	27 ± 3
<b>Volatile solids (gVS.L<sup>-1</sup>)</b>	26 ± 4
<b>COD (g.L<sup>-1</sup>)</b>	33 ± 4

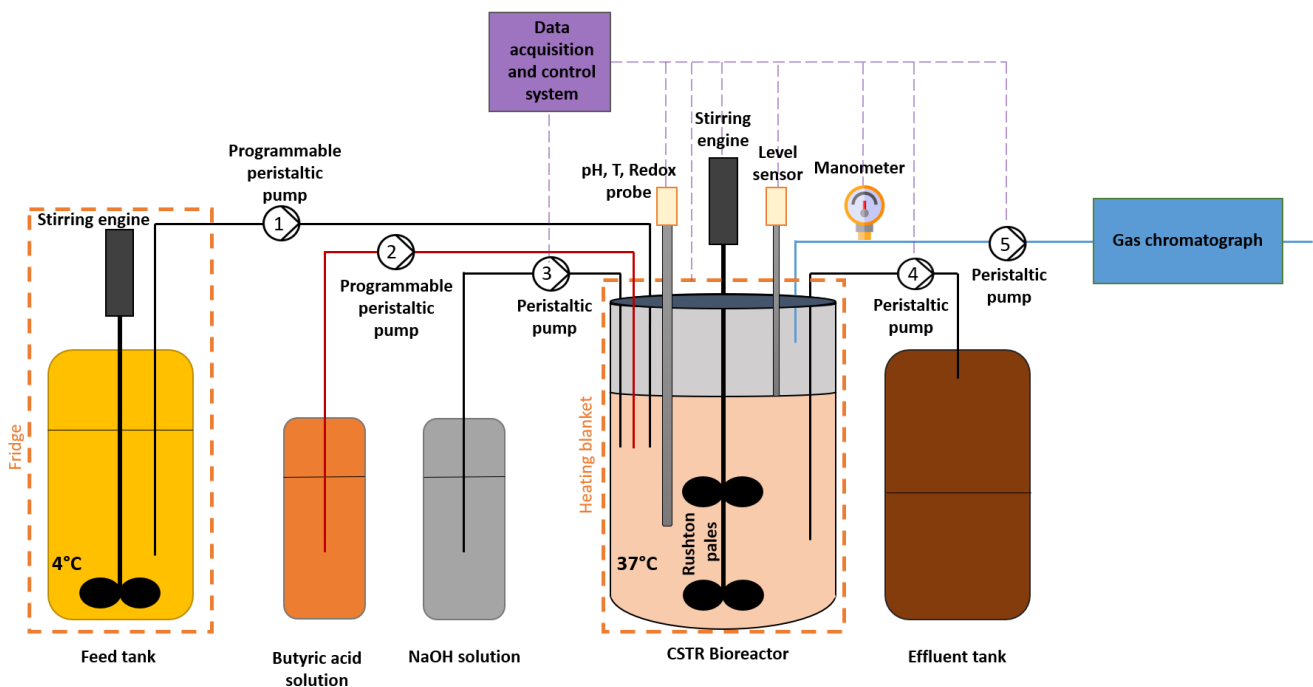
#### 3.4.4.3. *Experimental setup*

Experiments were set up in a 3 L glass fermenter (Applikon Bio 3L, Getinge, Sweden) with a 2 L working volume and 1 L headspace (Figure 3-20). Temperature and pH were controlled and monitored by means of an automatic system (M300, Mettler Toledo, USA). Temperature was measured with an immersed probe and regulated by a heating blanket. pH was measured by an in-situ probe and was regulated with 3 M NaOH. Mixing was ensured by mechanical stirring. Pressure was regulated with a control device combining a pressure sensor (LEO3, Keller, Switzerland) and a peristaltic pump (Masterflex L/S 7554-85, Cole Parmer, USA) following a two-band control law between 1030 and 1070 mbar. Gas production was measured through the pressure variations inside the fermenter and by using the operating time of the calibrated peristaltic pump. Produced gas volumes were normalized (T = 0 °C and P = 1 atm).

#### 3.4.4.4. *Operating conditions*

The reactors were first operated in batch mode for 9 hours. Inoculum, substrate and tap water were added to reach the working volume of 2 L. Initial batch operation was started with a substrate to biomass ratio of 9 (VS.VS<sup>-1</sup>) and a substrate concentration of 7.8 g<sub>VS</sub>.L<sup>-1</sup> (10 g<sub>COD</sub>.L<sup>-1</sup>). Fermenters were flushed with nitrogen for 15 min to remove oxygen and ensure anaerobic conditions, which were confirmed by oxidation reduction potential (ORP) values lower than - 400 mV during the entire continuous process. pH and temperature were regulated and monitored at 5.51 ± 0.02 and 36.9 ± 0.3 °C, respectively, and stirring was set at 180 rpm.

After this batch mode phase, continuous operation was initiated by starting a programmable peristaltic pump (Masterflex L/S model 07522-30, Cole Parmer, USA and head pump Masterflex L/S® FV-07018-20, Cole Parmer, USA) configured to deliver 100 mL of feed solution ( $26 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) every 36 min. The organic loading rate (OLR) and hydraulic retention time (HRT) during continuous operation were  $60 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $77 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and 12 h, respectively. This high OLR in comparison with other studies with FW (Castillo-Hernández et al., 2015; Reungsang et al., 2013) was set to induce stress by endogenous organic acids.



**Figure 3-20 : Schematic representation of the experimental setup used. 1, 2, 3, 4, 5: pumps for feed addition, butyric acid addition, pH regulation, effluent withdrawal and pressure regulation.**

The influence of a pre-stress stage using butyric acid was evaluated by comparing two scenarios: (1) Condition A, serving as a control and carried out in the conditions described above and (2) Condition B, in which butyric acid (butyric acid  $\geq 99\%$  CAS 107-92-6, Sigma Aldrich, USA) was continuously added in the reactor from the end of the 9h batch period and during 48 h (*i.e.*, 4 HRT) of continuous operation. Butyric acid addition was performed using a programmable peristaltic pump (Masterflex L/S model 07522-30, Cole Parmer, USA and head pump Masterflex L/S® FV-07014-20, Cole Parmer, USA) configured to deliver the butyric acid solution of  $176 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  at  $8.3 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ . A concentration of  $8.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of butyric acid was reached in the fermentation medium within 48 h (Figure 3-21). After this 48-h stress period, the exogenous butyric acid in the reactor was gradually washed out in the course of the feedings.

The total experimental period of 13 days in which reactors were monitored was divided into 3 different stages. The first period, named “period I” corresponded to the period from the beginning of the experiments to the end of the butyric acid addition (*i.e.*, after 2.4 days of

fermentation). The transitional phase from 2.4 days to 7 days, during which exogenous butyric acid was progressively washed out, was named “period II”. Finally, the steady-state from 7 to 13 days was named as “period III”. The differences in H<sub>2</sub> production, liquid metabolic products and microbial communities will be discussed sequentially for these three periods. One 13 days experimentation was conducted for conditions A and B, respectively.

#### *3.4.4.5. Gas and metabolite analysis*

The outlet of the gas pressure regulation pump was connected to a micro gas chromatograph (GC R3000, SRA Instrument, France) for on-line biogas composition monitoring. The chromatograph was equipped with two columns: One column dedicated to CO<sub>2</sub> analysis (Molesieve 5A 10 m column, temperature of 80 °C, 30 psi with argon as carrier gas) and a second column devoted to N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> analysis (PoraPlot U (PPU) 8 m column, temperature at 70 °C, 20 psi with helium as carrier gas). Two micro-thermal conductivity detectors (TCD) set at 90 °C completed the two analytical chains. 2 mL of liquid samples in duplicate were taken from the fermenters every two days and were centrifuged for 15 min at 13,400 rpm in a centrifuge (Minispin, Eppendorf, Germany). Supernatants and pellets were stored at -20 °C for further use. Supernatants were filtered through 0.2 µm (nylon filter 15121499, Fisher Scientific, USA) before metabolite analysis. Volatile fatty acids (VFAs) concentrations of each sample (acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, valerate, iso-valerate and caproate) were measured by gas chromatography (GC). The device was a Clarus 580 gas chromatograph (Perkin Elmer, USA) equipped with an AlltechFFAP EC™ 1000 column coupled to a flame ionization detector (FID) at 280 °C. The carrier gas was N<sub>2</sub> circulating at a flow rate of 6 mL.min<sup>-1</sup>. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was employed to analyze other metabolites concentration (ethanol, organic acids such as lactate or succinate, and residual sugars). The device was composed of a protective precolumn (Microguard cation H refill catbridges, Biorad, USA) and an HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Biorad, USA) running at 45 °C coupled to a refractive index detector (R410, Waters, USA) at 45 °C. A solution of 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 0.3 mL.min<sup>-1</sup> was used as eluent. The experiments and related analyses were performed at the Bio2E platform (Bio2E, 2018).

#### *3.4.4.6. Process performance evaluation*

The efficiency of substrate degradation into metabolites was assessed by calculating the ratio of the sum of the COD of each metabolite produced to the COD of the substrate introduced into the fermenter, as follows (Magdalena et al., 2020) (Equation 3-5):



$$\text{COD conversion} = \frac{\text{COD}_{\text{Acetate}} + \text{COD}_{\text{Butyrate}} + \text{COD}_{\text{Lactate}} + \text{COD}_{\text{H}_2}}{\text{COD}_{\text{substrate}}} \quad \text{Equation 3-5}$$

with  $\text{COD}_{\text{Acetate}}$ ,  $\text{COD}_{\text{Butyrate}}$ ,  $\text{COD}_{\text{Lactate}}$ ,  $\text{COD}_{\text{H}_2}$  and  $\text{COD}_{\text{Substrate}}$  corresponding to the COD of produced acetate, butyrate, lactate, H<sub>2</sub> and introduced substrate, respectively.

#### 3.4.4.7. Sequencing and microbial community analyses

The sample pellet obtained after centrifugation was used for microbiological analyses. DNA extraction was performed by means of the FastDNA SPIN kit for soil following manufacturer's instructions (MP biomedical, LCC, California, USA). DNA amount and purity in extracts was confirmed by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). Extracted DNA was then stored at -20 °C. The V3-V4 region of the 16S rRNA was amplified by PCR using universal primers as reported elsewhere (Carmona et al., 2015). The PCR mix was composed of MTP Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Germany) (0.05 u.µL<sup>-1</sup>) with enzyme buffer, forward and reverse primers (0.5 mM), dNTP (0.2 mM), sample DNA (5-10 ng.µL<sup>-1</sup>) and water until a final volume of 60 µL was obtained. 35 cycles of denaturation (95 °C, 1 min), annealing (65 °C, 1 min) and elongation (72 °C, 1 min) were carried out in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Germany). A final extension step was added for 10 min at 72 °C at the end of the 35-amplification cycle. PCR amplifications were verified by 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA). The GenoToul platform (Toulouse, France <http://www.genotoul.fr>) used an Illumina Miseq sequencer (2 x 300 pb paired-end run) for the sequencing reaction. The raw sequences obtained were analyzed using bioinformatic tools. Mothur version 1.39.5 was used for reads cleaning, assembly and quality checking. Alignment was performed with SILVA release 128. The latter was also used as taxonomic outline. Visual representation of the bacterial relative abundances was performed with phyloseq package in R software (McMurdie and Holmes, 2013).

#### 3.4.4.8. Statistical analyses

A principal component analysis was performed in R software with the package Factoshiny, using PCA function (Lê et al., 2008). The dimdesc function from this package was used to obtain correlations scores between variables and principal components and p-values associated. Correlation tests were performed using cor.test function from the package stats in R software.

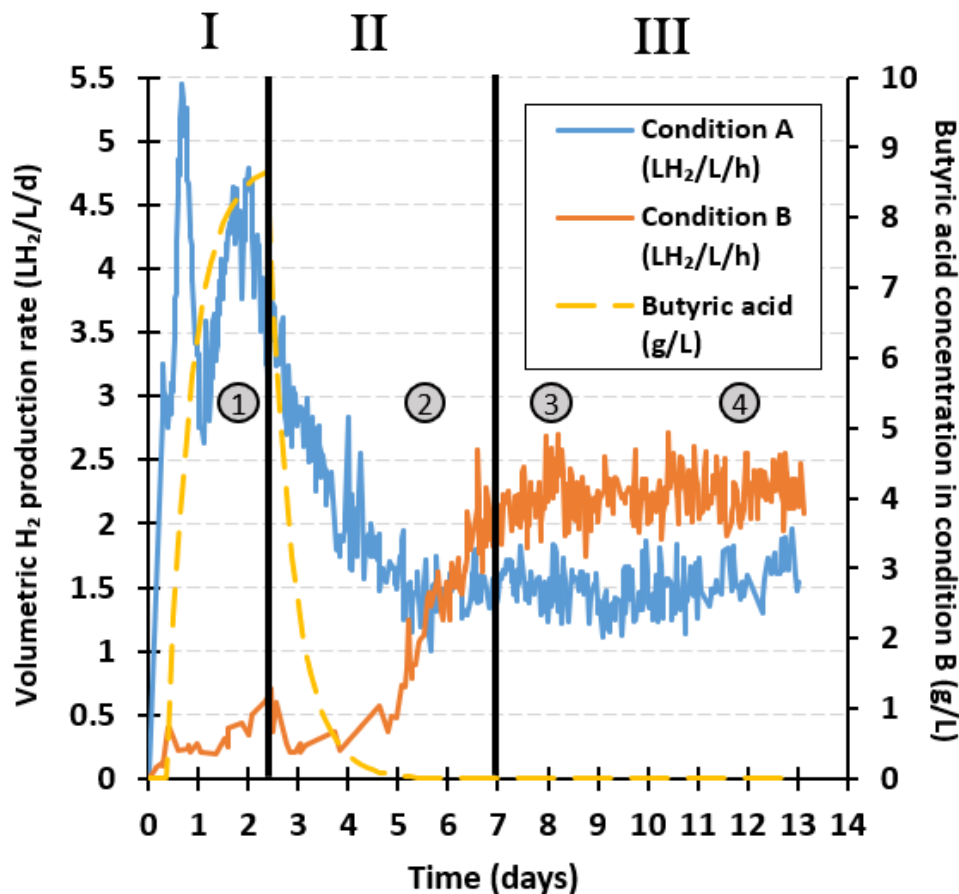
### 3.4.5. Results and discussion

#### 3.4.5.1. Dark fermentation for H<sub>2</sub> production

Figure 3-21 presents the volumetric H<sub>2</sub> production rate (HPR, L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup>) of the unstressed and stressed conditions (conditions A and B, respectively), as well as the theoretical evolution of exogenous butyric acid concentration (g.L<sup>-1</sup>, yellow dashes) added in condition B along the different periods of the fermentation I, II and III.

The highest HPR was reached during period I in the control - condition A - with a maximum of 5.4 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup>. This production peak was substantially higher than previously reported maximum rates of 0.6 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> on FW in a CSTR operated at 35 °C, pH 5.5, 12 h HRT and OLR of 37 g<sub>VS</sub>.L.d<sup>-1</sup> (Castillo-Hernández et al., 2015), or 0.38 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> on FW under similar CSTR conditions of temperature and pH (35 °C, pH 5), but 60 h HRT and OLR of 46 g<sub>COD</sub>.L.d<sup>-1</sup> (Reungsang et al., 2013). This improvement cannot be attributed to variations in the initial amount of inoculum, as in the present study reactors were inoculated with 0.9 g<sub>VS</sub>.L<sup>-1</sup> and started after a short 9 h batch mode, whereas the reactors were seeded with a higher amount in the other studies (2.3 g<sub>VSS</sub>.L<sup>-1</sup> and 8.04 g<sub>VS</sub>.L<sup>-1</sup> (Castillo-Hernández et al., 2015; Reungsang et al., 2013)) and a longer start-up of 96 h in the experiments of Castillo-Hernández et al. (2015). Most likely, the treatments applied to the seed inoculum (*i.e.*, freeze drying and thermal pretreatment) resulted in an enrichment in H<sub>2</sub> producers, and thus high H<sub>2</sub> productivities. Similarly, the use of a high OLR of 60 g<sub>VS</sub>.L.d<sup>-1</sup> certainly contributed to improve the HPR.

In comparison, the addition of butyric acid in condition B impacted the HPR, with a maximum of 0.61 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> corresponding to a 89 % reduction of HPR with regards to the control. Such reduction of H<sub>2</sub> production, likely due to an inhibition of H<sub>2</sub>-producing bacteria, was stronger than other values reported in the literature. For instance, a continuous fermentation of glucose at pH 5.5 and 10 h HRT in which 12.7 g.L<sup>-1</sup> exogenous butyric acid was added only reduced the HPR by 21 % from 0.29 to 0.23 L.h<sup>-1</sup> and the H<sub>2</sub> yield by 20 % from 2.5 ± 0.1 to 2.0 ± 0.1 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> (S. Van Ginkel and Logan, 2005). Likewise, exogenous butyric acid at concentrations similar to those employed in the present investigation (8.36 g.L<sup>-1</sup>) reduced the specific HPR only by 13 % from 61.8 ± 0.6 to 53.6 ± 0.5 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>.g<sub>VSS</sub>.h<sup>-1</sup> and the H<sub>2</sub> yield by 7 % from 1.75 ± 0.06 to 1.63 ± 0.04 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> in a batch fermentation with glucose as substrate at pH 6 (Zheng and Yu, 2005). Nonetheless, the inhibitory effect of butyric acid on H<sub>2</sub> production from glucose might be weaker than from more complex substrate, since, in this case, H<sub>2</sub> production relies not only on fermentative bacteria but also on hydrolytic bacteria.



**Figure 3-21 : Volumetric H<sub>2</sub> production rate in conditions A and B and exogenous butyric acid concentration added in condition B (yellow dashes) during the stress-period (I), the transitional period (II) and the steady-state (III), respectively. The four samples used for microbial community characterization in conditions A and B are represented in black circle filled in grey to indicate their time of collection.**

The second phase (period II) was associated with a progressive reduction of HPR from 3.7 to 1.4 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> in condition A and an increase in HPR from 0.6 to 2.0 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> in condition B (Figure 3-21, II). Six days were required to reach a steady-state in condition A. In comparison, Bakonyi et al. (2014) estimated through literature review the time to reach the steady state from 10 to more than 30 days, in continuous fermentation reactor for biohydrogen production. Therefore, this 6-day period attained herein was fairly fast. In condition B, HPR exceeded the maximum value of 0.61 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> obtained in Period I only when exogenous butyric acid was totally washed out, *i.e.* after 5 days of fermentation. The duration required to reach steady-state conditions after the butyric acid stress was only 2 days (*i.e.*, 4 HRTs). In comparison, six and seven days were necessary to recover stable HPR of 7.5 ± 0.2 and 7.6 ± 0.2 L<sub>H<sub>2</sub></sub>.L.d<sup>-1</sup> in a continuous reactor fed with galactose (pH 5.5, HRT 12 h, OLR of 45 g<sub>cod</sub>.L.d<sup>-1</sup>), after a transitory load shock and an acidification shock at pH 3.5, respectively (Kumar et al., 2017). Also, feeding a continuous reactor with tequila vinasse (pH 5.5, 4 h HRT) showed a recovery of the HPR in about 4 days after 3 days of acidification at pH 3.8 (García-depraect et al., 2020). In conclusion, the butyric acid stress mode applied here was less detrimental than the disturbances applied in the other studies.

Steady-states observed in Period III were associated with HPR of  $1.5 \pm 0.2$  and  $2.2 \pm 0.2$   $L_{H_2} \cdot L \cdot d^{-1}$ , in conditions A and B, respectively. By pre-stressing the reactor with butyric acid,  $H_2$  production rate was substantially improved by 48 % over the 6-days steady-state period. Again, HPR in these two conditions are higher than the previously reported HPR from other studies carried in similar operating conditions but with lower OLR ( $0.6 L_{H_2} \cdot L \cdot d^{-1}$  with OLR of  $37 g_{VS} \cdot L \cdot d^{-1}$  (Castillo-Hernández et al., 2015) and  $0.38 L_{H_2} \cdot L \cdot d^{-1}$  with  $46 g_{COD} \cdot L \cdot d^{-1}$  (Reungsang et al., 2013)).

#### 3.4.5.2. *Organic acids: focus on butyric acid*

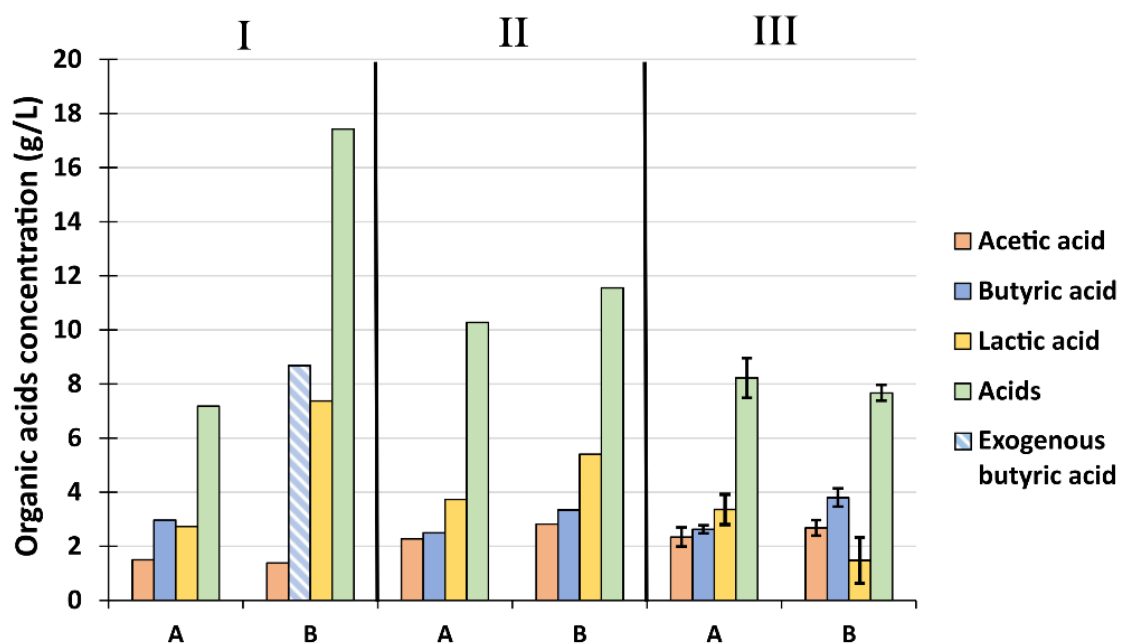
Figure 3-22 presents the concentrations of endogenous organic acids in periods I, II and III as well as the concentration of exogenous butyric acid. In period I, II and III, the concentrations presented are those from samples taken at days 2 (when maximum exogenous butyric acid concentration was reached), 5.5 (when exogenous butyric acid was totally wash-out) and an average of the concentrations of three samples taken during steady-state, respectively.

During period I, in the control - condition A -, acetic acid, butyric acid, lactic acid and total acids concentrations reached  $1.5$ ,  $3.0$ ,  $2.7$  and  $7.2 g \cdot L^{-1}$ , respectively. These concentrations corresponded to a butyric/acetic acid (B/A) molar ratio of 1.4. This ratio is consistent with the high  $H_2$  production observed, as a B/A ratio of 1.5 was previously associated with efficient  $H_2$  production performances (S. H. Kim et al., 2006). In condition B and period I, the measured butyric acid concentration corresponded exactly to the exogenous butyric acid added ( $8.7 g \cdot L^{-1}$ ). This suggests that butyric acid addition not only inhibited  $H_2$  production as presented in the previous section, but also the production of endogenous butyric acid. Similarly to condition A, acetic acid concentration reached  $1.4 g \cdot L^{-1}$  and was not affected by butyric acid addition. The fact that the addition of exogenous butyric acid inhibited its own production without affecting or even enhancing acetic acid production was already observed by Zheng and Yu (2005) and Huang et al. (2012) with butyric acid concentration up to  $16.72 g \cdot L^{-1}$  and  $25 g \cdot L^{-1}$ , respectively. Enhancement of COD conversion into acetic acid during butyric acid stress conditions could be related to a higher ATP yield through acetic acid pathway than butyric acid which may be necessary to cope with the acid stress and associated energy requirements, as suggested elsewhere (Huang et al., 2012). Finally, the lactic acid concentration in condition B was 2.7 fold higher than in condition A, reaching  $7.4 g \cdot L^{-1}$ . This high lactic acid production was attributed to changes in microbial community and / or at a cellular level, to a regulatory response to butyric acid stress to maintain the NADH/NAD<sup>+</sup> balance (Payot et al., 1999).

Period II was associated, in condition A, to a decrease in butyric acid production and an increase in the production of acetic and lactic acids, which reached  $2.5$ ,  $2.3$  and  $3.7 g \cdot L^{-1}$ , respectively. This result is consistent with the decrease in HPR, as B/A dropped to 0.74. In condition B, the increase in  $H_2$  production was associated with a high increase in the

production of acetic and endogenous butyric acids, reaching 2.8 and 3.3 g.L<sup>-1</sup>, respectively, and a decrease in lactic acid production down to 5.4 g.L<sup>-1</sup>. B/A was then 0.8, which is similar to B/A in condition A and consistent with the similar HPR in the two conditions at the sampling time (5.5 days). It can be inferred from these data that the inhibitory threshold for HPR by organic acids is between organic acids concentrations measured in period II and I, *i.e.*, (i) 2.8 g.L<sup>-1</sup> acetic acid with 3.3 g.L<sup>-1</sup> butyric acid and (ii) 1.4 g.L<sup>-1</sup> acetic acid with 8.7 g.L<sup>-1</sup> butyric acid. In comparison, in a batch reactor fed with glucose and operated at pH 6, 12.5 g.L<sup>-1</sup> of acids composed of 10.2 g.L<sup>-1</sup> butyric acid and 2.3 g.L<sup>-1</sup> acetic acid was shown to strongly inhibit the HPR (Noblecourt et al., 2017). The lower threshold value in this study could be related to the use of a lower pH (5.5), which increases the undissociated acid concentration, or with the high amount of lactic acid that could have exerted an additional inhibitory effect (Noblecourt et al., 2018).

During period III (*i.e.*, steady-state), total organic acids production was slightly higher in condition A ( $8.2 \pm 0.7$  g.L<sup>-1</sup>) than in condition B ( $7.7 \pm 0.3$  g.L<sup>-1</sup>). This was explained by a higher lactic acid concentration of  $3.3 \pm 0.6$  g.L<sup>-1</sup> in condition A than  $1.5 \pm 0.8$  g.L<sup>-1</sup> in condition B. In addition, the butyric acid concentration increased in condition B, reaching  $3.8 \pm 0.3$  g.L<sup>-1</sup> while acetic acid concentration remained stable at  $2.7 \pm 0.3$  g.L<sup>-1</sup>. A significant correlation was found between butyric acid production and H<sub>2</sub> yield considering all periods and conditions A and B (Pearson correlation, correlation score: 0.72, p-value: 0.045) while no correlation could be established between endogenous acids production and H<sub>2</sub> yield (Pearson correlation, correlation score: - 0.43, p-value: 0.29). To conclude, the initial butyric acid stress was associated to a metabolic pattern with 44 % increase in butyric acid production, 56 % decrease in lactic acid production, and slight 14 % increase in acetic acid production during the 6-days steady state.



**Figure 3-22 : Endogenous organic acids concentrations in A and B conditions and exogenous butyric acid concentration in condition B, during the periods I at day 2, II at day 5 and III (average of three samples taken during the steady-date period) of the fermentation.**

Similarly, Huang et al. (2012) induced butyric acid tolerance and improved H<sub>2</sub> yield by 56 % from 1.43 to 2.25 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> and HPR by 69 % from 0.26 to 0.44 LH<sub>2</sub>·L·h<sup>-1</sup> by progressively increasing butyric acid concentration, up to 25 g·L<sup>-1</sup>, with glucose as substrate and in batch mode. This improvement was associated with a reduction of solvents (*i.e.*, ethanol, butanol and acetone) in favor of acetic and butyric acids, along with an increase in H<sup>+</sup> ATPase activity from 72 to 128 U·g<sub>VSS</sub><sup>-1</sup> for the original and evolved culture, respectively. The authors suggested that an enrichment in acid tolerant bacteria in the mixed culture permitted to improve H<sub>2</sub> production performances, but the analysis of the microbial communities was missing to confirm the hypothesis. Using a different strategy based on a 7-days incubation in batch with no feeding in presence of 4 g·L<sup>-1</sup> of butyric acid, Zhao et al. (2010) improved H<sub>2</sub> production by 214 % from 30 to 64 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VSS</sub><sup>-1</sup>, using kitchen waste as substrate. These authors reported higher hydrolytic enzymes activities (β-glucosidase, BAA-hydrolysing protease and dehydrogenase enzyme) in the reactor subjected to butyric acid stress. Here, the mechanisms underlying this improved H<sub>2</sub> production performances will be discussed in the next sections.

#### 3.4.5.3. Process performance indicators

Process performances in conditions A and B were assessed by several indicators which are presented in Tableau 3-8 for the periods I, II and III. First, H<sub>2</sub> production decreased for condition A from  $65 \pm 12 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$  in period I to  $25 \pm 3 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$  in period III. Conversely, it increased for condition B from  $4 \pm 2 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$  in period I to  $37 \pm 3 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$  in period III. H<sub>2</sub> production observed at the steady-state in this study were higher than the production of  $11 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$  obtained by Castillo-Hernández et al. (2015) in very similar operating conditions (pH 5.5, 35 °C,  $37.1 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L} \cdot \text{d}^{-1}$ , 12 h HRT, restaurant FW). The fact that the substrate used in this study corresponded to a reconstituted FW might explain its higher biodegradability with regards to other complex substrates coming from a real waste source. Nevertheless, the H<sub>2</sub> production was lower than other values reported in the literature in continuous reactors operated with real FW, which indicates the multiparametric influence on the process efficiency (Reungsang et al., 2013). Indeed, a review made on FW conversion to H<sub>2</sub> highlighted that many parameters can affect the H<sub>2</sub> production, such as the carbohydrate content in the substrate, the applied pretreatments (either to the inoculum or to the substrate), the pH, temperature, OLR and the HRT (Jarunglumert et al., 2018). The operating conditions of the present study followed the guidelines provided in this latter review, *i.e.*: heat treatment applied to the substrate and the inoculum together with an HRT lower than 72 h. However, the low pH value of 5.5 selected may have limited H<sub>2</sub> production, as pH 6 – 8 seems to be associated with higher process yields (Jarunglumert et al., 2018). In addition, the same reconstituted food waste was fermented in batch conditions in the study conducted by Dauplain et al. (2021) in flasks of 0.2 L working volume, at pH 6 and with an inoculum sampled in the same waste water treatment plant than the one used herein. The fermentation resulted in a H<sub>2</sub> production of  $125 \pm 7 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$ , which is 3.4-fold higher than the one obtained in the present investigation ( $37 \pm 3 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}}^{-1}$ ). This fact confirms that the operating conditions (*e.g.*, high OLR, low HRT) and the continuous feeding mode had a drastic effect on the process efficiency.

Additionally, H<sub>2</sub> proportion in bioreactor headspace composition was greatly impacted by butyric acid addition in period I, as it was  $5 \pm 4 \text{ v/v}\%$  in condition B in comparison with  $54 \pm 2 \text{ v/v}\%$  in condition A. Apart from this distinction in period I, no differences in H<sub>2</sub> proportions in headspace could be observed within the two conditions, with  $48 \pm 1$  and  $49 \pm 4 \%$  in period II and  $48 \pm 2$  and  $50 \pm 1 \%$  in period III in condition A and B, respectively. In comparison, a lower H<sub>2</sub> proportion of  $35 \pm 5 \%$  was found in the two studies conducted by Castillo-Hernández et al. (2015) at an OLR of  $57 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  and by Li et al. (2008) (OLR  $50 \pm 16 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , pH 5.3-5.5, 35 °C, kitchen waste as substrate, 48 h HRT, intermittent CSTR). Comparison of B/A molar ratio does not permit to conclude on a higher homoacetogenic activity in their studies, as it reaches 0.93, which is equivalent to the ratio observed here in condition B, period III (0.96). Most likely,

these lower proportions of H<sub>2</sub> could be related with a higher consumption of lactate, as this pathway is known to be associated with higher CO<sub>2</sub> production (García-Depraect et al., 2021b).

**Tableau 3-8 : Performances of the continuous fermentation in the periods I, II and III in conditions A and B**

Performance indicator	I		II		III	
	A	B	A	B	A	B
<b>Average HPR (LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)</b>	3.9 ± 0.7	0.3 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2
<b>Average H<sub>2</sub> production (mLH<sub>2</sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>)</b>	65 ± 12	4 ± 2	27 ± 4	22 ± 7	25 ± 3	37 ± 3
<b>H<sub>2</sub> % (v/v)</b>	54 ± 2	5 ± 4	48 ± 1	49 ± 4	48 ± 2	50 ± 1
<b>COD conversion (%)</b>	34   37	26   27	36   41	40 ± 8	34 ± 2	37 ± 2

Globally, in condition A, COD conversion varied over time, with values of 34 – 37 %, 36 – 41 % and 34 ± 2 % in periods I, II and III, respectively. COD conversion was reduced during butyric stress (Period I, condition B), with 26 and 27 % of FW converted to metabolic products at days 1 and 2. Therefore, the butyric acid stress impacted the global microbial activity. COD conversion peaked in period II, day 5.5, for conditions A and B at 36 - 41 % and 40 ± 8 %, respectively, but this level of degradation was not maintained. COD conversion was improved in steady-state of condition B compared to that of condition A, reaching 37 ± 2 % versus 34 ± 2 %. Therefore, butyric pre-stressed condition slightly improved the substrate degradation during the period III by 9 %. Castillo-Hernández et al. (2015) (pH 5.5, 35 °C, 37.1 g<sub>Vs</sub>·L<sup>-1</sup>, 12-h HRT, restaurant FW) reported COD removal comparable with the COD conversion observed in condition B, period I, with 23 ± 7 %. Also, a higher COD removal of 33 ± 3 % was found by Li et al. (2008) (OLR 50 ± 16 g<sub>COD</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, pH 5.3-5.5, 35 °C, kitchen waste as substrate, 48 h HRT), but with a lower HPR of 1.34 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, which is probably related with a greater production of H<sub>2</sub> from lactate in their study, as previously suggested.

Improvement of the COD conversion observed in condition B could be explained by a higher amount of active biomass in the stressed reactor than in condition A. Additionally, an enrichment of the microbial community with hydrolytic and acidogenic functions due to microbial adaptation to high butyric acid concentrations might have occurred. Microbial community analysis was then carried out to validate this assumption.

#### 3.4.5.4. Microbial communities

To decipher the mechanisms involved behind the improvement of H<sub>2</sub> production in the pre-stressed reactor, microbial communities were analyzed. Figure 3-23 presents the relative



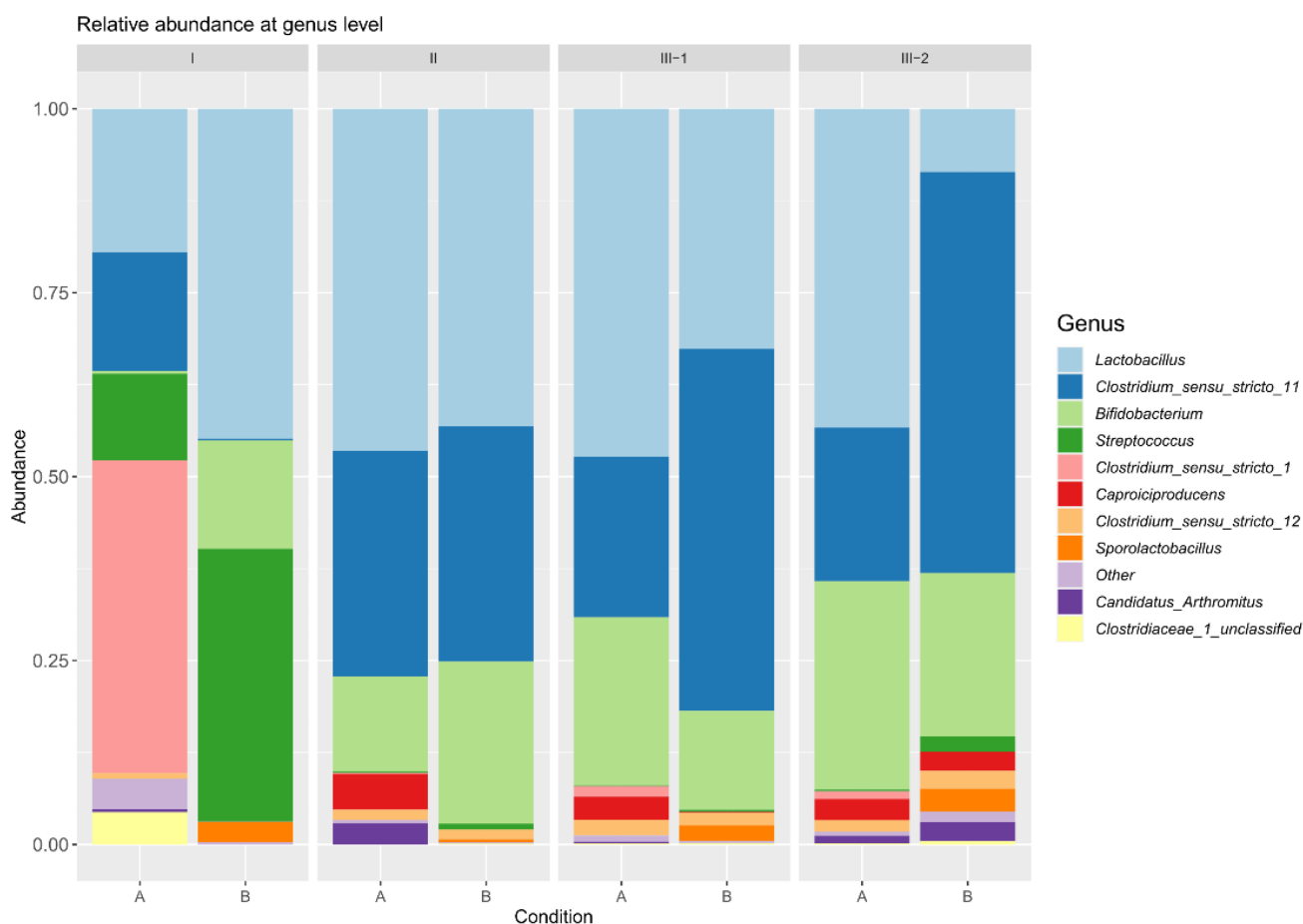
abundance of bacterial communities at genus level in periods I, II, III-1 and III-2 at days 2, 5, 8 and 12, respectively, for conditions A and B. The bacterial community was composed of 1520 operational taxonomic units (OTUs). All OTUs with an abundance greater than 1 % belonged to Firmicutes and Actinobacteria phyla and to only 6 families: *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* and *Sporolactobacillaceae*.

During period I, microbial community in condition A was dominated by 42 % *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* followed by 19 % *Lactobacillus* sp. and 16 % *Clostridium\_sensu\_stricto\_11*. In total, *Clostridium* sp. represented 59 % of the community, which is consistent with the high H<sub>2</sub> production observed. In comparison, during the stress period (I) in condition B, the microbial community was only composed by 0.3 % *Clostridium* sp. and was dominated by 44 % *Lactobacillus* sp., 37 % *Streptococcus* sp. and 15 % *Bifidobacterium* sp. These genera are mostly associated with lactic and acetic acid production activities (Reungsang et al., 2013), which is consistent with the low H<sub>2</sub> production ( $4 \pm 2$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>) and the production of lactic and acetic acids observed during this period.

During period II, microbial communities in conditions A and B evolved towards a higher and similar proportion of *Clostridium\_sensu\_stricto\_11* with 31 and 32 %, respectively. *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, highly abundant in condition A, was totally washed-out during the fermentation process. It can be hypothesized that this genus was able to grow in the 9-h batch mode but failed to maintain when 12 h HRT was applied. As H<sub>2</sub> production highly decreased in condition A from period I to period II, *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* was related to higher H<sub>2</sub> yields than *Clostridium\_sensu\_stricto\_11*. Also, in conditions A and B, *Bifidobacterium* sp. abundance increased up to 12 and 24 %, respectively. As *Bifidobacterium* sp. can degrade carbohydrates into acetic acid (Pokusaeva et al., 2011), their increase in abundance was likely linked to the increase in acetic acid production from period I to period II in condition A. *Lactobacillus* sp. abundance increased in condition A up to 45 %, which could be related to the reduction of H<sub>2</sub> production performance and to the increase in lactic acid production. In comparison, *Lactobacillus* sp. abundance remained stable in condition B with 42 %. Similarly, the undesirable growth of *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. during the continuous fermentation of FW for H<sub>2</sub> production was also reported by Canto-Robertos et al. (2022) (Anaerobic sequencing batch reactor, HRT = 48h, 37 °C, pH 5-5.5) and Villanueva-Galindo and Moreno-Andrade (2020) (Anaerobic sequencing batch reactor, HRT = 48h, 37 °C, pH 5.5). Most likely, these bacteria were imported through the substrate (Canto-Robertos et al., 2022). Therefore, the similar H<sub>2</sub> production at day 5 in period II in conditions A and B was associated with similar metabolites production, functional redundancy of the microbial communities in the two conditions assessed, and the butyric stress did not prevent the growth of the substrate endogenous flora. Interestingly, and although the FW used in the present study was reconstituted, its fermentation was associated with the same emergence of substrate endogenous flora. However, the control of the bacterial growth in the substrate

before fermentation through this reconstitution may also explain the stability of the process. Indeed, higher growth of endogenous flora and higher organic acids concentrations are expected in real FW (Noblecourt et al., 2018) and the extent of this growth certainly affects the stability of the process.

Even though similar microbial communities were obtained in period II, they evolved differently in period III. Indeed, at the beginning of period III (III-1), in condition A, *Clostridium\_sensu\_stricto\_11* was outcompeted (22 %) by *Lactobacillus* sp. (46 %) and *Bifidobacterium* sp. (23 %). Conversely, in condition B, *Clostridium\_sensu\_stricto\_11* outcompeted the other bacteria as its abundance increased up to 49 % while *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. abundances decreased to 31 and 13 %, respectively. At the end of period III (III-2), *Clostridium\_sensu\_stricto\_11* abundance remained stable in A and B conditions, at 21 and 54 %, respectively. It could therefore be interpreted that this genus was the main bacteria ensuring stable H<sub>2</sub> production in both stressed and control reactors. Also, in conditions A and B, *Bifidobacterium* abundance increased up to 28 and 22 %, respectively. *Lactobacillus* highly decreased in condition B, reaching 6 %, whereas its abundance remained stable in condition A at 43 %. Likewise, in condition B, minor OTUs progressively increased with fermentation time, from 4 % to 15 %. It is interesting to note that although metabolic production was stable in terms of concentration from day 7 to day 14, during period III of conditions A and B, part of the bacterial community showed some versatility.

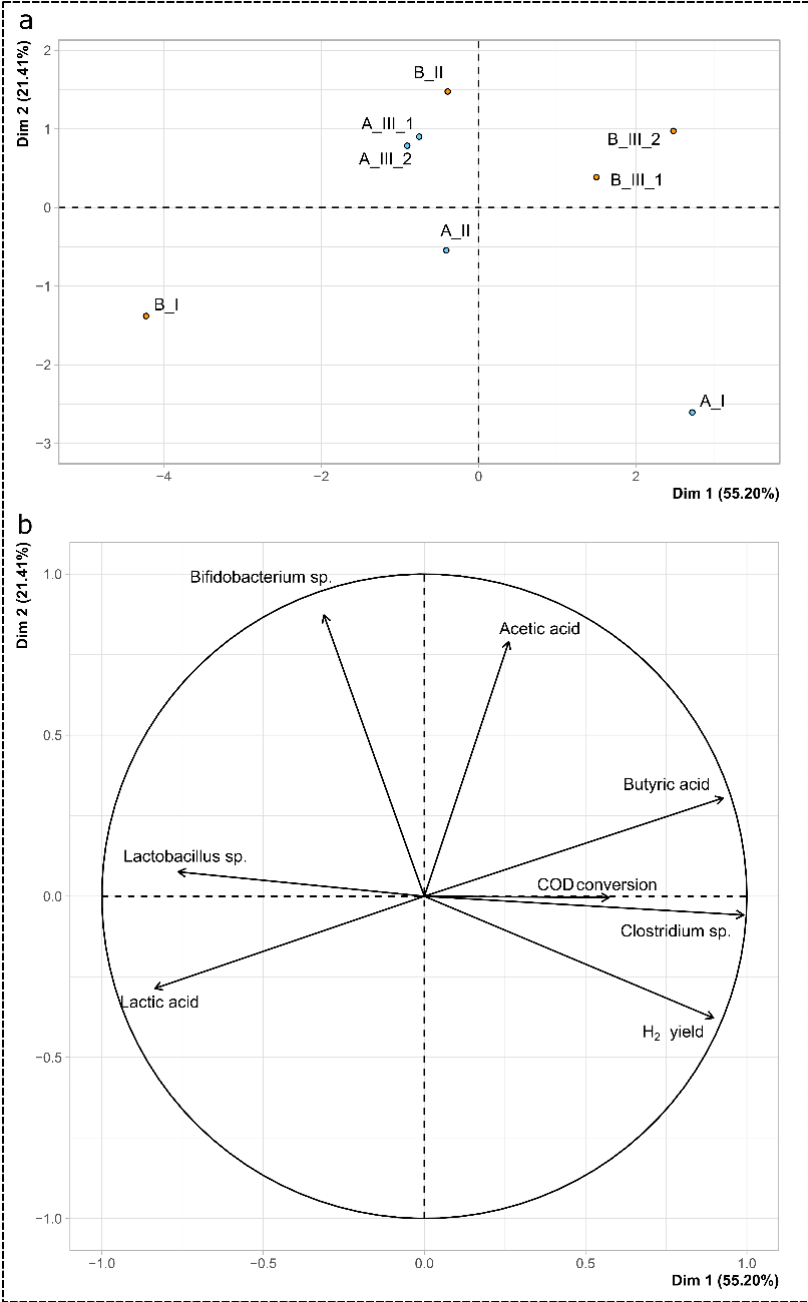


**Figure 3-23: Relative bacterial community abundance (%) in A and B conditions during the periods I (day 2), II (day 5), III-1 (day 8) and III-2 (day 12)**

#### 3.4.5.5. Principal component analysis

To better understand the interaction among the microbial communities, the performance indicators and the butyric stress applied, a principal component analysis (PCA) was performed (Figure 3-24). The variables considered in the analysis were: H<sub>2</sub> yield, acetic, endogenous butyric and lactic acid concentrations, *Clostridium* sp. relative abundance, *Lactobacillus* sp. relative abundance, *Bifidobacterium* sp. relative abundance and COD conversion. The principal components 1 and 2 accounted for 55.2 % and 21.4 % of the dataset variance, respectively, for a total of 76.6 % of the variance explained in the analysis. The first principal component (Dim. 1 on Figure 3-24) highly correlated positively with *Clostridium* sp. abundance, endogenous butyric acid concentration and H<sub>2</sub> yield with correlation scores of 0.99, 0.93 and 0.90, resp. and p-values of  $2.3 \cdot 10^{-6}$ ,  $9.6 \cdot 10^{-4}$  and  $2.6 \cdot 10^{-3}$ , respectively. In addition, this component negatively correlated with *Lactobacillus* sp. abundance and lactic acid concentrations with correlations scores of  $-0.76$  and  $-0.84$ , resp. and p-values of  $2.8 \cdot 10^{-2}$  and  $9.8 \cdot 10^{-3}$ , respectively. This result supports the observation that *Clostridium* sp. was primarily responsible for the production of H<sub>2</sub> and butyric acid, while *Lactobacillus* sp. exerted

an inhibitory activity associated with the production of lactic acid. The second principal component (Dim. 2 on Figure 3-24), positively correlated with *Bifidobacterium* sp. abundance and with acetic acid concentration, with correlation scores of 0.87 and 0.79 resp. and p-values of  $4.7 \cdot 10^{-3}$  and  $2.0 \cdot 10^{-2}$ , respectively. The individual plot (Figure 3-24-a) highlights and summarizes the differences in performances in period I between conditions A and B (individual B\_I and A\_I) during the butyric acid stress, as well as in period III (individuals A\_III\_1, A\_III\_2, B\_III\_1 and B\_III\_2). In addition, the close coordinates of A\_III\_1 and A\_III\_2 in one hand and of B\_III\_1 and B\_III\_2 in another hand, strengthen the previous description of a steady-state.



**Figure 3-24 : Principal component analysis. a : individuals plot, b : variables plot**

#### 3.4.5.6. Diversity and abundances at species level

A deeper analysis at species level was performed in order to improve the understanding of the dynamics of microbial communities during the fermentation process. Tableau 3-9 presents the identification at the species level (where possible) for OTUs with an abundance higher than 5 % in at least one sample.

First, the diversity of the bacterial community was evaluated for the two conditions A and B and during the three periods. The Shannon index ranged between 1.3 and 1.9 in all samples and the period I was associated to a slightly lower Shannon index of 1.3 in condition B than 1.9 in condition A. In period III – 2, no more differences in Shannon index appeared between condition A and B (1.6), suggesting that the microbial diversity was more constrained at steady state by the operating conditions rather than the initial butyric stress. These values are very similar to those obtained during the batch fermentation of real FW, without inoculum addition, at pH 6 (1.1 – 1.9) (Moon et al., 2015). However, this diversity index was really low in comparison with the Shannon index ranging between 4.9 and 5.4 calculated during the fermentation of FW in an anaerobic sequencing batch reactor (48 h HRT, 37 °C, pH 5 -5.5, heat treated anaerobic granular sludge used as inoculum) (Canto-Robertos et al., 2022). Again, the low diversity in the present study could be explained by the harsh treatment applied to the inoculum (freeze-drying, heat shock) or to the low HRT of 12 h. The evenness of the microbial communities was estimated with the Pielou index, which did not vary between the conditions and ranged between 0.4 and 0.6.

*Clostridium* genus was only represented by three major species: *Clostridium guangxiense*, *Clostridium perfringens* and *Clostridium butyricum*. More precisely, only *C. guangxiense* remained at a high abundance in conditions A and B, during periods II and III, with values ranging between 21 and 54 %. The decrease in HPR from period I to period II in condition A could be explained by a lower H<sub>2</sub> yield exhibited by *C. guangxiense* in comparison with *C. perfringens*. Indeed, Wang and Yin (2021) reviewed H<sub>2</sub> production with various *Clostridium* species and highlighted that, with glucose as substrate, H<sub>2</sub> yield ranged between 1.4 – 3.9 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> with *C. perfringens* and between 0.6 - 3.0 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> with *C. acetobutylicum* (Wang and Yin, 2021) (the closest species to *C. guangxiense* (Zhao et al., 2017)).

In conditions A and B, *Streptococcus* sp., initially present at a significant abundance in period I (12 and 37 % in conditions A and B, respectively), was identified with the same similarity score of 100 % as *Streptococcus parasuis*, *Streptococcus suis* and *Streptococcus equinus*. As for *C. perfringens* and *C. butyricum*, this OTU was not anymore found in periods II and III. This suggests that continuous flow induced a wash-out of all these species that succeeded to grow in the 9 hours batch mode. No identification at species level could be done for *Bifidobacterium* sp. Concerning *Lactobacillus* sp., some differences were observed

between conditions A and B at species level. Indeed, *Lactobacillus delbrueckii* was identified in condition A at significant abundances from 19 to 42 %, while it reached a maximum of 3 % in condition B. In contrast, the abundance of *Lactobacillus johnsonii* was high in condition B, from 30 to 41 % in periods I to III-1, while it was totally absent in condition A. Interestingly, *L. johnsonii* almost totally disappeared between periods III-1 and III – 2 (abundance from 30 % to 1 %), although H<sub>2</sub> and organic acids production were stable. Hye et al. (2007) showed that instability in continuous H<sub>2</sub> producing reactors was associated with a bloom of *Lactobacillus sp.* in link with *Clostridium sp.* inhibition. Here, the instability in *Lactobacillus sp.* abundance at species level did not affect *C. guangxiense* abundance in both conditions during the 6-days steady-state period studied. This interesting result may be due to a resistance of *C. guangxiense*, or a selection of *Lactobacillus sp.* which did not perform an inhibitory activity towards *Clostridium sp.* For example, interaction of *Clostridium sp.* and *Lactobacillus sp.* during the fermentation of wheat straw was associated with the highest H<sub>2</sub> production, without inhibitory interaction between the strains, but a potential cross-feeding relation (Pérez-rangel et al., 2021). However, as *L. delbrueckii* and *L. johnsonii* are both used as probiotics to inhibit *C. perfringens* (Gervasi et al., 2014; Heo et al., 2018) and considering PCA results, we favor the hypothesis that these strains exerted an inhibitory activity against *C. guangxiense*, but with an unidentified mechanisms, the latter succeeded to maintain its abundance in the process.

Finally, several hypotheses can be formulated to explain the higher abundance of *C. guangxiense* after butyric acid stress. A better resistance of *C. guangxiense* to butyric acid in condition B does not seem convincing as its abundance was 0 % in stress-period. Alternatively, if a cross-feeding was established between *Lactobacillus sp.* / *Bifidobacterium sp.* and *C. guangxiense*, with H<sub>2</sub> production from lactic acid achieved by *C. guangxiense* (as observed and reviewed in several DF with *Clostridium sp.* on complex substrates by García-Depraect et al. (2021b)), then, the higher lactic acid concentration in condition B (7.4 g.L<sup>-1</sup>) during stress period may have stimulated *C. guangxiense* abundance increase. Otherwise, the suppression of *L. delbrueckii* abundance in condition B, mainly replaced by *Bifidobacterium sp.* and *L. johnsonii* may have result in a higher activity of *C. guangxiense*, in connection with a relief of inhibition.

**Tableau 3-9 : . Species abundances in periods I, II, III-1 and III-2 in conditions A and B and diversity indexes**

OTU	Species	Identity (%)	Relative abundance (%)							
			I		II		III – 1		III - 2	
			A	B	A	B	A	B	A	B
1	<i>Clostridium guangxiense</i>	98.25	16	0	31	32	22	49	21	54
2	<i>Streptococcus parasuis / suis / equinus</i>	100.00	12	37	0	1	0	0	0	2
3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	96.00	19	0	42	0	42	0	37	3
4	<i>Bifidobacterium sp.</i>	96.83	0	15	12	22	23	13	28	22
5	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	98.59	0	41	0	39	0	30	0	1
6	<i>Clostridium perfringens</i>	98.75	36	0	0	0	0	0	0	0
7	<i>Clostridium butyricum</i>	99.75	6	0	0	0	1	0	1	0
	Others (%)		10	7	14	6	12	8	13	17
Diversity indexes										
	Shannon index		1.9	1.3	1.6	1.4	1.6	1.3	1.6	1.6
	Pielou index		0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.5	0.4	0.5

#### 3.4.6. Conclusion

The interest of applying a pre-stress (exogenous butyric acid addition for 48 h) prior continuous DF of FW to increase H<sub>2</sub> production was investigated. The stress applied enhanced H<sub>2</sub> production by 48 % during a 6-days steady-state period when compared to the control reactor. This improvement was associated to an increase in butyric acid production by 44 %, an increase in COD conversion from 26 ± 2 % to 32 ± 5 % and a decrease in lactic acid production by 56 %, which was confirmed by a PCA. Microbial analysis revealed butyric acid pre-stress altered the microbial structure. In fact, the higher H<sub>2</sub> production was associated to an increase in abundance of the H<sub>2</sub>-producer *C. guangxiense*, from 22 % to 52 %. Microbial diversity was lowered from 1.9 to 1.3 (Shannon index) during the butyric acid stress, but during the steady-state, no differences in diversity was detected. In addition, instability of *Lactobacillus* species during the steady state period was not associated with an inhibition of *C. guangxiense* abundance. Therefore, adaptation of inocula with acid stress may be an interesting strategy to be implemented in order to improve FW degradation into H<sub>2</sub> and enhance process stability in a continuous fermentation.

### 3.5. A retenir

Les résultats de ce chapitre montrent que l'acétate, le butyrate et le lactate ont des effets délétères sur la production d'H<sub>2</sub> dépendants de la nature de l'acide et de sa concentration. Néanmoins, un seuil inhibiteur de la production d'H<sub>2</sub> a été identifié à 50 mM pour les trois acides considérés. La diminution de la production d'H<sub>2</sub> a été attribuée à de multiples perturbations de l'activité microbienne : diminution de la dégradation du substrat, modification des voies métaboliques et modification des communautés microbiennes.

Plus spécifiquement, les voies métaboliques initialement orientées vers la production de butyrate, d'H<sub>2</sub> et d'acétate ont été redirigées vers la production de lactate de façon dose-dépendante. A 200 mM, 300 mM ou 400 mM de butyrate, d'acétate ou de lactate, la production d'H<sub>2</sub> a été totalement inhibée en faveur de la production de lactate. De plus, le butyrate a présenté l'effet le plus inhibiteur, avec une inhibition de 50 % de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> à 104 mM, alors que l'acétate et le lactate l'induisaient à 209 et 273 mM, respectivement.

Concernant les communautés microbiennes, 300 mM d'acétate, 200 mM de butyrate et 400 mM de lactate ont été associés à une diminution de l'abondance relative de *Clostridiaceae* en faveur de celles de *Lactobacillaceae* et de *Bacillaceae*. En dessous de ces concentrations, une combinaison de changements métaboliques, d'inhibition de la consommation du substrat et dans une moindre mesure de changements populationnels a induit l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub>. Plus précisément, à l'échelle de la famille et du genre, les communautés microbiennes ne pouvaient pas être clairement distinguées malgré des productions en H<sub>2</sub> variables. Toutefois, à l'échelle de l'espèce, deux *Clostridium* sp. ont présenté des résistances variables aux acides ajoutés. Particulièrement, *Clostridium butyricum*, dont la croissance n'a pas été inhibée jusqu'à 100, 200 et 250 mM de butyrate, d'acétate et de lactate, respectivement, est suspecté d'avoir changé d'activité métabolique en faveur de la production de lactate.

Ainsi, ces travaux ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> en culture mixte et montrent que la seule considération de la concentration en acides non dissociés est insuffisante et que la nature de l'acide influence également le processus d'inhibition.

Au-delà, des expériences complémentaires ont mis en évidence une production d'H<sub>2</sub> secondaire en présence de fortes concentrations en acides. Ces fermentations secondaires ont été principalement associées à la croissance de deux espèces : *C. guangxiense* jusqu'à 200 mM d'acétate et de butyrate, et *C. tyrobutyricum* jusqu'à 300 mM de lactate. Ces espèces présentent les avantages d'être capables de croître sous stress acide sans effet de la concentration en acide sur leurs rendements en H<sub>2</sub>, et même en présence de microorganismes potentiellement antagonistes. Ces résultats suggèrent donc que l'adaptation des consortia



microbiens peut être une stratégie d'intérêt pour l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> en conditions de stress acide.

Une stratégie d'adaptation de consortium microbien au butyrate a donc été développée pour améliorer la production d'H<sub>2</sub> lors de la fermentation de soupe de déconditionnement reconstituée. Suite au traitement au butyrate pendant 48 h d'un réacteur alimenté en continu, l'émergence de *C. guangxiense* a été favorisée ; ce dernier s'étant maintenu avec une abondance relative de 52 % pendant un état stationnaire de 6 jours, contre 22 % sans traitement initial. Cette augmentation de l'abondance relative de *C. guangxiense* a contribué à l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> de 47 %, passant de  $1,5 \pm 0,2$  à  $2,2 \pm 0,2$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

Les acides organiques, co-produits lors de la fermentation sombre, jouent donc un rôle majeur dans le déroulement de la fermentation, pouvant affecter la dégradation du substrat, les voies métaboliques et les dynamiques des populations. Au travers de ces trois expériences, un intérêt particulier a été porté sur l'évolution des communautés microbiennes sous stress acide. Il en ressort que la diversité des écosystèmes microbiens, ainsi que leur adaptabilité, sont de formidables sources à investiguer afin d'améliorer la résilience des réacteurs de production d'H<sub>2</sub> à diverses perturbations.



## 4. Influence de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> sur la fermentation sombre et la production d'H<sub>2</sub>

---

### 4.1. Résumé du chapitre

La fermentation sombre est le procédé de production biologique d'H<sub>2</sub> présentant les productivités les plus élevées avec, pour ordre de grandeur, 1 à 60 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> (Łukajtis et al., 2018) contre 0,1 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> par photofermentation ou 3,0 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> par électrolyse microbienne (Volumes en conditions CNTP, *i.e.* à 0 °C et 1 bar) (Levin et al., 2004). Cette caractéristique, intéressante pour le développement de la fermentation sombre à une échelle industrielle, est néanmoins à l'origine de phénomènes de sursaturation du milieu fermentaire par l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> (Kraemer and Bagley, 2006). D'une part, l'accumulation d'H<sub>2</sub> dissous est suspectée de limiter le rendement en H<sub>2</sub> en inhibant l'activité des hydrogénases ou en favorisant l'activité homoacétogène. D'autre part, la concentration en CO<sub>2</sub> dissous est également suspectée d'affecter l'activité homoacétogène et la diversité des communautés microbiennes (D.-H. H. Kim et al., 2006; Nasr et al., 2015). Face à cette problématique, la littérature recense différents types de changements opérationnels à mettre en œuvre pour (i) augmenter le transfert des produits de fermentation de la phase liquide vers la phase gazeuse (par recirculation interne du biogaz, augmentation de la vitesse d'agitation) et (ii) diminuer les pressions partielles en gaz (par dilution du ciel gazeux avec du N<sub>2</sub>, baisse de la pression dans l'espace de tête du fermenteur, extraction sélective de l'H<sub>2</sub> ou du CO<sub>2</sub>). Ces modifications sont associées à des améliorations de la production d'H<sub>2</sub> allant de 10 à 1000 % (Huang et al., 2021; Massanet-Nicolau et al., 2016; Oh et al., 2009).

Pourtant, la compréhension des mécanismes associés à ces améliorations de production d'H<sub>2</sub> en cultures mixtes reste limitée. Ainsi, alors même que la pression partielle en H<sub>2</sub> est souvent considérée comme un paramètre clé, à maintenir bas, l'extraction sélective du CO<sub>2</sub> montre également des effets positifs sur la production d'H<sub>2</sub>. De plus, un nombre limité d'articles présente une analyse des communautés microbiennes, des stratégies de mesure de l'activité homoacétogène performantes ou des mesures des concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dissous. Ainsi les effets individuels de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> sur la fermentation sombre sont encore mal compris.

L'objectif de ce chapitre est donc d'améliorer la compréhension des mécanismes d'inhibition par l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> lors de la fermentation d'une soupe de déconditionnement reconstituée.

Premièrement, en partie 4.2, l'influence sur la production d'H<sub>2</sub> d'une diminution de pression dans le réacteur, du captage du CO<sub>2</sub> et du couplage de ces deux stratégies a été étudiée en mode batch. En résultat majeur, le couplage de la diminution de pression à 0,5 bar

et du captage du CO<sub>2</sub> a été associé à une amélioration du rendement en H<sub>2</sub> de 58 %, notamment *via* la diminution drastique de l'abondance relative d'une bactérie lactique, *Streptococcus lutetiensis*, en faveur de l'abondance de *Clostridiaceae*. Ce changement populationnel a été associé à une diminution de la production de lactate en faveur de la production de butyrate. *S. lutetiensis* exerçait donc probablement une compétition pour le substrat défavorable à la production d'H<sub>2</sub>.

Deuxièmement, en partie 4.3, cet effet de sélection populationnelle a été étudié pendant douze jours lors d'une fermentation conduite en mode continu, en utilisant de nouveau une soupe de déconditionnement. Confirmant les résultats précédents, le captage du CO<sub>2</sub> couplé à une diminution de pression à 0,5 bar a été associé à une réduction drastique de l'abondance de *S. lutetiensis*. Néanmoins, dans ce cas, cette diminution d'abondance d'un compétiteur n'a pas été associée à une augmentation de la production d'H<sub>2</sub>, ce dernier ayant été remplacé par des membres de la famille *Bifidobacteriaceae*, bactéries lactiques. Par ailleurs, l'influence de l'historique de la culture microbienne a également été évaluée en stoppant le captage du CO<sub>2</sub> et/ou en remontant la pression de régulation à 1 bar après six jours de fermentation continue. Suite à l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et à la remontée de la pression de régulation à 1 bar au bout de six jours, la production d'H<sub>2</sub> n'a pas été affectée, mais un changement populationnel en défaveur des *Bifidobacteriaceae* et en faveur des *Lactobacillaceae* a été observé. L'abondance de *S. lutetiensis* est restée nulle après ce changement opérationnel, suggérant que la limitation de sa croissance peut être conservée après arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et augmentation de la pression de régulation à 1 bar.

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'un article en partie 4.2 et sous format conventionnel, en français, en partie 4.3. Les résultats de la partie 4.2 seront soumis à la revue *International Journal of Hydrogen Energy* en 2023.

## 4.2. Stimulation de la communauté microbienne productrice d'H<sub>2</sub> par la capture du CO<sub>2</sub> et la réduction de pression en batch

### 4.2.1. Avant-propos

Dans cette première partie, l'influence d'une diminution de pression et de la capture du CO<sub>2</sub> a été mesurée sur plusieurs paramètres : la production d'H<sub>2</sub>, les rendements métaboliques (acétate, butyrate, lactate), la dégradation du substrat, les concentrations en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> dissous, l'activité homoacétogène et les communautés microbiennes. Le niveau bas de la pression de régulation (0,5 bar en pression absolue) a été choisi selon deux critères. D'une part, des résultats préexistants effectués au laboratoire ont suggéré qu'une baisse de pression à 0,8 bar était insuffisante pour améliorer la production d'H<sub>2</sub>. D'autre part, la pression de 0,5 bar correspondait à une limitation technique, cette pression étant le seuil minimal toléré par les tubes en néoprène utilisés pour assurer un pompage performant du substrat. Les conditions de fermentation (inoculum, préparation du substrat, S/X, température, pH de régulation, concentration en substrat initiale) sont les mêmes que celles appliquées au démarrage de fermentation en mode continu en partie 3.4.

### 4.2.2. Abstract

#### **Boosting hydrogen-producing microbial community through CO<sub>2</sub> capture and low headspace pressure**

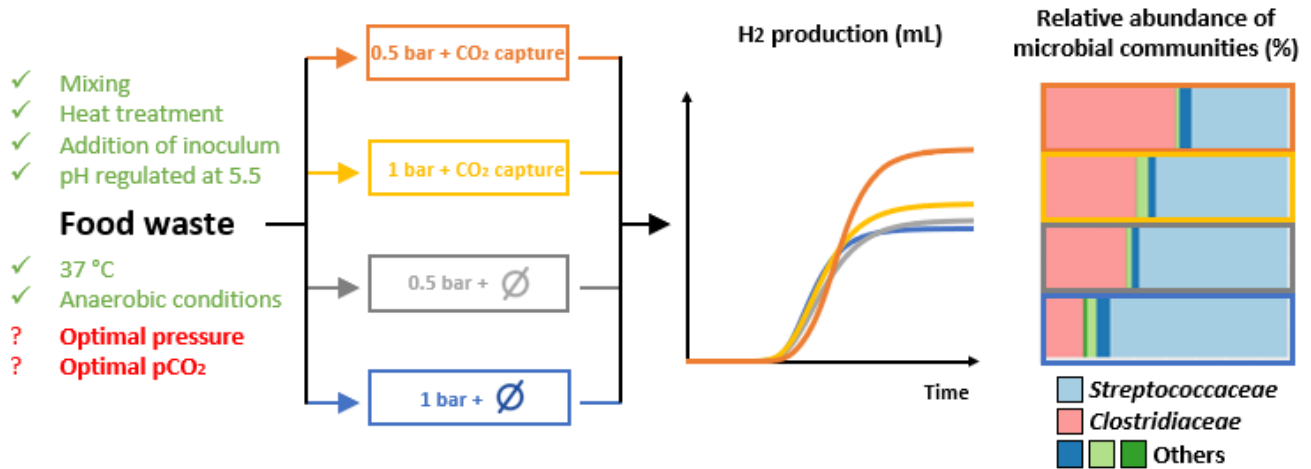
Authors: Nogueur Marie Céline<sup>1</sup>, Perat Lucie<sup>1</sup>, Latrille Eric<sup>1</sup>, Bernet Nicolas<sup>1</sup>, Escudie Renaud, Trably Eric<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>INRAE, Univ Montpellier, LBE, 102 Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

\*eric.trably@inrae.fr

Producing hydrogen (H<sub>2</sub>) with mixed culture by dark fermentation often remains below the maximal H<sub>2</sub> theoretical yield due to metabolic and populational limitations. The reduction of headspace pressure is mostly associated with an improvement of H<sub>2</sub> production. However, the individual effect of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> concentrations is only poorly understood in mixed culture. In this study, reduced pressure, CO<sub>2</sub> capture and a combination of both methods were applied to batch anaerobic fermenters to investigate the effects of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> accumulation on food waste fermentation. As results, coupling reduced pressure and CO<sub>2</sub> capture enhanced the H<sub>2</sub> production by 58%. This improvement correlated with a reduction of *Streptococcus sp.* abundance, replaced by H<sub>2</sub> producing bacteria. These findings highlight how modulation of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations could be used as action levers for fermentation control through microbial population selection.

**Keywords:** Biohydrogen, Homoacetogenesis, Lactic acid bacteria, Supersaturation



**Figure 4-1 : Graphical abstract**

#### 4.2.3. Introduction

In 2019, 79 % of worldwide energy supply relied on fossil energies (*Key World Energy Statistics 2020*, 2020). However, greenhouse gas emissions from fossil fuel combustion contribute to global warming (*Key World Energy Statistics 2020*, 2020). Future energy sources that are carbon-free and renewable are expected to be developed to reduce oil-dependence and ensure sustainable energy transition (Nikolaidis and Poullikkas, 2017). Hydrogen (H<sub>2</sub>) appears as an interesting alternative to fossil fuels because of clean combustion and high energy yield compared to conventional fuels. However, H<sub>2</sub> must be produced from sustainable processes to play a determinant role as game changer in energy transition (Łukajtis et al., 2018). Alternative processes have been investigated to produce H<sub>2</sub> from renewable energy sources. Among them, biological processes, based on the activity of microorganisms that release H<sub>2</sub> as metabolic co-product, exhibit a low impact on the environment (Dincer and Acar, 2014). Dark fermentation is considered as one of the most promising biological processes to be developed at industrial scale (Chen et al., 2021a). Dark fermentation consists in an anaerobic microbial process that converts organic matter into organic acids, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. However, due to thermodynamic limitations, a maximum of 33 % of the organic substrate (as COD) can be theoretically converted into H<sub>2</sub> and the conversion process should be finalized with other technologies, such as anaerobic digestion (AD) (Hallenbeck, 2009).

Several phenomena are responsible for lowering the H<sub>2</sub> production in mixed cultures, mainly related to metabolic and populational limitations. In one hand, H<sub>2</sub> accumulation in the bulk phase inhibits H<sub>2</sub> production due to thermodynamic limitations, by redirecting the microbial metabolisms to other metabolic pathways to ensure the cellular redox balance

(Thauer, 1977). On the other hand, H<sub>2</sub>-consuming bacteria, so-called hydrogenotrophic bacteria can develop, reducing the apparent H<sub>2</sub> production. Among these hydrogenotrophs, acetogenic bacteria converting H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> into acetate are considered as an unresolved challenge in dark fermentation (Carosia et al., 2021; Castelló et al., 2020; Saady, 2013).

The partial pressure of H<sub>2</sub> in the gas phase has been considered as a key parameter to control H<sub>2</sub> accumulation since it is supposed to correlate with the dissolved concentration. Different methods such as reduced pressure, sparging, or gas release have been used to reduce the H<sub>2</sub> partial pressure and most of the authors have reported successful improvement of H<sub>2</sub> production by using these methods (Lee et al., 2012; Liu and Wang, 2017; Mizuno et al., 2000; Nunes Ferraz Júnior et al., 2020). In addition, CO<sub>2</sub> capture was also implemented to reduce CO<sub>2</sub> partial pressure and subsequently limit the homoacetogenic activity (Park et al., 2005). This strategy successfully improved the H<sub>2</sub> production, even though it was associated with an increase in H<sub>2</sub> partial pressures. Then, the individual effect of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressures was investigated by Massanet-Nicolau et al. (2016) who showed that H<sub>2</sub> removal alone was inefficient in enhancing H<sub>2</sub> production, but CO<sub>2</sub> removal and coupled H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> removal induced a 10- and a 26-fold increase in H<sub>2</sub> yield, respectively. The authors attributed this improvement to a reduction in homoacetogenic activity, but microbial analysis was lacking to confirm the hypothesis. In contrast, Kim et al. (2006) also improved H<sub>2</sub> yield in a continuous reactor from 0.75 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>hexose added</sub><sup>-1</sup> to 0.93 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>hexose added</sub><sup>-1</sup> by sparging the liquid phase with N<sub>2</sub> and up to 1.2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>hexose added</sub><sup>-1</sup> by sparging the liquid phase with CO<sub>2</sub>. The authors observed that, interestingly, CO<sub>2</sub> sparging at 300 mL.min<sup>-1</sup> simplified the microbial community, disfavoured homoacetogenic activity and selected H<sub>2</sub>-producing microorganisms. Therefore, it is not yet clearly stated how the methods of reduced pressure, sparging, gas release can improve the production of H<sub>2</sub>.

The main objective of this study was to investigate the individual inhibition mechanisms of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> during anaerobic fermentation of reconstituted food waste in batch fermenters, operated with a mixed microbial culture. The partial pressures of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were modulated using a CO<sub>2</sub> trap, a reduced headspace pressure and a combination of both strategies. As supersaturation of the liquid phase in H<sub>2</sub> can occur during dark fermentation (Kraemer and Bagley, 2006), the dissolved concentration of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were measured. The novelty of this work, in comparison with the studies previously reported, stands in the monitoring of metabolic products, substrate degradation, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> dissolved concentrations and microbial population dynamics during cultivation to better understand the mechanisms involved.

#### 4.2.4. Material and Methods

##### 4.2.4.1. *Microbial inoculum preparation*

The initial microbial inoculum corresponded to an activated aerobic sludge sampled from a wastewater treatment plant in Narbonne (France). The sludge was centrifuged to remove water, and aliquots of the pellet were freeze-dried and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After processing, the inoculum was composed of  $750 \pm 1\text{ mg}_{\text{VS}}\cdot\text{g}^{-1}$  (VS = volatile solids). Before use, the freeze-dried powder was rehydrated in water (reaching  $18.75\text{ g}_{\text{VS}}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and thermally pre-treated to remove methanogenic archaea. Heat-shock pre-treatment was carried out with a hot plate (IKA CMAG H57) and a temperature probe IKA ETS D5, for 15 minutes at  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Measurements of total solids (TS) and volatile solids (VS) were performed according to the APHA standard methods (APHA, 2017).

##### 4.2.4.2. *Composition of the feedstock*

The substrate consisted of a reconstituted deconditioning soup prepared from frozen food. The composition was inspired from an average biowaste composition of major French food retailers as carried by Dauptain et al. (2020). It was composed of  $348.3 \pm 0.6\text{ mg}_{\text{TS}}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $336.7 \pm 0.6\text{ mg}_{\text{VS}}\cdot\text{g}^{-1}$ . Biochemical methane potential (BMP) of the feedstock was determined through direct measurement and near infrared spectroscopy (Lesteur et al., 2011). Direct BMP measurement were performed in the same way as in Van Vlierberghe et al. (2021) experiments, with  $2\text{ g}_{\text{VS}}$  of substrate,  $2\text{ g}_{\text{VS}}$  of inoculum (anaerobic sludge from granular UASB), macro- and microelement solutions and  $\text{NaHCO}_3$  as buffer. The resulting BMP (from direct measurement and near infrared spectroscopy) amounted to  $451 \pm 6\text{ mL}_{\text{CH}_4}\cdot\text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ . From this value, and considering that  $350\text{ mL}$  of  $\text{CH}_4$  can be theoretically recovered from one gram of biodegradable COD (chemical oxygen demand), the amount of biodegradable COD per gram of VS was estimated at  $1.28 \pm 0.02\text{ g}_{\text{biodegradableCOD}}\cdot\text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ . Before use, the substrate was mixed and diluted to reach  $0.10\text{ g}_{\text{TS}}\cdot\text{g}_{\text{substrate}}^{-1}$ . A thermic hygienisation step was carried out (1h at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  in water bath). The mixture was then filtered at  $2\text{ mm}$  and added to the batch fermenter. Final medium composition in the fermenter is presented in Tableau 4-1. The filtered mixture characteristics were  $100 \pm 5\text{ mg}_{\text{TS}}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $93 \pm 4\text{ mg}_{\text{VS}}\cdot\text{g}^{-1}$ . Additional information regarding the substrate are available in Tableau 2-2.



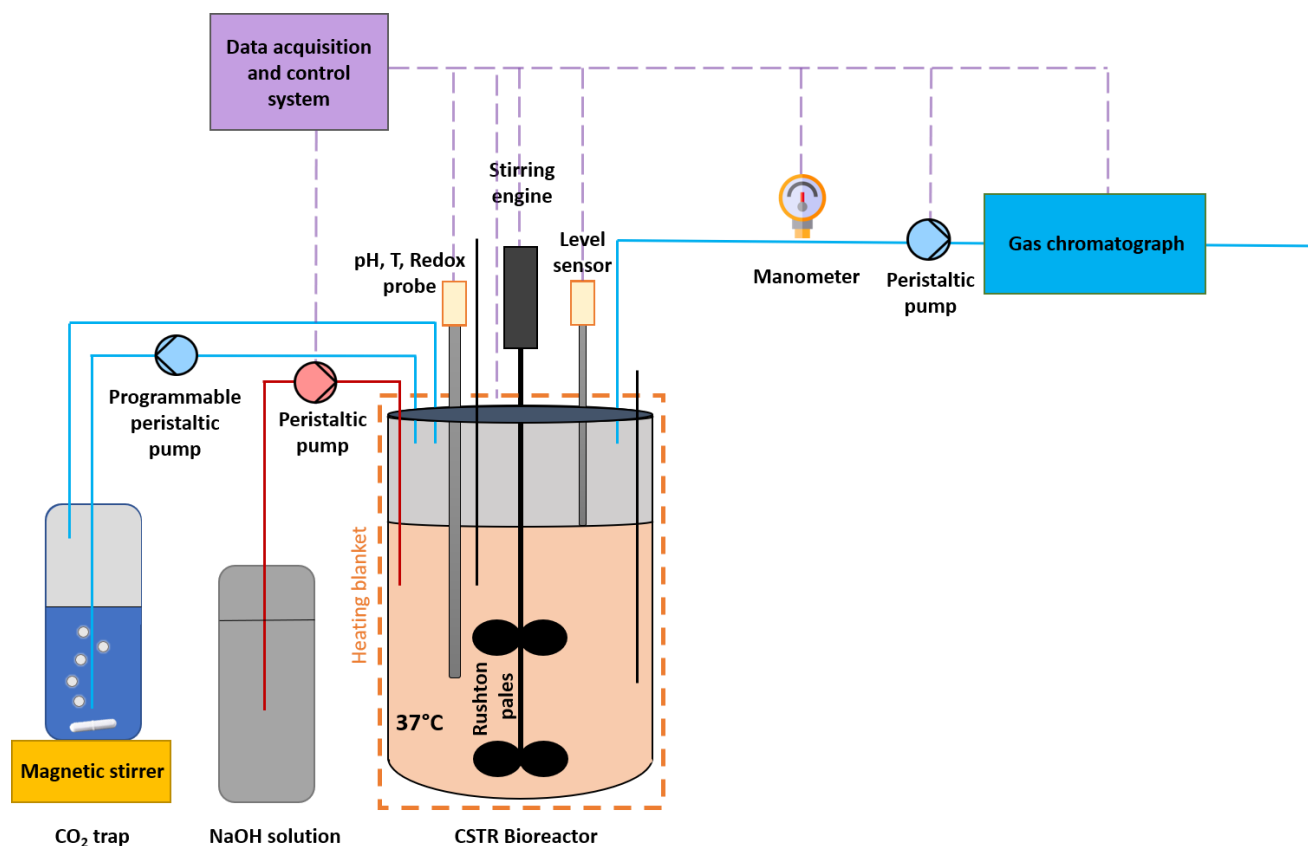
**Tableau 4-1 : Initial composition of the fermentation medium**

<b>Composition</b>	<b>Concentration (g·L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Minced beef</b>	3.5 ± 0.02
<b>Yogurt</b>	2.3 ± 0.05
<b>Red berries</b>	3.5 ± 0.12
<b>Breaded fish</b>	2.3 ± 0.03
<b>French fries</b>	4.6 ± 0.09
<b>Mix of vegetables</b>	3.5 ± 0.07
<b>Bread</b>	3.5 ± 0.02
<b>Total solids (g<sub>TS</sub>·L<sup>-1</sup>)</b>	8.1 ± 0.4
<b>Volatile solids (g<sub>VS</sub>·L<sup>-1</sup>)</b>	7.8 ± 0.4
<b>COD (g·L<sup>-1</sup>)</b>	10 ± 0.5

#### 4.2.4.3. *Experimental setup*

Experiments were set in a 3L-Applikon glass fermenter with a working volume of 2 L and a headspace volume of 1 L. A probe inside an immersion sleeve measured the internal temperature and a heated blanket regulated the temperature. Mixing was ensured by magnetic stirring. pH was measured by an in-situ probe and was regulated with 3 M NaOH. The gas production was measured through the measurements of pressure variations inside the fermenter and by using a peristaltic pump calibrated at different levels of pressure. Produced volumes were normalized (T = 0 °C and P = 1 atm). Pressure was regulated with a control device combining a pressure sensor (LEO3, Mano 2000, KELLER, 0 – 4 bar) and a peristaltic pump (Masterflex L/S, Cole Parmer 7554-85) following a two-band control law actuated by the on-line control software Odin (INRIA, France).

A CO<sub>2</sub> removal method was developed to trap the CO<sub>2</sub> from the biogas and reduce the CO<sub>2</sub> partial pressure in the headspace of the fermenter. This trap was composed of a 600 mL-bottle with 570 mL of a solution composed of 1 L NaOH (3 M) supplemented with 5 mL of thymolphthalein at 0.4 %. The bottle was sealed and placed on a magnetic stirrer. Biogas from the fermenter was injected in the liquid phase of the CO<sub>2</sub> trap with a peristaltic pump at a flow rate of 150 ± 5 mL·min<sup>-1</sup>. The outlet gas, depleted in CO<sub>2</sub>, was then recirculated to the fermenter headspace (Figure 4-2).



**Figure 4-2 : Experimental setup**

#### 4.2.4.4. Operating conditions

The inoculum, the substrate and tap water were mixed, reaching the working volume of 2 L. Substrate to biomass (S/X) ratio was set at  $11.1 \text{ g}_{\text{biodegradable COD}} \cdot \text{g}_{\text{inoculum}} \text{ VS}^{-1}$  and the substrate concentration was  $10 \text{ g}_{\text{biodegradable COD}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Fermenters were flushed with N<sub>2</sub> for 15 min to remove O<sub>2</sub> and ensure anaerobic conditions. pH was kept above 5.5 while temperature was regulated at  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Stirring was set at 180 RPM.

Batch fermentations were carried out in triplicates under four specific conditions of pressure, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressures. A control fermentation (named 1b) was carried out with total pressure regulated between 1030 and 1060 mbars. A reduced pressure was applied for the condition with a total pressure regulated between 500 and 550 mbars (named 0.5b). The 1b\_0CO<sub>2</sub> condition corresponded to a fermenter regulated at a total pressure between 1030 and 1060 mbar and coupled with the CO<sub>2</sub> trap. Finally, the 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition combined a pressure regulated between 500 and 550 mbars and a CO<sub>2</sub> trap. Fermentations were monitored for 48 hours.

#### 4.2.4.5. Gas and metabolites analysis

The outlet of the gas regulation pump was connected to a micro gas chromatograph (SRA I-GC R3000) for on line monitoring of the biogas composition. The chromatograph was equipped with two columns: One column dedicated to CO<sub>2</sub> analysis (Molesieve 5A 10 m column, temperature of 80 °C, 30 PSI with argon as carrier gas) and a second column dedicated to N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> analysis (a PoraPlot U (PPU) 8 m column, temperature at 70 °C, 20 PSI with helium as carrier gas). Two micro-thermal conductivity detectors (TCD) set at 90 °C completed the two analytical chains. Gas composition was analysed every two hours. 2 mL of liquid samples in duplicate were taken from the fermenter every 2 hours over the day and were centrifuged for 15 min at 13,000 g in an Eppendorf Minispin centrifuge. Supernatants and pellets were stored at -20 °C until further use.

Supernatants were filtered at 0.2 µm (nylon filter) before analysis. VFA concentrations of each sample (acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, valerate, iso-valerate) were measured by gas chromatography (GC). The device was composed of a Clarus 580 gas chromatograph (Perkin Elmer) equipped with an AlltechFFAP EC™ 1000 column coupled to a flame ionization detector (FID) at 280 °C. The carrier gas was N<sub>2</sub> at a flow rate of 6 mL·min<sup>-1</sup>. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) measured other metabolites concentration (ethanol, organic acids such as lactate, succinate, and residual sugars). The device was composed of a protective precolumn Microguard cation H refill catbridges, Biorad), an HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Biorad) running at 35 °C and a refractive index detector (Waters R410) at 45 °C. A solution of 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 0.3 mL·min<sup>-1</sup> was used as eluent.

#### 4.2.4.6. COD conversion and metabolic yields calculation

The substrate COD conversion into metabolites was estimated through the calculation of the ratio between the sum of the COD of each produced metabolite and the initial COD introduced in the fermenter as follows (Equation 4-1):

$$\text{COD conversion} = \frac{COD_{\text{Acetate}} + COD_{\text{Butyrate}} + COD_{\text{H}_2} + COD_{\text{Lactate}}}{COD_{\text{Substrate}}} \quad \text{Equation 4-1}$$

with  $COD_{\text{Acetate}}$ ,  $COD_{\text{Butyrate}}$ ,  $COD_{\text{H}_2}$ ,  $COD_{\text{Lactate}}$  and  $COD_{\text{Substrate}}$  corresponding to the COD of produced acetate, butyrate, H<sub>2</sub>, lactate and introduced substrate, respectively.

Yields of acetate ( $\text{gCOD}_{\text{Acetate}} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$ ), butyrate ( $\text{gCOD}_{\text{Butyrate}} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$ ) and lactate ( $\text{gCOD}_{\text{Lactate}} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$ ) were calculated by dividing the COD of the considered metabolite by the COD of the sum of all other metabolites quantified, including  $\text{H}_2$ .

#### 4.2.4.7. Sequencing, qPCR and microbial community analyses

The sample pellet was used for microbiological analyses. DNA extraction was made with FastDNA™ SPIN kit (MP biomedical, LCC, California, USA) following manufacturer's instructions (Braga Nan et al., 2020). Extracted DNA was then stored at -20 °C before use.

The V3-V4 region of the 16S rRNA was amplified by PCR using universal primers as reported by Carmona-Martinez et al 2014 (Carmona et al., 2015). The PCR mix was composed of MTP™ Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Inc., Merck, Germany) ( $0.05 \text{ u} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) with enzyme buffer, forward and reverse primers (0.5 mM), dNTP (0.2 mM), sample DNA ( $0.04 \text{ to } 0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) and water until a final volume of 60  $\mu\text{L}$ . 35 cycles of denaturation (95 °C, 1 min), annealing (59 °C, 1 min) and elongation (72 °C, 1 min) were carried out in a Mastercycler® thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). A final extension step was added for 10 min at 72 °C at the end of the 35 amplification cycles. PCR amplifications were verified by 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, California, USA). The GenoToul platform (Toulouse, France <http://www.genotoul.fr>) used an Illumina Miseq sequencer (2 x 300 pb paired-end run) for the sequencing reaction. Mothur version 1.39.5 was used for reads cleaning, assembly and quality checking. Alignment was performed with SILVA release 128. The latter was also used as taxonomic outline. Visual representation of the bacterial relative abundances was performed with phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013).

qPCR analyses were carried out to specifically quantify total bacteria, homoacetogenic and hydrogen-producing bacteria using the intercalating fluorescent dye SYBR Green. A BioRad CFX96 Real-Time Systems C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-rad Laboratories, USA) was used for all qPCR programs. Genes targeted, qPCR mix composition, primers and qPCR cycles are detailed in Tableau 2-6.

#### 4.2.4.8. Modelling of Hydrogen production

$\text{H}_2$  production over time curve was modelled with a modified Gompertz equation (Chang et al., 2012) (Equation 4-2).

$$H(t) = H_{\text{max}} \times e^{-e^{R \times e^{1 \times H_{\text{max}} (\lambda - t) + 1}}} \quad \text{Equation 4-2}$$

where  $H(t)$  is the volume of produced  $H_2$  over time per gram of volatile solid introduced from the substrate ( $\text{mL}\cdot\text{gVS}^{-1}$ ),  $H_{max}$  is the maximal quantity of  $H_2$  produced ( $\text{mL}\cdot\text{gVS}^{-1}$ ),  $R$  is the maximal rate of  $H_2$  production ( $\text{mL}\cdot\text{gVS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) and  $\lambda$  is the lag phase (day). Modelling was carried out with R software (version 4.0.4), using the grofit package developed by Kahm et al. (2010).

#### 4.2.4.9. Dissolved $H_2$ and $CO_2$ concentrations

The concentrations of dissolved  $H_2$  and  $CO_2$  were manually estimated using a static headspace chromatography (SH-GC) method. SH-GC analysis was carried out in two steps, following the method described by Kolb and Ettre (2006) : first, a liquid sample of the fermenter was poured in a vial with a known headspace volume. The vial was sealed and stored until an equilibrium in  $H_2$  and  $CO_2$  was established between the content of the liquid and the gaseous phase. Then, an aliquot of the vial's headspace was analysed by GC.

More precisely, the protocol of Kraemer and Bagley (2006) was used and slightly modified because the use of needle of 1.2 mm was not adapted to pump dense organic materials. 20 mL of the fermenter bulk were sampled and poured (instead of being added with a syringe and through a needle) in a 25 mL vial containing either 3 mL of  $H_2SO_4$  (98 %) or 3 mL of NaOH (18.4 M) to reach  $\text{pH} < 0.5$  and  $> 13$ , respectively. These extreme-pH conditions are set to stop biological activities and therefore prevent endogenous gas production. Acid conditions were used to estimate the dissolved  $CO_2$  as all carbonates are in gaseous state. The vial was then fast sealed with a septum and an aluminium cap. Vials were stored upside down for 24 hours at room temperature. The composition of the headspace was analysed with a PerkinElmer® Clarus 580 gas chromatograph (Waltham, US) as described by Brémond et al. (2020).

Finally, a relationship between gas concentration in headspace ( $H_2$  or  $CO_2$ ), the dissolved concentration in the liquid phase and the liquid / gas volume ratio of the vial was used (Equation 4-3, Equation 4-4):

$$[H_2]_{aq} = \frac{n_{H_2(g)} \times (1 + H_{H_2}^{cp} \times R \times T \times \frac{V_L}{V_G})}{V_{sample}} \quad \text{Equation 4-3}$$

$$[C_T]_{aq} = \frac{n_{C_T(g)} \times (1 + H_{CO_2}^{cp} \times R \times T \times \frac{V_L}{V_G})}{V_{sample}} \quad \text{Equation 4-4}$$

where  $[H_2]_{aq}$  is the concentration of dissolved  $H_2$  in the reactor ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $[C_T]_{aq}$  is the concentration of dissolved carbonate in the reactor ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $V_{sample}$  is the volume of sampled medium (L),  $n_{H_2(g)}$  is the number of mole of  $H_2$  in the gaseous phase in the vial after equilibrium deduced from headspace volume, pressure, and  $H_2$  proportion in the vial,  $n_{C_T(g)}$

is the number of mole of CO<sub>2</sub> in the gaseous phase in the vial after equilibrium deduced from headspace volume, pressure, and CO<sub>2</sub> proportion in the vial,  $H_{H_2}^{cp}$  and  $H_{CO_2}^{cp}$  are Henry's constant for H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> respectively, at 20 °C ( $8.026 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$  and  $3,9\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$  (Sander, 2015)), R is the perfect gas constant ( $R = 0.08206 \text{ L}\cdot\text{atm}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ), T is room temperature in °K,  $V_L$  is the volume of liquid phase in the vial (which corresponds to the addition of  $V_{sample}$  and of the volume of acid / base added, L) and  $V_G$  is the volume of the gas headspace (L).

In the vials containing 3 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %), *i.e.* pH < 0.5, it was assumed that all carbonates were in CO<sub>2</sub> form and thus, CO<sub>2</sub> dissolved concentration in the fermenter ( $[CO_2]_{aq}$ ) was deduced from the distribution of the total carbonate content  $C_T$  in forms of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> at the pH of the fermenter. As mentioned by Kraemer and Bagley (2006), H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was assumed to be negligible.

The precision of the developed method was estimated at  $79 \pm 4 \%$  of the spiked H<sub>2</sub> and  $77 \pm 4 \%$  of the spiked CO<sub>2</sub> that were recovered. This precision is lower than Kraemer and Bagley's results who obtained a 101 % recovery. The use of highly concentrated base and acid solutions resulted in exothermic reactions that induce high temperature variation, which was probably the source of imprecision. Without acid or base addition in the vial, the H<sub>2</sub> recovery reached  $95 \pm 5 \%$ .

Finally, a supersaturation factors (Sf) was calculated as follow (Equation 4-5):

$$Sf = \frac{\text{Measured dissolved concentration}}{\text{Dissolved concentration based on Henry's law}} \quad \text{Equation 4-5}$$

#### 4.2.4.10. Hydrogen production efficiency

The Hydrogen production efficiency (HPE) corresponded to the ratio between the experimentally accumulated H<sub>2</sub> and the theoretical H<sub>2</sub> production based on the butyrate and acetate concentration, and was calculated as follows (Equation 4-6) (Infantes et al., 2011):

$$HPE = \frac{H_2}{2 (Ac + Bu)} \quad \text{Equation 4-6}$$

where H<sub>2</sub> correspond to H<sub>2</sub> recovery (mol), Ac and Bu correspond to acetate and butyrate production (mol), respectively.

#### 4.2.4.11. Statistical data analysis

Statistical analyses were carried out with R software. Analysis of variances (ANOVA) was calculated using the aov function. Shapiro and Barlett tests were performed to confirm the hypotheses of residue distribution normality and homoscedasticity.

#### 4.2.5. Results and Discussion

##### 4.2.5.1. Hydrogen production

The evolution of H<sub>2</sub> production (mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>) during fermentation was modelled using the Gompertz model, for each condition and replicate. Tableau 4-2 presents the Gompertz parameters after fitting with experimental data: H<sub>max</sub>, the maximal H<sub>2</sub> production (in mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>); R, the maximal H<sub>2</sub> production rate (in mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>); λ, the lag phase (in days). The efficiency of the CO<sub>2</sub> trap was confirmed by the low amount of CO<sub>2</sub> found in bioreactor headspace. A maximum of 1.9 ± 0.2 % and 4.6 ± 0.3 % of CO<sub>2</sub> were found in 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions, respectively.

**Tableau 4-2 : Fitted gompertz parameters describing hydrogen production kinetics**

Conditions	<i>H</i> max (mL·g <sub>VS added</sub> <sup>-1</sup> )	<i>R</i> (mL·g <sub>VS added</sub> <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> )	λ (day)
<b>1b</b>	82 ± 29	444 ± 206	0.35 ± 0.03
<b>1b_0CO<sub>2</sub></b>	97 ± 25	385 ± 134	0.34 ± 0.02
<b>0.5b</b>	86 ± 20	340 ± 55	0.35 ± 0.02
<b>0.5b_0CO<sub>2</sub></b>	130 ± 13	595 ± 219	0.41 ± 0.06

Fermentation at standard 1b condition resulted in a H<sub>max</sub> of 82 ± 29 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>. H<sub>max</sub> of 86 ± 21 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup> observed in 0.5b condition was similar to 1b. In comparison with 1b condition, 18 % improvement of the H<sub>2</sub> production was observed in 1b\_0CO<sub>2</sub> condition, with an intermediate H<sub>max</sub> of 97 ± 25 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>. The highest H<sub>max</sub> value was achieved with the 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, with 130 ± 13 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>, corresponding to an interesting improvement of the performances by 58 %. This result suggests that simultaneous CO<sub>2</sub> capture and low headspace pressure could have a synergistic effect on H<sub>2</sub> production improvement. Overall, fermentation with a CO<sub>2</sub> trap (1b\_0CO<sub>2</sub>, 0.5b\_0CO<sub>2</sub>) had a significant positive impact on H<sub>max</sub> (ANOVA, p = 0.050) in comparison with fermentation without CO<sub>2</sub> trapping (1b, 0.5b). In contrast, fermentation with reduced pressure (0.5b, 0.5b\_0CO<sub>2</sub>) did not significantly improve H<sub>max</sub> (ANOVA, p = 0.189). Such synergistic effect between CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> partial pressures reduction was also reported by Massanet-Nicolau et al. (2016) who reduced both H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressures in a continuous reactor fed with sucrose and coupled with an electrochemical purification system and CO<sub>2</sub> trap (pH = 5.5, 37 °C, HRT (hydraulic retention

time) = 24 h). Similarly, in their study, H<sub>2</sub> trapping alone does not enhance H<sub>2</sub> production, CO<sub>2</sub> trapping increased H<sub>2</sub> yield from 0.07 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> (under atmospheric pressure) to 0.72 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> and the highest yield of 1.79 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>hexose</sub><sup>-1</sup> was reached by coupling H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> trapping.

Interestingly, the lowest production rate (R) was reached in 0.5b condition, with 340 ± 55 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, and the highest was reached in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, with 595 ± 219 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>. 1b condition and 1b\_0CO<sub>2</sub> conditions showed similar rates of 444 ± 206 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> and 385 ± 134 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>VS added</sub><sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, respectively. No significant effect of pressure reduction or CO<sub>2</sub> trapping on R was found.

The lag phase was not impacted by the conditions with an average value of 0.36 ± 0.03 days observed in all conditions. Therefore, it was concluded that the reduced H<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub> partial pressure did not accelerate or slow down the initial phases of fermentation.

Finally, less variability in H<sub>max</sub> was observed in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition with regard to the other conditions (standard deviation of 29 %, 25 %, 20 % and 13 % for 1b, 1b\_0CO<sub>2</sub>, 0.5b and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions, respectively), suggesting that the use of reduced pressure and CO<sub>2</sub> trap could participate to selective pressure of metabolic pathways and / or microbial populations.

As in the present study, some authors reported that reduced pressure did not substantially improve H<sub>2</sub> production. Lee et al. (2012) evaluated that a decrease in absolute pressure from 1 bar to 0.5 bar only induced a 8 % increase in H<sub>2</sub> production rate and H<sub>2</sub> yield (continuous CSTR, 500 RPM, pH 5.5, 37 °C, sucrose as substrate), while Kataoka et al. (1997) did not observe any improvement in H<sub>2</sub> yield between atmospheric pressure and 0.28 bar using a pure culture of *Clostridium butyricum* (continuous, no stirring, pH 6.7, 30 °C, glucose and poplypeptone as substrate). However, the lack of significant positive effect of low pressure on H<sub>2</sub> production in our study is in contradiction with some results previously reported in the literature. For instance, in continuous culture, Ferraz et al. (2020) obtained a higher H<sub>2</sub> production rate and H<sub>2</sub> yield under low pressure conditions (0.8 bar) with an increase of 60 % than under atmospheric conditions (continuous CSTR, 250 RPM, pH 5.5, 37 °C, molasse as substrate). This diversity in the effects of headspace pressure modulation could be explained by the various operating conditions used. Indeed, pressure reduction is conducted to reduce dissolved concentration and supersaturation of liquid phase but supersaturation relies on many parameters such as: H<sub>2</sub> production rate (Ljunggren et al., 2011; Zhang et al., 2013), cross sectional area of the reactor, temperature, stirring velocity, geometrical parameters of the vessel and the stirred employed, superficial gas velocity and liquid effective viscosity (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

In continuous culture, Nasr et al. (2015) (CSTR, pH 5.2, 8h HRT, glucose as substrate) demonstrated that the use of a CO<sub>2</sub> trap increased H<sub>2</sub> yield by 22 %, which is consistent with the 18 % increase in H<sub>2</sub> production observed in the condition 1b\_0CO<sub>2</sub> in this study. Park et al. (2005) observed a higher increase in H<sub>2</sub> production yield of 43 % in a batch fermenter coupled



with a CO<sub>2</sub> trap (300 RPM, initial pH 6.2, 30 °C, glucose as substrate). In the study conducted by Massanet-Nicolau et al. (2016) in continuous mode, a 10-fold improvement in H<sub>2</sub> production was achieved with CO<sub>2</sub> trapping (gas mixing loop, 24h HRT, pH 5.5, 35 °C, sucrose as substrate). Again, differences in operating conditions may explain the variability of the impact of CO<sub>2</sub> trapping. In addition, the CO<sub>2</sub> trapping method could also have an influence. Indeed, in some studies CO<sub>2</sub> concentration is decreased through KOH exposure in the headspace (Nasr et al., 2015; Park et al., 2005), or headspace gas was recirculated in a NaOH solution (our study) which probably enhanced superficial gas velocity, while Massanet-Nicolau et al. (2016) followed the same practice and additionally bubbled the CO<sub>2</sub>-depleted gas into the culture medium, which probably enhanced superficial gas velocity and improved stirring.

#### 4.2.5.2. H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations

H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressures (pH<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>) were estimated over the time course of the experiment on the basis of the total pressure and the biogas composition (Figure 4-3-a). Figure 4-3-b presents the pressure pH<sub>2</sub> in function of the cumulated H<sub>2</sub> production divided by maximal H<sub>2</sub> production (Hmax %) in order to eliminate bias due to differences in dynamics between experiments. For an advancement of H<sub>2</sub> production ranging from 0 % to 20 % of Hmax (*i.e.*, from 0 to 8.9 - 10.8 hours after the beginning of the fermentation), pH<sub>2</sub> were similar for all conditions (Figure 4-3-b). For H<sub>2</sub> production higher than 20 % of Hmax, pH<sub>2</sub> strongly varied between 1b, 0.5b and 1b\_0CO<sub>2</sub> conditions. For instance, at 90 % of Hmax, pH<sub>2</sub> reached 475 ± 101 mbar in 1b condition, 240 ± 52 mbar in 0.5b condition, and 811 ± 99 mbar in 1b\_0CO<sub>2</sub> condition, although the final H<sub>2</sub> productions were not significantly different. Since the pH<sub>2</sub> in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition varied in a similar way as in 1b condition, reaching 480 ± 21 mbar at 90 % of Hmax, it was concluded that the pH<sub>2</sub> was not the main factor affecting the H<sub>2</sub> production performances. Similarly, no relation was found between pCO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> production (data not shown). For these reasons, the dissolved concentrations of H<sub>2</sub> ([H<sub>2</sub>]aq) and CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]aq) in the liquid phase were considered.

Figure 4-3 c-d presents the dissolved concentration of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> measured in the liquid phase of the reaction medium at two different times. The first sampling time corresponded to the end of the H<sub>2</sub> production phase (t<sub>1</sub> = 0.70 ± 0.03 day), while the second one (t<sub>2</sub> = 1.72 ± 0.05 days) was performed during the H<sub>2</sub> consumption phase characterized by a decrease in headspace pressure and H<sub>2</sub> fraction. This phase was associated to an apparent homoacetogenic phase. In addition, supersaturation factors (Sf) were calculated for each condition at t<sub>1</sub> and t<sub>2</sub> and are presented in Figure 4-3 c and d (crosses and dots for t<sub>1</sub> and t<sub>2</sub>, respectively).

The 0.5b\_0CO<sub>2</sub> and 1b\_0CO<sub>2</sub> conditions corresponded to the highest [H<sub>2</sub>]aq with values of 0.6 ± 0.1 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup> and 0.5 ± 0.4 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup> at time t<sub>1</sub>, respectively compared to conditions

1b ( $0.008 \pm 0.005 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and 0.5b ( $0.026 \pm 0.025 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Interestingly,  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  correlated negatively with  $\text{pCO}_2$  with a correlation score of - 0.75, a p-value of 0.005 and positively with Hmax with a correlation score of 0.27, a p-value of 0.007 (pearson correlation evaluated with cor.test function in R). Conversely, J. Kraemer and Bagley (2008) and Zhang et al. (2013) found that  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  did not correlated with  $\text{H}_2$  yields decreasing  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  with  $\text{N}_2$  sparging from 1.4 mM to 0.5 mM and from 0.4 mM to 0.1 mM in a continuous reactor.

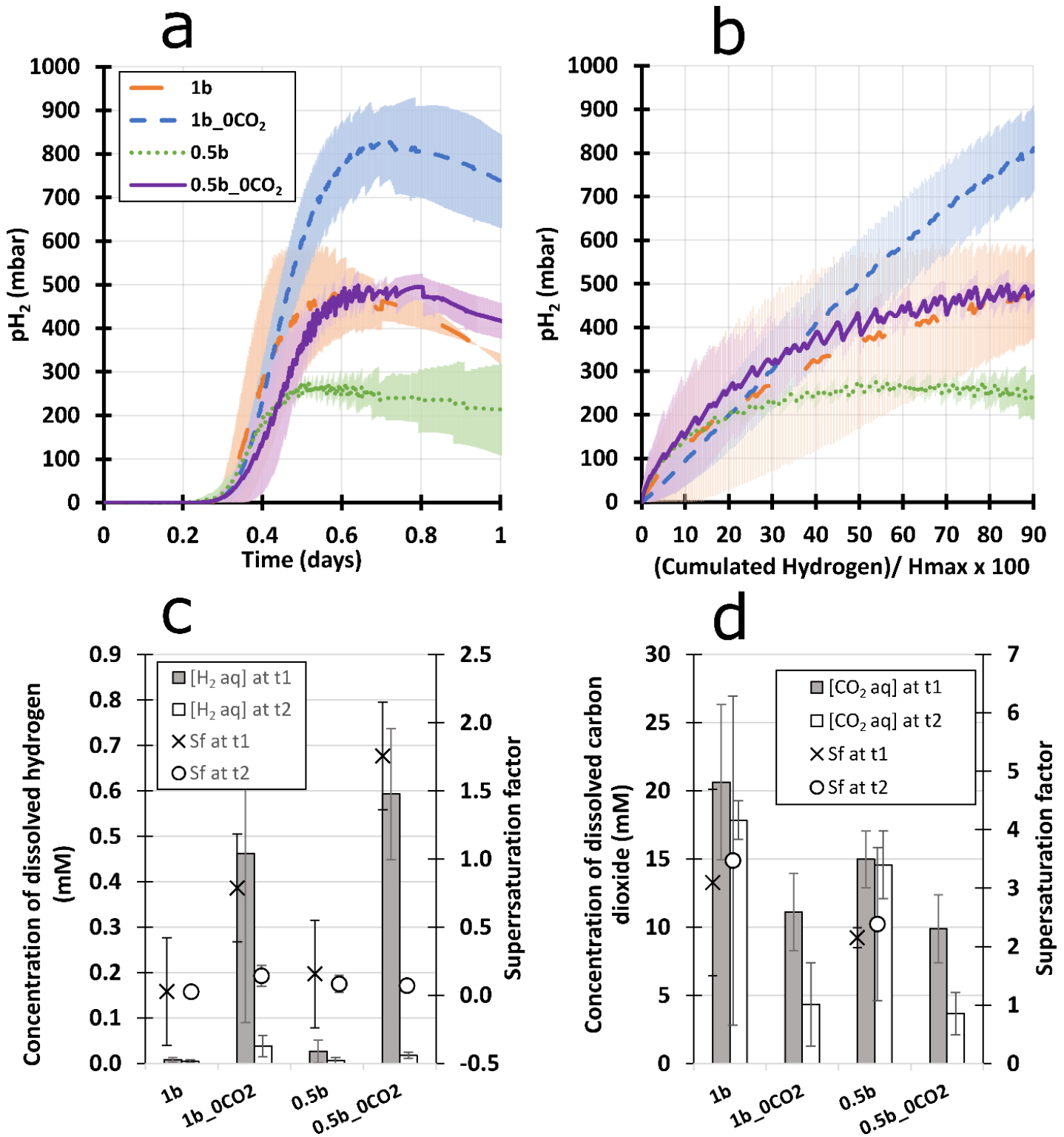
In addition, and surprisingly, the only condition showing a supersaturation in  $\text{H}_2$  was the condition 0.5b\_0CO<sub>2</sub> at t1 ( $\text{Sf} = 1.8 \pm 0.3$ ), while Sf was equal to  $0.8 \pm 0.7$  for 1b\_0CO<sub>2</sub> at t1. More specifically, Sf measured in 1b\_0CO<sub>2</sub> condition at t1 was 4 times and 40 times higher than 0.5b ( $0.2 \pm 0.1$ ) and 1b ( $0.02 \pm 0.01$ ), respectively. According to the literature,  $\text{H}_2$  producing reactors are usually in supersaturation state, with  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  between 7 (Beckers et al., 2015) and 80 times (Pauss et al., 1990) the value expected at the equilibrium, especially in batch fermenters. The low supersaturations measured in this study may be related with the measurement of  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  when  $\text{H}_2$  production rate was already low in all conditions ( $47 \pm 23 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{VS added}} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Consistently with this hypothesis, Pauss et al. (1990) found that  $\text{H}_2$  supersaturation decreased from 50 to 15 during a batch fermentation.

In the present study, best performances were associated with the highest  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  and supersaturation factor at the end of the  $\text{H}_2$  production phase. This  $\text{H}_2$  accumulation in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition could be a consequence of a lower homoacetogenic activity, resulting in lower  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$  consumption, of a higher  $\text{H}_2$  producing activity, or a combination of both phenomena.

The high variability of  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  and Sf (80 % and 92 %) between 1b\_0CO<sub>2</sub> condition replicates was likely explained by the differences in the fermentation dynamics. Indeed, the duplicate samples corresponding to sampling time t1 were made for a similar duration of fermentation of 0.7 day, but for one replicate, the apparent homoacetogenic phase already started.

For all conditions,  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$  significantly decreased at time t2 with  $\text{Sf} < 1$ , which reflected a potential increase in  $\text{H}_2$  - consumption through homoacetogenesis. Indeed, a Sf ratio lower than 1 could be interpreted as an  $\text{H}_2$  - consumption rate faster than an  $\text{H}_2$  transfer rate from the gas to the liquid phase.

Regarding the  $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$ , both 1b and 0.5b conditions presented the highest  $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$  ( $21 \pm 6$  and  $15 \pm 2 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively) (Figure 4-3 d). On the contrary, 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions presented the lowest  $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$  at t1 with  $11 \pm 3 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $10 \pm 2 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. Similar trends were observed at the second sampling time t2, when homoacetogenesis occurred, with  $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$  reaching  $18 \pm 1 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $15 \pm 2 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4 \pm 3 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $4 \pm 2 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$  in 1b, 0.5b, 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions, respectively. As for  $[\text{H}_2]_{\text{aq}}$ ,  $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$  decreased at t2 in comparison with t1, probably due to the homoacetogenic activity and to the lower  $\text{H}_2$  production rate.



**Figure 4-3 : H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations evolution. Partial pressures of H<sub>2</sub> as a function of time (a). Partial pressure of H<sub>2</sub> as a function of cumulated H<sub>2</sub> divided by H<sub>max</sub> (%) (b). The coloured areas around the lines represent standard deviations. Dissolved concentration of H<sub>2</sub> and supersaturation factors at t<sub>1</sub> = 0.70 ± 0.03 day and t<sub>2</sub> = 1.72 ± 0.05 days (c). Dissolved concentration of CO<sub>2</sub> and supersaturation factors at t<sub>1</sub> = 0.70 ± 0.03 day and t<sub>2</sub> = 1.72 ± 0.05 days (d).**

Interestingly, although the use of the CO<sub>2</sub> trap divided the CO<sub>2</sub> partial pressure by a factor of 35, from 350 mbar in 1b condition to 10 mbars in 1b\_0CO<sub>2</sub> condition, the aqueous concentration [CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub> was only divided by 2, from 21 ± 6 mmol<sub>CO<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup> to 11 ± 3 mmol<sub>CO<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>. Similarly, at 0.5 bar, the use of CO<sub>2</sub> trap divided CO<sub>2</sub> partial pressure by 26 from 260 mbar in 0.5b condition to 10 mbars in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, but [CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub> was only divided by 1.5, from 15 ± 2 mmol<sub>CO<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup> to 10 ± 2 mmol<sub>CO<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>. Supersaturation factor in CO<sub>2</sub> for 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions was estimated to be higher than 10. This observation suggests that, although the reactor was stirred at 180 RPM, and the CO<sub>2</sub> trap reduced the CO<sub>2</sub> partial pressure below 5 % at any time of the fermentation, CO<sub>2</sub> concentration in the liquid phase did not highly decrease. With N<sub>2</sub> sparging, the [CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub> was more efficiently reduced, by a factor 7, from 5.5 mM to 0.75 mM (Kraemer and Bagley, 2008). The authors suggested that sparging could reduce H<sub>2</sub> consumption by homoacetogens along with a decrease in [CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub>.

#### 4.2.5.3. *Enhancement of butyrate production and substrate degradation efficiency with CO<sub>2</sub> trapping coupled to pressure reduction*

Yields of production of acetate, butyrate and lactate were calculated at t1 and t2 (Tableau 4-3). Homoacetogenesis is characterized by a consumption of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> to produce acetate. Therefore, if one condition was less impacted by homoacetogenesis, differences in acetate concentrations might have been observed. However, acetate yields during the H<sub>2</sub> production phase (*i.e.* during the first 24 hours) were not significantly impacted by low headspace pressure or CO<sub>2</sub> capture. Indeed, at the end of the H<sub>2</sub> production phase (t1), acetate yield ranged from 0.18 ± 0.03 to 0.22 ± 0.06 gCOD<sub>acetate</sub>·gCOD<sub>metabolized</sub><sup>-1</sup> for all conditions. Nevertheless, the acetate yields increased in all conditions between t1 and t2 and varied at t2 from 0.25 ± 0.00 and 0.28 ± 0.02 in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> and 1b\_0CO<sub>2</sub> conditions to 0.29 ± 0.02 and 0.32 ± 0.09 gCOD<sub>acetate</sub>·gCOD<sub>metabolized</sub><sup>-1</sup> in 1b and 0.5b conditions, respectively. No H<sub>2</sub> production was recorded between times t1 and t2. As both the total pressure and H<sub>2</sub> fraction in the gas phase decreased, it was concluded that part of the acetate produced was the result of homoacetogenesis.

Regarding butyrate, at t1, the 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition presented the highest butyrate yield, with 0.69 ± 0.06 gCOD<sub>butyrate</sub>·gCOD<sub>metabolized</sub><sup>-1</sup> (1.96 ± 0.12 g<sub>butyrate</sub>·L<sup>-1</sup>) against 0.50 ± 0.21 gCOD<sub>butyrate</sub>·gCOD<sub>metabolized</sub><sup>-1</sup> (1.32 ± 0.52 g<sub>butyrate</sub>·L<sup>-1</sup>) for the 1b condition. Similarly, at t2, the 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition had still the highest yield, with 0.61 ± 0.09 gCOD<sub>butyrate</sub>·gCOD<sub>metabolized</sub><sup>-1</sup> (2.08 ± 0.17 g<sub>butyrate</sub>·L<sup>-1</sup>) against 0.53 ± 0.06 gCOD<sub>butyrate</sub>·gCOD<sub>metabolized</sub><sup>-1</sup> for the 1b condition (1.64 ± 0.11 g<sub>butyrate</sub>·L<sup>-1</sup>). This result suggests that butyrate pathway was enhanced for 0.5\_0CO<sub>2</sub> condition. Also, butyrate concentrations increased between time t1 and t2 in all conditions, reaching 1.64 ± 0.11, 1.41 ± 0.08, 1.73 ± 0.01 and 2.08 ± 0.17 g<sub>butyrate</sub>·L<sup>-1</sup> at 1b, 0.5b, 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions, respectively. These results suggest that H<sub>2</sub> production did

not stop between t1 and t2, but H<sub>2</sub> consumption rate was higher than H<sub>2</sub> production rate, as the pressure and H<sub>2</sub> content in the biogas decreased. Also, a decrease in lactate yield from  $0.17 \pm 0.30 \text{ gCOD}_{\text{lactate}} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$  in 1b condition at t1 to  $0.01 \pm 0.01 \text{ gCOD}_{\text{lactate}} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$  in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> at t1 was observed. Therefore, it can be hypothesized that pressure reduction and CO<sub>2</sub> capture reduced lactate production in favour of butyrate and H<sub>2</sub> production.

**Tableau 4-3 : Metabolic yields, hydrogen production efficiency (HPE) and substrate degradation efficiency (SDE) measured at at t1 = 0.70 ± 0.03 day and t2 = 1.72 ± 0.05 days for each condition.**

Condition	Time (days)	Yield ( $\text{gCOD} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$ )			HPE (mol/mol)	SDE ( $\text{gCOD} \cdot \text{gCOD}_{\text{substrate}}^{-1}$ )
		Lactate	Acetate	Butyrate		
1b	t1	$0.17 \pm 0.30$ <sup>1</sup>	$0.22 \pm 0.06$	$0.50 \pm 0.21$	$0.38 \pm 0.11$	$50 \pm 2$
	t2	$0.05 \pm 0.09$	$0.29 \pm 0.02$	$0.53 \pm 0.06$	$0.35 \pm 0.04$	$59 \pm 3$
1b_0CO <sub>2</sub>	t1	$0.04 \pm 0.08$	$0.18 \pm 0.03$	$0.60 \pm 0.06$	$0.49 \pm 0.16$	$51 \pm 1$
	t2	$0 \pm 0$	$0.28 \pm 0.02$	$0.52 \pm 0.03$	$0.39 \pm 0.1$	$60 \pm 4$
0.5b	t1	$0.07 \pm 0.13$ <sup>2</sup>	$0.20 \pm 0.00$	$0.49 \pm 0.04$	$0.46 \pm 0.09$	$50 \pm 4$
	t2	$0 \pm 0$	$0.32 \pm 0.09$	$0.43 \pm 0.03$	$0.35 \pm 0.07$	$58 \pm 6$
0.5b_0CO <sub>2</sub>	t1	$0.01 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.02$	$0.69 \pm 0.06$	$0.56 \pm 0.04$	$56 \pm 4$
	t2	$0 \pm 0$	$0.25 \pm 0.00$	$0.61 \pm 0.09$	$0.47 \pm 0.02$	$67 \pm 6$

<sup>1</sup> values of the triplicates: 0.0; 0.0 and 0.51  $\text{gCOD} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$ . <sup>2</sup> values of the triplicates: 0.22, 0.0 and 0.0  $\text{gCOD} \cdot \text{gCOD}_{\text{metabolized}}^{-1}$ .

In comparison, Nasr et al. (2015) observed an increase in acetate concentration and a decrease in butyrate concentration when a CO<sub>2</sub> trap was applied. Park et al. (2005) did not notice a difference in acetate production when applying a CO<sub>2</sub> trap. This wide differences in metabolite profiles can be explained by differences in inoculum, substrate and operating conditions that could favour a metabolic pathway.

In addition, substrate COD conversion was estimated at t1 and t2 (Tableau 4-3). COD conversion tends to be positively affected by coupling CO<sub>2</sub> capture and low pressure at t2 in comparison with 1b condition (ANOVA,  $p = 0.071$ ), increasing by 15 % from  $59 \pm 3$  % ( $5.6 \pm 0.11 \text{ gCOD}$ ) to  $67 \pm 6$  % ( $6.44 \pm 0.83 \text{ gCOD}$ ), while COD conversion in 0.5b ( $58 \pm 6 \text{ gCOD}$ ) and 1b\_0CO<sub>2</sub> ( $60 \pm 4 \text{ gCOD}$ ) are really close to COD conversion in 1b condition. Similar trends appear at t1, with a higher COD conversion of  $56 \pm 4 \text{ gCOD}$  in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, in comparison with  $50 \pm 2 \text{ gCOD}$ ,  $51 \pm 1 \text{ gCOD}$  and  $50 \pm 4 \text{ gCOD}$  in 1b, 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b conditions.

In comparison, and consistently, concerning the overall substrate degradation, Massanet-Nicolau et al. (2016) observed a 13 % increase in carbohydrate removal by reducing both H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressures. Also consistently with our results, Lee et al. (2012) observed that reduced pressure did not impact the substrate degradation in continuous fermentation for an

HRT of 2 h. With a CO<sub>2</sub> trap, Park et al. (2005) obtained a slight increase in glucose degradation (7%). Again, these results could be due to differences between operating parameters in continuous fermenters.

In order to estimate to what extent acetate production was associated to H<sub>2</sub> production, H<sub>2</sub> production efficiency (HPE) was calculated (Tableau 4-3). This ratio corresponds to the experimentally recovered H<sub>2</sub> value divided by the theoretical produced H<sub>2</sub>, deduced from acetate and butyrate concentrations. In the 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, HPE suggests a lower homoacetogenic activity compared to 1b conditions (ANOVA,  $p = 0.05$ ). Indeed, at time t<sub>1</sub>, the ratio for 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition was  $0.56 \pm 0.04$  compared to  $0.38 \pm 0.11$  for the 1b condition,  $0.49 \pm 0.16$  for the 1b\_0CO<sub>2</sub> condition and  $0.46 \pm 0.09$  in the 0.5b condition. This result strengthens the idea that homoacetogenic activity was reduced in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition. Interestingly, HPE remained far below the optimal value of 1 ( $0.56 \pm 0.04$ ). HPE was even below 1 very early during the fermentation process, since it decreased after only 0.61 day to  $0.82 \pm 0.11$  in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> and  $0.61 \pm 0.15$  in 1b condition (data not shown). In conclusion, although H<sub>2</sub> production was improved through a probable diminution of homoacetogenesis, an improvement of substrate degradation efficiency and an enhancement of butyrate pathway, homoacetogenesis remained a significant source of H<sub>2</sub> depletion in all reactors. Homoacetogenesis is one of the major concerns of H<sub>2</sub> production limitation, and several authors observed that this reaction cannot be fully inhibited, even at low H<sub>2</sub> pressure. Ferraz et al. (2020) found that at reduced pressure (0.8 bar), 30 % of the acetate was produced from homoacetogenesis (against 43.8 % at 1.2 bar). Palomo-Briones et al. (2019) observed that 32 to 46 % of total acetate was produced with from homoacetogenesis when mass transfer was improved with stirring ( $K_{la}$  ranging from 1.04 to 4.23 h<sup>-1</sup>).

#### 4.2.5.4. CO<sub>2</sub> sequestration coupled with pressure reduction suppresses the growth of *Streptococcus* sp. and promotes hydrogen producers

Bacterial community analysis showed the presence of 1415 OTUs from 23 phyla. OTUs with at least an abundance of 1 % in one sample were grouped into 4 phyla (Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes), 9 classes, 15 orders, 19 families and 30 genera. Figure 4-4-a presents the relative abundance of bacteria at genus level for the four operating conditions. OTUs representing at least 10 % of the total abundance in a sample are grouped in only three families: *Streptococcaceae*, *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae*. For conditions 1b, 1b\_0CO<sub>2</sub> and 0.5b, bacterial community was mainly dominated by *Streptococcus* sp. (*Streptococcus lutetiensis*, 98.75% identity, representing 21 to 42 % at 1 day), *Clostridium\_sensu\_stricto\_5* (*Clostridium paraputrificum*, 98.35 % identity, representing 16 to 23 % at 1 day) and *Clostridiaceae\_1\_unclassified* (*Clostridium diolis*, 96.25 % identity, representing 6 to 8 % at 1 day). Consistently, Palomo-Briones et al. (2018) reported a

dominance of *Clostridium sp.* and *Streptococcus sp.* during the fermentation of cheese whey. In 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, an important shift of the bacterial community occurred, as *Streptococcus sp.* was limited to an abundance of 2 %. In addition, the abundance of *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* (*Clostridium butyricum*, OTU 3, 98.50 % identity and *Clostridium perfringens*, OTU 7, 100% identity) reached up to 47 % at 0.6 day and 32 % at 1 day, whereas it only reached maximum values of 18.6 % in 0.5b condition at 1 day and 10 % in 1b condition at 1.6 days. *C. butyricum* and *C. perfringens* are well known to be hydrogen producers (Chen et al., 2005; Morra et al., 2016; Plangklang et al., 2012; Wang et al., 2011), as well as the previously mentioned *C. diolis* and *C. paraputrificum* (Evyernie et al., 2000; Matsumoto and Nishimura, 2007). Overall, *Clostridiaceae* abundance increased from 41 ± 10 % in 1b, 0.5b and 1b\_0CO<sub>2</sub> conditions to 70 % in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition at 0.6 day and from 49 ± 5 % to 63 % at 1 day. The lowest abundance of *Clostridiaceae* was reached in 1b condition with values ranging from 30 % at 0.6 day to 40 % at 1 day. From this result, it can be concluded that CO<sub>2</sub> capture and pressure reduction favoured the selection of H<sub>2</sub>-producing bacteria. Consistently, Bru et al.(2012) observed that CO<sub>2</sub> sparging at 500 mL.min<sup>-1</sup> disfavoured H<sub>2</sub> production. However, positive effect of CO<sub>2</sub> trapping on H<sub>2</sub>-producing bacteria does not explain the higher H<sub>2</sub> production in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition in comparison with the condition 1b\_0CO<sub>2</sub>. As diffusion coefficients increase proportionally to decreasing pressure (Verseux, 2020), pressure reduction may have, synergistically with CO<sub>2</sub> trapping, modify aqueous gas concentrations at the beginning of the fermentation and influence bacterial selection.

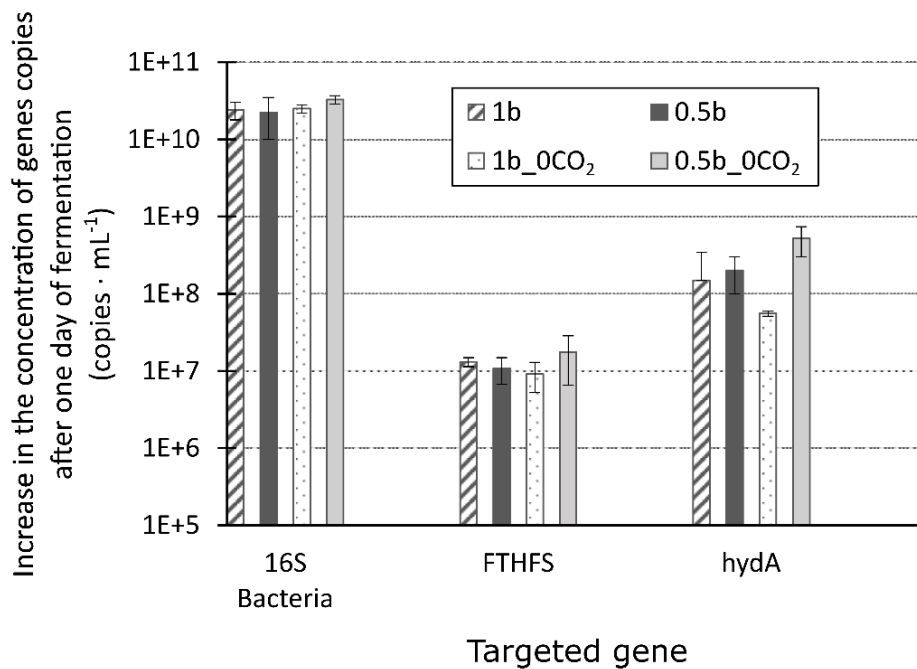
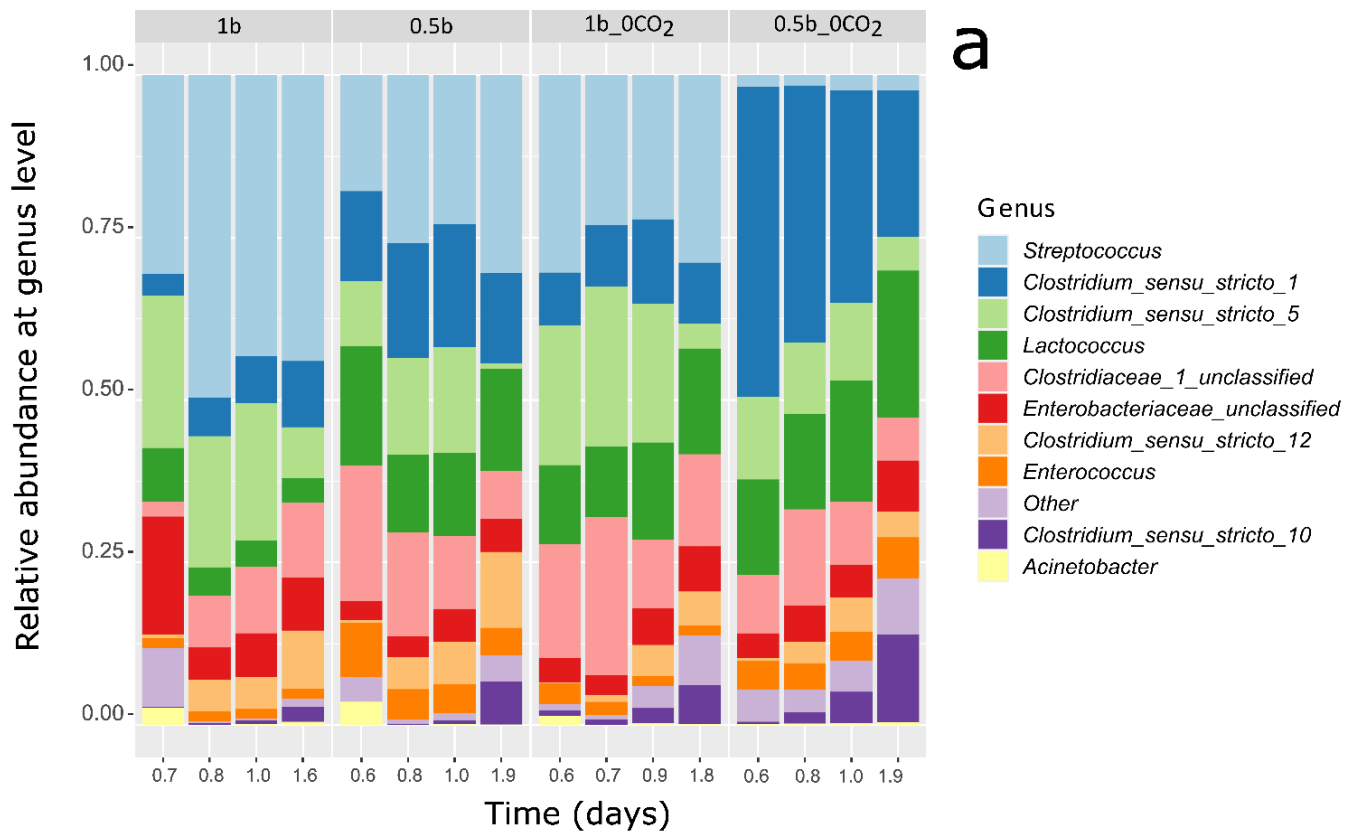
On the other hand, *Streptococcus sp.* which abundance has been adversely affected in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, belongs to the Lactobacillales order, which is often associated with lactate production (Milinovich et al., 2008; Palomo-Briones et al., 2018). Lactobacillales are also known for their capacity to release bacteriocins which inhibits *Clostridium sp.* (Heo et al., 2018; Sabino et al., 2019). Furthermore, despite the fact that *S. lutetiensis* is not known among the most common homoacetogenic microorganisms (Singh et al., 2019), *Streptococcus sp.* was isolated by Leclerc et al. (1998) from human colon and was autotrophically cultivated with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Godwin et al. (2014) also identified multiple *Streptococcus sp.* as hydrogenotrophic bacteria using RNA stable isotope probing with <sup>13</sup>C to track the homoacetogenic activity of microorganisms issued from kangaroo forestomach. Therefore, the ecological role of *Streptococcus sp.* in the present study is not fully clarified, as it could be involved in substrate competition associated with lactate production, in the inhibition of H<sub>2</sub> producers through bacteriocins production, in a homoacetogenic metabolism or in a combination of these mechanisms. To complement, *Clostridium\_sensu\_stricto\_12* (*Clostridium magnum*, 99.25% identity) is identified in the literature as having a homoacetogenic activity (Bomar et al., 1991; Groher and Weuster-Botz, 2016; Uhlig et al., 2016). However, here, its maximum abundance remained between 5 and 12 % for all conditions, without tendencies depending on the condition, and without correlation with the extent of the apparent consumption of H<sub>2</sub> after one day of fermentation. Therefore, although a higher HPE in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition in comparison with other conditions combined with low Sf in 1b, 0.5b and 1b\_0CO<sub>2</sub> suggested

that homoacetogenic activity was reduced in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, the present microbial community analysis cannot clearly state that the abundance of homoacetogenic microorganisms has been reduced in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition.

In addition, *Lactococcus sp.* (*Lactococcus lactis*, OTU 5, 100% identity and *Lactococcus garvieae*, OTU 6, 98.35% identity) abundance was enhanced with CO<sub>2</sub> trap, reduced pressure and the combination of both from 4.1 % in 1b condition to 15 ± 3 % in 1b\_0CO<sub>2</sub>, 0.5b and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> conditions at 1 day. As a higher yield of lactate was measured in 1b condition (0.17 ± 0.30 g<sub>COD Lactate</sub>·g<sub>COD metabolized</sub><sup>-1</sup>) in comparison with other conditions, this suggests that lactate production was more associated to *Streptococcus sp.* than *Lactococcus sp.*. In addition, *Lactococcus lactis* isolated from a mixture of leaf-shaped vegetable refuses and potato peels was found to be able to produce H<sub>2</sub> up to 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>·mol<sub>glucose</sub><sup>-1</sup> by Marone et al. (2014). Thus, promoting the growth of *Lactococcus lactis* with the reduced pressure and CO<sub>2</sub> capture might have played a positive role in improving H<sub>2</sub> production.

In order to compare the specific growth of Bacteria, homoacetogenic bacteria and hydrogen producing bacteria in the four operating conditions, qPCR targeting 16S Bacteria gene, FTHFS gene and hydA gene were carried, respectively. Figure 4-4-b presents, for the four operating conditions, the increase in gene copy concentrations between the beginning of the fermentation and 0.95 ± 0.06 day in log scale for the four genes targeted. Increase in 16S gene concentration reached similar values of 2.2·10<sup>10</sup> ± 1.2·10<sup>10</sup>, 2.4·10<sup>10</sup> ± 6.3·10<sup>9</sup> and 2.5·10<sup>10</sup> ± 2.9·10<sup>9</sup> copies·mL<sup>-1</sup> in 0.5b, 1b and 1b\_0CO<sub>2</sub> conditions, respectively and up to 3.3·10<sup>10</sup> ± 3.9·10<sup>9</sup> in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, without significant differences. However, regarding hydA copies increase, a significant difference (ANOVA, p-value: 0.02) was found between 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition (5.2·10<sup>8</sup> ± 2.2·10<sup>8</sup> copies·mL<sup>-1</sup>) and 1b\_0CO<sub>2</sub> condition (5.6·10<sup>7</sup> ± 4.3·10<sup>6</sup> copies·mL<sup>-1</sup>), *i.e.*, a 9-fold increase. This result tends to be consistent with the significant increase in H<sub>2</sub> production in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition. In addition, increase in hydA copies concentrations in 1b and 0.5b conditions were similar, with 1.5·10<sup>8</sup> ± 2.0·10<sup>8</sup> and 2.0·10<sup>8</sup> ± 1.0·10<sup>8</sup> copies·mL<sup>-1</sup>. Finally, increase in FTHFS copies was slightly higher in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition, with 1.8·10<sup>7</sup> ± 1.1·10<sup>7</sup> copies·mL<sup>-1</sup> in comparison with 1.1·10<sup>7</sup> ± 3.2·10<sup>6</sup> copies·mL<sup>-1</sup> in 1b, 0.5b and 0.5b\_0CO<sub>2</sub> combined, but no significant differences were measured.





**Figure 4-4 : Bacterial community analysis. (a) Evolution of bacterial community over time at genus level (b) Difference between copy numbers per mL of sample of 16S Bacteria, FTHFS, and hydA genes at  $0.95 \pm 0.06$  day and at the beginning of the fermentation ( $t_0$ )**

The similar concentrations of FTHFS gene in all conditions is surprising since a decrease of the homoacetogenic activity was suspected to be the cause of the improvement of H<sub>2</sub> production in 0.5b\_0CO<sub>2</sub> condition. Therefore, the specificity of the FTHFS primers was questioned. The FTHFS gene, a conserved sequence encoding for a key enzyme in the Wood-Ljungdahl pathway, has been largely used to target acetogens. However, a large number of bacteria contain the FTHFS gene without acetogen activity (Singh et al., 2020). Indeed, FTHFS gene is carried by other microorganisms such as syntrophic acetate-oxidizing bacteria, sulfate-reducing bacteria and purinolytic bacteria (Ottesen and Leadbetter, 2011; Sánchez-Andrea et al., 2020). FTHFS gene was found (locus tag: NPD4\_248, GenBank) in the genome of *Clostridium butyricum strain CDC\_51208* (GenBank: CP013239.1) which is closely related to *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* found in the present study (an alignment of 16S amplicon from *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* with 16S sequence from *Clostridium butyricum strain CDC\_51208* resulted in 98.75% similarity). Alignment of FTHFS primers used in this study with FTHFS gene from *Clostridium butyricum strain CDC\_51208* confirms the highly probable amplification of FTHFS gene from *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, as only one mismatch on 5' end was found. To conclude, a potential lack of specificity of FTHFS primers made not straightforward the interpretation of the FTHFS qPCR results and further studies are needed to develop efficient tools targeting homoacetogenic activities.

#### 4.2.6. Conclusions and perspectives

Pressure reduction combined with CO<sub>2</sub> capture enhanced H<sub>2</sub> production by 58 % in comparison with a fermentation conducted at atmospheric pressure without CO<sub>2</sub> capture. The increase of H<sub>2</sub> production was associated with the lowest CO<sub>2</sub> dissolved concentration and the highest H<sub>2</sub> dissolved concentration among the conditions tested. A 15 % increase in substrate degradation efficiency, a 38 % increase in butyrate yield and a specific selection of H<sub>2</sub>-producing bacteria with a drastic reduction of *Streptococcus sp.* abundance were reported. This study suggests that pressure modulation combined with CO<sub>2</sub> capture is an interesting tool to shape microbial communities more broadly than simply impacting homoacetogenic activity.

#### 4.2.7. Acknowledgements

The research was supported by the PROBHYM project financed by National Research Agency (n° ANR-18-CE43-0012-01) in France. The authors are grateful for Gaëlle Santa-Catalina's work concerning biomolecular tasks and 16S sequencing.

#### 4.2.8. CRediT authorship contribution statement

M.C Noguer: Conceptualization, Supervision, Validation, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, review & editing

L. Perat: Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, review & editing

E. Latrille: Experimental validation, Writing – review & editing.

N.Bernet: Validation, Writing - review & editing.

E. Trably: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Validation, Writing - review & editing.

R. Escudie: Conceptualization, Supervision, Validation, Writing - review & editing

#### 4.2.9. Conclusion étendue en français

L'objectif de cette partie était d'étudier les effets des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> en modifiant ces dernières par diminution de la pression totale dans le réacteur de fermentation, en captant le CO<sub>2</sub> produit, et en couplant ces deux stratégies.

Le couplage de la diminution de pression au captage du CO<sub>2</sub> a permis d'améliorer la production d'H<sub>2</sub> de 58 %, passant de 82 ± 29 (à 1 bar) à 130 ± 13 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>. L'application de cette stratégie a également permis d'augmenter la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> de 444 ± 206 à 595 ± 219 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. En comparaison, l'application de la diminution de pression ou du captage de CO<sub>2</sub> seul n'a pas permis d'augmenter substantiellement la production d'H<sub>2</sub>, avec respectivement 86 ± 21 et 97 ± 25 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>. L'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> a été associée à une augmentation du rendement en butyrate de 38 % ainsi qu'à une diminution du rendement en lactate. La dégradation du substrat a également été améliorée, passant de 59 ± 3 % (à 1 bar) à 67 ± 6 %. Le rendement en H<sub>2</sub> a ainsi augmenté de 110 ± 39 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>DCO consommée</sub><sup>-1</sup> à 154 ± 15 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>DCO consommée</sub><sup>-1</sup>, soit une augmentation de 40 %.

Une mesure ponctuelle des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> dissous a montré que les fermentations avec captage du CO<sub>2</sub> étaient celles associées avec les concentrations en H<sub>2</sub> dissous et les facteurs de sursaturation les plus élevés. Ainsi, dans cette étude, l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> a été associée à une augmentation de la concentration en H<sub>2</sub> dissous, contrairement aux résultats précédemment documentés dans la littérature. Ce résultat a suggéré que l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> ne provenait probablement pas d'une diminution de la concentration en H<sub>2</sub>, favorisant l'activité des hydrogénases, mais plutôt qu'un changement populationnel ou métabolique avait eu lieu, augmentant la production d'H<sub>2</sub>.

L'analyse des communautés microbiennes a révélé un changement populationnel significatif. A 1 bar, à pression réduite et enfin à 1 bar avec captage du CO<sub>2</sub>, les familles microbiennes les plus abondantes étaient les *Streptococcaceae*, bactéries lactiques, et des

*Clostridiaceae*, bactéries productrices d'H<sub>2</sub>. En couplant captage du CO<sub>2</sub> et diminution de la pression, l'abondance relative d'un membre des *Streptococcaceae*, *S. lutetiensis*, a diminué en passant de valeurs comprises entre 21 et 42 % dans les autres conditions évaluées à 2 % seulement. La diminution de son abondance relative a favorisé l'augmentation de l'abondance relative de membres des *Clostridiaceae*, bactéries productrices d'H<sub>2</sub>. L'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> semble donc avoir été le résultat d'un changement populationnel.

Le rôle de *S. lutetiensis* dans l'écosystème microbien reste peu clair. Ce dernier est typiquement producteur de lactate, mais certains *Streptococcaceae* homoacétogènes ont été cultivés ou associés à la consommation d'H<sub>2</sub> en culture mixte. De plus, les *Streptococcaceae* sont également producteurs de bactériocines, inhibitrices de *Clostridiaceae*. L'évaluation de l'activité homoacétogène au cours des fermentations a été réalisée d'une part par méthode calculatoire et a suggéré que la baisse de pression couplée au captage de CO<sub>2</sub> pouvait en effet diminuer cette activité. Toutefois, d'autre part, l'usage d'une technique moléculaire reposant sur l'amplification d'un gène marqueur de l'activité homoacétogène, n'a pas permis de différencier l'activité homoacétogène en fonction des conditions expérimentales.

Ainsi, dans les conditions expérimentales appliquées, la variation de pression partielle en H<sub>2</sub> dans l'espace de tête des fermenteurs n'a pas eu d'impact significatif sur la production d'H<sub>2</sub>. Au contraire, le captage du CO<sub>2</sub> tend à avoir significativement ( $p = 0,05$ ) et positivement impacté la production d'H<sub>2</sub> par rapport aux fermentations réalisées sans captage. D'un point de vue opérationnel, ce résultat suggère donc que la concentration en CO<sub>2</sub> est un facteur à prendre en compte pour optimiser la production d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre. Par ailleurs, le captage du CO<sub>2</sub> par simple recirculation du gaz d'espace de tête dans un piège externe a permis de diviser les pressions partielles de ce gaz par un facteur 35 et 26 à 1 bar et à pression réduite, respectivement, en comparaison avec les fermentations conduites sans captage. Cependant, les concentrations en CO<sub>2</sub> dissous mesurées ont été divisées au maximum par un facteur 2, passant de  $21 \pm 6$  à  $10 \pm 2$  mmol<sub>CO<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>.

### 4.3. Intérêt de la capture du CO<sub>2</sub> et de la réduction de pression en fermentation continue

#### 4.3.1. Avant-propos

Les précédentes expériences menées en mode batch ont montré que le couplage de la diminution de pression avec le captage du CO<sub>2</sub> améliorerait la production d'H<sub>2</sub> notamment *via* un changement populationnel en défaveur des *Streptococcaceae* et en faveur des *Clostridiaceae*. La stratégie appliquée pourrait donc servir de moyen de pilotage du procédé.

Toutefois, dans les conditions de l'étude précédente, *i.e.* en batch, la durée de la production d'H<sub>2</sub> était restreinte à un jour. La résilience de la sélection microbienne induite par le changement opératoire sur une durée supérieure à un jour est donc inconnue. Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés aux effets des changements de pression et de concentration en CO<sub>2</sub> lors d'une fermentation continue. De plus, la persistance des effets du changement de pression et/ou de concentration en CO<sub>2</sub> après retour à une condition de fermentation standard (1 bar, sans captage du CO<sub>2</sub>) a été évaluée.

Plus précisément, nous avons appliqué ces stratégies à des fermentations conduites en mode continu, avec un temps de séjour de 12 h. De manière similaire, les fermentations ont été conduites à (i) 1 bar (condition témoin), (ii) à 0,5 bar, (iii) à 1 bar avec captage du CO<sub>2</sub> et (iv) à 0,5 bar avec capture du CO<sub>2</sub>. Les changements de pression totale et de concentrations en CO<sub>2</sub> ont été appliqués pendant six jours de fermentation puis, les conditions de fermentation ont toutes été ramenées à 1 bar sans captage du CO<sub>2</sub> pendant six jours supplémentaires afin d'évaluer la résilience de la communauté microbienne et la persistance des effets éventuels.

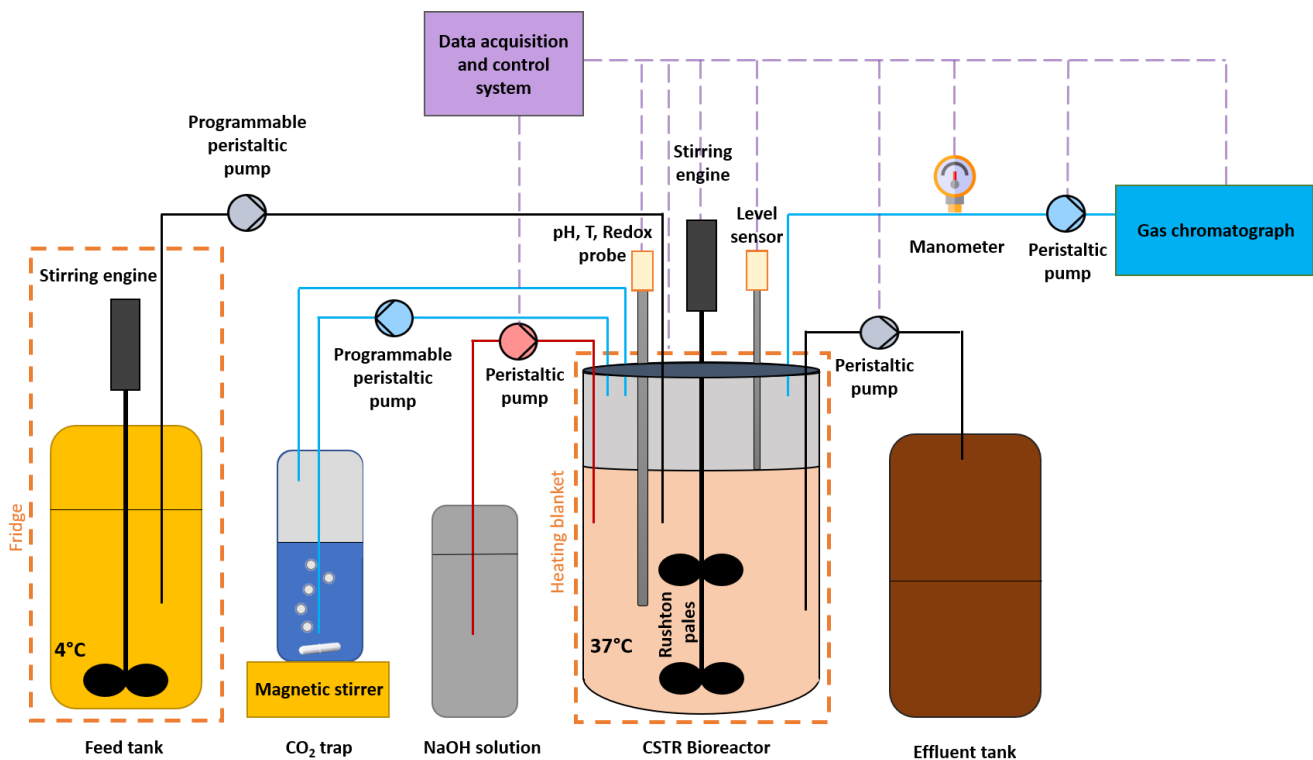
De plus, une méthode de mesure d'H<sub>2</sub> dissous en continu grâce à une sonde ampérométrique ainsi qu'une méthode de mesure de l'activité homoacétogène *via* des tests *ex situ* ont été développées afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes associés aux modifications de la pression et de la concentration en CO<sub>2</sub>.

#### 4.3.2. Mise en œuvre expérimentale

- **Conditions opératoires**

Une soupe de déconditionnement reconstituée (identique à celle du chapitre précédent) a été utilisée comme substrat. Au cours de la fermentation, elle a été stockée à 4 °C et renouvelée tous les quatre jours. Les fermentations ont été conduites dans des réacteurs

instrumentés (Figure 4-5) dans les mêmes conditions que les parties 4.2 et 3.4, c'est-à-dire : pH 5,5, 37 °C, agitation à 180 RPM, pression régulée, ensemencement avec le même inoculum et avec le même S/X de 11,1 g DCO biodégradable·g MV substrat<sup>-1</sup> (concentration en substrat de 10



**Figure 4-5 : Schéma de fonctionnement du réacteur opéré en continu avec captage du CO<sub>2</sub>**

$\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$ ), TSH de 12 heures. La charge organique a néanmoins été abaissée par rapport au chapitre 3.4, passant de  $60 \text{ g}_{\text{MV}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  à  $30 \text{ g}_{\text{MV}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  (solution d'alimentation à une concentration de  $15 \text{ g}_{\text{MV}}\cdot\text{L}^{-1}$ ) afin de pouvoir négliger les inhibitions liées aux concentrations élevées en acides. Les fermentations ont duré entre dix et douze jours.

Dans un premier temps, les quatre conditions précédemment étudiées en partie 4.2 ont été appliquées pendant six jours de fermentation :

- Une fermentation témoin à 1 bar (1b\_C)
- Une fermentation à 0,5 bar (0,5b\_C)
- Une fermentation à 1 bar avec captage du CO<sub>2</sub> (1b\_0CO<sub>2</sub>\_C).
- Une fermentation à 0,5 bar avec captage du CO<sub>2</sub> (0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C).

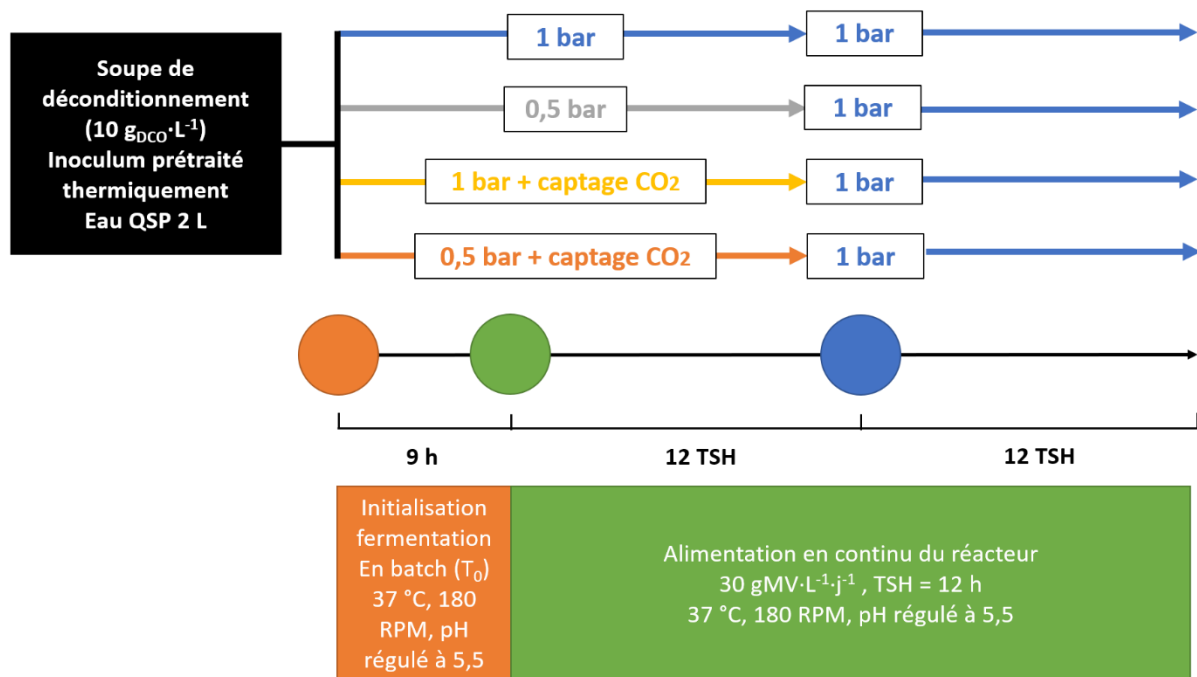
Les abréviations des conditions de cultures indiquent, de gauche à droite : la pression de fermentation (« 1b » / « 0,5b »), un éventuel captage du CO<sub>2</sub> (rien ou « 0CO<sub>2</sub> » lors du captage) et enfin, le mode de culture appliqué, en l'occurrence, en continu (« C »).

Le captage du CO<sub>2</sub> a été réalisé comme en partie 4.2 : en recirculant continuellement le biogaz dans un piège. Ce piège était une bouteille de 600 mL avec 570 mL d'une solution de NaOH (3 M) additionnée de thymolphthaléine (indicateur coloré) à 0,02 %. La bouteille a été

scellée et placée sur un agitateur magnétique. Le biogaz provenant du fermenteur était injecté dans la phase liquide du piège à CO<sub>2</sub> à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 150 ± 5 mL·min<sup>-1</sup>. Le gaz de sortie, appauvri en CO<sub>2</sub>, était recirculé dans l'espace de tête du fermenteur.

Afin d'étudier la persistance des effets des changements de concentrations en gaz, la pression a été réglée à 1 bar et le captage du CO<sub>2</sub> a été stoppé dans toutes les conditions après environ six jours de fermentation. Toutes les fermentations ont alors été poursuivies dans les conditions appliquées à 1b\_C pendant six jours supplémentaires.

La durée totale de la fermentation de douze jours a été déterminée suite aux résultats obtenus en partie 3.4. En effet, avec une charge de 60 g<sub>MV</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> au lieu de celle de 30 g<sub>MV</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> utilisée dans cette expérience, toutes choses égales par ailleurs, il a fallu trois jours afin d'atteindre un état stationnaire pour le débit de production d'H<sub>2</sub>. Ainsi, dans la présente étude, il a été postulé qu'il faudrait également trois jours pour atteindre un premier état stationnaire, puis que ce dernier serait maintenu durant trois jours (6 TSH). Les conditions de fermentation ont donc été modifiées pour revenir à 1 bar et sans captage du CO<sub>2</sub> après six jours de fermentation. Ensuite, trois jours ont été à nouveau supposés nécessaires pour atteindre un deuxième état stationnaire, maintenu durant trois jours (de nouveau, 6 TSH). La Figure 4-6 résume le plan expérimental appliqué.



**Figure 4-6 : Illustration du plan expérimental appliqué pour évaluer l'effet des modifications de pressions partielles en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> en continu ainsi que l'effet du changement de condition opératoire au cours de la fermentation**

- **Tests d'activité homoacétogène**

Un test de mesure d'activité homoacétogène a été mis au point. Ce test est réalisé *ex situ*, *via* le prélèvement du milieu de culture de fermentation et son introduction dans une fiole inertée à l'azote dans laquelle sont injectées des quantités connues d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>. La fiole est mise sous agitation à 35 °C. Des mesures de pression et de la qualité du gaz au cours du temps permettent de suivre l'évolution de la quantité d'H<sub>2</sub> dans la fiole (Voir détail section 2.6).

- **Mesures de concentrations en gaz dissous**

Concernant la mesure des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> dissous, une version améliorée du protocole utilisé en partie 4.2 a été développée. Ce protocole repose sur l'utilisation de flacons de filtration pouvant être mis sous vide et dans lesquels le milieu fermentaire est introduit directement depuis le fermenteur par un raccord en verre de diamètre d'environ 1 cm. L'avantage de ce système est qu'il permet de prélever le milieu fermentaire sans le mettre en contact avec l'air libre (et donc d'éviter toute perte d'H<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>) et qu'il peut être mis sous vide, réduisant la dilution de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> dégazés dans de l'azote et améliorant ainsi la précision de la mesure. Ce système présentait néanmoins le désavantage d'être fermé sans bague métallique (par simple enfoncement d'un bouchon).

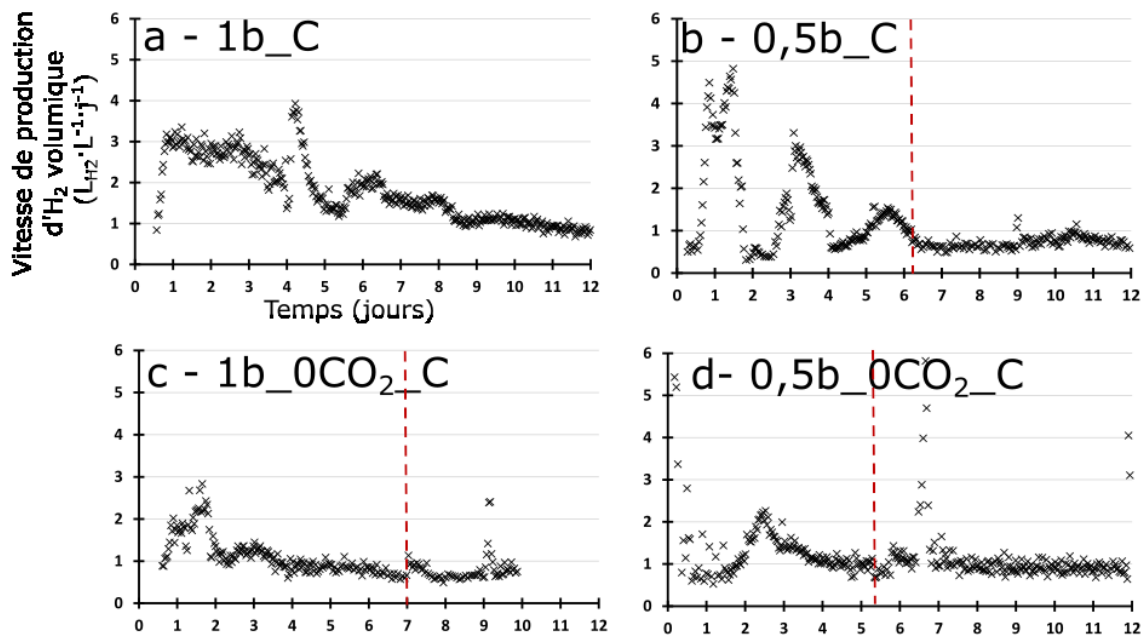
Malheureusement, ce système de fermeture s'est révélé susciter des variations de volumes du ciel gazeux de la fiole lors des changements de pression, rendant les mesures effectuées inexploitable. L'usage d'une sonde de mesure spécifique de l'H<sub>2</sub> dissous par ampérométrie a également été étudié (Sonde Shallow Water, Aquams, France). Dans la sonde, l'H<sub>2</sub> dissous passe au travers d'une membrane perméable aux gaz. Il diffuse jusqu'à une électrode où s'opère une réaction d'oxydation électrochimique. Le courant généré, proportionnel à la pression partielle en H<sub>2</sub> dissous, est mesuré par la sonde. La gamme de mesure était de 0,001 mg·L<sup>-1</sup> à 5 mg·L<sup>-1</sup>. Cependant, ce système s'est révélé trop fragile, et n'a pas supporté les conditions de fermentation appliquées. En conséquence, les concentrations en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dissous ne sont pas présentées dans cette partie. L'Annexe 1 présente le développement technique effectué.



### 4.3.3. Résultats

#### 4.3.3.1. Production d'H<sub>2</sub> au cours de la fermentation

Les débits volumiques de production d'H<sub>2</sub> au cours des fermentations 1b\_C, 0,5b\_C, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C ont tout d'abord été comparés, et sont présentés en Figure 4-7. Les fermentations ont été suivies pendant douze jours, à l'exception de la fermentation 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, pour laquelle l'alimentation automatique en substrat s'est interrompue après 10 jours.



**Figure 4-7 : Vitesse de production d'H<sub>2</sub> volumique (par volume de milieu fermentaire) en fonction du temps de fermentation pour les conditions 1b C (a), 0,5b C (b), 1b 0CO<sub>2</sub> C (c) et 0,5b 0CO<sub>2</sub> C (d). Les barres rouges indiquent le moment où les conditions de fermentation ont été ramenées à 1 bar sans capture du CO<sub>2</sub> (i.e. dans des conditions similaires à celles appliquées en 1b C).**

La fermentation 1b\_C, qui correspond au témoin, a été associée, de 1 à 2 jours, à un débit moyen de  $2,7 \pm 0,3 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ , ce qui correspond à une production d'H<sub>2</sub> de  $88 \pm 10 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{MV}} \text{ ajoutée}^{-1}$ , soit une production similaire à celle précédemment mesurée en batch, en condition 1b :  $82 \pm 29 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{MV}} \text{ ajoutée}^{-1}$ . Une rapide perturbation du débit d'H<sub>2</sub> a été remarquée, avec tout d'abord une augmentation du débit de  $1,3 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  à  $3,9 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  de 4 à 4,2 jours, puis une diminution jusqu'à  $1,6 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  à 4,8 jours. Le renouvellement de la solution d'alimentation ayant été effectué à 4 jours, il coïncide avec cette perturbation, et l'explique potentiellement. Le débit d'H<sub>2</sub> a par la suite progressivement diminué jusqu'à atteindre  $1 \pm 0,1 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  en fin d'expérience, entre 9 à 12 jours de fermentation. Entre le début et la fin de la fermentation, le débit a ainsi diminué de 63 %.

Une plus grande variabilité a été observée au cours de la fermentation à 0,5 bar (condition 0,5b\_C, Figure 4-7-b), le débit fluctuant entre 0,3 et 4,8  $\text{LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  de 0 à 2 jours. De 4 à 6 jours, le débit de production était en moyenne de  $1 \pm 0,3 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ . A 6,2 jours, lorsque le débit était de  $0,72 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ , la régulation de pression a été modifiée et fixée à 1 bar. La production a ensuite peu évolué jusqu'à la fin de la fermentation, atteignant  $0,8 \pm 0,1 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  de 9 à 12 jours. Le changement de régulation de la pression, passant de 0,5 bar à 1 bar à 6,2 jours, n'a donc pas été concomitant à un changement de débit de production d' $\text{H}_2$ .

Lors des fermentations avec captage de  $\text{CO}_2$ , en conditions 1b\_0 $\text{CO}_2$ \_C (Figure 4-7-c) et 0,5b\_0 $\text{CO}_2$ \_C (Figure 4-7-d), les débits de production d' $\text{H}_2$  de 3 à 6 jours et de 4 à 6 jours étaient similaires, respectivement de  $0,9 \pm 0,1 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  et  $1,0 \pm 0,1 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ . La modification de la pression de régulation à 1 bar et l'arrêt du captage du  $\text{CO}_2$  effectués respectivement à 7 et 5,4 jours, n'ont de nouveau pas coïncidé avec une évolution du débit de production d' $\text{H}_2$ . Par rapport à la production mesurée entre 3 et 6 jours, le débit a progressivement diminué de 22 % pour 1b\_0 $\text{CO}_2$ \_C, atteignant  $0,7 \pm 0,1 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  et de 10 % pour 0,5b\_0 $\text{CO}_2$ \_C, atteignant  $0,9 \pm 0,1 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ .

En conclusion, quelles que soient les conditions de pression totale et de pression partielle en  $\text{CO}_2$ , le débit de production d' $\text{H}_2$  a progressivement diminué au cours de la fermentation, pour atteindre en moyenne  $0,9 \pm 0,3 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  à partir de 9 jours. Ce débit correspond à une production d' $\text{H}_2$  de  $30 \pm 10 \text{ mLH}_2\cdot\text{g}_{\text{MVajoutée}}^{-1}$ . La production d' $\text{H}_2$  des différentes fermentations a donc été similaire après le rétablissement des conditions opérationnelles à 1 bar sans captage du  $\text{CO}_2$ , suggérant que l'historique de la culture n'a pas eu d'impact sur la production d' $\text{H}_2$ . De plus, jusqu'à environ 6 jours, *i.e.*, lorsque les conditions de pression totale et de pressions partielles en  $\text{CO}_2$  étaient distinctes pour les quatre réacteurs, la production d' $\text{H}_2$  était globalement instable. Durant les périodes les plus stables avant 6 jours, les débits d' $\text{H}_2$  étaient respectivement de (i)  $2,9 \pm 0,2$  ; (ii)  $1,0 \pm 0,3$  ; (iii)  $1,0 \pm 0,2$  et (iv)  $1,1 \pm 0,2 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  pour les conditions 1b\_C, 0,5b\_C, 1b\_0 $\text{CO}_2$ \_C et 0,5b\_0 $\text{CO}_2$ \_C. Ainsi, seul le débit d' $\text{H}_2$  en condition 1b\_C se distingue en étant 2,6 à 2,9 fois plus élevée que le débit d' $\text{H}_2$  dans les autres conditions. Les conditions 0,5b\_C, 1b\_0 $\text{CO}_2$ \_C et 0,5b\_0 $\text{CO}_2$ \_C appliquées n'ont donc pas été favorables à une augmentation de la production d' $\text{H}_2$ . Enfin, le changement de conditions expérimentales ramenant la pression totale à 1 bar et l'arrêt du captage du  $\text{CO}_2$  n'impliquent pas de changement de débit concomitant, suggérant que dans les conditions étudiées, les concentrations en gaz ont un effet négligeable sur l'évolution de la production d' $\text{H}_2$ .

#### 4.3.3.2. Concentrations en produits métaboliques et dégradation du substrat au cours de la fermentation

Dans cette partie, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux concentrations des acides organiques et alcools en fonction du temps pour les différentes conditions étudiées. Dans un second temps, la conversion du substrat en acétate, en butyrate et en lactate a été comparée en fonction des conditions opératoires, après six jours de fermentation.

- **Evolution des concentrations en acides organiques et en alcools au cours de la fermentation, pour chaque condition expérimentale**

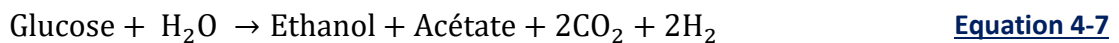
Afin d'évaluer si les conditions appliquées ont eu un effet sur l'activité métabolique, la production de métabolites (acétate, butyrate, isobutyrate, lactate, formate, valérate, isovalérate, propionate, caproate et éthanol) a été suivie au cours des quatre fermentations (Figure 4-8). Les métabolites principaux identifiés dans ces fermentations étaient le lactate, l'acétate et le butyrate.

Etant donnée la production d' $H_2$  similaire entre les différentes conditions étudiées de 9 à 12 jours de fermentation, les similarités de concentrations en métabolites entre les différentes conditions ont tout d'abord été recherchées. Pour les conditions 0,5b\_C, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, la concentration en lactate relevée à 1 jour de fermentation a varié entre 24 mM (pour 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C) et 55 mM (pour 0,5b\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C). Pour ces trois conditions, la concentration en lactate diminue par la suite. De plus, quelle que soit la condition observée, la concentration en lactate après 6 jours de fermentation a été substantielle, avec  $25 \pm 7$  mM,  $20 \pm 3$  mM,  $13 \pm 8$  mM et  $18 \pm 3$  mM en conditions 1b\_C, 0,5b\_C, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C ( $17 \pm 8$  mM toutes conditions confondues).

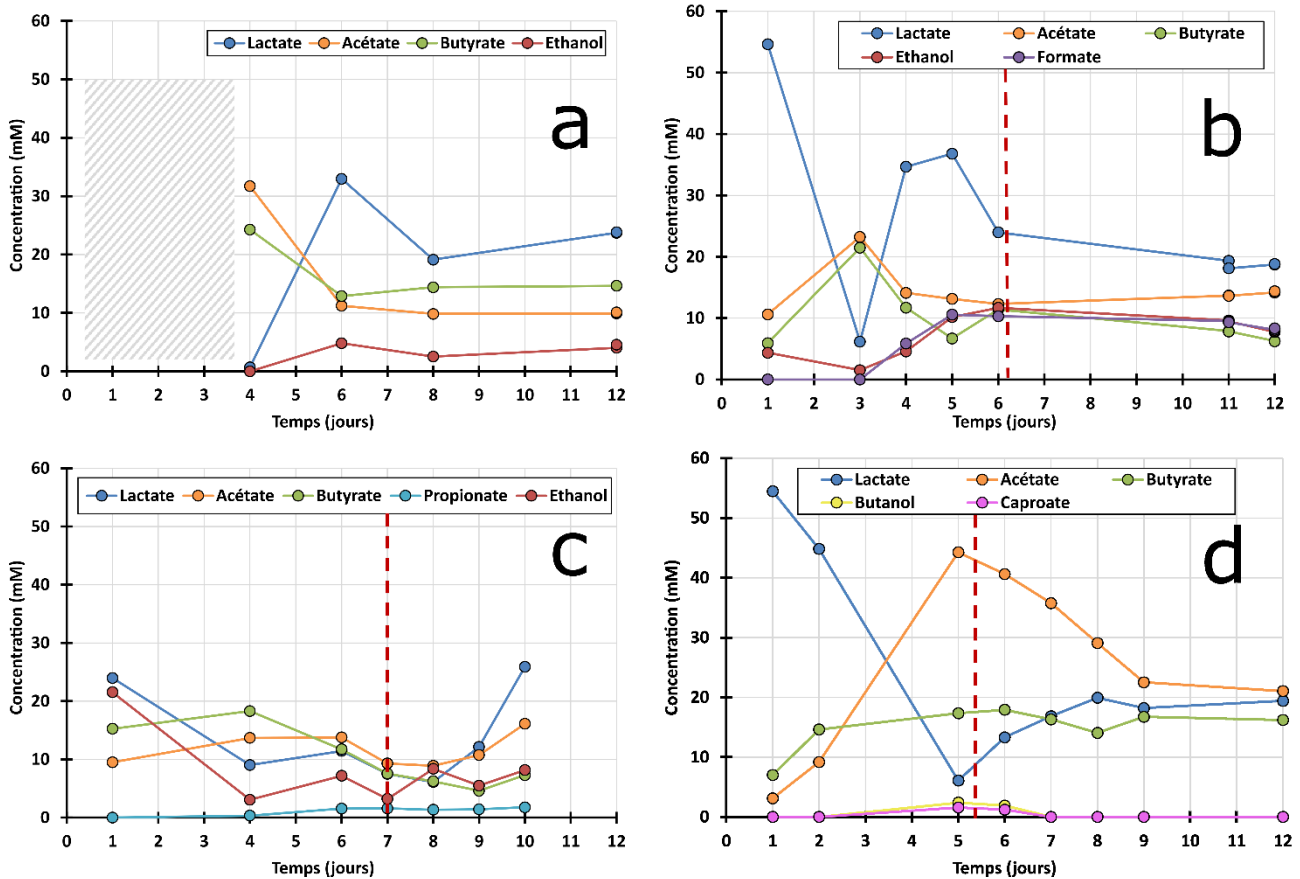
En condition 1b\_C (Figure 4-8-a), la concentration en lactate était inférieure au seuil de détection à 4 jours de fermentation, et la concentration en butyrate était de 24 mM, à savoir la concentration en butyrate la plus élevée mesurée, toutes fermentations confondues. La production d' $H_2$  de  $2,7 \pm 0,3$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> observée au début de fermentation 1b\_C est donc attribuable à une production de butyrate favorisée par rapport à la production de lactate. De plus, l'augmentation de la concentration en lactate entre 4 et 6 jours de 0 à 33 mM est concomitante avec une diminution des concentrations en acétate et butyrate de 32 mM et 24 mM à 11 mM et 15 mM, respectivement. La diminution concomitante du débit de production d' $H_2$  de  $3,93$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> à  $1,42$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> peut donc être attribuée à une augmentation de la production de lactate au détriment des voies productrices d' $H_2$ . Une production minime

d'éthanol, s'élevant à  $3 \pm 1$  mM, a été observée à partir de 6 jours de fermentation, suggérant éventuellement une production d' $H_2$  par la voie acétate-éthanol.

En condition 0,5b\_C (Figure 4-8-b), la concentration en lactate de 55 mM à 1 jour a diminué pour atteindre 6 mM à 3 jours avant de remonter à 37 mM à 4 jours. Cette instabilité était cohérente avec l'instabilité du débit de production d' $H_2$  précédemment observée, entre 0,3 et 4,8  $LH_2 \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$ . A partir de 6 jours, les concentrations en acétate et en butyrate étaient de  $13 \pm 1$  mM et  $9 \pm 3$  mM respectivement. Le changement de condition opératoire ayant été appliqué à 6 jours, ce dernier n'a donc pas eu d'effet notable sur l'activité métabolique. Une production de formiate et d'éthanol a également été observée au cours de cette fermentation, à hauteur de  $9 \pm 1$  mM et  $10 \pm 2$  mM respectivement à partir de 6 jours. Cette diversion des voies fermentaires était cohérente avec la diminution de la production d' $H_2$  observée, de  $1,0 \pm 0,3$   $LH_2 \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$  à  $0,8 \pm 0,1$   $LH_2 \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$ . En effet, l'accumulation de formiate n'est pas associée à une production d' $H_2$ , et la voie acétate / éthanol productrice d' $H_2$  éventuellement empruntée présente un rendement en  $H_2$  plus faible que la voie acétate / butyrate avec respectivement  $2 \text{ mol} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  (Equation 4-7) et entre 2 et 4  $\text{mol} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  (Li and Fang, 2007).



Au cours de la fermentation 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C (Figure 4-8-c), la concentration en lactate à 1 jour de 24 mM a diminué et s'est stabilisée à  $9 \pm 3$  mM de 4 à 9 jours. Cette concentration limitée en lactate maintenue sur une période prolongée a été la plus faible relevée parmi les différentes conditions évaluées. Néanmoins, cette restriction de la production de lactate n'a pas été associée à une augmentation de la production d'acétate ou de butyrate. En effet, la concentration de ces acides à 1 jour était respectivement de 15 mM et 10 mM. La concentration en butyrate a diminué progressivement jusqu'à atteindre  $6 \pm 3$  mM à partir de 7 jours de fermentation. La concentration en acétate est restée stable tout au long de la fermentation avec  $12 \pm 3$  mM. Ainsi, de nouveau, le changement de condition opératoire, appliqué à 7 jours, n'a pas eu d'effet notable sur les concentrations en acides et alcools produits. En comparaison, le débit de production d' $H_2$  élevé mesuré en début de condition 1b\_C de  $2,7 \pm 0,3$   $LH_2 \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$  avait été associé à la production de 32 mM et 24 mM d'acétate et de butyrate respectivement, soit 2,7 et 4 fois plus que dans la condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C. Par ailleurs, une production substantielle d'éthanol a été relevée, à hauteur de 22 mM à 1 jour de fermentation, puis  $6 \pm 2$  mM durant le reste de la fermentation. De nouveau, une voie acétate / éthanol productrice d' $H_2$  a pu être empruntée.



**Figure 4-8 : Suivi des concentrations en métabolites majoritaires en fonction du temps pour les conditions 1b C (a), 0,5b C (b), 1b  $\text{OCO}_2$  C (c) et 0,5b  $\text{OCO}_2$  C (d). Un problème technique a rendu inexploitable les concentrations en acides organiques avant quatre jours en condition 1b C, cette période a donc été hachurée. Les barres rouges indiquent le moment où les conditions de fermentation ont été ramenées à 1 bar sans capture du  $\text{CO}_2$  (i.e. dans des conditions similaires à celles appliquées en 1b C).**

Pour finir, en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C (Figure 4-8-c), la production de butyrate est restée plus stable que dans les autres conditions, avec  $16 \pm 1$  mM de 2 à 12 jours. Cette concentration a été légèrement supérieure aux concentrations de  $13 \pm 3$  et  $7 \pm 3$  mM mesurées à partir de 4 et 6 jours en conditions 0,5b\_C et 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, et équivalente à la concentration de  $16 \pm 1$  mM mesurée en condition 1b\_C de 6 à 12 jours. Cette production de butyrate a prédominé sur la production d'acétate à 2 jours de fermentation, avec 9 mM d'acétate. La production d'acétate a cependant fortement augmenté après 2 jours, atteignant 44 mM à 5 jours, soit la concentration la plus élevée mesurée parmi toutes les conditions, puis a rediminué progressivement à partir de 6 jours jusqu'à atteindre 21 mM à 12 jours. Cette forte variation de la concentration en acétate n'a pas été associée à une variation concomitante de la production d'H<sub>2</sub>, le débit étant resté faible, à  $1,2 \pm 0,6$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Cette faible production d'H<sub>2</sub>, malgré la concentration élevée en acétate, suggère que la production d'acétate a partiellement été décorrélée de la production d'H<sub>2</sub>. La concentration en lactate a suivi l'évolution inverse à celle de l'acétate, diminuant de 55 mM à 6 mM de 1 à 5 jours, puis

augmentant jusqu'à 19 mM de 6 à 12 jours. La diminution de la concentration en acétate et l'augmentation de la concentration en lactate étaient alors concomitantes avec l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et l'augmentation de la pression de régulation. Potentiellement donc, et au cours de cette condition uniquement, le changement de conditions a pu induire une modification des produits métaboliques.

- **Conversion du substrat après changement opératoire entre les différentes fermentations**

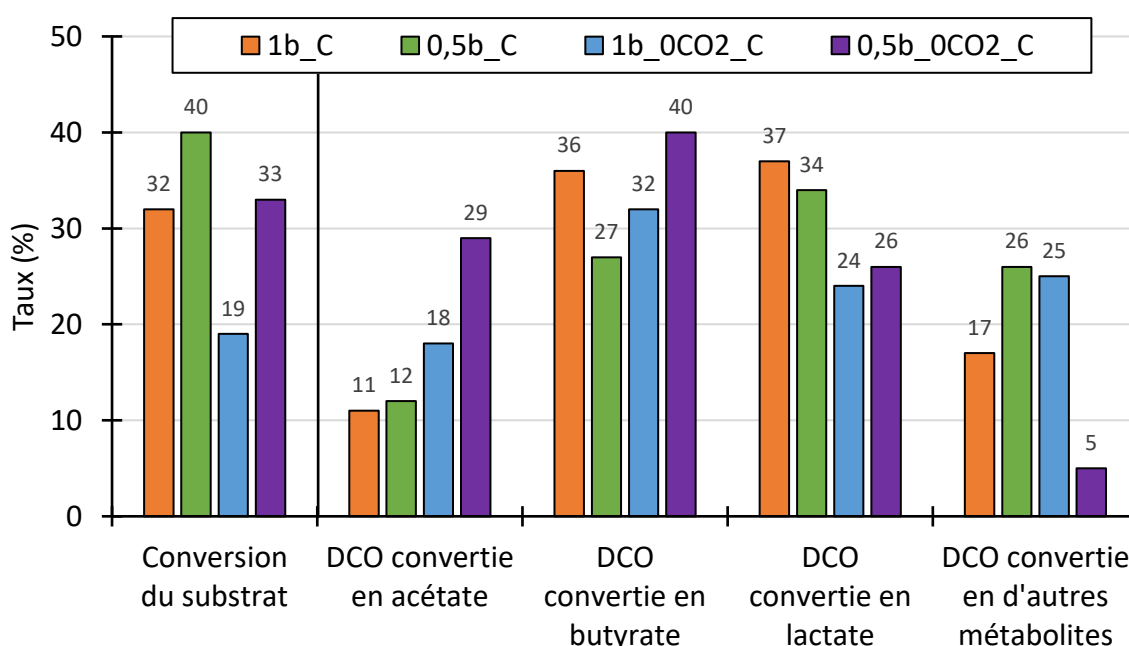
Afin de déterminer si les conditions appliquées ont eu un impact sur la conversion du substrat et de s'affranchir de la variabilité de la quantité de métabolites produits pour décrire les voies métaboliques empruntées, la conversion du substrat a été calculée. Le taux de conversion du substrat a été déterminé en calculant le rapport entre la somme de la DCO quantifiée des métabolites (H<sub>2</sub>, acides et alcools) et la DCO du substrat introduit dans le réacteur, après le changement de conditions opératoires (à environ six jours) et jusqu'à la fin de la fermentation. Etant donné l'instabilité de l'activité métabolique dans les fermenteurs dans chacune des conditions étudiées avant six jours, la répartition de la DCO pendant cette période n'a pas été analysée. La Figure 4-9 présente le taux de conversion du substrat pour les différentes conditions évaluées ainsi que la répartition de la DCO dégradée en trois métabolites majoritaires, *i.e.* l'acétate, le butyrate et le lactate ainsi qu'en la somme des autres métabolites après 6 jours. Dans la période considérée, les fermentations étaient donc toutes conduites à 1 bar et sans captage du CO<sub>2</sub>.

Les taux de conversion du substrat en métabolites quantifiés ont été de 32 %, 40 %, 19 % et 33 % en conditions 1b\_C, 0,5b\_C, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C respectivement. La variabilité de ces valeurs suggère que l'historique de culture des fermentations a impacté la conversion du substrat. Le captage de CO<sub>2</sub> initial a ainsi été associé au plus faible taux de conversion du substrat. En comparaison, en batch, le captage du CO<sub>2</sub> n'a pas été associé à une diminution de l'efficacité de dégradation du substrat. Potentiellement, un métabolite a pu ne pas être identifié au cours des analyses.

Premièrement, la conversion du substrat en lactate a été plus élevée en conditions 1b\_C et 0,5b\_C, avec 37 % et 34 %, qu'en conditions 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, avec 24 et 26 % respectivement. Le captage du CO<sub>2</sub> initial semble donc avoir eu un effet résilient, diminuant la proportion de lactate dans la DCO convertie. La diminution de la proportion de DCO convertie en lactate par rapport à la condition 1b avait déjà été observée en batch, mais également lors de la réduction de pression. En effet, en batch, elle s'était élevée jusqu'à 51 % en condition 1b, mais a été restreinte à un maximum de 22 %, 14 % et 2 % en conditions 0,5b, 1b\_0CO<sub>2</sub> et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>. De nouveau donc, le captage du CO<sub>2</sub> couplé à la diminution de pression mais

également le captage du CO<sub>2</sub> seul pourrait avoir induit un changement populationnel défavorable aux producteurs de lactate, comme en batch, et ce, de façon résiliente après arrêt du captage de CO<sub>2</sub>.

De plus, la proportion de DCO convertie en butyrate après changement opératoire a quant à elle varié entre 27 % en condition 0,5b\_C et 40 % en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C. En conditions 1b\_C et 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, elle était de 36 % et 32 % respectivement. Ainsi, ni la baisse de pression ni le captage de CO<sub>2</sub> ne semble donc avoir influencé la production de butyrate après changement de conditions de fermentation, et cette dernière est similaire en condition 1b\_C (36 %) et 0,5b\_0CO<sub>2</sub> (40 %).



**Figure 4-9 : Conversion du substrat en métabolites quantifiés, en acétate, en butyrate, en lactate et en autres métabolites, pour les différentes conditions de fermentation. Les taux de conversions ont été calculés de six jours à la fin de la fermentation.**

Enfin, la proportion de DCO convertie en acétate après changement opératoire tend à être deux à trois fois plus élevée en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C qu'en conditions 1b\_C, 0,5b\_C et 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, avec respectivement 29 % en comparaison avec 11 %, 12 % et 18 %. Toutefois, en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, la concentration en acétate a fortement évolué, diminuant de 44 mM à 5 jours à 21 mM à 12 jours. En revanche, même en considérant seulement la période de 9 à 12 jours au cours de laquelle la concentration en acétate était plus stable, avec 21 et 22 mM, la proportion de DCO convertie en acétate reste supérieure à celle relevée dans les autres conditions, à 25 %. Ainsi, le captage du CO<sub>2</sub> et la réduction de pression appliqués initialement ont été associés à une augmentation de la conversion du substrat en acétate après changement opératoire, sans évolution substantielle de la production d'H<sub>2</sub>. Entre autres, deux hypothèses peuvent expliquer cette observation. Une augmentation de l'activité productrice

d'H<sub>2</sub> a pu être couplée à une augmentation de l'activité homoacétogène, résultant en une augmentation de la concentration en acétate *via* ces deux activités, sans augmentation apparente de la production d'H<sub>2</sub>. Cette hypothèse semble peu probable, puisque l'activité de consommation (par homoacétogénèse) d'H<sub>2</sub> est estimée représenter entre 11 et 43 % de la production d'H<sub>2</sub> (Saady, 2013). Alternativement, la production d'acétate supplémentaire observée peut ne pas être issue d'une voie productrice d'H<sub>2</sub>.

Enfin, la condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C après changement opératoire n'a été associée qu'à une conversion du substrat en d'autres métabolites que l'acétate, le butyrate et le lactate à hauteur de 5 % seulement. En comparaison, en conditions 1b\_C, 0,5b\_C et 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, cette part de DCO s'élevait à 17 %, 26 % et 25 %. Dans ces trois cas, cette DCO a été principalement convertie en éthanol. Potentiellement, l'application initiale de la baisse de pression couplée au captage du CO<sub>2</sub> a donc pu limiter de façon résiliente la diversion des voies métaboliques de la production d'acétate, de butyrate et de lactate.

#### 4.3.3.3. *Evolution des communautés microbiennes au cours de la fermentation*

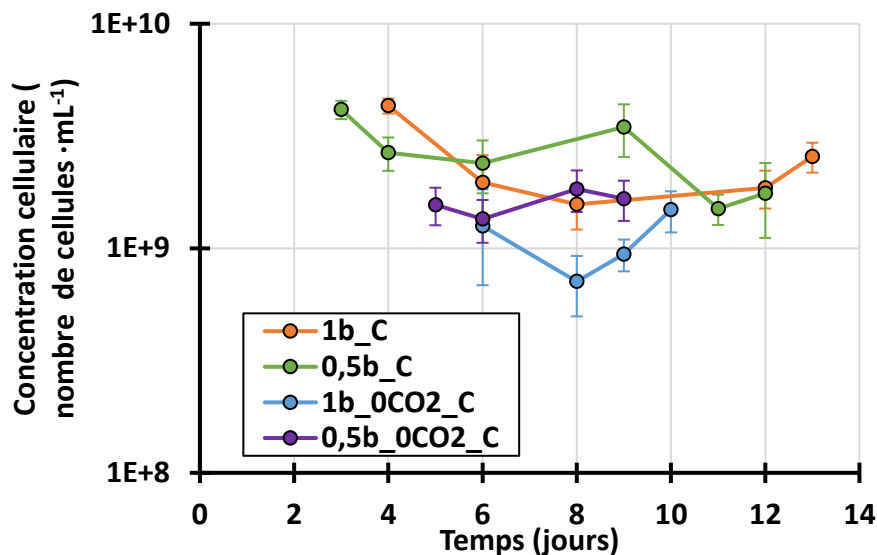
Une analyse des communautés microbiennes a été réalisée afin de déceler les changements populationnels éventuellement induits par les différentes conditions expérimentales. L'analyse a mis en évidence la présence de 163 OTUs, dont les 20 majoritaires, représentant en moyenne  $93 \pm 5$  % de l'abondance totale, appartiennent à deux phyla (Firmicutes et Actinobacteria), trois classes (Clostridia, Bacillia, Actinobacteria), cinq ordres (Clostridiales, Lactobacillales, Bifidobacteriales, Bacillales, Actinomycetales) et 8 familles (*Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Actinomycetaceae*).

- **Impact des conditions opératoires sur la croissance bactérienne**

Dans un premier temps, l'impact des conditions opératoires sur la croissance bactérienne totale a été évalué. La Figure 4-10 présente les concentrations cellulaires totales calculées à partir de mesures de PCRq en fonction du temps de fermentation pour les différentes conditions expérimentales. Pour rappel, les concentrations cellulaires ont été calculées en prenant en compte le nombre de copies 16S par cellule en fonction de chaque OTU (voir partie 2.8.1). Les concentrations cellulaires ont été mesurées, en fonction des conditions expérimentales, à hauteur de (i)  $2 \cdot 10^9 \pm 1 \cdot 10^9$  (1b\_C), (ii)  $3 \cdot 10^9 \pm 1 \cdot 10^9$  (0,5b\_C), (iii)  $1 \cdot 10^9 \pm 3 \cdot 10^8$  (1b\_0CO<sub>2</sub>\_C) et (iv)  $2 \cdot 10^9 \pm 2 \cdot 10^8$  (0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C). La concentration cellulaire a été significativement plus faible dans les conditions avec captage du CO<sub>2</sub> (ANOVA, p-value = 0.006,



Tukey Test, p-value = 0,002). En particulier, la condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C a été celle associée aux concentrations cellulaires les plus faibles. Le faible taux de conversion du substrat précédemment discuté (19 %) a donc potentiellement été lié à une croissance légèrement plus faible que dans les autres conditions. Toutefois, comme le rapport entre les concentrations cellulaires maximales et minimales mesurées est de 6,1 (soit moins de 1 log d'écart), les différences de croissances entre les conditions étaient faibles.



**Figure 4-10 : Concentration cellulaire totale en fonction du temps de fermentation pour les différentes conditions de fermentation étudiées. Les barres d'erreurs indiquées ont sont des écart-types calculés à partir des écart-types de chaque PCR quantitative effectuée.**

- **Changements populationnels relatifs aux bactéries productrices d'H<sub>2</sub> et aux bactéries lactiques en fonctions des conditions opératoires**

Ensuite, les effets des différentes conditions opératoires sur la structure des communautés microbiennes a été étudiée. La Figure 4-11 présente la concentration cellulaire relative des OTUs à l'échelle de la famille en fonction du temps de fermentation pour les différentes conditions expérimentales.

Dans un premier temps, étant donné la production d'H<sub>2</sub> similaire entre les différentes conditions entre 9 et 12 jours de fermentation, à hauteur de  $0,9 \pm 0,3 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ , des similarités dans la structure des communautés microbiennes entre les conditions opératoires ont été recherchées. En fin de fermentation, la concentration relative en *Clostridiaceae* était similaire entre les différentes conditions, estimée à  $36 \pm 4 \%$ , soit  $7 \cdot 10^8 \pm 2 \cdot 10^8 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Ainsi, quel

que soit l'historique de fermentation, dans les conditions étudiées, les *Clostridiaceae* tendent à atteindre une concentration relative similaire. Par ailleurs, des *Sporolactobacillaceae*, bactéries lactiques, sont apparues dans toutes les conditions, en fin de fermentation. En conditions 1b\_C ; 0,5b\_C, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, elles sont apparues respectivement à 8, 11, 10 et 12 jours de fermentation avec une concentration relative supérieure à 1 %, et ont représenté en fin de fermentation (à 12, 12, 10 et 12 jours respectivement) 28 %, 20 %, 16 % et 11 %. Ainsi, et quelle que soit la condition de fermentation, la concentration relative de cette famille a progressé avec le temps de culture. En comparaison, cette famille n'a pas été identifiée lors de la fermentation de soupe de déconditionnement en batch. Palomo-Briones et al. (2017a) ont également observé la progressive augmentation de l'abondance de *Sporolactobacillaceae* au cours d'une culture à pH 5,9, 37 °C en CSTR avec un TSH de 12 h et du lactose comme substrat (charge de 40 g<sub>lactose</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). L'abondance de cette famille a progressé de moins de 5 % à environ 40 % entre 3 et 6 jours de culture (Palomo-Briones et al., 2017), soit plus tôt que dans les expériences de la présente étude, et a été associée à une production de lactate. L'installation lente de cette famille dans les fermenteurs est cohérente avec les faibles taux de croissance de ses membres, de l'ordre de 0,1 h<sup>-1</sup>, en comparaison avec les taux de croissance de 0,5 h<sup>-1</sup> pour des *Clostridiaceae*, par exemple (Palomo-Briones et al., 2017). Globalement donc, les productions d'H<sub>2</sub> similaires en fin de fermentation, quelle que soit la condition opératoire appliquée, peuvent être associées à une abondance de *Clostridiaceae* similaire, et à une émergence systématique de la même famille *Sporolactobacillaceae*, productrice de lactate.

Dans la suite de cette partie, les changements populationnels observés dans chaque condition de fermentation ont d'abord été décrits, en tentant d'associer l'évolution des communautés et l'activité métabolique observée. Ensuite, une analyse globale des changements populationnels a été réalisée et discutée. L'évolution des communautés microbiennes a été décrite pendant toute la durée de la fermentation, avant changement opératoire, et après.

- **Analyse des populations microbiennes par condition opératoire**

En condition **1b\_C**, les *Clostridiaceae* et les *Streptococcaceae* représentaient plus de 90 % de la concentration cellulaire de 4 à 11 jours. En particulier, la communauté bactérienne à 4 jours a été celle associée à la concentration cellulaire relative en *Clostridiaceae* la plus élevée, avec 82 %. Cette concentration relative a progressivement diminué de 4 jours à 12 jours, jusqu'à atteindre 40 %. Ce résultat est cohérent avec la diminution progressive de la productivité en H<sub>2</sub> observée en condition 1b\_C, de 2,7 ± 0,3 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> à 1,0 ± 0,1 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> des jours 1-3 à 9-12. A l'inverse, la concentration relative des *Streptococcaceae* a progressivement

augmenté de 4 à 11 jours de 16 % à 43 %, avant de rediminuer à 16 % à 12 jours (Figure 4-11-b).

Des *Lactobacillaceae* ont été retrouvés dans la communauté microbienne à une faible concentration cellulaire relative, à  $1,4 \pm 0,0$  %. Leur concentration relative a toutefois augmenté à 12 jours de fermentation à 5,5 %. Enfin, la concentration cellulaire d'*Enterococcaceae* et de *Ruminococcaceae* a également augmenté à 12 jours de fermentation, atteignant 2,3 % et 6,4 % alors que leur concentration relative représentait 0 % jusqu'à 8 et 11 jours, respectivement. La famille *Ruminococcaceae* (plus récemment nommée *Oscillospiraceae*) comporte le genre *Caproiciproducens* (Carlos A. Contreras-Dávila, Johan Esveld, 2021) bactéries productrices de caproate (Feng et al., 2018), des bactéries hydrogénotrophes acétogènes (Gagen et al., 2015), mais a également été associée à la production d' $H_2$  et d'éthanol (Veeravalli et al., 2017). Considérant ces communautés microbiennes et l'évolution de leurs concentrations relatives, la production de lactate au cours de la fermentation 1b\_C (entre 20 et 35 mM à partir de 6 jours) a probablement été principalement attribuable à la croissance des *Streptococcaceae*, et la production d'éthanol à la croissance de *Clostridiaceae* principalement (Ren et al., 2007).

En condition **0,5b\_C**, jusqu'à six jours, la concentration relative des *Clostridiaceae* a fortement varié, entre 16 % et 43 %, ce qui est cohérent avec la variabilité de production d' $H_2$  observée pendant cette période ( $0,3 - 4,9 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ). La concentration relative en *Clostridiaceae* a néanmoins également varié entre 9 et 12 jours, de 20 à 64 %, alors même que la production d' $H_2$  variait dans une moindre proportion ( $0,5 - 1,1 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ). Cette variation de concentration relative est liée à une variation de la concentration cellulaire des *Clostridiaceae*, entre  $4 \cdot 10^8$  et  $2 \cdot 10^9$  cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$ , soit d'un facteur 5. De nouveau, les *Streptococcaceae* ont représenté une part considérable de la concentration relative, de 17 à 44 % et une concentration variant de  $6 \cdot 10^8$  à  $2 \cdot 10^9$  cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$ , sans tendance d'évolution avec le temps de fermentation toutefois.

De plus, la condition 0,5b\_C a été la seule condition au cours de laquelle des *Enterococcaceae* sont apparus en concentration relative substantielle, augmentant de 4 % à 3 jours à 33 % à 6 jours, puis en représentant 25 et 26 % à 11 et 12 jours. Seul un OTU a été identifié parmi ces *Enterococcaceae*. Il s'agit de *Enterococcus camelliae* ou *Enterococcus italicus* (pourcentage d'identité de 100% pour les deux espèces). *Enterococcus camelliae* a été identifiée comme productrice de lactate à partir de glucose (Sukontasing et al., 2007), et, plus généralement, les entérocoques produisent essentiellement du lactate, mais également de l'acétate, du formiate et de l'éthanol (Aguilar-Galvez et al., 2012). La production substantielle de formiate et d'éthanol (jusqu'à 10 mM chacun) au cours de cette fermentation a donc été probablement en lien avec la croissance d'*Enterococcus* sp.. Au cours de cette fermentation,

le changement de conditions opératoires (régulation de la pression à 1 bar plutôt à 0,5 bar) n'a pas été associé à un changement populationnel apparent à l'échelle de la famille.

En condition **1b\_0CO<sub>2</sub>\_C**, la concentration relative en *Clostridiaceae* a peu varié tout au long de la fermentation, avec  $33 \pm 5 \%$ , correspondant à  $4 \cdot 10^8 \pm 2 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>. De nouveau, des *Streptococcaceae* ont représenté une part non négligeable de la concentration cellulaire, de 25 à 32 %, et ont présenté une concentration cellulaire absolue plutôt stable de 6 jours à la fin de la fermentation, avec  $3 \cdot 10^8 \pm 0,6 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>.

La condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C s'est distinguée des conditions 1b\_C et 0,5b\_C par l'identification de *Bifidobacteriaceae*, représentant 8 à 22 % de la concentration cellulaire, et entre  $8 \cdot 10^7$  et  $3 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>. Les membres de cette famille produisent le plus souvent de l'acétate et du lactate, avec un ratio molaire Acétate / Lactate entre 4/1 et 1/1 (Desjardins et al., 1990). Certaines espèces de *Bifidobacteriaceae* peuvent également produire de l'éthanol et du formiate à partir de sucres (Pokusaeva et al., 2011), ou encore du propionate (Sivagurunathan et al., 2014), ce qui est cohérent avec la détection de ce métabolite en condition 1b\_0CO<sub>2</sub> (< 5 mM). Cette famille est régulièrement identifiée en fermentation sombre, notamment lorsque le substrat est un biodéchet, comme par exemple, lors d'une culture en semi-continu, en CSTR, à des pH allant de 4 à 6, avec un temps de rétention de 4 jours et une charge de  $12 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  (Feng et al., 2018). Les auteurs avaient alors observé une augmentation de la concentration en acétate avec l'augmentation de l'abondance de *Bifidobacterium* sp. De plus, lors de la fermentation de biodéchets en ASBR avec un TSH de 48 h, à pH 5,5 et une alimentation de chaque cycle avec  $5 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L}^{-1}$ , l'abondance relative de *Bifidobacterium* sp. a progressivement augmenté, de 0 % au 4<sup>e</sup> cycle à ~50 % au 56<sup>e</sup> cycle (Villanueva-Galindo and Moreno-Andrade, 2020). Les auteurs ne détaillent néanmoins pas l'évolution des concentrations en acides. Enfin, nous avons également identifié des *Bifidobacteriaceae* dans les mêmes conditions de culture au cours de cette thèse (pH 5,5, même substrat, HRT 12h en CSTR, 1 bar) mais sans captage du CO<sub>2</sub>, et avec une charge organique deux fois plus élevée ( $60 \text{ g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ). Des *Ruminococcaceae* sont également apparus au cours de cette fermentation 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, représentant 4 à 10 % de la concentration cellulaire ( $7 \cdot 10^7 \pm 2 \cdot 10^7$  cellules·mL<sup>-1</sup>). Enfin, la concentration relative de *Lactobacillaceae* a augmenté avec le temps de fermentation, de 2 % à 6 jours à 11 % à 10 jours. De nouveau, le changement de conditions opératoires (arrêt du captage du CO<sub>2</sub>) n'a pas été associé à un changement populationnel concomitant apparent à l'échelle de la famille.

Enfin, en condition **0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C** la concentration relative des *Clostridiaceae* a progressivement diminué, sans effet du changement opératoire, de 52 % à 5 jours à 39 % à 12 jours. Toutefois, cette condition s'est distinguée par une faible concentration relative de *Streptococcaceae*, avec  $3 \pm 1 \%$  en moyenne, soit entre  $2 \cdot 10^7$  et  $7 \cdot 10^7$  cellules·mL<sup>-1</sup>. En

comparaison, les *Streptococcaceae* représentaient (i) 16 à 43 % en 1b\_C, (ii) 16 à 44 % en 0,5b\_C et (iii) 16 à 32 % en 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, *i.e.*, entre  $2 \cdot 10^8$  et  $2 \cdot 10^9$  cellules·mL<sup>-1</sup> dans ces trois conditions confondues, soit 3 à 120 fois plus qu'en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C.

De plus, les concentrations relatives en *Bifidobacteriaceae* les plus élevées ont été relevées dans cette condition, avec des valeurs entre 22 et 46 %, ( $5 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>). Plus précisément, la concentration en *Bifidobacteriaceae* était entre  $6,5 \cdot 10^8$  et  $7,3 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup> à 5 et 6 jours, et a été réduite entre  $3,3 \cdot 10^8$  et  $4,2 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup> à partir de 8 jours. Leur concentration relative a diminué par la même occasion de valeurs entre 41 et 46 % à  $24 \pm 2$  %. Cette diminution de la concentration en *Bifidobacteriaceae* tend à avoir été simultanée avec l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et la régulation à basse pression. Entre 6 et 8 jours également, la concentration cellulaire des *Lactobacillaceae* a augmenté de 3 à 22 % (de  $4,6 \cdot 10^7$  à  $3 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>, soit une augmentation de leur concentration par un facteur 6,5). Ces évolutions des concentrations en *Lactobacillaceae* et en *Bifidobacteriaceae* peuvent expliquer l'évolution des concentrations en métabolites. D'une part, l'accumulation d'acétate, jusqu'à 44 mM, à 5 jours, puis sa diminution jusqu'à 21 mM à 12 jours, peuvent être dues à l'évolution concomitante de la concentration des *Bifidobacteriaceae*, l'abondance de ces microorganismes ayant été associée avec la concentration en acétate (Feng et al., 2018). D'autre part, l'augmentation de la concentration en lactate, de 6 à 20 mM de 5 à 8 jours, peut être attribuée à la croissance simultanée des *Lactobacillaceae*. Plus précisément, *Lactobacillus delbrueckii* (pourcentage d'identité : 100 %) est le principal membre de la famille des *Lactobacillaceae* à croître en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, sa concentration relative augmentant de 1 % de 5 à 6 jours à  $21 \pm 5$  % à partir de 8 jours.

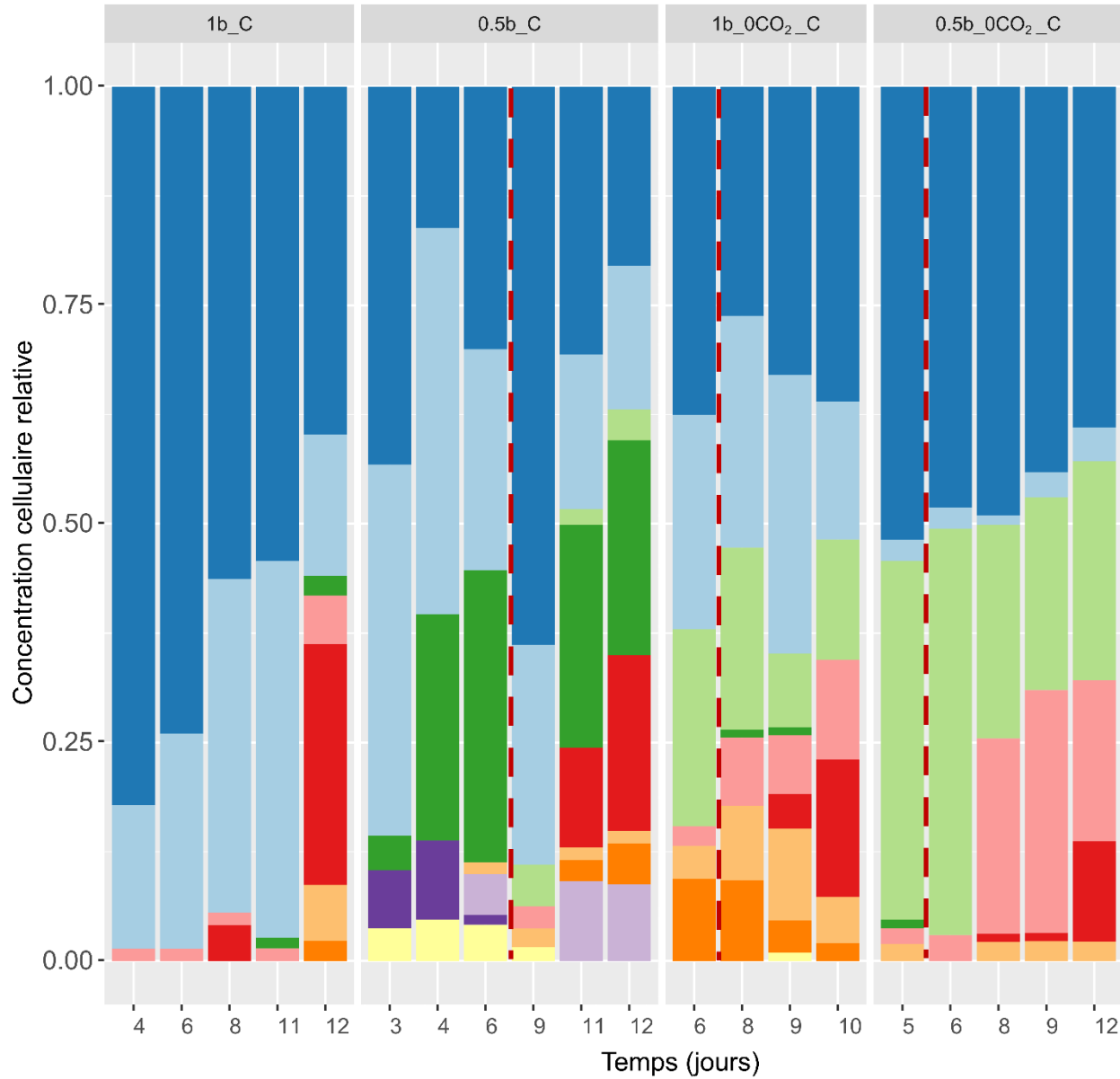
- **Analyse globale des effets des conditions opératoires sur les communautés microbiennes**

A partir des résultats précédents, il semblerait que le captage initial du CO<sub>2</sub> ait pu favoriser la croissance de *Bifidobacteriaceae*, dont la concentration cellulaire était inférieure à 100 cellules·mL<sup>-1</sup> du début à la fin de la fermentation 1b\_C ainsi que jusqu'à 6 jours en condition 0,5b\_C tandis qu'elle était entre  $8 \cdot 10^7$  et  $7 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup> en conditions 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C.

Aussi, l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et de la basse pression combinés a été associé à des changements populationnels. En effet, la croissance de *Lactobacillaceae* a été favorisée et la croissance de *Bifidobacteriaceae* a été défavorisée. Toutefois, l'arrêt du captage de CO<sub>2</sub> sans modification de la pression (en condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C) ne s'est pas traduit par une même évolution claire des concentrations en *Lactobacillaceae* ou en *Bifidobacteriaceae*. En comparaison, Feng et al. (2018) avaient également observé une augmentation de l'abondance

relative de *Lactobacillus* sp. liée à une diminution de l'abondance relative en *Bifidobacterium* sp, lors de la fermentation de biodéchets à pH 4,5-4,7. Potentiellement, la compétition entre *Lactobacillaceae* et *Bifidobacteriaceae* au cours de la fermentation sombre des biodéchets pourrait être généralisable.

Plus précisément, la concentration relative de *Streptococcus lutetiensis* (99,06% d'identité) a été de 0 % en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, soit moins de 100 cellules·mL<sup>-1</sup> en comparaison notamment avec 2·10<sup>7</sup> - 5·10<sup>7</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> en conditions 1b\_C et 0,5b\_C (en considérant toute la durée de la fermentation). Ce *Streptococcus* sp. représentait 61 à 100 % des Streptococcaceae en condition 1b\_C, 18 à 91 % en condition 0,5b\_C et 5 à 43 % en condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C. En condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, la concentration cellulaire de *S. lutetiensis* a varié de moins de 100 à 1·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> et sa concentration cellulaire la plus élevée a été mesurée avant changement opératoire. Ces résultats suggèrent que la combinaison du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression a défavorisé la croissance de *S. lutetiensis*. En partie 4.2, nous avons déjà observé ce phénomène. Ainsi, le captage du CO<sub>2</sub> combiné à une réduction de pression a le même effet en batch et en continu, défavorisant la croissance de *S. lutetiensis*. Il est intéressant de remarquer que l'absence de *S. lutetiensis* a été maintenue après l'arrêt du captage de CO<sub>2</sub> et la régulation de la pression à 1 bar. L'effet du captage du CO<sub>2</sub> combiné à la basse pression sur la croissance de cette espèce semble donc persistant pendant 6 jours après l'arrêt de ces conditions.



**Famille**

- *Clostridiaceae*
- *Streptococcaceae*
- *Bifidobacteriaceae*
- *Enterococcaceae*
- *Lactobacillaceae*
- *Sporolactobacillaceae*
- *Ruminococcaceae*
- *Actinomycetaceae*
- *Lachnospiraceae*
- *Moraxellaceae*
- *Other*

**Figure 4-11 : Concentration relative à l'échelle de la famille en fonction du temps de fermentation, pour les différentes conditions de fermentation. Les traits rouges en pointillés indiquent les moments auxquels les changements de conditions expérimentales ont été effectués.**

Néanmoins, en comparaison avec les résultats observés en batch, la suppression de la croissance de *S. lutetiensis* en 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C n'a pas été associée à une augmentation de l'abondance en *Clostridiaceae* et de la production d'H<sub>2</sub>. En effet, la baisse de la croissance de *Streptococcaceae* a été cette fois-ci favorable à la croissance des *Bifidobacteriaceae*. Plus précisément, les concentrations en *Clostridiaceae* en condition 1b\_C étaient de 1,5·10<sup>9</sup> - 3,5·10<sup>9</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à 4 – 6 jours et, en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, de 7,5·10<sup>8</sup> - 8,2·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup> à 5-6 jours, respectivement. Après 4 jours de fermentation, il y avait donc en moyenne trois fois moins de *Clostridiaceae* en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C qu'en condition 1b\_C. Le « remplacement » de *S. lutetiensis* par des *Bifidobacteriaceae* a donc pu être délétère pour la production d'H<sub>2</sub>, qui s'élevait entre 4 et 6 jours entre 1,0 et 2,0 L·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> en condition 1b\_C et à environ 1,0 L·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C. Plusieurs phénomènes pourraient expliquer une interaction plus négative pour la production d'H<sub>2</sub> entre *Clostridiaceae* et *Bifidobacteriaceae* qu'entre *Clostridiaceae* et *Streptococcaceae*.

- A concentration relative élevée en *Bifidobacteriaceae*, une concentration en acétate de 44 mM a été relevée. Cette concentration en acétate n'a certes pas dépassé le seuil inhibiteur de 50 mM précédemment décrit, mais le cumul des concentrations en acides organiques atteignant ~70 mM, un effet inhibiteur sur la croissance des *Clostridiaceae* dû au mélange d'acides ne peut pas être exclu.
- Les *Bifidobacteriaceae* et les *Streptococcaceae* sont deux familles dont les membres sont sécrétors de bactériocines, molécules pouvant inhiber la croissance de *Clostridiaceae* (Martinez et al., 2013; Sabino et al., 2019). Potentiellement, les *Bifidobacteriaceae* ont pu exercer une activité inhibitrice plus forte que les *Streptococcaceae*.
- Enfin, la croissance des *Bifidobacteriaceae* a été associée à une accumulation d'acétate au détriment du lactate. Puisque le lactate est un substrat intéressant pour la production d'H<sub>2</sub> et que l'acétate est uniquement un co-substrat, la croissance des *Bifidobacteriaceae* a pu limiter la production d'H<sub>2</sub> à partir de lactate.

Ainsi, le captage du CO<sub>2</sub> et la baisse de pression combinés ont semblé agir comme une pression de sélection, défavorisant la croissance d'un microorganisme compétiteur non producteur d'H<sub>2</sub> de la famille des *Streptococcaceae*, mais a laissé émerger d'autres compétiteurs, des *Bifidobacteriaceae*. L'activité de ces derniers a pu être plus antagoniste que les *Streptococaceae* envers les *Clostridiaceae*, expliquant l'absence d'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> en comparaison avec les résultats observés en batch, et la production d'H<sub>2</sub> plus faible en 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C qu'en 1b\_C avant 6 jours.

Le carbone inorganique (CO<sub>2</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) stimule ou inhibe la croissance de divers microorganismes (Belletti et al., 2009). En effet, d'une part, il est une source de carbone pour les autotrophes, un accepteur d'électrons pour les méthanogènes, ou encore, un substrat



pour quasiment tous les organismes afin assurer des réactions de carboxylation (comme la formation d'oxaloacétate à partir du pyruvate), la synthèse d'acides aminés ou de bases azotées (Belletti et al., 2009). D'autre part, à des concentrations trop élevées, le CO<sub>2</sub> peut inhiber la croissance microbienne, et cette inhibition dépend du microorganisme et des conditions de culture (Belletti et al., 2009). Cette inhibition est notamment due à l'altération des propriétés membranaires, potentiellement du pH intracellulaire, et à l'interférence avec les réactions de carboxylations (Belletti et al., 2009).

Le CO<sub>2</sub> favorise notamment la croissance et l'activité des bactéries lactique. Par exemple, Repaske et al. (1974) ont observé que la croissance de *Streptococcus sanguis* était favorisée par l'ajout de CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête d'un réacteur de fermentation (à 1 bar). Sans ajout de CO<sub>2</sub>, la croissance était quasiment nulle, tandis que l'ajout de 0,15 % de CO<sub>2</sub> a été associé à un temps de doublement de population de 110 min, et l'ajout de 2,4 % de CO<sub>2</sub> était associé à un temps de génération de 43 minutes. De la même manière, l'ajout de 10 % de CO<sub>2</sub> lors d'une culture de *Streptococcus thermophilus* a augmenté la densité optique du milieu fermentaire d'un facteur ~2,3. Dans une autre étude, l'enrichissement de l'atmosphère de culture de *S. thermophilus* de 0 à 18 % CO<sub>2</sub> a augmenté la production de biomasse d'un facteur 3,6 (Arioli et al., 2009). La restriction drastique de la concentration cellulaire de *S. lutetiensis* dans notre étude en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub> en batch et en continu est donc tout à fait cohérente avec ces résultats.

Au cours de notre étude et avant changement opératoire, la pCO<sub>2</sub> était de (i) 380 ± 90 mbar en condition 1b\_C, (ii) 210 ± 60 mbar en condition 0,5b\_C, (iii) 17 ± 8 mbar en condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et (iv) 19 ± 8 mbar en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C. La pCO<sub>2</sub> était donc similaire en conditions 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, alors que la réduction de la concentration cellulaire de *S. lutetiensis* a été observée uniquement en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C (tout comme en batch). Toujours avant changement opératoire, la pH<sub>2</sub> a toutefois été deux fois plus élevée en condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C qu'en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, avec 879 ± 73 mbars et 436 ± 29 mbars respectivement. Deux hypothèses peuvent justifier la restriction de la croissance de *S. lutetiensis* en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C et non pas en condition 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C. Soit (i) la diminution de la pH<sub>2</sub> et de la pCO<sub>2</sub> ont été défavorables à la croissance de *S. lutetiensis*, ce qui suggèrerait qu'il puisse avoir une activité homoacétogène ; soit (ii) une interaction ou un effet cumulatif existe entre la diminution de pression et le captage du CO<sub>2</sub>. Nous avons précédemment discuté l'activité homoacétogène de *Streptococcus sp.* observée dans la littérature (Godwin et al., 2014; Leclerc et al., 1998; Singh et al., 2019) et conclu qu'une telle activité chez *S. lutetiensis* ne pouvait pas être exclue. Une synthèse bibliographique a recensé des effets de la pression sur la croissance des microorganismes (sans limitation des concentrations en gaz utiles pour la croissance) (Verseux, 2020). L'étude a montré que, globalement, peu de travaux ont étudié les effets substantiels d'une variation de pression entre 100 mbar et 1 bar sur la croissance des microorganismes. Toutefois, Schuerger and Nicholson (2006) ont mené une étude sur les effets de la pression, de la proportion en CO<sub>2</sub> dans le ciel gazeux et de

l'interaction des deux paramètres sur la croissance de *Bacillus sp.*. Ils ont montré que la germination de spores de *B. subtilis* n'était pas affectée par la diminution de pression de 1013 mbar à 100 mbars sous une atmosphère composée d'air, avec 249 colonies dénombrées dans les deux cas, mais diminuait de 91 à 0 colonies avec la même réduction de pression avec un ciel gazeux composé à 100 % de CO<sub>2</sub>. Autre exemple, la croissance d'une souche de *B. subtilis* diminuait de 22,5 % en diminuant la pression de 1013 mbar à 100 mbar sous atmosphère composée d'air (de 4 à 3,1, facteur sans unité), mais de 82 % avec un ciel gazeux composé à 100 % de CO<sub>2</sub> (de 0,55 à 0,1). Les auteurs ont conclu que des effets interactifs ou cumulatifs de la basse pression et de la concentration en CO<sub>2</sub> existent, et que ces derniers peuvent être complexes et spécifiques aux espèces (Schuerger and Nicholson, 2006). Ces résultats soutiennent ainsi l'hypothèse que la pression et la composition du ciel gazeux en CO<sub>2</sub> peuvent avoir des effets interactifs ou cumulatifs sur la croissance des microorganismes. En conclusion, il n'est pas possible de conclure quant à l'activité de *S. lutetiensis* dans les cultures suivies, ni quant au mécanisme expliquant la restriction de sa croissance spécifiquement en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C.

En conclusion, les productions similaires d'H<sub>2</sub> en fin de fermentation quelle que soit la condition opératoire initiale appliquée ont été associées à une abondance en *Clostridiaceae* similaire, à 36 ± 4 %. Les *Streptococcaceae* représentaient les bactéries lactiques les plus abondantes dans toutes les conditions, sauf en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C. Comme en batch, cette condition a été associée à la suppression de la croissance de *S. lutetiensis*. Toutefois, dans cette condition, la croissance de *S. lutetiensis* a été supplantée par celle de *Bifidobacteriaceae*. Il a semblé que les communautés microbiennes aient évolué suite au changement de conditions opératoires uniquement en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C, avec une diminution d'abondance des *Bifidobacteriaceae* en faveur d'une augmentation d'abondance de *Lactobacillaceae*.

#### 4.3.3.4. *Evaluation de l'activité homoacétogène en fonction des conditions opératoires*

L'analyse des communautés microbiennes a mis en évidence des différences de concentrations cellulaires absolues et relatives entre les différentes conditions. Les familles dont la concentration cellulaire a varié (*i.e.*, *Bifidobacteriaceae*, *Streptococcaceae* et *Lactobacillaceae* principalement) sont généralement associées, en fermentation sombre, à une production de lactate ou d'acétate. La variation de leur abondance peut donc avoir été associée à une variation de la quantité de substrat disponible pour la production d'H<sub>2</sub>. Toutefois, les concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub>, modifiées par les différentes conditions expérimentales appliquées, sont également suspectées de pouvoir influencer l'étendue de l'homoacétogénèse, et les *Streptococcaceae* peuvent notamment porter une telle activité.

L'étendue de l'activité homoacétogène a donc été évaluée en fonction des conditions expérimentales.

- Mesure de l'activité homoacétogène par évaluation de la consommation d'H<sub>2</sub> *ex situ*

L'activité homoacétogène des communautés microbiennes cultivées en continu sous différentes conditions expérimentales a été évaluée en *ex situ*, *i.e.*, à l'extérieur du fermenteur, dans des fioles de 60 mL (Voir protocole détaillé partie 2.6). Pour ce faire, 20 mL de milieu fermentaire ont été prélevés et placés dans des fioles purgées au N<sub>2</sub> puis fermées par un septum et une bague métallique. L'évolution de la qualité et de la pression du ciel gazeux des fioles a été suivie durant 24 h et dans deux conditions : (i) en présence d'un mélange H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> d'une part (50/50, 0,5 bar ajouté, soit 414 ± 44 μmol d'H<sub>2</sub> et 348 ± 54 μmol de CO<sub>2</sub> ; pH<sub>2</sub> = 0.24 ± 0.03 bar et pCO<sub>2</sub> = 0.29 ± 0.02 bar) et (ii) uniquement en présence de N<sub>2</sub> d'autre part. Ces tests ont été effectués à deux reprises pour les quatre conditions de fermentation : entre 3 et 6 jours (période « 1 »), *i.e.*, avant changement de condition opératoire et entre 9 et 12 jours (période « 2 »), *i.e.*, après changement de condition opératoire. Dans toute cette partie, la production d'H<sub>2</sub> dans fermenteurs en mode continu a été qualifiée d'*in situ* et la consommation d'H<sub>2</sub> dans les fioles de test d'activité homoacétogène est qualifiée d'*ex situ*.

La Figure 4-12 présente les vitesses volumiques de consommation d'H<sub>2</sub> moyennes (LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>) mesurées pendant 24 h avec un ajout initial d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> (« H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> », barres orange), sans ajout (« N<sub>2</sub> », barres grises), en fonction du réacteur de fermentation (1b\_C, 0,5b\_C, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C) et de la période de fermentation : entre 3 et 6 jours (« \_1 ») et entre 9 et 12 jours (« \_2 »). Un problème technique a rendu inexploitable le test d'activité homoacétogène de la condition 1b\_C au cours de la période 2, ce dernier n'est donc pas présenté.

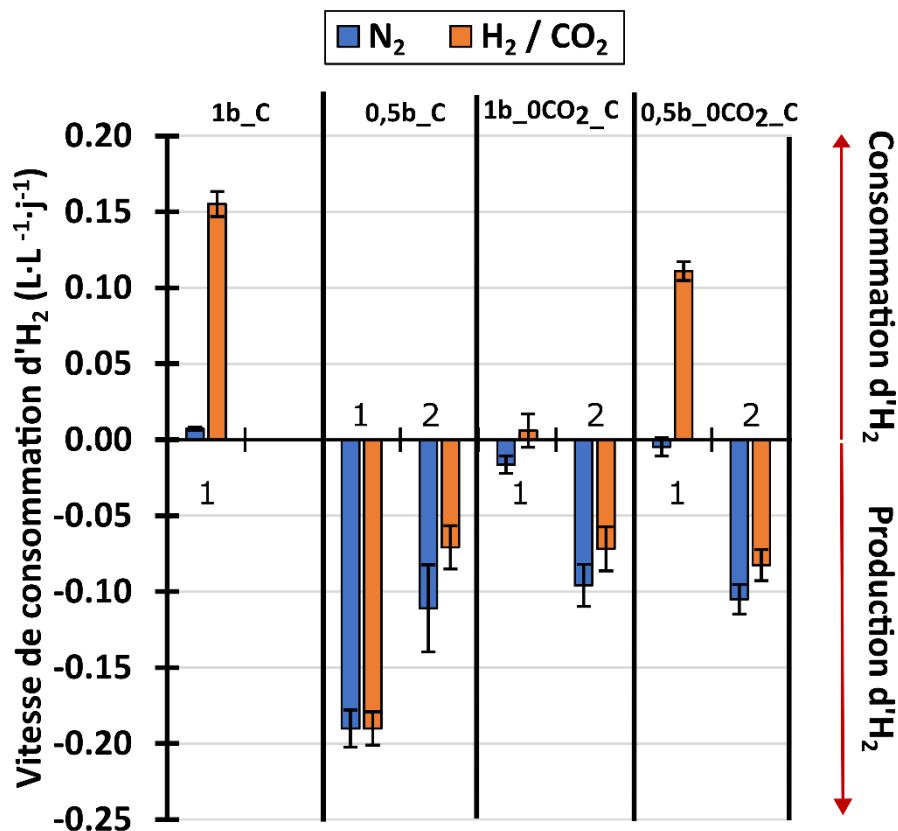
Une consommation de l'H<sub>2</sub> ajouté dans les fioles a été mesurée seulement dans les cas 1b\_C\_1, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1 avec des vitesses de consommation de 0,16 ± 0,01, 0,01 ± 0,01 et 0,11 ± 0,01 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> respectivement. Dans les autres conditions, une production d'H<sub>2</sub> a été mesurée. Ainsi, en conditions 0,5b\_C\_2, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2, la production d'H<sub>2</sub> *ex situ* a été similaire dans les fioles avec ajout d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> avec un vitesse de production de 0,08 ± 0,01 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. D'autre part, pour ces mêmes conditions, la production d'H<sub>2</sub> *ex situ* sans ajout d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> dans les fioles a également été similaire, à 0,10 ± 0,01 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. En comparaison, la production d'H<sub>2</sub> tend à avoir été plus élevée en condition 0,5b\_C\_1, avec 0,19 ± 0,01 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> avec et sans ajout d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> dans les fioles. En comparant les vitesses de production / consommation d'H<sub>2</sub> avec et sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pour chaque condition, il apparaît donc qu'à part en condition 0,5b\_C\_1, l'ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> a été

associé à une diminution de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> ou une augmentation de la vitesse de consommation d'H<sub>2</sub>. Ainsi, l'ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> favoriserait l'activité homoacétogène et/ou inhibe la production d'H<sub>2</sub> dans tous les cas à l'exception de 0,5b\_C\_1. Les pH relevés en fin de test d'activité homoacétogène étaient de  $5.7 \pm 0.3$  et  $5.8 \pm 0.3$  avec et sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, respectivement. Une influence de l'ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sur le pH et sur l'activité microbienne est donc écartée. Ces valeurs de pH supérieures à la valeur de régulation dans le réacteur (5,5) peuvent s'expliquer par une consommation de lactate dont le pKa (3.86) est inférieur à celui de ses produits de dégradation (acétate pKa = 4.76, butyrate pKa = 4.82). L'évolution des concentrations en métabolites est présentée par la suite.

La vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> *ex situ* peut être comparée avec la vitesse de production d'H<sub>2</sub> mesurée *in situ*. La vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> la plus élevée a été mesurée dans la condition 1b\_C\_1 (Figure 4-12, 1b\_C\_1), avec  $0,16 \pm 0,01$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. La condition 1b\_C\_1 est aussi celle avec le débit de production d'H<sub>2</sub> *in situ* le plus élevé mesuré au moment du prélèvement pour test d'activité homoacétogène, avec  $2,1 \pm 0,8$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. La seconde vitesse de consommation la plus élevée, mesurée en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1, s'élevait à  $0,11 \pm 0,01$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> et le débit de production d'H<sub>2</sub> *in situ* était alors bien plus faible, avec  $1,0 \pm 0,3$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Il ne semble donc pas y avoir de corrélation entre la vitesse de consommation mesurée *ex situ* et la vitesse de production *in situ*.

Afin d'estimer les pertes d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse lors de la fermentation en mode continu, le rapport de la vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> mesuré *ex situ* et de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> *in situ* peut être calculé (J. T. Kraemer and Bagley, 2008). Ainsi, la consommation d'H<sub>2</sub> mesurée *ex situ* s'élève à 8 % de la production d'H<sub>2</sub> *in situ* en condition 1b\_C\_1 et à 11 % de la production d'H<sub>2</sub> *in situ* en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1. A titre de comparaison, en mettant en place un test de mesure d'activité homoacétogène *ex situ* en prélevant le milieu fermentaire d'un réacteur opéré en continu (25 °C, 10 h TSH, pH 5,5, glucose 10 g·L<sup>-1</sup>), Kraemer and Bagley (2008) ont mesuré des vitesses de consommation d'H<sub>2</sub> *ex situ* représentant 2 à 11 % de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> *in situ*. Dans une autre étude, des fermentations semi continues ont été conduites en fiole (pH 5,0, 37°C, HRT = 36 h, substrat : glucose) à différentes charges (0,28 ; 0,56 et 0,83 g·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>), différentes pressions (1,0 ; 0,8 ; 0,6 ; 0,4 et 0,2 bar) et l'H<sub>2</sub> présumé consommé par homoacétogénèse a été estimé par méthode calculatoire (basée sur les concentrations en métabolites) (Huang et al., 2021). La proportion d'H<sub>2</sub> consommé par rapport à l'H<sub>2</sub> produit au total (production mesurée + consommation calculée) a varié de 15 à 90 % (Huang et al., 2021). Les auteurs ont observé que la baisse de pression dans les fermenteurs ainsi que la baisse de charge permettaient de diminuer la proportion d'H<sub>2</sub> consommée. Potentiellement, à plus faible charge, les concentrations en gaz dans la phase liquide étaient réduites. La consommation d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse semble donc très variable en fonction des conditions expérimentales.

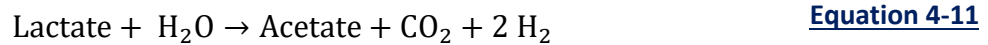
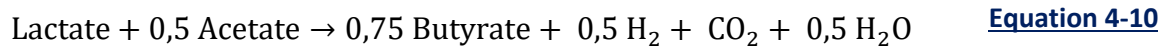
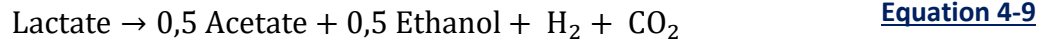
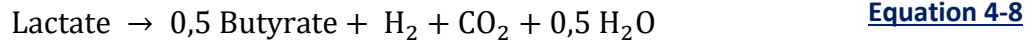
La variabilité de la production et de consommation d'H<sub>2</sub> mesurées *ex situ* dans la présente étude pourrait être liée à une variabilité de l'activité homoacétogène, certes, mais également à une variabilité dans la disponibilité en substrat résiduel ou en métabolites fermentescibles en H<sub>2</sub> dans le milieu fermentaire prélevé (lactate, acétate). Les concentrations en métabolites au début et en fin de chaque test d'activité homoacétogène ont donc été mesurées et sont présentées en Figure 4-13. Les concentrations en métabolites principaux (lactate, acétate, butyrate, formate, propionate, éthanol, H<sub>2</sub>) sont présentées, (i) au début du test *ex situ* sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (« T0 », barres grises), (ii) au début du test *ex situ* avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (« T0 + H<sub>2</sub> », barres jaunes) ; (iii) à la fin du test *ex situ*, sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (« T », barres bleues) et (iv) à la fin du test *ex situ* en condition d'ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (« + », barres orange) pour chaque test effectué (1b\_C\_1 ; 0,5b\_C\_1 ; 0,5b\_C\_2 ; 1b\_0CO<sub>2</sub>\_1 ; 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2 ; 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2).



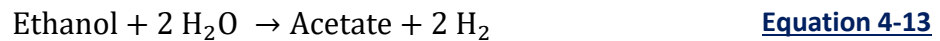
**Figure 4-12 : Vitesses de consommation d'H<sub>2</sub> mesurée *ex-situ* en fonction des conditions expérimentales (1b C, 0,5b C, 1b 0CO<sub>2</sub> C, 0,5b 0CO<sub>2</sub> C) et du moment de prélèvement du milieu fermentaire (1 : avant 6 jours ; 2 : après 6 jours) en présence d'un ciel gazeux composé à 100 % de N<sub>2</sub> (N<sub>2</sub>) ou enrichi en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>)**

Plusieurs substrats fermentescibles en H<sub>2</sub> ont été quantifiés en début de test *ex situ*. Une concentration en lactate initiale supérieure à 5 mM a été relevée dans la majorité des conditions : 0,5b\_C\_1, 0,5b\_C\_2, 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1, 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2. Jusqu'à 37 mM de lactate ont été initialement mesurés en début de test, en condition 0,5b\_C\_1.

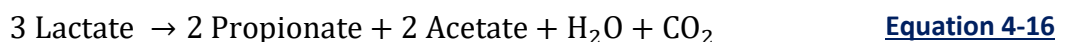
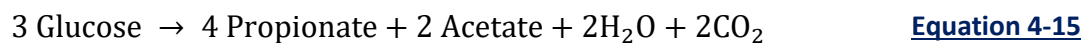
Systématiquement, ce lactate a été entièrement consommé au cours du test *ex situ*. De nombreuses voies de consommation du lactate ont été observées en fermentation sombre (García-Depraect et al., 2021a) (Equation 4-8, Equation 4-9, Equation 4-10, Equation 4-11), et peuvent avoir été associée à une production d'H<sub>2</sub>.



Par ailleurs, du formiate et de l'éthanol ont également été utilisés comme substrat, notamment en conditions 0,5b\_C\_1 et 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1, avec jusqu'à 11 mM et 21 mM consommés, respectivement. Le formiate peut être un substrat pour la production d'H<sub>2</sub> *via* l'Equation 4-12. L'éthanol peut aussi être un substrat pour la production d'acétate et d'H<sub>2</sub> (Equation 4-13) (Park et al., 2005) ou encore pour la production de butyrate par élongation de chaîne (Equation 4-14).



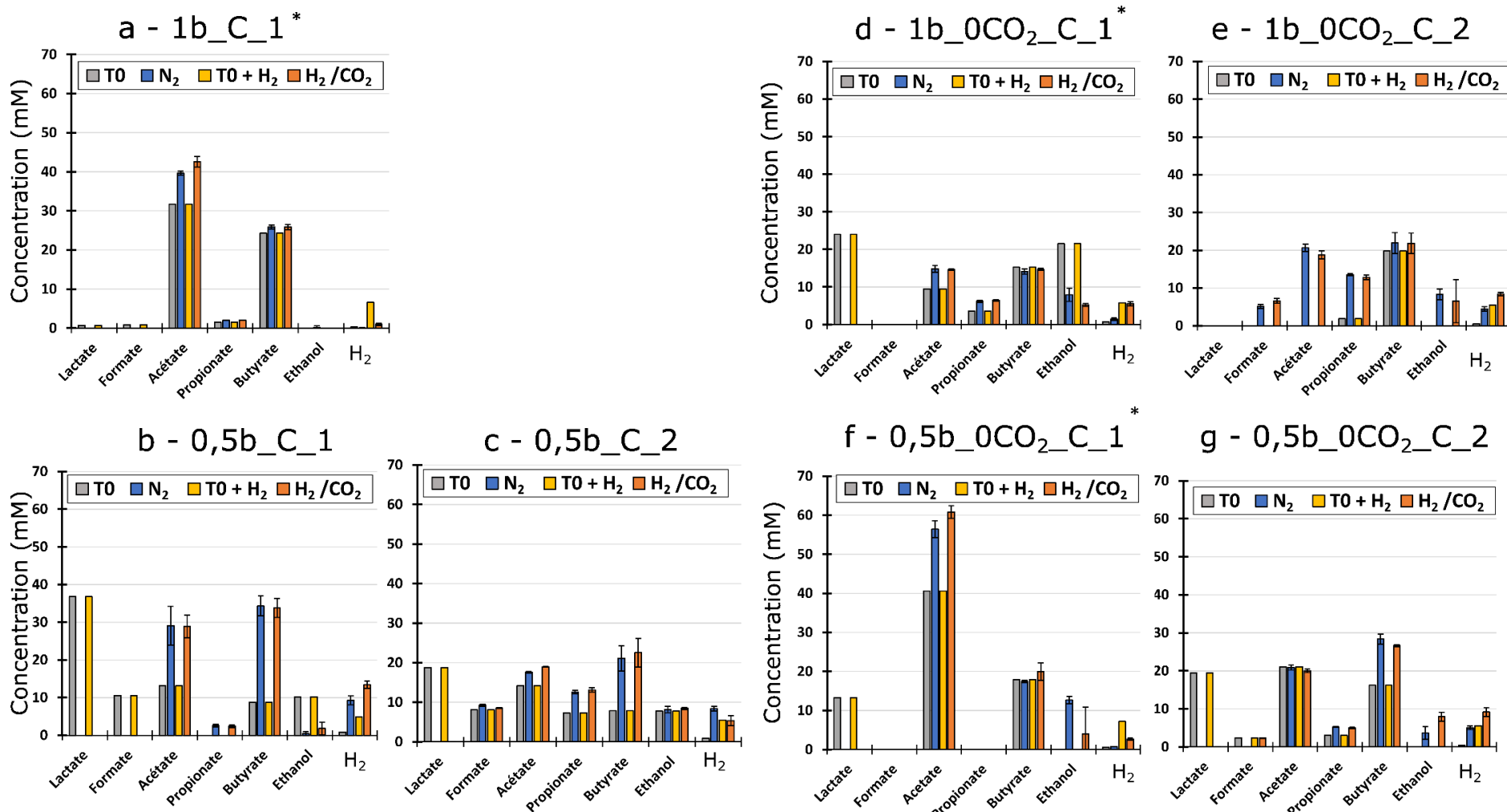
En fin de test *ex situ*, les concentrations en acétate ont systématiquement augmenté, passant au maximum de 41 à 61 mM en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1, lors d'ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, à l'exception de la condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C pour laquelle la concentration en acétate est restée stable à 21 mM. Les concentrations en butyrate ont également augmenté ou sont restées stables, passant au maximum de 9 à 34 mM en condition 0,5b\_C\_1. Enfin, du propionate a été produit dans toutes les conditions, de 2 à 5 mM, à l'exception de la condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1. Sa production peut être notamment issue de la dégradation du glucose ou du lactate (Equation 4-15, Equation 4-16) (Hillion et al., 2018).



Au maximum, si l'entièreté des 5,9 ± 0,6 mM d'H<sub>2</sub> ajoutés avaient été consommés par homoacétogénèse, une production de 1,5 mM d'acétate aurait été attendue. Or, la production d'acétate a fortement varié, de 0 à 20 mM avec une moyenne de 9 ± 8 mM. Considérant cette augmentation de la concentration en acétate ainsi que toutes les voies métaboliques

potentiellement empruntées et précédemment décrites, l'évolution de la concentration en acétate au cours des tests *ex situ* ne résulte clairement pas uniquement d'une activité homoacétogène. L'utilisation de la concentration en acétate pour quantifier la consommation d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse paraît donc inadaptée.

De plus, l'activité métabolique dans les fioles de test d'activité homoacétogène pourrait avoir résulté d'une dégradation du substrat résiduel non métabolisée (la soupe de déconditionnement). Pour évaluer cette activité, la Figure 4-14 présente la DCO métabolisée quantifiée en début et en fin de test *ex situ*. Toute DCO quantifiée supplémentaire en fin de test *ex situ* par rapport au début de test provient d'une dégradation du substrat résiduel au cours des tests. La DCO initiale quantifiée (*i.e.* sous forme d'acides et d'alcools) sans compter l'H<sub>2</sub> ajouté était de  $6,1 \pm 1,6 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  (entre 3,4 et 7,9  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ ). La quantité de DCO quantifiée a systématiquement augmenté au cours du test *ex situ*, au minimum de 0,4  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  (0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2) et au maximum de 3,0  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  (1b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_2). Cette DCO supplémentaire constitue une augmentation de 5 à 87 % de la DCO initiale. En conditions 1b\_0CO<sub>2</sub>\_C, l'évolution de la DCO au cours du test *ex situ* est atypique : elle diminue de 6,9 à 4,6  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  en période 1 et augmente de 3,4 à 6,5  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  en période 2. Potentiellement, un métabolite n'a pas été identifié au cours de cette fermentation, ce qui serait cohérent avec le faible taux de conversion du substrat dans le fermenteur précédemment discuté (19 %). Au final, la consommation de tout l'H<sub>2</sub> ajouté (0,09  $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) par homoacétogénèse représenterait seulement 3 % à 23 % de la DCO supplémentaire mesurée.

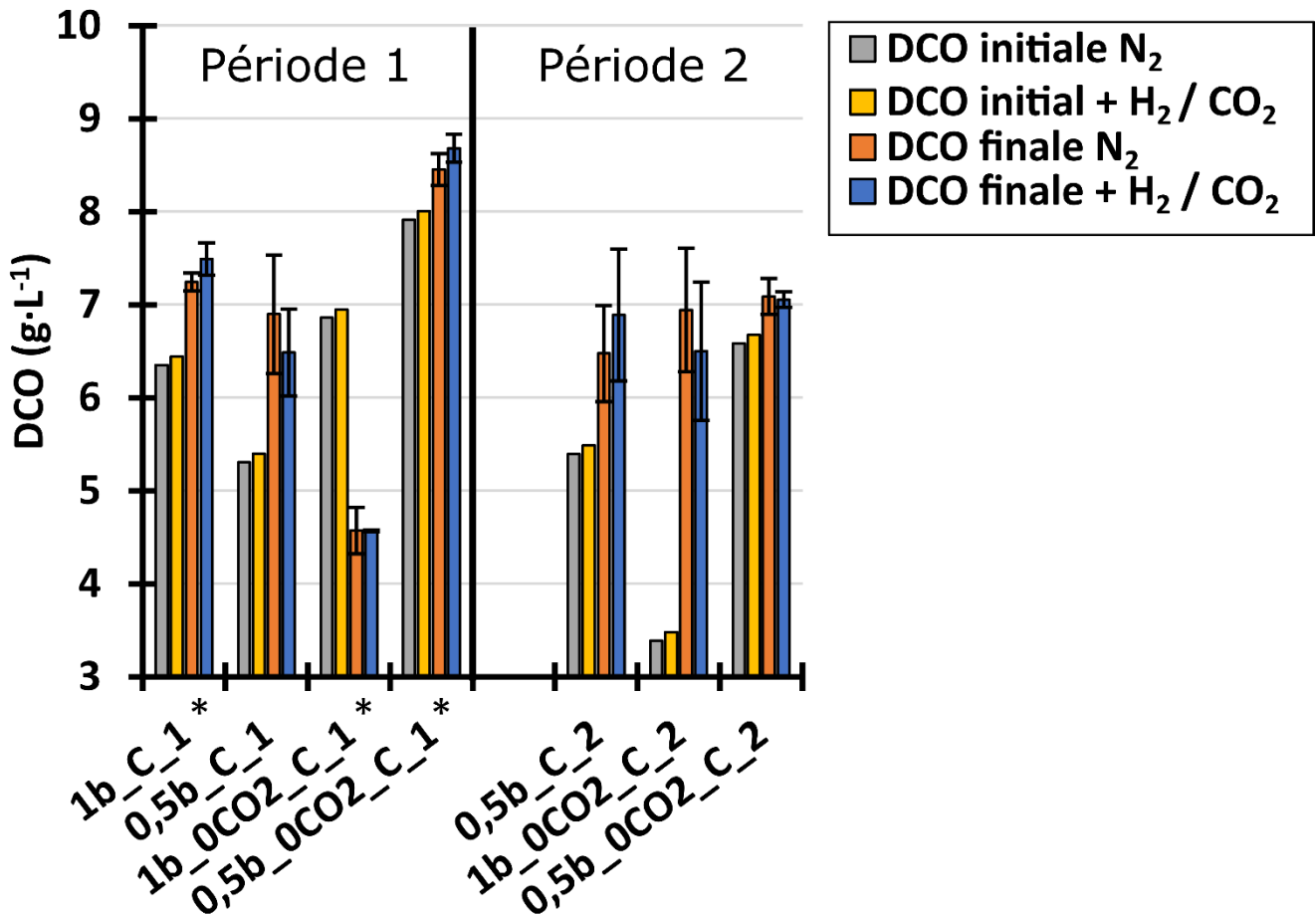


**Figure 4-13 : Concentrations en métabolites au début et à la fin des tests d'activité homoacétogène *ex situ*. 1b C 1 (a) ; 0,5b C 1 (b) ; 0,5b C 2 (c) ; 1b 0CO<sub>2</sub> C 1 (d) ; 1b 0CO<sub>2</sub> C 2 (e) ; 0,5b 0CO<sub>2</sub> C 1 (f) ; 0,5b 0CO<sub>2</sub> C 2 (g). T0: concentrations initiales sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. T0 + H<sub>2</sub> : concentrations initiales avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. N<sub>2</sub> : concentrations finales sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> : concentrations finales avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Les astérisques désignent les tests au cours desquels une consommation d'H<sub>2</sub> a été mesurée.**



En conclusion, à cause (i) de la multitude d'activités métaboliques impliquant l'H<sub>2</sub> et/ou l'acétate, et (ii) de la dégradation du substrat non métabolisé résiduel, le test de mesure de l'activité homoacétogène *ex situ* réalisé ne permet pas de mesurer celle-ci de manière fiable. Il est toutefois assez remarquable d'observer qu'une consommation d'H<sub>2</sub> ait été mesurée en conditions 1b\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1 alors qu'en cumulant la consommation de lactate et la dégradation du substrat résiduel non métabolisé, 0,9-1,0 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup> et 1,8-2,0 g<sub>DCO</sub>·L<sup>-1</sup> ont été respectivement dégradés au cours de ces tests d'activité *ex situ*. Cette dégradation de DCO pouvant être associée à une production d'H<sub>2</sub>, l'activité homoacétogène a probablement été sous-estimée. La vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> mesurée est alors la résultante de la différence entre la production d'H<sub>2</sub> et sa consommation. Nous pouvons néanmoins estimer la vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> réelle *ex situ* en conditions 1b\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1. La production d'H<sub>2</sub> représente généralement, de façon variable en fonction des voies métaboliques empruntées, 3 à 10 % de la DCO métabolisée sous forme d'acides et d'alcools. Ainsi, potentiellement, les consommations de DCO (hors H<sub>2</sub>) en conditions 1b\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1 ont pu être associées aux productions respectives de 0,05 à 0,19 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (valeur minimale et maximale) et de 0,08 à 0,30 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Pour rappel, en conditions 1b\_C\_1 et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1, les vitesses de consommation d'H<sub>2</sub> ont été mesurées à hauteur de 0,16 ± 0,01 et 0,11 ± 0,01 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. En conséquence, en condition 1b\_C\_1, la vitesse de consommation réelle d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse peut être estimée, par somme de la vitesse de consommation mesurée et de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> estimée, entre 0,21 et 0,35 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>, soit entre 10 et 17 % de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> *in situ* (2,1 ± 0,8 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>). En condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C\_1, la vitesse de consommation réelle d'H<sub>2</sub> est estimable entre 0,19 et 0,41 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>, représentant alors entre 19 et 41 % de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> *in situ* (1,0 ± 0,3 LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>).

En conclusion, malgré la multiplicité des métabolismes ayant pris place au cours des tests d'activité homoacétogène *ex situ*, une consommation d'H<sub>2</sub> a pu être estimée, représentant entre 10 et 41 % de la production d'H<sub>2</sub> *in situ*. Cette activité homoacétogène substantielle a été mesurée en période 1, en conditions 1b\_C et 0,5b\_0\_CO<sub>2</sub>. Les mesures effectuées ne suggèrent pas que l'activité homoacétogène puisse avoir diminué *via* le captage du CO<sub>2</sub> et/ou la diminution de pression *in situ*.



**Figure 4-14 : Concentrations en DCO sous la forme d'acides, d'alcools et d'H<sub>2</sub> au début des tests *ex situ* : en comptabilisant (DCO initiale + H<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>) ou non l'H<sub>2</sub> (DCO initiale N<sub>2</sub>); et en fin des tests *ex situ* : avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (DCO finale + H<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>) et sans ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (DCO finale N<sub>2</sub>). Les astérisques indiquent les tests auxquels ont été associés à une apparente consommation d'H<sub>2</sub>. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des concentrations mesurés dans les trois répliques.**

De multiples paramètres peuvent affecter l'homoacétogénèse. Par exemple, l'augmentation de la concentration en glucose défavorise le métabolisme de réduction du CO<sub>2</sub> chez *Moorella thermoacetica* (Park et al., 2019). Certains auteurs estiment que le métabolisme hétérotrophe (dégradation de sucres / acides) des bactéries porteuses d'activité homoacétogène prédomine dans les réacteurs de fermentation sombre, de par la disponibilité en substrat organique. Ainsi, Ryan et al. (2006) ont dénombré 10<sup>5</sup> à 10<sup>8</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> d'acétogènes dans différentes boues en provenance de digesteurs anaérobies, mais en cultivant ces boues à partir d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, un temps de latence de 60 à 100 h a précédé la consommation de gaz. Les auteurs ont suggéré que les homoacétogènes dans les boues se sont maintenues dans les digesteurs par croissance hétérotrophe et que leur culture dans des milieux contenant de l'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> a nécessité une longue période de transition du métabolisme hétérotrophe au métabolisme autotrophe. En comparaison, lorsque nous avons mesuré une

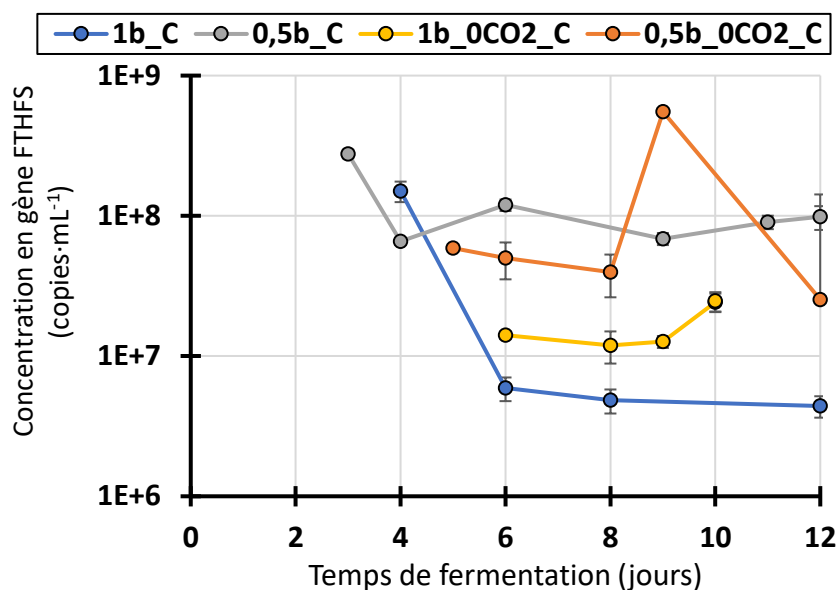
consommation d'H<sub>2</sub> *ex situ*, la latence avant consommation était comprise entre < 5 h et < 20 h, suggérant que le métabolisme autotrophe des homoacétogènes était fonctionnel dans nos milieux fermentaires.

La vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse dépend également de la concentration en CO<sub>2</sub> (J. T. Kraemer and Bagley, 2008). Des vitesses de consommation d'H<sub>2</sub> ont ainsi varié de 0,20 mM·h<sup>-1</sup> à 0,34 mM·h<sup>-1</sup> en variant la concentration en CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête de 3 à 7 mM (J. T. Kraemer and Bagley, 2008). Dans notre étude, les concentrations en CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête des fioles au début des tests d'activité ont varié en fonction des conditions expérimentales. Sans captage de CO<sub>2</sub> *in situ*, elles étaient en *ex situ* de 10 ± 2 mM avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dans les fioles et de 4 ± 2 mM sans ajout. Lors du captage de CO<sub>2</sub> *in situ*, elles étaient en *ex situ* de 10 ± 1 mM avec ajout d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dans les fioles et de 1,0 ± 0,5 mM sans ajout. En comparaison, *in situ*, les concentrations en CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête des fermenteurs étaient, avant six jours, de 15 ± 4 mM (1b\_C), 8 ± 2 mM (0,5b\_C) et 0,7 ± 0,3 mM (1b\_0CO<sub>2</sub> et 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C confondus). Ces variations ont donc potentiellement influencé l'activité homoacétogène, *in situ* et *ex situ*.

- Mesure de l'activité homoacétogène *in situ* par méthode génétique

La quantification de l'activité homoacétogène par mesure *ex situ* n'ayant pas été concluante, une estimation de cette activité à partir du séquençage des communautés bactériennes *in situ* a été réalisé. Premièrement, la concentration en gène FTHFS, indicateur de la capacité acétogène des microorganismes porteurs, a été mesurée par PCRq en fonction du temps de fermentation, pour les différentes conditions étudiées (Figure 4-15).

Les concentrations en gène FTHFS ont varié de 4,4·10<sup>6</sup> à 5,6·10<sup>8</sup> copies·mL<sup>-1</sup> en fonction des conditions. Ces concentrations ne tendent pas à avoir évolué de la même manière avec le temps de fermentation pour les différentes conditions expérimentales, et la diminution de pression et / ou le captage de CO<sub>2</sub> n'ont pas été associés à une évolution particulière des concentrations en gène FTHFS. Notamment, malgré la production d'H<sub>2</sub> similaire en fin de fermentation, *i.e.*, entre 10 et 12 jours, les concentrations en gène FTHFS ont été distinctes entre les conditions, avec 4,4·10<sup>6</sup> ± 6,7·10<sup>6</sup> copies·mL<sup>-1</sup> en condition 1b\_C et jusqu'à 9,8·10<sup>7</sup> ± 1,9·10<sup>7</sup> copies·mL<sup>-1</sup> en condition 0,5b\_C. Aucune différence significative de concentrations en gène FTHFS entre les différentes conditions expérimentales n'a été relevée (ANOVA, p-value = 0,3). Cette analyse ne permet donc pas de conclure quant à une différence éventuelle d'activité homoacétogène entre les conditions évaluées.



**Figure 4-15 : Evolution de la concentration en gène FTHFS dans le milieu de culture en fonction du temps de fermentation, pour les différentes conditions. Les barres d'erreurs correspondent à des écarts-types calculés à partir de l'écart-type des PCRq.**

Le gène FTHFS a souvent été utilisé comme marqueur d'activité homoacétogène dans la littérature (Matsui et al., 2019; Ottesen, 2009; Singh et al., 2020; Xu et al., 2009). Toutefois, la démarche est complexe puisque certains microorganismes possèdent un gène FTHFS sans être homoacétogènes (Xu et al., 2009). Le développement des amorces amplifiant le gène FTHFS vise alors à cibler spécifiquement les gènes FTHFS des homoacétogènes, avec plus ou moins de succès (Singh et al., 2020; Xu et al., 2009, cette thèse : partie 4.2.5.4).

Par ailleurs, le séquençage 16S peut être utilisé pour évaluer l'abondance de microorganismes à activité homoacétogène potentielle. Une liste de genres comportant des espèces à activité homoacétogène a donc été constituée d'après deux synthèses bibliographiques sur l'acétogénèse (Drake et al., 2008; Saady, 2013). Cette liste est présentée en Tableau 4-4.

Les genres comportant des espèces homoacétogènes identifiés ont ensuite été recherchés parmi les genres des OTUs identifiés au cours des fermentations de notre étude. Seuls 12 OTUs du genre *Clostridium* et 1 OTU du genre *Streptococcus* ont été retrouvés dans nos échantillons (Tableau 4-4). Ces OTUs ont ensuite été identifiés au rang de l'espèce. Parmi les 13 espèces, cinq ont été identifiées comme potentiellement homoacétogènes. Les autres sont des membres du genre *Clostridium* ne portant pas d'activité homoacétogène ou dont cette activité n'est pas documentée. Ces cinq espèces sont *C. drakei*, *C. luticellarii*, *C. ljundhalii*, *C.*

*thailandense* et *S. lutetiensis*. La concentration cellulaire de *S. lutetiensis* en fonction des conditions expérimentales a précédemment été discutée en parties 4.2.5.4 et 4.3.3.3. Son abondance ayant plutôt été associée à la concentration en lactate en partie 4.2.5.4, et un effet positif du CO<sub>2</sub> sur sa croissance hétérotrophe étant connu d'après la littérature, sa concentration cellulaire ne sera pas de nouveau discutée ici. Il n'est toutefois pas exclu que *S. lutetiensis* ait eu une activité homoacétogène au cours des présentes fermentations.

**Tableau 4-4 : Recensement des OTUs issus des expériences 1b C, 0,5b C, 1b 0CO<sub>2</sub> C et 0,5b 0CO<sub>2</sub> C appartenant aux genres identifiés comme comportant des espèces à activité homoacétogène.**

Famille associée	Genre comprenant des espèces à activité homoacétogène	Référence	Nombre d'OTUs dans la présente étude
<b><i>Peptostreptococcaceae</i></b>	<i>Peptostreptococcus</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
<b><i>Eubacteriaceae</i></b>	<i>Acetobacterium</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
	<i>Eubacterium</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
<b><i>Lachnospiraceae</i></b>	<i>Acetitomaaculum</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
	<i>Blautia</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
<b><i>Clostridiaceae</i></b>	<i>Clostridium</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	<b>12</b>
	<i>Caloramator</i>		
	<i>Tindallia</i>		
	<i>Natronincola</i>		
<b><i>Thermoanaerobacteriaceae</i></b>	<i>Moorella</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
	<i>Thermoanaerobacter</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
<b><i>Sporomusaceae</i></b>	<i>Sporomusa</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
<b><i>Lachnospiraceae</i></b>	<i>Syntrophococcus</i>	(Drake et al., 2008; Saady, 2013)	0
<b><i>Ruminococcaceae</i> / <i>Oscillospiraceae</i></b>	<i>Ruminococcus</i>	(Drake et al., 2008; Liu et al., 2015)	
<b><i>Streptococcaceae</i></b>	<i>Streptococcus</i>	(Bernalier et al., 1996; Leclerc et al., 1998)	<b>1</b>
<b><i>Holophagaceae</i></b>	<i>Holophaga</i>	(Drake et al., 2008)	0
	<i>Tindallia</i>	(Drake et al., 2008)	0
<b><i>Halobacteroidaceae</i></b>	<i>Natroniella</i>	(Drake et al., 2008)	0

Le Tableau 4-5 présente les concentrations cellulaires minimales et maximales des espèces identifiées comme potentiellement homoacétogènes appartenant au genre *Clostridium* pour chaque condition expérimentale. Les concentrations varient largement, d'une valeur inférieure au seuil de détection ( $\sim 100$  cellules·mL<sup>-1</sup>) à  $2 \cdot 10^8$  cellules·mL<sup>-1</sup>. Quelle que soit l'espèce considérée, aucune tendance en lien avec le temps de fermentation ou bien en lien avec le changement de conditions expérimentales n'est distinguable (données non présentées). Certaines espèces ont été identifiées dans une seule condition, comme *C. ljungdahlii* retrouvée uniquement en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C ou *C. thailandense* retrouvée uniquement en condition 0,5b\_C. A l'inverse, *C. drakei* a été identifiée dans toutes les conditions expérimentales et *C. luticellarii* dans toutes sauf en condition 0,5b\_0CO<sub>2</sub>\_C.

**Tableau 4-5 : Concentrations cellulaires des espèces du genre *Clostridium* identifiées comme potentiellement homoacétogènes en fonction des conditions expérimentales**

Genre	Espèce	Score d'identité (%)	Concentrations cellulaires minimales – maximales estimées			
			1b_C	0,5b_C	1b_0CO <sub>2</sub> _C	0,5b_0CO <sub>2</sub> _C
<i>Clostridium</i>	<i>drakei</i>	99.50	0* - $1 \cdot 10^8$	0* - $2 \cdot 10^8$	0* - $1 \cdot 10^7$	0* - $2 \cdot 10^7$
	<i>luticellarii</i>	100	$1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$	0* - $1 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$	0 - 0*
	<i>ljungdahlii</i>	98.75	0 - 0*	0 - 0*	0 - 0*	0* - $1 \cdot 10^7$
	<i>thailandense</i>	99.75	0 - 0*	0* - $4 \cdot 10^7$	0 - 0*	0 - 0*
Sommes minimales – maximales des concentrations cellulaires des espèces homoacétogènes dans les communautés microbiennes			$1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$	0 - $3 \cdot 10^7$
Concentrations cellulaires des espèces homoacétogène en pourcentage de la concentration cellulaire totale (% , minimal - maximal)			0,8 - 3,8	0,7 - 5,3	0,6 - 1,8	0 - 2,0

\* 0 signifie inférieur au seuil de détection de la concentration en copies 16S, qui est approximable à 100 cellules·mL<sup>-1</sup>.

Au total, la concentration cellulaire de ces OTUs a représenté entre 0 et 3,8 % de la concentration cellulaire totale. En comparaison, lors des fermentations réalisées en batch en partie 4.2, l'abondance d'une seule espèce potentiellement homoacétogène, *C. magnum* représentait entre 5 et 12 % de l'abondance totale. Ces résultats suggèrent que différents homoacétogènes ont pu entrer en croissance en fonction du mode opérationnel (batch / continu) et que l'homoacétogénèse a pu être plus élevée en batch qu'en continu.

Enfin, en supposant que les espèces présentées en Tableau 4-5 présentaient une activité homoacétogène au cours des fermentations réalisées, il est très difficile d'estimer une vitesse

de consommation d'H<sub>2</sub> à partir de la concentration cellulaire en bactéries homoacétogènes. Saady (2013) a relevé une vitesse spécifique de consommation d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse de 1,4 mg<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>cellule</sub><sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, soit 22,4 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>cellule</sub><sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> (conditions normales de température et pression). La masse d'une cellule peut fortement varier d'une espèce à une autre. Néanmoins, en considérant par exemple que la masse cellulaire de *C. luticellarii* est proche de celle de *Clostridium pasteurianum*, i.e. 7·10<sup>-13</sup> g<sub>masse sèche</sub>·cellule<sup>-1</sup> (Berthomieu, 2021), alors en s'accumulant à hauteur de 6·10<sup>6</sup> à 1·10<sup>8</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>, *C. luticellarii* pourrait être à l'origine d'une consommation d'H<sub>2</sub> à des vitesses de 0,09 à 1,57 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Cette consommation représente 10 à 174 % de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> atteinte en moyenne quelle que soit la condition expérimentale, après neuf jours de fermentation continue (0,9 ± 0,3 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>). Notons donc que, alors même que *C. luticellarii* représente au maximum 3 % de la concentration cellulaire bactérienne totale, il peut potentiellement être à l'origine d'une consommation d'H<sub>2</sub> substantielle.

#### 4.3.4. Conclusion

Dans cette partie, les effets de la modification de la pression totale et de la pression partielle en CO<sub>2</sub> sur la fermentation sombre ont été étudiés en mode continu. Le substrat utilisé était une soupe de déconditionnement, alimentée avec une charge de 30 g<sub>MV</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> et un temps de séjour de 12 h. Les expériences ont été réalisées avec régulation de la pression dans le fermenteur à 1 bar ou à 0,5 bar, avec ou sans captage du CO<sub>2</sub>. La persistance des effets éventuellement induits par la régulation à basse pression et/ou le captage du CO<sub>2</sub> a été évaluée en stoppant la régulation à basse pression et/ou le captage du CO<sub>2</sub> après environ six jours de fermentation. Les fermentations ont alors été suivies pendant six jours supplémentaires avec régulation de pression à 1 bar, sans captage de CO<sub>2</sub>.

Après neuf jours de fermentation, la production d'H<sub>2</sub> s'élevait en moyenne à 0,9 ± 0,3 L<sub>H<sub>2</sub></sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>, soit 30 ± 10 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> quelles que soient la régulation de pression et la gestion du CO<sub>2</sub> appliquées pendant les six premiers jours. De plus, quelles que soient les conditions appliquées, la production d'H<sub>2</sub> a diminué au cours des 12 jours de fermentation. Le retour à une condition standard de fermentation, i.e., une régulation de la pression à 1 bar sans captage du CO<sub>2</sub>, n'a pas été associé à un changement concomitant du débit de production d'H<sub>2</sub>. Cependant, des différences d'activité métabolique ont pu être observées. Notamment, le captage du CO<sub>2</sub> couplé à une diminution de pression a été associé à la concentration la plus élevée en acétate mesurée, jusqu'à 44 mM. Suite à l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et de la régulation à basse pression, la concentration en acétate a diminué et celle en lactate a alors augmenté, suggérant que le changement opéré affectait les activités métaboliques, hors production d'H<sub>2</sub>.

A l'échelle populationnelle, la communauté microbienne était dominée par des *Clostridiaceae* (entre 26 et 82 %) et des *Streptococcaceae* (entre 16 et 42 %) à (i) 1 bar, à (ii) 0,5 bar et (iii) lors du captage du CO<sub>2</sub> à 1 bar. En revanche, la croissance des *Streptococcaceae* a été restreinte à  $3 \pm 1$  % en condition de captage du CO<sub>2</sub> et de pression réduite. Plus précisément, aucune croissance de *S. lutetiensis* n'a été détecté en condition de captage du CO<sub>2</sub> et de pression réduite. Cette modification des communautés n'a néanmoins pas eu d'effet positif sur la production d'H<sub>2</sub>, l'abondance de *Streptococcaceae* n'ayant pas été supplantée par des *Clostridiaceae*, mais par des *Bifidobacteriaceae*, microorganismes non producteurs d'H<sub>2</sub>. Suite au changement opératoire à six jours, l'abondance des *Bifidobacteriaceae* a été réduite, et celle des *Lactobacillaceae* a augmenté. Ce changement populationnel était tout à fait cohérent avec l'augmentation de la concentration en acétate suivie par sa diminution après six jours et l'augmentation concomitante de la concentration en lactate. En effet, les *Bifidobacteriaceae* sont connus pour produire majoritairement de l'acétate, et les *Lactobacillaceae* majoritairement du lactate. De manière surprenante, *Streptococcaceae* n'a pas émergé suite au changement des paramètres opératoires, suggérant que la restriction de sa croissance était persistante. Il n'est donc potentiellement pas nécessaire de conserver un captage du CO<sub>2</sub> et une basse pression pendant toute la fermentation pour limiter la croissance de *Streptococcaceae*.

Enfin, au cours de mesures réalisées à l'extérieur du fermenteur, une activité homoacétogène a été détectée (i) à 1 bar ainsi qu'(ii) à pression réduite avec captage du CO<sub>2</sub>, à hauteur respectives de  $0,16 \pm 0,01$  et  $0,11 \pm 0,01$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>. Toutefois, cette consommation d'H<sub>2</sub> a probablement été sous-estimée à cause d'une production d'H<sub>2</sub> à partir de substrats résiduels concomitante. Nous estimons que les vitesses de consommation d'H<sub>2</sub> réelles ont pu s'élever entre  $0,19$  et  $0,41$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>, représentant entre 19 et 41 % de la vitesse de production d'H<sub>2</sub> mesurée dans les fermenteurs. Plusieurs espèces de *Clostridium sp.* porteuses d'activité homoacétogène ont été identifiées dans la communauté microbienne. Il s'agissait de *C. drakei*, *C. luticellarii*, *C. ljundhalii* et *C. thailandense*. Au maximum, la somme des concentrations relatives de ces espèces dans les fermenteurs constituait seulement 4 % de la concentration cellulaire totale. Toutefois, d'après la vitesse spécifique de consommation d'H<sub>2</sub> par les homoacétogènes (Saady, 2013), une consommation d'H<sub>2</sub> supérieure à  $0,09$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> a pu être associée à la croissance de ces homoacétogènes. Cette consommation d'H<sub>2</sub> constitue 10 % de la production d'H<sub>2</sub> moyenne relevée en fin de fermentations, toutes conditions confondues, et n'est donc pas négligeable.



#### 4.4. A retenir

La synthèse bibliographique suggérait que les modifications des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> pouvaient améliorer la production d'H<sub>2</sub> principalement par restriction d'activité homoacétogène ou par diminution de l'inhibition de l'activité des hydrogénases. Il apparaît finalement, dans nos conditions expérimentales, que ces modifications peuvent également impacter la communauté microbienne plus largement, en défavorisant la croissance de microorganismes exerçant une compétition pour le substrat, en batch, mais également en fermentation continue.

Plus précisément, en batch, une amélioration de 58 % de la production d'H<sub>2</sub> a été mesurée en diminuant la pression de fermentation de 1 bar à 0,5 bar et en captant simultanément le CO<sub>2</sub> produit. La production d'H<sub>2</sub> a ainsi augmenté de  $82 \pm 29$  à  $130 \pm 13$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>. Le captage de CO<sub>2</sub> seul et la diminution de pression seule n'ont pas permis d'augmenter significativement la production d'H<sub>2</sub>. En fermentation continue, l'application de ces différentes stratégies n'a pas permis d'améliorer la production d'H<sub>2</sub>. Quelle que soit la gestion des gaz appliquée, le débit de production d'H<sub>2</sub> a progressivement diminué au cours des 12 jours de fermentations, pour atteindre  $0.9 \pm 0.3$  LH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> à partir de 9 jours, soit  $30 \pm 10$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup>. Une production de  $88 \pm 10$  mL<sub>H<sub>2</sub></sub>·g<sub>MV ajoutée</sub><sup>-1</sup> a transitoirement été mesurée pendant les deux premiers jours de la fermentation conduite à 1 bar, soit l'équivalent de la production observée en batch, mais cette activité n'a pas été maintenue.

En mode batch, la fermentation a été associée à une production de trois acides organiques principaux : acétate, butyrate et lactate. L'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> a été associée à une augmentation du rendement en butyrate et à une diminution du rendement en lactate. En continu, une plus grande diversité de produits métabolites a été identifiée. L'acétate, le butyrate et le lactate restaient majoritaires, mais du formiate et de l'éthanol se sont également accumulés dans le milieu de culture, témoignant d'une plus grande diversité de voies métaboliques empruntées.

A l'échelle populationnelle, en batch et en continu, les fermentations conduites à (i) 1 bar, (ii) avec captage du CO<sub>2</sub> seul et (iii) avec pression réduite seule ont été associées à une domination de l'abondance de *Clostridiaceae* et de *Streptococcaceae*. Parmi les *Streptococcaceae*, une espèce prédominait en batch et en continu : *S. lutetiensis*. Le captage du CO<sub>2</sub> couplé à la diminution de pression a été associé à la restriction de l'abondance de *S. lutetiensis* à 2 % en batch, et sous le seuil de détection en continu. En batch, cette diminution d'abondance a été associée à une augmentation de l'abondance de *Clostridiaceae* productrices d'H<sub>2</sub>, alors qu'en continu, elle a été associée à une augmentation d'abondance de *Bifidobacteriaceae*, bactéries productrices d'acétate. Cette distinction justifie l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> en batch, et non en continu. Ainsi, la combinaison du captage du CO<sub>2</sub> et de la réduction de pression a agi comme une pression de sélection,

défavorisant sélectivement la croissance d'un microorganisme. Le succès de l'application de cette stratégie dépend visiblement de la communauté microbienne cultivée et des conditions opératoires.

Ce changement populationnel est cohérent avec des observations issues des cultures pures. En effet, d'une part, dans diverses études, la croissance de *Streptococcus* sp. a pu être favorisée en ajoutant du CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture. Il apparaît donc cohérent de voir sa croissance défavorisée lors du captage de CO<sub>2</sub> au cours des fermentations étudiées. Par ailleurs, il a également été observé, lors de cultures de *Bacillus* sp., que les modifications de la pression totale et de la concentration en CO<sub>2</sub> pouvaient interagir ou présenter des effets cumulatifs. En d'autres termes, baisser la pression affectait plus ou moins négativement la croissance bactérienne ou encore la germination des spores en fonction de la concentration en CO<sub>2</sub>. Un même effet cumulatif / interactif des stratégies de baisse de pression et de capture du CO<sub>2</sub> peut avoir pris place au cours de nos expériences de fermentation.

Par ailleurs, l'effet de l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et de la régulation à basse pression ont été évalués en réacteur continu. Cet arrêt a été concomitant avec des changements de produits métaboliques et de communauté microbienne. D'une part, la concentration en acétate, élevée pendant le captage du CO<sub>2</sub> et la régulation à basse pression en continu, a chuté, et la concentration en lactate a alors augmenté. Cette évolution a été associée à une chute de l'abondance en *Bifidobacteriaceae* et une augmentation de l'abondance en *Lactobacillaceae*. Ce phénomène est tout à fait cohérent avec l'activité majoritairement productrice d'acétate des *Bifidobacteriaceae*, et principalement productrice de lactate des *Lactobacillaceae*. L'abondance des *Streptococaceae* n'a pas réaugmenté après arrêt du captage de CO<sub>2</sub> et de la régulation à basse pression. Ainsi, contrairement aux conditions lors du démarrage de la fermentation, lors du changement de conditions opératoires, les *Streptococaceae* n'ont pas été favorisés. Le captage du CO<sub>2</sub> et la baisse de pression peuvent donc potentiellement être appliqués temporairement afin de sélectionner des populations microbiennes. En l'occurrence, les *Bifidobacteriaceae* tendent à avoir été plus antagonistes pour la production d'H<sub>2</sub> et la croissance des *Clostridiaceae* que les *Streptococaceae*. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cela : (i) la production d'acétate par les *Bifidobacteriaceae* a pu être associée à des inhibitions, ce dernier étant plus toxique sur le rendement en H<sub>2</sub> que le lactate ; (ii) cette production d'acétate a pu limiter la production de lactate, et donc la production d'H<sub>2</sub> à partir du lactate ; (iii) enfin, les deux familles comportent des membres sécréteurs de bactériocines, mais la toxicité de ces dernières ainsi que leur degré de sécrétion ont pu varier.

Puisque l'application des mêmes méthodes de modification des concentrations en gaz en batch et en continu, toutes choses égales par ailleurs, a résulté en deux résultats très distincts sur la production d'H<sub>2</sub>, la disparité des effets des différentes méthodes appliquées dans la littérature n'est pas surprenante. Il apparaît donc que les conditions opératoires mais également les communautés microbiennes sont deux paramètres essentiels à considérer lorsqu'une modification des concentrations en gaz souhaite être appliquée pour améliorer la

production d'H<sub>2</sub>. Puisque la flore indigène des substrats utilisés en culture mixte peut impacter significativement la fermentation sombre, un effet substrat intervient également probablement. Finalement, alors que la diminution des concentrations en gaz est généralement motivée par une suppression de l'activité homoacétogène ou une augmentation de l'activité des hydrogénases, elle peut finalement être considérée comme un levier d'ajustement de la composition d'une communauté microbienne, comme le pH, le temps de séjour ou la charge.

Enfin, au cours de ce chapitre, nous avons cherché à quantifier l'activité homoacétogène, dont l'étendue a pu être potentiellement affectée par les modifications de concentrations en gaz. Notamment, il n'est pas exclu que *S. lutetiensis* ait eu une activité homoacétogène, cette dernière ayant été observée en culture pure. Pour quantifier l'activité homoacétogène de la communauté bactérienne, nous avons utilisé plusieurs méthodes : (i) une méthode calculatoire basée sur les concentrations en acétate, en butyrate et en H<sub>2</sub> ; (ii) une méthode moléculaire reposant sur la quantification d'un gène marqueur de l'activité homoacétogène ; (iii) une méthode physique de mesure de la vitesse de consommation d'H<sub>2</sub> et (iv) une méthode reposant sur l'analyse des communautés microbiennes issues d'un séquençage 16S, avec recherche d'espèces connues pour leur activité homoacétogène. Malgré l'utilisation de ces différentes stratégies, nous ne sommes pas parvenus à quantifier clairement cette activité, et à la distinguer en fonction des conditions expérimentales appliquées. Il apparaît néanmoins que la consommation d'H<sub>2</sub> par homoacétogénèse ait pu être non négligeable et représenter 10 à 40 % de la production d'H<sub>2</sub>.



## Conclusions, discussion générale, et perspectives

---

### ***Conclusion & discussion générale***

Les effets des acides organiques et des gaz produits par fermentation sombre sur l'activité microbienne en cultures pures et mixtes ont été décrits dans une centaine de publications. La revue de cette littérature a globalement mis en évidence des effets significatifs des produits métaboliques sur la production d'H<sub>2</sub> ainsi que l'intérêt de leur extraction pour l'optimisation des performances des fermenteurs. Toutefois, une grande disparité des seuils inhibiteurs et des effets des produits métaboliques sur la production d'H<sub>2</sub> a été relevée. Cette disparité rend peu fiable la prédiction de la limitation de la production d'H<sub>2</sub> en fonction des concentrations en produits métaboliques et de leur nature. Afin d'optimiser les rendements en H<sub>2</sub> et d'assurer une stabilité des cultures, il existe donc un grand intérêt à améliorer la compréhension des effets des produits métaboliques en fermentation sombre.

Au cours de cette thèse, les effets de produits métaboliques majoritaires ont été étudiés en accordant un fort intérêt aux communautés microbiennes, avec comme enjeu une meilleure compréhension de l'évolution de ces communautés en fonction de la nature des produits métaboliques et de leurs concentrations. Les mécanismes d'inhibition par les acides et par les gaz de fermentation ont tout d'abord été étudiés en batch. Les connaissances acquises ont ensuite été employées pour optimiser la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre en mode continu.

#### ***❖ Amélioration de la compréhension des mécanismes d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les produits métaboliques***

Dans un premier temps, il a été montré que, lors de la fermentation d'un substrat simple (glucose) en mode batch durant quatre jours, l'ajout initial d'acétate, de butyrate ou de lactate induisait une inhibition dose-dépendante de la production d'H<sub>2</sub> au-delà d'un seuil de 50 mM, quel que soit l'acide ajouté. Cette diminution de production d'H<sub>2</sub> a été attribuée à trois mécanismes : (i) une diminution globale de la croissance bactérienne, (ii) une altération des voies métaboliques productrices d'H<sub>2</sub> et (iii) une inhibition de la croissance de bactéries productrices d'H<sub>2</sub>, en faveur de bactéries compétitrices.

L'étendue de ces différents mécanismes d'inhibition était dépendante de la nature et de la concentration de l'acide ajouté au milieu de culture. Il en a résulté une inhibition de 50 % de la vitesse maximale de production d'H<sub>2</sub> à 209 mM d'acétate, 104 mM de butyrate ou 273

mM de lactate. A des concentrations de 300 mM d'acétate, 200 mM de butyrate et 400 mM de lactate, la production d'H<sub>2</sub> a été totalement inhibée en faveur d'une production de lactate uniquement. Ce changement de produits métaboliques a été expliqué par la diminution de la croissance des membres de la famille des *Clostridiaceae* d'un facteur 100, en faveur de *Bacillaceae* ou de *Lactobacillaceae*, qui représentaient alors près de 100 % de l'abondance relative. A des concentrations en acides inférieures, l'ajout d'acétate ou de butyrate a diminué de façon dose-dépendante le rendement en H<sub>2</sub>, tandis que l'ajout de lactate a principalement impacté négativement la croissance microbienne. Les communautés microbiennes au rang de la famille étaient alors moins impactées, l'abondance relative des *Clostridiaceae* persistant à plus de 50 %. Toutefois, deux espèces du genre *Clostridium* ont montré des résistances variables aux acides ajoutés. Particulièrement, la croissance de *Clostridium butyricum* n'a pas été inhibée jusqu'à 100, 200 et 250 mM de butyrate, d'acétate et de lactate, respectivement, mais son activité métabolique est suspectée d'avoir été altérée par la présence d'acides, en faveur de la production de lactate.

Face à ces limitations de la production d'H<sub>2</sub>, une incubation prolongée des communautés microbiennes durant une dizaine de jours en présence d'acides a été réalisée afin d'étudier l'émergence de microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> résistants au stress acide. Cette incubation prolongée a permis d'observer une production d'H<sub>2</sub> malgré la présence de 300 mM d'acétate, 300 mM de lactate ou 200 mM de butyrate. Remarquablement, lors de ces fermentations, le rendement en H<sub>2</sub> n'a pas été inhibé de façon dose-dépendante par la concentration en acide, et s'est élevé à  $106 \pm 32 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{DCO consommée}}^{-1}$ , soit  $0,9 \pm 0,3 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{équivalent glucose}}^{-1}$ . Au cours de ces fermentations, du glucose, mais également du lactate et dans une moindre mesure de l'acétate ont été utilisés comme substrats. La croissance de deux espèces de *Clostridiaceae* a alors été identifiée : *C. guangxiense*, entré en croissance en présence de butyrate et d'acétate ainsi que *C. tyrobutyricum*, entré en croissance en présence de lactate.

Ces résultats ont mis en évidence l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides en culture mixte en lien avec des changements populationnels variables en fonction de la nature des acides et de leur concentration. Ces observations sont cohérentes avec la récente étude de Chen et al. (2021), dans laquelle l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par l'ajout de butyrate a notamment été associée à l'augmentation de l'abondance de *Bacillaceae*. De plus, ces résultats ont montré que l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> en présence d'acides peut être contrecarrée par la croissance de microorganismes producteurs d'H<sub>2</sub> présentant une résistance à ces acides. L'analyse des communautés microbiennes apparaît donc comme un facteur indispensable pour comprendre les mécanismes d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides en culture mixte. Ce facteur était globalement jusque-là peu considéré (S. Van Ginkel and Logan, 2005; B. Wang et al., 2008; Y. Wang et al., 2008; Zheng and Yu, 2005). Aussi, cette étude a souligné l'influence de la nature de l'acide organique sur l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> en culture mixte, suggérant que la considération de la concentration totale en acides non dissociés seule apparaît inadéquate pour expliquer les inhibitions (Chen et al.,

2021b; S. Van Ginkel and Logan, 2005). Enfin, le lactate a présenté un rôle ambivalent, inhibiteur de l'activité microbienne lors des fermentations de quatre jours, mais principal substrat pour la production d'H<sub>2</sub> lors des incubations prolongées. L'ambivalence des bactéries lactiques dans les écosystèmes en fermentation sombre, associée à des rendements faibles ou élevés en H<sub>2</sub> en fonction des études (García-Depraect et al., 2021b), pourrait donc être en partie liée au rôle ambivalent du lactate lui-même.

Dans un deuxième temps, les effets des concentrations en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> sur la fermentation sombre et la production d'H<sub>2</sub> ont été étudiés en mode batch également, en utilisant un biodéchet reconstitué comme substrat. Pour modifier les concentrations en gaz, des fermentations ont été réalisées à différentes pressions totales (1 bar ou 0,5 bar), avec ou sans captage du CO<sub>2</sub>. De manière intéressante, la diminution de la pression de 0,5 bar couplée au captage du CO<sub>2</sub> a permis une amélioration de 58 % de la production d'H<sub>2</sub> par rapport à une fermentation réalisée en condition standard (1 bar sans captage de CO<sub>2</sub>). La production d'H<sub>2</sub> atteignait alors  $130 \pm 13 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{MV ajoutée}}^{-1}$ . De plus, une amélioration de 15 % de la dégradation du biodéchet, de 38 % du rendement en butyrate ainsi qu'une suppression presque totale de l'accumulation de lactate ont été observées. Ces modifications de l'activité microbienne se sont expliquées par une diminution majeure de l'abondance relative de *Streptococcus lutetiensis*, bactérie lactique, de 42 % en condition standard à seulement 2 %. À l'inverse, l'abondance relative de bactéries productrices d'H<sub>2</sub> de la famille des *Clostridiaceae* a été favorisée, passant de 30 % à 47 %. Le captage du CO<sub>2</sub> couplé à une baisse de pression de 0,5 bar a donc favorisé la production d'H<sub>2</sub> par une sélection populationnelle. Dans le milieu fermentaire, la concentration en CO<sub>2</sub> dissous a été divisée par deux par rapport à une fermentation en condition standard, soit  $10 \pm 2 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ . Dans ces conditions, la concentration en H<sub>2</sub> dissous a augmenté, induisant notamment une sursaturation du milieu fermentaire d'un facteur  $1,8 \pm 0,3$ .

Globalement, les expériences réalisées au cours de cette thèse n'ont pas mis en évidence une inhibition de la production d'H<sub>2</sub> avec l'augmentation des pressions partielles ou concentrations dissoutes en H<sub>2</sub> ou en CO<sub>2</sub>. D'une part, les fermentations réalisées en fiole, sans agitation, ont été associées à un rendement de  $1,6 \pm 0,2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ , du même ordre de grandeur que les rendements obtenus en culture pure dans des conditions similaires mais avec agitation du milieu de culture (Wang and Yin, 2021). D'autre part, en réacteur agité, ni la baisse de pression seule, ni le captage du CO<sub>2</sub> seul n'a induit d'augmentation significative de la production d'H<sub>2</sub>. À l'inverse même, l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> a été mesurée en lien avec une augmentation de la concentration en H<sub>2</sub> dissous. Cette absence d'effet significatif de la baisse de pression totale ou du captage de CO<sub>2</sub> sur la production d'H<sub>2</sub> est en contradiction avec la plupart des études publiées à ce jour (Huang et al., 2021; Nasr et al., 2015; Nunes Ferraz Júnior et al., 2020; Park et al., 2005). Dans ces études, les auteurs ont supposé que l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> suite à la baisse des pressions partielles en H<sub>2</sub> ou en CO<sub>2</sub> était due à une augmentation de l'activité des hydrogénases et/ou une diminution

d'activité homoacétogène. Nos conditions expérimentales ont donc potentiellement constitué un cas particulier dans lequel les modifications de pressions partielles en gaz n'ont pas permis de favoriser l'activité des hydrogénases ou de diminuer l'activité homoacétogène de façon significative.

En revanche, le couplage du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression a remarquablement augmenté la production d'H<sub>2</sub> en défavorisant l'abondance d'une bactérie lactique du genre *Streptococcus* au profit de bactéries productrices d'H<sub>2</sub> du genre *Clostridium*. Nos résultats mettent donc en évidence un mécanisme original d'amélioration de la production d'H<sub>2</sub>. Ces résultats sont cohérents avec l'observation en culture pure d'une augmentation du taux de croissance de *Streptococcus* sp. en présence de CO<sub>2</sub> (Arioli et al., 2009; Repaske et al., 1974). Par ailleurs, la diminution de l'abondance *S. lutetiensis* uniquement lors du couplage du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression et non pas lors du captage du CO<sub>2</sub> seul était étonnante, puisque les concentrations en CO<sub>2</sub> étaient similairement réduites dans ces deux conditions. Dès lors, soit (i) la diminution de la concentration en H<sub>2</sub> avec la baisse de pression totale a affecté l'abondance de *S. lutetiensis*, soit (ii) la pression de fermentation en tant que telle est un facteur pouvant présenter des effets cumulatifs ou interactifs avec la concentration en CO<sub>2</sub> sur la communauté microbienne. De tels effets entre la pression et la concentration en CO<sub>2</sub> sur la germination de spores de *Bacillus* sp. et leur taux de croissance ont été préalablement décrits (Schuerger and Nicholson, 2006). Ces hypothèses amènent d'une part à reconsidérer le rôle de *Streptococcus* sp. dans les écosystèmes de fermentation sombre et d'autre part à reconsidérer les effets des modifications de pression et des concentrations en gaz sur la production d'H<sub>2</sub>, en envisageant des effets cumulatifs / interactifs.

#### ❖ *Etude de l'influence de stratégies de levée d'inhibition par les produits métaboliques*

La modification des concentrations en acides organiques ou en gaz de fermentation a été associée à des changements populationnels influençant la production d'H<sub>2</sub> en batch. Des stratégies ont par la suite été appliquées dans le but de réduire les inhibitions par les produits métaboliques. Ces stratégies ont été appliquées au cours de fermentations en mode continu afin d'étudier la persistance des changements populationnels potentiellement induits.

Une stratégie d'adaptation de consortium microbien au butyrate, métabolite le plus inhibiteur, a été appliquée au cours d'une fermentation sous forte charge organique de biodéchets reconstitués. Un traitement au butyrate d'un réacteur alimenté en continu pendant 48 h a été associé au doublement de l'abondance relative de *C. guangxiense*, bactérie productrice d'H<sub>2</sub>, en défaveur de l'abondance de *Lactobacillus* sp., bactérie lactique, pendant un état stationnaire de six jours. Ce changement populationnel a été associé à une amélioration substantielle de la production d'H<sub>2</sub> de 47 %, atteignant 37 ± 3 mL<sub>H2</sub>·g<sub>MV</sub> ajoutée<sup>-1</sup>,



couplée à une augmentation de la production de butyrate et à une diminution de la production de lactate.

L'intérêt d'un stress temporaire au butyrate sur un consortium microbien pour augmenter la production d'H<sub>2</sub> avait précédemment été étayé en mode batch par Huang et al. (2012) et Zhao et al. (2010). De façon similaire, Zhao et al. (2010) avait également observé que l'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> suite au stress au butyrate était associée à une augmentation de la production de butyrate et à une diminution de la production de lactate. L'étude réalisée au cours de cette thèse a permis d'identifier le mécanisme d'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> à l'échelle populationnelle, et souligne que l'augmentation de la production d'H<sub>2</sub> sous stress acide était associée à l'augmentation de l'abondance d'un microorganisme précédemment identifié comme résistant au butyrate. De plus, le stress temporaire au butyrate appliqué a été une stratégie efficace pour améliorer la production d'H<sub>2</sub> lors d'une fermentation en continu sous charge organique élevée.

En parallèle, la persistance des changements populationnels induit par le captage du CO<sub>2</sub> couplé à une pression réduite a également été étudiée lors de fermentations en mode continu. Sous ce mode de culture, la diminution de pression couplée au captage du CO<sub>2</sub> n'a pas permis d'améliorer la production d'H<sub>2</sub>. En effet, quelles que soient la pression appliquée et la gestion du CO<sub>2</sub>, la production d'H<sub>2</sub> a progressivement diminuée au cours des douze jours de fermentation continue pour atteindre une production de  $30 \pm 10 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}_{\text{MV}} \text{ ajoutée}^{-1}$ . Toutefois, le couplage du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression a de nouveau affecté l'abondance relative de *S. lutetiensis*, qui a été indétectable dans cette condition alors que son abondance relative s'élevait entre 10 et 35 % à 1 bar sans captage du CO<sub>2</sub>. La restriction de l'abondance de ce microorganisme n'a en revanche pas favorisé une augmentation de l'abondance de bactéries productrices d'H<sub>2</sub>, mais celle d'autres microorganismes compétiteurs, des *Bifidobacteriaceae*, justifiant l'absence d'amélioration de la production d'H<sub>2</sub>. Enfin, l'influence de l'arrêt du captage du CO<sub>2</sub> et de la régulation à basse pression lors de la fermentation en mode continu a été évaluée. Le retour aux conditions standards (1 bar sans captage du CO<sub>2</sub>) a été concomitant avec une diminution de l'abondance des *Bifidobacteriaceae* et avec une augmentation de l'abondance en *Lactobacillaceae*. Suite à ce changement de conditions, l'abondance des *S. lutetiensis* n'a pas réaugmenté, suggérant que les conditions n'étaient plus favorables au développement de ce microorganisme, contrairement aux conditions lors du démarrage de fermentation.

Ces résultats se sont également distingués de la plupart des études de la littérature portée sur les effets des gaz de fermentation, puisque la diminution des pressions partielles en H<sub>2</sub> et/ou en CO<sub>2</sub> n'a pas affecté positivement la production d'H<sub>2</sub>. En revanche, cette étude a confirmé l'intérêt du couplage du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression pour défavoriser spécifiquement la croissance de *Streptococcus* sp.. Or, la croissance de *Streptococcaceae*, mais

également de bactéries de la famille des *Lactobacillaceae* ou de *Bifidobacteriaceae* est fréquente au cours des fermentations en continu (Canto-Robertos et al., 2022; Cieciora-Włoch et al., 2020; García-depraect and León-becerril, 2018; Palomo-Briones et al., 2017; Villanueva-Galindo and Moreno-Andrade, 2020). Dans un grand nombre d'études, une amélioration de la production d'H<sub>2</sub> a été observée dès lors que l'abondance de *Clostridiaceae* était favorisée et que l'abondance des *Streptococcaceae*, des *Lactobacillaceae* ou des *Bifidobacteriaceae* était défavorisée (Canto-Robertos et al., 2022; Macías-muro et al., 2021; Palomo-Briones et al., 2017). Il existe donc un grand intérêt à identifier des leviers de sélections aptes à défavoriser ces microorganismes compétiteurs. Le couplage du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression s'avère ainsi efficace pour réduire l'abondance de *Streptococcus* sp. en mode batch et en continu, et semble être effectif même en étant appliqué temporairement.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'accumulation des produits métaboliques dans le milieu fermentaire ne doit pas seulement être considérée comme un risque d'inhibition de la production d'H<sub>2</sub>, mais plutôt comme un paramètre opératoire dont le contrôle peut servir d'outil de pilotage de la production d'H<sub>2</sub>, notamment au travers de la modification de la structure de la communauté microbienne. Ces résultats montrent que l'ajustement des concentrations en métabolites peut être un levier de sélection très strict, favorisant ou défavorisant sélectivement une espèce bactérienne malgré les changements de conditions expérimentales.

## *Perspectives*

### ❖ *Développer des outils pour améliorer le suivi des concentrations en produits métaboliques, des communautés microbiennes et de leurs activités*

Pour aller plus loin dans la compréhension des effets des produits métaboliques en fermentation sombre, il est important de **développer des systèmes de mesures des concentrations dissoutes en H<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub>**, notamment lors de la fermentation de substrat complexe. En effet, les capteurs actuels (sondes ampérométriques) permettant la mesure de la concentration en H<sub>2</sub> dissous sont fragiles et peu compatibles avec des fermentations prolongées dans des milieux possédant des particules en suspension. De plus, si la mesure de gaz dissous ne peut pas être effectuée de manière directe dans le fermentateur, un développement méthodologique doit également être mené pour réaliser une analyse *ex situ*, en transférant le milieu fermentaire pour mesure externe sans le mettre en contact avec l'air ambiant, afin de ne pas provoquer de désaturation.

Au cours de cette thèse, nous ne sommes pas parvenus à déceler un lien entre les concentrations en H<sub>2</sub> ou en CO<sub>2</sub> et l'activité homoacétogène. En effet, les méthodes utilisées pour **quantifier l'homoacétogénèse** ont été peu probantes. Celles-ci doivent donc évoluer pour améliorer notre compréhension de cette activité. Notamment, les méthodes calculatoires sont biaisées par la multiplicité des métabolismes concomitants, tout comme les mesures d'activité biologique en dehors des réacteurs de fermentation. De plus, considérant la versatilité métabolique des homoacétogènes, les méthodes basées sur l'ADN (quantification du gène FTHFS, séquençage 16S) ont le défaut de ne pouvoir refléter que le potentiel homoacétogène d'une culture, et non pas l'activité réelle. Alternativement, la métatranscriptomique a été utilisée par Greening et al. (2019) pour étudier les diverses voies de production et de consommation d'H<sub>2</sub> chez les ruminants, et constitue une stratégie d'intérêt. Réaliser les cultures en présence de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub> peut permettre également d'identifier l'activité des homoacétogènes par suivi des isotopes stables des produits métaboliques et de l'ARN (*RNA Stable Isotope Probing*, RNA-SIP) (Godwin et al., 2014).

Enfin, les résultats de cette thèse suggèrent qu'il existe un intérêt à **suivre en temps réel les communautés microbiennes pour piloter les fermentations**. Dans le domaine de la santé, avec le gain d'intérêt pour les microbiotes, des stratégies peu coûteuses et rapides pour caractériser des microbiotes complexes se développent. Notamment, l'utilisation de la cytométrie en flux est actuellement développée pour caractériser instantanément une communauté microbienne. Dans un cytomètre en flux, les cellules du milieu de culture passent au travers d'un faisceau de lumière et sont alors caractérisées en fonction de leur taille et de leur granularité. Pour différencier avec davantage de précision les populations, des marqueurs ciblant divers critères phénotypiques peuvent être utilisés (Bellais et al., 2022). Si cette stratégie s'avère efficace pour distinguer diverses populations spécifiques en fermentation sombre, cette technologie s'avèrerait alors être une solution peu coûteuse pour caractériser la composition d'une communauté microbienne en temps réel, sans réaliser de séquençage, et ainsi pouvoir adopter une stratégie adaptée pour maintenir les performances de production d'H<sub>2</sub> d'un fermenteur.

#### ❖ **Améliorer notre compréhension des mécanismes d'inhibition par les produits métaboliques**

Pour clarifier le mécanisme d'amélioration de la production d'H<sub>2</sub> lors du couplage du captage du CO<sub>2</sub> et de la baisse de pression, **l'activité éventuellement homoacétogène de *S. lutetiensis* reste à élucider**. Il serait intéressant d'isoler ce microorganisme et de le cultiver sous différentes conditions de disponibilités en substrat organique et en H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ainsi que sous différentes pressions absolues. Les *Streptococcus* sp. sont souvent retrouvés en fermentation sombre, mais très généralement considérés comme des producteurs de lactate

et non pas comme des homoacétogènes (Dauplain, 2022). Clarifier leur activité en culture pure améliorerait la compréhension de leur rôle dans les écosystèmes de fermentation sombre.

Les recherches sur les effets des gaz de fermentation sur la production d' $H_2$  ont souvent été focalisées sur l'effet inhibiteur de l' $H_2$ , de par la sensibilité des hydrogénases à l' $H_2$ . Toutefois, de nombreux travaux, en culture pure comme en culture mixte, y compris ceux présentés dans cette thèse, suggèrent que la concentration en  $CO_2$  peut également fortement affecter la production d' $H_2$ . De fait, les travaux sur la régulation cellulaire de la production d' $H_2$  nous suggèrent que, grâce à un merveilleux équipement génétique composé de multiples hydrogénases et de multiples ferrédoxines à potentiel redox variable, les bactéries sont capables de s'adapter à une large gamme de concentrations en  $H_2$  afin de conserver ce puits d'électrons qu'est la production d' $H_2$  (Calusinska et al., 2010; Jay et al., 2020; Zheng et al., 2014). Pour mieux comprendre dans quelle mesure les baisses de concentrations en  $H_2$  techniquement atteignables peuvent augmenter la production d' $H_2$ , il conviendrait donc de **poursuivre la compréhension des mécanismes de régulation cellulaire de la production d' $H_2$**  pour diverses bactéries productrices d' $H_2$ .

D'autre part, l'accumulation des acides organiques ainsi que du  $CO_2$  et des carbonates augmente certainement l'osmolarité du milieu de culture. Or, il est connu que l'augmentation de l'osmolarité peut affecter négativement la croissance bactérienne et la production d' $H_2$  (Ciranna et al., 2014; Hirshfield et al., 2003; Willquist et al., 2009; Zheng et al., 2005). Il serait donc intéressant d'**étudier la prépondérance de l'inhibition de la production d' $H_2$  en culture mixte par l'augmentation de l'osmolarité** en lien avec les concentrations en acides organiques et en  $CO_2$ . Notamment, l'étude des effets de l'augmentation de la pression osmotique pourrait clarifier la toxicité plus importante des acides ajoutés au milieu de culture par rapport à ceux produits par les microorganismes (Heuvel et al., 1988; S. Van Ginkel and Logan, 2005).

Par ailleurs, nous avons cherché au cours de cette thèse à distinguer les changements métaboliques se réalisant à l'échelle cellulaire, des changements populationnels se réalisant à l'échelle d'une communauté microbienne. Pour distinguer ces changements, nous avons comparé les rendements métaboliques, la dégradation du substrat, et les communautés microbiennes *via* l'abondance des espèces mais également la diversité des communautés. Un effet métabolique pouvait alors être identifié lorsque des rendements métaboliques différaient sans changement populationnel associé. Mais comment **identifier un changement métabolique concomitant à un changement populationnel** ? La modélisation pourrait être utilisée pour répondre à cette question. En particulier, l'activité métabolique de chaque OTU identifié au sein d'une communauté microbienne par séquençage 16S peut être estimée par modélisation. Un tel modèle a été développé au LBE (Moscoviz, 2017), et repose sur trois hypothèses : (i) chaque OTU présente la même activité métabolite dans les différentes conditions étudiées, (ii) chaque OTU contribue à une production de métabolites

proportionnelle à son abondance et (iii) les prédictions d'activité métabolique sont thermodynamiquement réalistes. Avec un tel modèle, une activité métabolique variable d'un OTU en fonction des conditions expérimentales peut être détectée même si la communauté microbienne varie. L'application de ce type modèle pourrait permettre par exemple de conclure quant au changement d'activité métabolique de *C. butyricum* en faveur de la production de lactate lors d'un stress acide.

❖ **Comment prédire les effets des concentrations en métabolites sur la production d'H<sub>2</sub> ?**

Pour poursuivre, les changements populationnels observés en modifiant les concentrations en produits métaboliques suggèrent que l'effet inhibiteur de ces produits sur la production d'H<sub>2</sub> est dépendant de la communauté microbienne cultivée. La communauté microbienne entrant en croissance est elle-même dépendante de l'inoculum, du substrat et des conditions opératoires (pH, conditions de mélange, temps de séjour, température, etc.) (Etchebehere et al., 2016). En d'autres termes, l'impact des acides sur la production d'H<sub>2</sub> peut dépendre de l'inoculum, du substrat et des conditions opératoires, ce qui justifie la grande disparité d'impact des acides recensée dans la littérature. Dès lors, comment prédire l'influence des acides sur la production d'H<sub>2</sub> ? Une approche pourrait consister à adopter une méthodologie appliquée par Capson-Tojo et al. (2020). Les auteurs ont étudié l'inhibition de la digestion anaérobie par l'azote ammoniacal et ont constaté une grande disparité des seuils d'inhibition en fonction des conditions expérimentales. Il s'agit donc du même constat que pour l'influence des acides organiques sur la production d'H<sub>2</sub> en fermentation sombre. Pour identifier les facteurs à l'origine de cette disparité, ces chercheurs ont réalisés une **méta-analyse** à partir de données collectées de 50 études de la littérature portant sur l'inhibition par l'azote ammoniacal, et ont appliqué une méthode de clustering. Cette méthode a permis de lier l'inhibition aux conditions opératoires et aux communautés microbiennes, et de généraliser des constantes d'inhibition en fonction des clusters. La même procédure pourrait être appliquée pour identifier les facteurs à l'origine de la disparité des constantes d'inhibition par les acides organiques en fermentation sombre. Toutefois, parmi les études portant sur l'inhibition de la production d'H<sub>2</sub> par les acides en fermentation sombre, la caractérisation des communautés microbiennes a été très rarement réalisée. Ainsi, davantage d'études portant sur l'inhibition par les acides de la production d'H<sub>2</sub> en culture mixte et intégrant une caractérisation des communautés microbiennes sont nécessaires pour pouvoir réaliser une méta-analyse robuste.

Pour pallier ce manque de données, la littérature en culture pure peut potentiellement être informative. En effet, la fermentation sombre en culture mixte présente les avantages (i) d'être réalisée par des communautés souvent largement dominées par un seul genre

bactérien (Etchebehere et al., 2016) et (ii) d'être réalisée par des OTUs pour la plupart identifiables au rang de l'espèce avec une fiabilité correcte (> 98 %). Cette identification des espèces cultivées permet d'investiguer leurs caractéristiques décrites en culture pure dans la littérature. Ainsi, la collecte dans la littérature des constantes d'inhibition par les acides de ces espèces cultivées isolées pourrait donc générer une base de données utilisable pour prédire les effets des acides en culture mixte, conjointement avec les données issues des expériences en cultures mixtes. **L'extrapolation de résultats en culture pure à des résultats en culture mixte** peut s'avérer limitée, mais pourrait néanmoins contribuer à améliorer la prédiction des effets des acides en culture mixte.

Plus généralement, les effets des concentrations en acides organiques et en gaz de fermentation sur la croissance de microorganismes anaérobies recourent de nombreux domaines. Par exemple, en agro-alimentaire, les atmosphères riches en CO<sub>2</sub> sont utilisées dans le but d'améliorer la préservation des aliments en inhibant sélectivement la croissance de certains microorganismes (Esmailian et al., 2021). Alternativement, et depuis des décennies, le lactate est utilisé dans l'industrie de la transformation de viande pour ses effets anti-microbiens (Hirshfield et al., 2003). Dans l'hypothèse d'un voyage sur mars, des chercheurs se sont intéressés à la viabilité des microorganismes en fonction de la pression totale et de la concentration en CO<sub>2</sub> environnante (Schuerger and Nicholson, 2006). Enfin, récemment, le microbiote intestinal suscite de nombreuses recherches, notamment sur la croissance de *Clostridium* sp. en fonction des acides organiques dans le milieu environnant. Par exemple, l'ingestion de butyrate par des souris a été associée à une augmentation de l'abondance de *Clostridium* sp. dans leur système digestif, ce qui a participé à la prévention d'une réaction allergique aux cacahuètes (ACS Newsroom, 2022). Pour améliorer notre compréhension des effets des produits métaboliques sur la croissance des microorganismes et les dynamiques populationnelles en fermentation sombre, ainsi que leur lien avec la production d'H<sub>2</sub>, nous avons donc tout **intérêt à nous intéresser à ces domaines connexes et à identifier les traits communs entre ces écosystèmes microbiens et ceux en fermentation sombre**. Sur ce point, notons que le plus efficient serait finalement de systématiser le formatage et le dépôt des données en accès libre, dans tous les domaines de recherche, pour faciliter la compilation de résultats et les méta-analyses dans des domaines complexes comme les cultures mixtes.

❖ ***Utiliser les concentrations en produits métaboliques comme outil de pilotage des cultures mixtes***

D'après les résultats obtenus au cours de cette thèse, il existe une perspective d'utilisation des concentrations en métabolites pour piloter les fermentations. Il serait notamment intéressant de **coupler les connaissances acquises sur les effets des concentrations en gaz et**

**en acides organiques** sur les populations microbiennes pour favoriser la production d'H<sub>2</sub>. Par exemple, nous avons observé en mode batch que des concentrations en acétate ou en lactate supérieures à 250 ou 300 mM respectivement pouvaient favoriser la croissance d'un membre des *Lactobacillaceae*, *Lactoplantibacillus plantarum*, bactérie productrice de lactate. De la même façon, en mode continu, à une forte charge organique, *Lactobacillus* sp. était le principal compétiteur, limitant la production d'H<sub>2</sub>. Or, la littérature recense de longue date des études montrant que les croissances de *L. plantarum* et de *Lactobacillus* sp. sont favorisées par une concentration élevée en CO<sub>2</sub> (Daniels et al., 1985; Dixon and Kell, 1989). Potentiellement, la croissance de ces microorganismes lors de l'accumulation d'acides pourrait donc être contrecarrée par le captage du CO<sub>2</sub>, stratégie plus simple à appliquer que l'extraction des acides du milieu de culture. Nous proposons donc d'étudier l'influence du captage du CO<sub>2</sub> lors de fermentations en continu à forte charge organique, en substitution ou en combinaison avec la stratégie de traitement initial au butyrate du fermenteur.

Plus largement, afin d'améliorer la stabilité de la production d'H<sub>2</sub> et les rendements en fermentation sombre, il existe un intérêt à **caractériser les performances de différentes stratégies de modification des concentrations en produits métaboliques**. Par exemple, concernant les acides organiques, une diversité de stratégies existe : extraction par membrane, absorption sur charbon actif, adaptation de l'inoculum au stress acide, bioaugmentation avec des souches sélectionnées pour leur capacité de production d'H<sub>2</sub> en condition de stress acide, modification des conditions opératoires...

Lors d'une diminution de la production d'H<sub>2</sub> en lien avec l'accumulation d'acides, en première approche, la modification des conditions opératoires telles que l'augmentation du pH, l'augmentation de la température en cas d'accumulation de propionate ou encore un ajustement de la charge organique, sont des solutions à bas coût ayant démontré leur efficacité pour réduire une inhibition présumée due aux acides. Ces stratégies peuvent avoir un effet direct, réduisant les concentrations en acides, ou indirect, en changeant les communautés microbiennes.

**L'extraction des acides** par membrane est une stratégie fortement investiguée. Néanmoins, son efficacité sur le long terme lors d'une culture continue est questionnable. Les membranes d'extraction présentent l'inconvénient de se colmater rapidement, particulièrement avec des déchets à forte teneur en lipides, comme la soupe de déconditionnement utilisée dans cette thèse. Plus globalement, la fraction lipidique de ce substrat tend à n'apporter que des inconvénients à la fermentation sombre : (i) elle n'est pas dégradée au cours de la fermentation et constitue donc une masse qui circule dans le procédé sans en tirer de bénéfice ; (ii) elle encrasse les réservoirs et canules d'alimentation et de soutirage ; (iii) elle s'accumule à l'interface liquide/gaz dans le réacteur et y défavorise potentiellement le transfert. Il y aurait donc un intérêt à mettre en place une stratégie d'élimination de cette fraction lipidique en amont du procédé de fermentation sombre, afin de la valoriser dans un autre procédé, comme la méthanisation. Une telle élimination

faciliterait l'usage de membranes pour l'extraction des acides. L'avantage de ces membranes est qu'elles peuvent être sélectives et ainsi permettre l'extraction d'un ou plusieurs acides en particulier. Il serait notamment pertinent d'éliminer le butyrate tout en conservant lactate et acétate dans le milieu de culture, substrats pour la production d'H<sub>2</sub>. A l'inverse, si les performances de production d'H<sub>2</sub> semblent négativement affectées par une surreprésentation de *Lactobacillaceae*, accumuler du butyrate dans le milieu de culture peut être une stratégie d'intérêt, ces dernières y étant peu résistantes d'après les résultats de cette thèse. Dans l'idéal, nous pourrions imaginer moduler le fonctionnement d'une membrane pour ajuster à façon les concentrations de différents acides, et ainsi utiliser ces concentrations afin d'orienter la sélection des communautés microbiennes...

### ❖ *Enjeux de la filière de production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre*

Pour terminer, il existe un enjeu clair de production d'H<sub>2</sub> décarboné. Dans ce cadre, l'intérêt de la production d'H<sub>2</sub> par fermentation sombre par rapport à d'autres procédés peut notamment provenir de sa sobriété énergétique. L'électrolyse de l'eau présente par exemple un rendement énergétique variable entre 60 et 75 %. En comparaison, les résultats d'une étude technico-économique réalisée dans le cadre du projet ANR PROBHYM (dont cette thèse fait partie) suggèrent que des rendements énergétiques supérieurs sont atteignables pour la production d'un biogaz non épuré. Il serait donc d'intérêt de poursuivre les recherches en fermentation sombre en **évaluant la consommation énergétique des différentes composantes du procédé** (prétraitement thermique de l'inoculum, agitation du milieu de culture, recirculation du gaz etc.) et en favorisant les conduites du procédé les moins énergivores.

Il convient également de prendre en compte le service de traitement de déchet apporté par le procédé, même si ce dernier est partiel et doit être couplé avec d'autres procédés, comme la méthanisation. En considérant un gisement local de déchets, comme par exemple des soupes de déconditionnement, il convient de choisir la voie de traitement et de valorisation du gisement en fonction des besoins locaux. En particulier, si un site industriel requiert un flux d'H<sub>2</sub> dont la purification n'est pas nécessaire, et dont le volume est cohérent avec le potentiel de production d'H<sub>2</sub> associé au gisement de déchets local, la fermentation sombre peut s'avérer très intéressante énergétiquement et environnementalement. Pour aboutir à ces applications, le **développement à grande échelle du procédé de fermentation sombre requiert définitivement l'amélioration des rendements en H<sub>2</sub> et leur stabilisation**. Les travaux menés dans cette thèse s'intègrent dans cette démarche.





## Références

---

- Abbad-Andalousi, S., Manginot-Durr, C., Amine, J., Petitdemange, E., Petitdemange, H., 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4413–4417. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4413-4417.1995>
- ACS Newsroom, 2022. Food allergies can be reversed in mice by targeting the microbiome [WWW Document]. URL <https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/newsreleases/2022/august/food-allergies-can-be-reversed-in-mice-by-targeting-the-microbiome.html> (accessed 9.19.22).
- ADEME, 2022. Impact climatique de l'hydrogène "bleu."
- ADEME, 2020. Rendement de la chaîne hydrogène.
- Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P., 2012. Les entérocoques: Avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16, 67–76.
- Akca, M.S., Bostancı, O., Aydın, A.K., Koyuncu, I., Altınbaş, M., 2021. BioH<sub>2</sub> production from food waste by anaerobic membrane bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 27941–27955. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.06.042>
- Akhlaghi, N., Najafpour-Darzi, G., 2020. A comprehensive review on biological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 22492–22512. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>
- Alsaker, K. V., Paredes, C., Papoutsakis, E.T., 2010. Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: Gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 1131–1147. <https://doi.org/10.1002/bit.22628>
- Alvarado-Cuevas, Z.D., López-Hidalgo, A.M., Ordoñez, L.G., Ocegüera-Contreras, E., Ornelas-Salas, J.T., De León-Rodríguez, A., 2015. Biohydrogen production using psychrophilic bacteria isolated from Antarctica. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 7586–7592. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.063>
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Domínguez-Espinosa, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
- APHA, 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Water and Wastewater.
- Arioli, S., Roncada, P., Salzano, A.M., Deriu, F., Corona, S., Guglielmetti, S., Bonizzi, L., Scaloni, A., Mora, D., 2009. The relevance of carbon dioxide metabolism in *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology* 155, 1953–1965. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024737-0>
- Arrêté du 9 avril 2018 [WWW Document], 2018. URL

[https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/article\\_jo/JORFARTI000036831029](https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/article_jo/JORFARTI000036831029) (accessed 7.18.22).

- Aslam, M., Ahmad, R., Yasin, M., Khan, A.L., Shahid, M.K., Hossain, S., Khan, Z., Jamil, F., Rafiq, S., Bilad, M.R., Kim, J., Kumar, G., 2018. Anaerobic membrane bioreactors for biohydrogen production: Recent developments, challenges and perspectives. *Bioresour. Technol.* 269, 452–464. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.050>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., 2009. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>
- Bahl, H., Gottwald, M., Kuhn, A., 1986. Nutritional factors affecting the ratio of solvents produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 169–172. <https://doi.org/10.1128/aem.52.1.169-172.1986>
- Bakonyi, P., Buitrón, G., Valdez-Vazquez, I., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2017. A novel gas separation integrated membrane bioreactor to evaluate the impact of self-generated biogas recycling on continuous hydrogen fermentation. *Appl. Energy* 190, 813–823. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.151>
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., Bélafi-Bakó, K., 2014. Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 40, 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.014>
- Baleeiro, F.C.F., Kleinstaub, S., Sträuber, H., 2021. Hydrogen as a Co-electron Donor for Chain Elongation With Complex Communities Experimental Design of Batch Cultures 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650631>
- Baronofsky, J.J., Schreurs, W.J.A., Kashket, E.R., 1984. Uncoupling by acetic acid limits growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1134–1139. <https://doi.org/10.1128/aem.48.6.1134-1139.1984>
- Bastidas-Oyanedel, J.R., Mohd-Zaki, Z., Zeng, R.J., Bernet, N., Pratt, S., Steyer, J.P., Batstone, D.J., 2012. Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.* 110, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.122>
- Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., Delvigne, F., Toyé, D., Crine, M., Thonart, P., Hilgsmann, S., 2015. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochem. Eng. J.* 98, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.01.008>
- Bellais, S., Nehlich, M., Ania, M., Duquenoy, A., Mazier, W., van den Engh, G., Baijer, J., Treichel, N.S., Clavel, T., Belotserkovsky, I., Thomas, V., 2022. Species-targeted sorting and cultivation of commensal bacteria from the gut microbiome using flow cytometry under anaerobic conditions. *Microbiome* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01206-7>
- Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G., Gardini, F., 2009. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties. *J. Food Prot.* 72, 2162–2169. <https://doi.org/10.1051/lait>

- Bernalier, A., Rochet, V., Leclerc, M., Doré, J., Pochart, P., 1996. Diversity of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-utilizing acetogenic bacteria from feces of non- methane-producing humans. *Curr. Microbiol.* 33, 94–99. <https://doi.org/10.1007/s002849900081>
- Berthomieu, R., 2021. Etude du mécanisme d'échange électronique chez *Clostridium pasteurianum*.
- BEYNUM, J.W.P.E.J. VAN, 1943. BOEKELSCHEURBACTERIEËN 315–346.
- Bhat, J. V, Barker, H.A., 1947. *Clostridium Spec .* and the Role of Acetic Acid in the Butyric Acid Fermentation of Lactate.
- Bio2E, I., 2018. Environmental Biotechnology and Biorefinery Platform [WWW Document]. <https://doi.org/10.5454/1.557234103446854E12>
- Blanco, H., Nijs, W., Ruf, J., Faaij, A., 2018. Potential for hydrogen and Power-to-Liquid in a low-carbon EU energy system using cost optimization. *Appl. Energy* 232, 617–639. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.09.216>
- Blanco, V.M.C., Oliveira, G.H.D., Zaiat, M., 2019. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor : Performance evaluation and kinetic modeling. *Renew. Energy* 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>
- Bomar, M., Hippe, H., Schink, B., 1991. Lithotrophic growth and hydrogen metabolism by *Clostridium magnum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 83, 347–350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04488.x>
- Borden, J.R., Lee, Y.Y., Yoon, H.H., 2000. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic biomass to acetic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 84–86, 963–970. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:963>
- Braga Nan, L., Trably, E., Santa-Catalina, G., Bernet, N., Delgenès, J.P., Escudie, R., 2020. Biomethanation processes: New insights on the effect of a high H<sub>2</sub> partial pressure on microbial communities. *Biotechnol. Biofuels* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01776-y>
- Braun, F., Hamelin, J., Gévaudan, G., Patureau, D., 2011. Development and Application of an Enzymatic and Cell Flotation Treatment for the Recovery of Viable Microbial Cells from Environmental Matrices Such as Anaerobic Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8487–8493. <https://doi.org/10.1128/AEM.05549-11>
- Braun, K., Gottschalk, G., 1981. Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*. *Arch. Microbiol.* 128, 294–298. <https://doi.org/10.1007/BF00422533>
- Brémond, U., Bertrandias, A., Loisel, D., Jimenez, J., Steyer, J.P., Bernet, N., Carrere, H., 2020. Assessment of fungal and thermo-alkaline post-treatments of solid digestate in a recirculation scheme to increase flexibility in feedstocks supply management of biogas plants. *Renew. Energy* 149, 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.062>
- Bru, K., Blazy, V., Jouliau, C., Trably, E., Latrille, E., Quéméneur, M., Dictor, M.C., 2012.

- Innovative CO<sub>2</sub> pretreatment for enhancing biohydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 14062–14071. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.111>
- Bryant, M.P., Burkey, L.A., 1955. The characteristics of lactate-fermenting sporeforming anaerobes from silage 43–46.
- Bu, J., Wei, H.L., Wang, Y.T., Cheng, J.R., Zhu, M.J., 2021. Biochar boosts dark fermentative H<sub>2</sub> production from sugarcane bagasse by selective enrichment/colonization of functional bacteria and enhancing extracellular electron transfer. *Water Res.* 202, 117440. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117440>
- Buitrón, G., Muñoz-Páez, K.M., Quijano, G., Carrillo-Reyes, J., Albarrán-Contreras, B.A., 2020. Biohydrogen production from winery effluents: control of the homoacetogenesis through the headspace gas recirculation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95, 544–552. <https://doi.org/10.1002/jctb.6263>
- Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., 2016. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., Hassan, M.A., 2015. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *J. Environ. Manage.* 157, 20–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.006>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G., Trably, E., 2017. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Cadoux, C., Milton, R.D., 2020. Recent Enzymatic Electrochemistry for Reductive Reactions. *ChemElectroChem* 7, 1974–1986. <https://doi.org/10.1002/celec.202000282>
- Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., Wilmotte, A., 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: A comparative genomic perspective. *Microbiology* 156, 1575–1588. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032771-0>
- Canto-Robertos, M., Quintal-Franco, C., Ponce-Caballero, C., Vega-De Lille, M., Moreno-Andrade, I., 2022. Inhibition of hydrogen production by endogenous microorganisms from food waste. *Brazilian J. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00235-5>
- Capson-Tojo, G., Moscoviz, R., Astals, S., Robles, Steyer, J.P., 2020. Unraveling the literature chaos around free ammonia inhibition in anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 117, 109487. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109487>
- Carlos A. Contreras-Dávila, Johan Esveld, C.J.N.B. and D.P.B.T.B.S., 2021. nZVI Impacts Substrate Conversion and Microbiome Composition in Chain Elongation From D- and L-Lactate Substrates 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.666582>
- Carmona, A., Trably, E., Milferstedt, K., Lacroix, R., Etcheverry, L., Bernet, N., 2015. Long-term continuous production of H<sub>2</sub> in a microbial electrolysis cell ( MEC ) treating saline wastewater. *Water Res.* 81, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.041>

- Carosia, M.F., dos Reis, C.M., de Menezes, C.A., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2021. Homoacetogenesis: New insights into controlling this unsolved challenge by selecting the optimal C/N ratio, C/P ratio and hydraulic retention time. *Process Saf. Environ. Prot.* 145, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.08.009>
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Montoya, L., Razo-Flores, E., 2014. Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 11423–11432. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.05.099>
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2012. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 5591–5601. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.004>
- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H.O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., Trably, E., Wenzel, J., Zaiat, M., 2019. A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 26237–26247. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.124>
- Casino drive [WWW Document], 2022. URL [www.casinodrive.fr](http://www.casinodrive.fr) (accessed 8.16.22).
- 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. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 5674–5682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A.D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S.D., Maintinguer, S.I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2020. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 119, 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Castillo-Hernández, A., Mar-Alvarez, I., Moreno-Andrade, I., 2015. Start-up and operation of continuous stirred-tank reactor for biohydrogen production from restaurant organic solid waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 17239–17245. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.046>
- Castro-Villalobos, M.C., García-Morales, J.L., Fernández, F.J., 2012. By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 7077–7083. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.12.032>
- Cavalcante de Amorim, E.L., Barros, A.R., Rissato Zamariolli Damianovic, M.H., Silva, E.L., 2009. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.007>

- Chandra, R., Mohan, S.V., 2014. Enhanced bio-hydrogenesis by co-culturing photosynthetic bacteria with acidogenic process : Augmented dark-photo fermentative hybrid system to regulate volatile fatty acid inhibition. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 7604–7615. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.196>
- Chang, D.E., Jung, H.C., Rhee, J.S., Pan, J.G., 1999. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1384–1389. <https://doi.org/10.1128/aem.65.4.1384-1389.1999>
- Chang, J.-J., Chou, C.-H., Ho, C.-Y., Chen, W.-E., Lay, J.-J., Huang, C.-C., 2008. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 5137–5146. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.021>
- Chang, J.J., Wu, J.H., Wen, F.S., Hung, K.Y., Chen, Y.T., Hsiao, C.L., Lin, C.Y., Huang, C.C., 2008. Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1579–1585. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.045>
- Chang, S., Li, J., Liu, F., Yu, Z., 2012. Effect of different gas releasing methods on anaerobic fermentative hydrogen production in batch cultures. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 6, 901–906. <https://doi.org/10.1007/s11783-012-0403-1>
- Chatellard, L., 2016. Doctoral dissertation: Production of biological hydrogen by dark fermentation of lignocellulosic residues: Links between substrate composition and structure of fermentative microbial communities.
- Chatellard, L., Trably, E., Carrère, H., 2016. The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresour. Technol.* 221, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.084>
- Chen, C.K., Blaschek, H.P., 1999. Effect of acetate on molecular and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 499–505. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.499-505.1999>
- 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. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.008>
- Chen, Y., Yin, Y., Wang, J., 2021a. Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 5053–5073. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.096>
- Chen, Y., Yin, Y., Wang, J., 2021b. Influence of butyrate on fermentative hydrogen production and microbial community analysis. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 26825–26833. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.05.185>
- Cho, D.H., Shin, S.J., Kim, Y.H., 2012. Effects of acetic and formic acid on ABE production by *clostridium acetobutylicum* and *clostridium beijerinckii*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17, 270–275. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0498-4>
- Cho, S.K., Jeong, M.W., Choi, Y.K., Shin, J., Shin, S.G., 2018. Effects of low-strength

- ultrasonication on dark fermentative hydrogen production: Start-up performance and microbial community analysis. *Appl. Energy* 219, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.03.047>
- Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Ali, M., Hassan, M.A., 2009. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 3277–3287. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>
- Chou, C.J., Shockley, K.R., Connors, S.B., Lewis, D.L., Comfort, D.A., Adams, M.W.W., Kelly, R.M., 2007. Impact of substrate glycoside linkage and elemental sulfur on bioenergetics of and hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6842–6853. <https://doi.org/10.1128/AEM.00597-07>
- Chung, K.T., 1976. Inhibitory effects of H<sub>2</sub> on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 342–348. <https://doi.org/10.1128/aem.31.3.342-348.1976>
- Cieciura-Włoch, W., Borowski, S., Otlewska, A., 2020. Biohydrogen production from fruit and vegetable waste, sugar beet pulp and corn silage via dark fermentation. *Renew. Energy* 153, 1226–1237. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.085>
- Ciranna, A., Ferrari, R., Santala, V., Karp, M., 2014. Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 6391–6401. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.047>
- Code de l'environnement : Prévention et gestion des déchets (Articles L541-1 à L541-50) [WWW Document], 2022. URL [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section\\_lc/LEGITEXT000006074220/LEGISCTA00006159289/#LEGISCTA000023268618](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006074220/LEGISCTA00006159289/#LEGISCTA000023268618) (accessed 7.18.22).
- Colin, T., Bories, A., Lavigne, C., Moulin, G., 2001. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Curr. Microbiol.* 43, 238–243. <https://doi.org/10.1007/s002840010294>
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S., Jones, D., 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and Some Catalase-Negative , Asporogenous , Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a New Genus *Carnobacterium* 310–316.
- Cope, E.K., Goldberg, A.N., Pletcher, S.D., Lynch, S. V., 2017. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences. *Microbiome* 5, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0266-6>
- Costa, K.C., Yoon, S.H., Pan, M., Burn, J.A., Baliga, N.S., Leigh, J.A., 2013. Effects of H<sub>2</sub> and formate on growth yield and regulation of methanogenesis in *Methanococcus maripaludis*. *J. Bacteriol.* 195, 1456–1462. <https://doi.org/10.1128/JB.02141-12>
- CRYOTEC, n.d. Lyophilisateur cosmos 20k cryotec.
- Dalena, F., Senatore, A., Marino, A., Gordano, A., Basile, M., Basile, A., 2018. Methanol Science and Engineering, in: *Methanol*. Elsevier, pp. 3–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444->



- Daniels, J.A., KRISHNAMURTHI, R., RIZVI, S.S.H., 1985. A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *J. Food Prot.* 48, 532–537. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.6.532>
- Dauplain, K., 2022. Impact des communautés microbiennes et des prétraitements de la matière organique sur les performances de la fermentation sombre.
- Dauplain, K., Schneider, A., Noguer, M., Fontanille, P., Escudie, R., Carrere, H., Trably, E., 2021. Impact of microbial inoculum storage on dark fermentative H<sub>2</sub> production. *Bioresour. Technol.* 319, 124234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124234>
- Dauplain, K., Trably, E., Santa-Catalina, G., Bernet, N., Carrere, H., 2020. Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. *Bioresour. Technol.* 313, 123665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123665>
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., DeVos, P., 2004. Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 50–60. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00250>
- De Giannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Spiga, D., 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 20930–20941. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>
- Desguin, B., Goffin, P., Viaene, E., Kleerebezem, M., Martin-Diaconescu, V., Maroney, M.J., Declercq, J.P., Soumillion, P., Hols, P., 2014. Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4615>
- Desjardins, M.L., Roy, D., Goulet, J., 1990. Growth of *Bifidobacteria* and Their Enzyme Profiles. *J. Dairy Sci.* 73, 299–307. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78673-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78673-0)
- Dessi, P., Porca, E., Frunzo, L., Lakaniemi, A.M., Collins, G., Esposito, G., Lens, P.N.L., 2018a. Inoculum pretreatment differentially affects the active microbial community performing mesophilic and thermophilic dark fermentation of xylose. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 9233–9245. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.117>
- Dessi, P., Porca, E., Waters, N.R., Lakaniemi, A.M., Collins, G., Lens, P.N.L., 2018b. Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidised bed reactors: Biohydrogen production and active microbial community. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 5473–5485. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.158>
- Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., Błaszczuk, M.K., 2019. Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microb. Cell Fact.* 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1085-1>
- Devi, M.P., Mohan, S.V., Mohanakrishna, G., Sarma, P.N., 2010. Regulatory influence of CO<sub>2</sub> supplementation on fermentative hydrogen production process. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10701–10709. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.024>

- Dey, S., Das, P.K., Dey, A., 2013. Mononuclear iron hydrogenase. *Coord. Chem. Rev.* 257, 42–63. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.021>
- Diez-Gonzalez, F., Russell, J.B., Hunter, J.B., 1995. The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Arch. Microbiol.* 164, 36–42.
- Dinamarca, C., Gañán, M., Liu, J., Bakke, R., 2011. H<sub>2</sub> consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Sci. Technol.* 63, 1582. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.214>
- Dincer, I., Acar, C., 2014. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 11094–11111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>
- Dinesh, G.K., Chauhan, R., Chakma, S., 2018. Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.009>
- Dixon, N.M., Kell, D.B., 1989. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 109–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03387.x>
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., Yu, Z., 2008. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031>
- Drake, H.L., 1991. Acetogenesis, Acetogenic Bacteria, and the Acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” Pathway: Past and Current Perspectives.
- Drake, H.L., Gößner, A.S., Daniel, S.L., 2008. Old acetogens, new light. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 100–128. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.016>
- Dreschke, G., Papirio, S., D’ippolito, G., Panico, A., Lens, P.N.L., Esposito, G., Fontana, A., 2019a. H<sub>2</sub>-rich biogas recirculation prevents hydrogen supersaturation and enhances hydrogen production by *Thermotoga neapolitana* cf. *capnolactica*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.022>
- Dreschke, G., Papirio, S., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2019b. Influence of liquid-phase hydrogen on dark fermentation by *Thermotoga neapolitana*. *Renew. Energy* 140, 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.126>
- Drider, D., Dalgaard, P., 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods 31, 592–613. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x>
- Eklund, T., 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 2, 159–167. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90035-2)
- Eklund, T., 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at

- different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 383–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02632.x>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H.S., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Esmailian, S., Rotabakk, B.T., Lerfall, J., Jakobsen, A.N., Abel, N., Sivertsvik, M., Olsen, A., 2021. The use of soluble gas stabilization technology on food – A review. *Trends Food Sci. Technol.* 118, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.015>
- Esquivel-Elizondo, S., Chairez, I., Salgado, E., Aranda, J.S., Baquerizo, G., Garcia-Peña, E.I., 2014. Controlled continuous bio-hydrogen production using different biogas release strategies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1737–1751. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0961-8>
- Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V.M., Carrillo-Reyes, J., Cisneros-Pérez, C., Fuentes, L., Moreno-Andrade, I., Razo-Flores, E., Filippi, G.R., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., Zaiat, M., 2016. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3371–3384. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7325-y>
- Fang, H.H.P., Liu, H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.* 82, 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9)
- Favaro, L., Alibardi, L., Lavagnolo, M.C., Casella, S., Basaglia, M., 2013. Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 11774–11779. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.06.137>
- FCHO, 2020. Chapter 2 Hydrogen molecule market.
- Feng, K., Li, H., Zheng, C., 2018. Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 270, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>
- Ferguson, T.J., Mah, R.A., 1983a. Effect of H<sub>2</sub> -CO<sub>2</sub> on Methanogenesis from Acetate or Methanol in *Methanosarcina* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 348–355. <https://doi.org/10.1128/aem.46.2.348-355.1983>
- Ferguson, T.J., Mah, R.A., 1983b. Effect of H<sub>2</sub> -CO<sub>2</sub> on Methanogenesis from Acetate or Methanol in *Methanosarcina* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 348–355. <https://doi.org/10.1128/aem.46.2.348-355.1983>
- Ferreira, T.B., Rego, G.C., Ramos, L.R., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., de Oliveira, L.L., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2018. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 18908–18917. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.08.177>
- Flores, M.G., Nakhla, G., Hafez, H., 2017. Hydrogen production and microbial kinetics of

*Clostridium termitidis* in mono - culture and co - culture with *Clostridium beijerinckii* on cellulose. AMB Express. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0256-2>

- Fontecilla-camps, J.C., Volbeda, A., Cavazza, C., Nicolet, Y., Fourier, J., 2007. Structure / Function Relationships of [ NiFe ] - and [ FeFe ] -Hydrogenases. Chem. Rev. 107, 4273–4303.
- Fourmond, V., Baffert, C., Sybirna, K., Dementin, S., Abou-Hamdan, A., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., Bottin, H., Léger, C., 2013. The mechanism of inhibition by H<sub>2</sub> of H<sub>2</sub>-evolution by hydrogenases. Chem. Commun. 49, 6840–6842. <https://doi.org/10.1039/c3cc43297a>
- François, E., Dumas, C., Gougeon, R.D., Alexandre, H., Vuilleumier, S., Ernst, B., 2021. Unexpected high production of biohydrogen from the endogenous fermentation of grape must deposits. Bioresour. Technol. 320. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124334>
- Friedlingstein, P., O’Sullivan, M., Jones, M.W., Andrew, R.M., Hauck, J., Olsen, A., Peters, G.P., Peters, W., Pongratz, J., Sitch, S., Le Quéré, C., Canadell, J.G., Ciais, P., Jackson, R.B., Alin, S., Aragão, L.E.O.C., Arneeth, A., Arora, V., Bates, N.R., Becker, M., Benoit-Cattin, A., Bittig, H.C., Bopp, L., Bultan, S., Chandra, N., Chevallier, F., Chini, L.P., Evans, W., Florentie, L., Forster, P.M., Gasser, T., Gehlen, M., Gilfillan, D., Gkritzalis, T., Gregor, L., Gruber, N., Harris, I., Hartung, K., Haverd, V., Houghton, R.A., Ilyina, T., Jain, A.K., Joetzjer, E., Kadono, K., Kato, E., Kitidis, V., Korsbakken, J.I., Landschützer, P., Lefèvre, N., Lenton, A., Lienert, S., Liu, Z., Lombardozzi, D., Marland, G., Metzl, N., Munro, D.R., Nabel, J.E.M.S., Nakaoka, S.I., Niwa, Y., O’Brien, K., Ono, T., Palmer, P.I., Pierrot, D., Poulter, B., Resplandy, L., Robertson, E., Rödenbeck, C., Schwinger, J., Séférian, R., Skjelvan, I., Smith, A.J.P., Sutton, A.J., Tanhua, T., Tans, P.P., Tian, H., Tilbrook, B., Van Der Werf, G., Vuichard, N., Walker, A.P., Wanninkhof, R., Watson, A.J., Willis, D., Wiltshire, A.J., Yuan, W., Yue, X., Zaehle, S., 2020. Global Carbon Budget 2020. Earth Syst. Sci. Data 12, 3269–3340.
- Frigon, J.C., Guiot, S.R., 1995. Impact of liquid-to-gas hydrogen mass transfer on substrate conversion efficiency of an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. Enzyme Microb. Technol. 17, 1080–1086. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00040-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00040-2)
- Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking, 2019. Hydrogen Roadmap Europe: A Sustainable Pathway for the European Energy Transition, 2019. <https://doi.org/10.2843/249013>
- Fuel cells and hydrogen observatory, 2021. Hydrogen supply and demand.
- Gagen, E.J., Padmanabha, J., Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2015. Hydrogenotrophic culture enrichment reveals rumen *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* acetogens and hydrogen-responsive Bacteroidetes from pasture-fed cattle. FEMS Microbiol. Lett. 362, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv104>
- García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E.R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L.C., Martínez-Mendoza, L.J., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., 2021a. A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. Bioresour. Technol. 324. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>
- García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E.R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L.C., Martínez-Mendoza, L.J., Carrillo-Reyes, J.,

- Buitrón, G., 2021b. A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresour. Technol.* 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>
- García-depraect, O., Diaz-cruces, V.F., Rene, E.R., León-Becerril, E., 2020. Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing reactor subjected to substrate- and pH-induced perturbations. *Bioresour. Technol.* 295, 122182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122182>
- García-depraect, O., León-becerril, E., 2018. Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate- acetate pathway : Operational performance , kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel* 234, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>
- García-Depraect, O., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E.R., León-Becerril, E., 2020. Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *Int. J. Hydrogen Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.209>
- García-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Gerritsen, J., n.d. The genus *Romboutsia* Genomic and functional characterization of novel The genus *Romboutsia* Genomic and functional characterization of novel.
- Gervasi, T., Lo Curto, R., Minniti, E., Narbad, A., Mayer, M.J., 2014. Application of *Lactobacillus johnsonii* expressing phage endolysin for control of *Clostridium perfringens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 355–361. <https://doi.org/10.1111/lam.12298>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy* 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- GIEC, 2018. Résumé à l'intention des décideurs, Réchauffement planétaire de 1,5°C, Rapport spécial du GIEC, Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat.
- Global Hydrogen Review, 2021. , International energy agency. <https://doi.org/10.1787/39351842-en>
- Glossary Eurostat: Final energy consumption [WWW Document], 2018. URL [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Glossary:Final\\_energy\\_consumption](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Glossary:Final_energy_consumption) (accessed 8.22.22).
- Godwin, S., Kang, A., Gulino, L.M., Manefield, M., Gutierrez-Zamora, M.L., Kienzle, M., Ouwerkerk, D., Dawson, K., Klieve, A. V., 2014. Investigation of the microbial metabolism of carbon dioxide and hydrogen in the kangaroo foregut by stable isotope probing. *ISME J.* 8, 1855–1865. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.25>
- Goud, R.K., Sarkar, O., Chiranjeevi, P., Venkata Mohan, S., Mohan, S.V., 2014. Bioaugmentation of potent acidogenic isolates: A strategy for enhancing biohydrogen

- production at elevated organic load. *Bioresour. Technol.* 165, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.049>
- Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L.C., Morales, S.E., McDonald, M.J., Rushton-Green, R., Morgan, X.C., Koike, S., Leahy, S.C., Kelly, W.J., Cann, I., Attwood, G.T., Cook, G.M., Mackie, R.I., 2019. Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *ISME J.* 13, 2617–2632. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>
- Greses, S., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., 2021. Short-chain fatty acids and hydrogen production in one single anaerobic fermentation stage using carbohydrate-rich food waste. *J. Clean. Prod.* 284. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124727>
- Groher, A., Weuster-Botz, D., 2016. General medium for the autotrophic cultivation of acetogens. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39, 1645–1650. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1634-5>
- Guo, X.M., 2012. Biohydrogen production and metabolic pathways in dark fermentation related to the composition of organic solid waste 247.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J.P., 2014. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 7476–7485. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.079>
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., Steyer, J.-P.P., Carrère, H., Steyer, J.-P.P., Carrre, H., Steyer, J.-P.P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Nagggar, M.H., Elbeshbishy, E., Baghchehsaraee, B., 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>
- Hallenbeck, P.C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7379–7389. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- Hallenbeck, P.C., Abo-Hashesh, M., Ghosh, D., 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 110, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.103>
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1185–1193. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3)
- Hamad, G.M., Abdelmotilib, N.M., Darwish, A.M.G., Zeitoun, A.M., 2020. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of *Clostridium perfringens* poultry meat infection in Egypt. *Anaerobe* 62, 102181. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102181>
- Harris, 2022. Les français et l'hydrogène : enquête harris interactive pour TEREKA [WWW

Document]. URL [https://harris-interactive.fr/opinion\\_polls/les-francais-et-lenergie-hydrogene/](https://harris-interactive.fr/opinion_polls/les-francais-et-lenergie-hydrogene/)

- Hassan, G.K., Jones, R.J., Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R., Abo-Aly, M.M., El-Gohary, F.A., Guwy, A., 2021. Increasing  $H_2$  and  $CH_4$  production from food waste by combining two-stage anaerobic digestion and electro dialysis for continuous volatile fatty acids removal. *Waste Manag.* 129, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.05.006>
- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>
- Heinekey, D.M., 2009. Hydrogenase enzymes: Recent structural studies and active site models. *J. Organomet. Chem.* 694, 2671–2680. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2009.03.047>
- Heo, S., Kim, M.G., Kwon, M., Lee, H.S., Kim, G.B., 2018. Inhibition of *Clostridium perfringens* using bacteriophages and bacteriocin producing strains. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 38, 88–98. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.1.88>
- Herrero, A.A., Gomez, R.F., Snedecor, B., Tolman, C.J., Roberts, M.F., 1985. Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids : A mechanism based on uncoupling by weak acids 53–62.
- Heuvel, J.C. Van Den, Beeftink, H.H., Verschuren, P.G., 1988. Inhibition of the acidogenic dissimilation of glucose in anaerobic continuous cultures by free butyric acid 1, 89–94.
- Heyndrickx, M., De Vos, P., Vancanneyt, M., De Ley, J., 1991. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 637–642. <https://doi.org/10.1007/BF00167914>
- Hillion, M. Lou, Moscoviz, R., Trably, E., Leblanc, Y., Bernet, N., Torrijos, M., Escudí, R., 2018. Co-ensiling as a new technique for long-term storage of agro-industrial waste with low sugar content prior to anaerobic digestion. *Waste Manag.* 71, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.024>
- Hirshfield, I.N., Terzulli, S., O’Byrne, C., 2003. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci. Prog.* 86, 245–269. <https://doi.org/10.3184/003685003783238626>
- Huang, J., Zhao, Y., Lei, C., Liu, Y., Wang, Y., 2021. The effect of reduced pressure and glucose concentration on hydrogen and volatile fatty acid yield: The role of homoacetogenesis. *Bioresour. Technol.* 329, 124830. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124830>
- Huang, Y., Zong, W., Yan, X., Wang, R., Hemme, C.L., Zhou, J., Zhou, Z., 2010. Succession of the Bacterial Community and Dynamics of Hydrogen Producers in a Hydrogen-Producing Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3387–3390. <https://doi.org/10.1128/AEM.02444-09>
- Huang, Z., Yu, X., Miao, H., Ren, H., Zhao, M., Ruan, W., 2012. Enzymatic dynamics of microbial acid tolerance response (ATR) during the enhanced biohydrogen production process via anaerobic digestion. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 10655–10662. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.116>

- Hung, C.H., Chang, Y.T., Chang, Y.J., 2011. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresour. Technol.* 102, 8437–8444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084>
- Hüsemann, M.H.W., Papoutsakis, E.T., 1988. Solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* fermentations related to carboxylic acid and proton concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 843–852. <https://doi.org/10.1002/bit.260320702>
- Hye, J., Ok, C., Sung, D., Moon, J., Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, D.S., Park, J.M., 2007. Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *J. Biotechnol.* 131, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.492>
- Infantes, D., González del Campo, A., Villaseñor, J., Fernández, F.J., 2011. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 15595–15601. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.061>
- Innovation for Cool Earth Forum, 2019. Industrial heat decarbonization roadmap.
- International Energy Agency, 2021. Net Zero by 2050.
- International Energy Agency, 2019a. The Future of Hydrogen: Seizing today's opportunities.
- International Energy Agency, 2019b. The Future of Rail - Opportunities for energy and the environment. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264312821-en>
- International Renewable Energy Agency, 2019. Hydrogen : a renewable energy perspective.
- International Renewable Energy Agency, 2018. Hydrogen from renewable power: Technology outlook for the energy transition.
- IPCC, 2022. Climate Change 2022 - Mitigation of Climate Change. <https://doi.org/10.1201/9781003264705-7>
- IRENA, 2022. Global hydrogen trade to meet the 1.5 °C climate goal: Part II – Technology review of hydrogen carriers.
- Jarunglumert, T., Prommuak, C., Putmai, N., Pavasant, P., 2018. Scaling-up bio-hydrogen production from food waste: Feasibilities and challenges. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 634–648. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.013>
- Jay, Z.J., Hunt, K.A., Chou, K.J., Schut, G.J., Maness, P.C., Adams, M.W.W., Carlson, R.P., 2020. Integrated thermodynamic analysis of electron bifurcating [FeFe]-hydrogenase to inform anaerobic metabolism and H<sub>2</sub> production. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1861, 148087. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148087>
- Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., Park, J.M., 2008. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresour. Technol.* 99, 6666–6672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.067>
- Jung, K.W., Kim, D.H., Kim, S.H., Shin, H.S., 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8612–8620.



<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.056>

- Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-Fraté, H., Ludwig, J., Kschischo, M., 2010. Grofit: Fitting biological growth curves with R. *J. Stat. Softw.* 33, 1–21. <https://doi.org/10.18637/jss.v033.i07>
- Kandler, O., Schillinger, U., Weiss, N., 1983. *Lactobacillus bifermentans* sp. nov., nom. rev., an Organism Forming CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> from Lactic Acid. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 408–412. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80025-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80025-3)
- Karatza, D., Konstantopoulos, C., Chianese, S., Diplas, S., Svec, P., Hristoforou, E., Musmarra, D., 2021. Hydrogen production through water splitting at low temperature over Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pellet: Effects of electric power, magnetic field, and temperature. *Fuel Process. Technol.* 211, 106606. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106606>
- Kataoka, N., Miya, A., Kiriya, K., 1997. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Sci. Technol.* 36, 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00505-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00505-2)
- 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. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 524–530. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.524>
- Key World Energy Statistics 2020, 2020. , International energy agency.
- Khor, W.C., Roume, H., Coma, M., Vervaeren, H., Rabaey, K., 2016. Acetate accumulation enhances mixed culture fermentation of biomass to lactic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8337–8348. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7578-5>
- Kim, D.-H., Kim, S.-H., Jung, K.-W., Kim, M.-S., Shin, H.-S., 2011. Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 102, 8646–8652. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.030>
- Kim, D.-H.H., Han, S.-K.K., Kim, S.-H.H., Shin, H.-S.S., 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 2158–2169. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.012>
- Kim, D.H., Jang, S., Yun, Y.M., Lee, M.K., Moon, C., Kang, W.S., Kwak, S.S., Kim, M.S., 2014. Effect of acid-pretreatment on hydrogen fermentation of food waste: Microbial community analysis by next generation sequencing. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 16302–16309. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.004>
- Kim, D.H., Kim, M.S., 2011. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8423–8431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113>
- Kim, D.H., Shin, H.S., Kim, S.H., 2012. Enhanced H<sub>2</sub> fermentation of organic waste by CO<sub>2</sub> sparging. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15563–15568. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.071>
- Kim, D.H., Wu, J., Jeong, K.W., Kim, M.S., Shin, H.S., 2011. Natural inducement of hydrogen from food waste by temperature control. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 10666–10673.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.153>

- Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem.* 41, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.013>
- Kim, T.H., Lee, Y., Chang, K.H., Hwang, S.J., 2012. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresour. Technol.* 103, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.093>
- Kirubakaran, a, Jain, S., Nema, R.K., 2009. The PEM Fuel Cell System with DC/DC Boost Converter: Design, Modeling and Simulation. *Int. J. Recent Trends Eng.* 1, 157–161.
- Kisielewska, M., Dębowski, M., Zieliński, M., Zielin, M., 2015. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 1925–1933. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1434-3>
- Kolb, B., Ettre, L.S., 2006. Front Matter, in: *Static Headspace–Gas Chromatography*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471914584.fmatter>
- Kolbeck, S., Ludwig, C., Meng, C., Hilgarth, M., Vogel, R.F., 2020. Comparative Proteomics of Meat Spoilage Bacteria Predicts Drivers for Their Coexistence on Modified Atmosphere Packaged Meat. *Front. Microbiol.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00209>
- Kotay, S.M., Das, D., 2007. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 98, 1183–1190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.009>
- Kovanda, L., Zhang, W., Wei, X., Luo, J., Wu, X., Atwill, E.R., Vaessen, S., Li, X., Liu, Y., 2019. In Vitro Antimicrobial Activities of Organic Acids and Their Derivatives on Several Species of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Molecules* 24, 3770. <https://doi.org/10.3390/molecules24203770>
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Kraemer, J., Bagley, D., 2008. Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6558–6565. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.033>
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2008. Measurement of H<sub>2</sub> consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production. *Water Sci. Technol.* 57, 681–685. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.066>
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2006. Supersaturation of dissolved H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> during fermentative hydrogen production with N<sub>2</sub> sparging. *Biotechnol. Lett.* 28, 1485–1491. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9114-7>
- Kumar, G., Park, J.H., Sivagurunathan, P., Lee, S.H., Park, H.D., Kim, S.H., 2017. Microbial responses to various process disturbances in a continuous hydrogen reactor fed with

- galactose. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.08.006>
- Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kuroda, K., Gaiger Silveira, R., Nishio, N., Sunahara, H., Nagai, S., 1991. Measurement of dissolved hydrogen in an anaerobic digestion process by a membrane-covered electrode. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 418–423. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90254-E](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90254-E)
- Kurokawa, T., Tanisho, S., 2005. Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Mar. Biotechnol.* 7, 112–118. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-3088-z>
- Kyazze, G., Martinez-Perez, N., Dinsdale, R., Premier, G.C., Hawkes, F.R., Guwy, A.J., Hawkes, D.L., 2006. Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 971–979. <https://doi.org/10.1002/bit.20802>
- Lakatos, G., 2018. Biological wastewater treatment, Wastewater and Water Contamination: Sources, Assessment and Remediation. <https://doi.org/10.1201/b18368-4>
- Lanzillo, F., Ruggiero, G., Raganati, F., Russo, M.E., Marzocchella, A., 2020. Batch syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans* for production of acids and alcohols. *Processes* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3390/pr8091075>
- Laurinavichene, T., Laurinavichius, K., Shastik, E., Tsygankov, A., 2018. Long-term H<sub>2</sub> photoproduction from starch by co-culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* in a repeated batch process. *Biotechnol. Lett.* 40, 309–314. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2486-z>
- Lazaro, C.Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesche, M.B.A., 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 6407–6418. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.058>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Leclerc, M., Elfoul-Bensaid, L., Bernalier, A., 1998. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Metabolism in Acetogenic Bacteria Isolated From the Human Colon. *Curr. Microbiol.* 37, 166–171. <https://doi.org/10.1007/s002849900358>
- Lee, K.S., Tseng, T.S., Liu, Y.W., Hsiao, Y.D., 2012. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15556–15562. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.039>
- Lee, Y.J., Miyahara, T., Noike, T., 2002. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 694–698. <https://doi.org/10.1002/jctb.623>
- Lertsriwong, S., Glinwong, C., 2020. Newly-isolated hydrogen-producing bacteria and biohydrogen production by *Bacillus coagulans* MO11 and *Clostridium beijerinckii* CN on

- molasses and agricultural wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 26812–26821. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.032>
- Lesteur, M., Latrille, E., Maurel, V.B., Roger, J.M., Gonzalez, C., Junqua, G., Steyer, J.P., 2011. First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* 102, 2280–2288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.044>
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M., 2004. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)
- Li, C., Fang, H.H.P., 2007. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Li, S.L., Kuo, S.C., Lin, J.S., Lee, Z.K., Wang, Y.H., Cheng, S.S., 2008. Process performance evaluation of intermittent-continuous stirred tank reactor for anaerobic hydrogen fermentation with kitchen waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1522–1531. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.049>
- Li, S.L., Lin, J.S., Wang, Y.H., Lee, Z.K., Kuo, S.C., Tseng, I.C., Cheng, S.S., 2011. Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresour. Technol.* 102, 8682–8687. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.067>
- Li, S.Y., Srivastava, R., Suib, S.L., Li, Y., Parnas, R.S., 2011. Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control. *Bioresour. Technol.* 102, 4241–4250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.078>
- Li, Z., Liu, B., Cui, H., Ding, J., Li, H., Xie, G., Ren, N., Xing, D., 2019. The complete genome sequence of *Ethanoligenens harbinense* reveals the metabolic pathway of acetate-ethanol fermentation: A novel understanding of the principles of anaerobic biotechnology. *Environ. Int.* 131, 105053. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105053>
- Linger, J.G., Ford, L.R., Ramnath, K., Guarnieri, M.T., 2020. Development of *Clostridium tyrobutyricum* as a Microbial Cell Factory for the Production of Fuel and Chemical Intermediates From Lignocellulosic Feedstocks. *Front. Energy Res.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00183>
- Liu, C., Li, J., Zhang, Y., Philip, A., Shi, E., Chi, X., Meng, J., 2015. Influence of glucose fermentation on CO<sub>2</sub> assimilation to acetate in homoacetogen *Blautia coccooides* GA-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 1217–1224. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1646-1>
- Liu, D., Min, B., Angelidaki, I., 2008. Biohydrogen production from household solid waste (HSW) at extreme-thermophilic temperature (70 °C) - Influence of pH and acetate concentration. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6985–6992. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.059>
- Liu, H., Wang, G., 2012. Hydrogen production of a salt tolerant strain *Bacillus* sp. B2 from marine intertidal sludge 31–37. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0789-0>

- Liu, W., Zuo, H., Wang, J., Xue, Q., Ren, B., Yang, F., 2020. The production and application of hydrogen in steel industry. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 10548–10569. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.12.123>
- Liu, Y., Wang, Y., 2017. Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 4095–4101. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.083>
- Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, Lang, Wang, Linjun, Han, B., Xing, X.H., 2013. States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresour. Technol.* 135, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.027>
- Ljunggren, M., Willquist, K., Zacchi, G., Van Niel, E.W.J., 2011. A kinetic model for quantitative evaluation of the effect of hydrogen and osmolarity on hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Biofuels* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-31>
- Lmg, C., Soby, S.D., 2009. Draft Genome Sequence of the Butanoic Acid-Producing Bacterium *Clostridium luticellarii* DSM 29923, Used for Strong Aromatic Chinese Liquor Production 5, 1–2.
- Logan, B.E., Oh, S.E., Kim, I.S., Van Ginkel, S., 2002. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2530–2535. <https://doi.org/10.1021/es015783i>
- Lopez-Hidalgo, A.M., Smoliński, A., Sanchez, A., 2022. A meta-analysis of research trends on hydrogen production via dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 47, 13300–13339. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.106>
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Lu, Y., Slater, F.R., Mohd-Zaki, Z., Pratt, S., Batstone, D.J., 2011. Impact of operating history on mixed culture fermentation microbial ecology and product mixture. *Water Sci. Technol.* 64, 760–765. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.699>
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., Kamiński, M., 2018. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Macías-muro, M., Arellano-garcía, L., Vel, J.B., Marino-marmolejo, E.N., 2021. Continuous hydrogen production and microbial community profile in the dark fermentation of tequila vinasse : Response to increasing loading rates and immobilization of biomass 172. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108049>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A.R.N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., Lopez, R., 2022. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* 50, W276–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
- Magdalena, J.A., Greses, S., González-Fernández, C., 2020. Anaerobic degradation of protein-

- rich biomass in an UASB reactor: Organic loading rate effect on product output and microbial communities dynamics. *J. Environ. Manage.* 274, 111201. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111201>
- Mainardis, M., Buttazzoni, M., Goi, D., 2020. Up-flow anaerobic sludge blanket (Uasb) technology for energy recovery: A review on state-of-the-art and recent technological advances. *Bioengineering* 7. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020043>
- Malbrunot, P., 2020. Mémento de l' Hydrogène 2–5.
- Mallette, M.F., Reece, P., Dawes, E.A., 1974. Culture of *Clostridium pasteurianum* in Defined Medium and Growth as a Function of Sulfate Concentration1. *Appl. Microbiol.* 28, 999–1003. <https://doi.org/10.1128/am.28.6.999-1003.1974>
- Mandal, B., Nath, K., Das, D., 2006. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* 28, 831–835. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9008-8>
- Manoharan, Y., Hosseini, S.E., Butler, B., Alzahrani, H., Senior, B.T.F., Ashuri, T., Krohn, J., 2019. Hydrogen fuel cell vehicles; Current status and future prospect. *Appl. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3390/app9112296>
- Marcelo Navarro-Díaz a, c, Valeria Aparicio-Trejo a, Idania Valdez-Vazquez b, Julián Carrillo-Reyes b, 4 Morena Avitia a, A.E.E., 2022. Variations in microbial diversity affect the stability and function of dark fermentation bioreactors 2 1–38.
- Marchal, R., Vandecasteele, J.P., 1990. Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*: effect of end-product inhibition 127–131.
- 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. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 10690–10700. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.008>
- Marone, A., Izzo, G., Mentuccia, L., Massini, G., Paganin, P., Rosa, S., Varrone, C., Signorini, A., 2014. Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. *Renew. Energy* 68, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.01.013>
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D., De Souza Oliveira, R.P., 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol. Adv.* 31, 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.010>
- Massanet-nicolau, J., Guwy, A., Dinsdale, R., Premier, G., Esteves, S., 2010. Production of hydrogen from sewage biosolids in a continuously fed bioreactor : Effect of hydraulic retention time and sparging. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.076>
- Massanet-Nicolau, J., Jones, R.J., Guwy, A., Dinsdale, R., Premier, G., Mulder, M.J.J., 2016. Maximising biohydrogen yields via continuous electrochemical hydrogen removal and carbon dioxide scrubbing. *Bioresour. Technol.* 218, 512–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.115>

- Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., Thonart, P., 2010. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 3371–3378. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.01.061>
- Masterflex, 2022. Masterflex® Vacuum/Suction Lift Data [WWW Document]. URL <https://www.masterflex.com/tech-article/masterflex-vacuum-suction-lift-data#anchor1> (accessed 8.17.22).
- Matsui, H., Mimura, A., Maekawa, S., Ban-Tokuda, T., 2019. Effects of feed intake on the diversity and population density of homoacetogens in the large intestine of pigs. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 32, 1907–1913. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0512>
- Matsumoto, M., Nishimura, Y., 2007. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 236–241. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.236>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Milnovich, G.J., Burrell, P.C., Pollitt, C.C., Klieve, A. V., Blackall, L.L., Ouwkerk, D., Woodland, E., Trott, D.J., 2008. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *ISME J.* 2, 1089–1100. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.67>
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* 73, 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00130-3)
- Mıynat, M.E., Argun, H., 2020. Prevention of substrate and product inhibitions by using a dilution strategy during dark fermentative hydrogen production from molasses. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 34695–34706. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.03.118>
- Mollah, A.H., Stuckey, D.C., 1992. The influence of H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and dilution rate on the continuous fermentation of acetone-butanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 533–538. <https://doi.org/10.1007/BF00240720>
- Montiel Corona, V., Razo-Flores, E., 2018. Continuous hydrogen and methane production from *Agave tequilana* bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Montoya-Rosales, J. de J., Palomo-Briones, R., Celis, L.B., Etchebehere, C., Cházaro-Ruiz, L.F., Escobar-Barrios, V., Razo-Flores, E., 2022. Coping with mass transfer constrains in dark fermentation using a two-phase partitioning bioreactor. *Chem. Eng. J.* 445, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136749>
- Moon, C., Jang, S., Yun, Y.M., Lee, M.K., Kim, D.H., Kang, W.S., Kwak, S.S., Kim, M.S., 2015. Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.* 179, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.128>
- Morra, S., Arizzi, M., Allegra, P., La Licata, B., Sagnelli, F., Zitella, P., Gilardi, G., Valetti, F., 2014. Expression of different types of [FeFe]-hydrogenase genes in bacteria isolated from a

- population of a bio-hydrogen pilot-scale plant. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 9018–9027. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.009>
- Morra, S., Mongili, B., Maurelli, S., Gilardi, G., Valetti, F., 2016. Isolation and characterization of a new [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium perfringens*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63, 305–311. <https://doi.org/10.1002/bab.1382>
- Moscoviz, R., 2017. Contrôle d'un bioprocédé par voie électrochimique : électro-fermentation du glycérol.
- Mota, V.T., Ferraz Júnior, A.D.N., Trably, E., Zaiat, M., 2018. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Res.* 128, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>
- Mudgett, R.E., 1980. Controlled gas environments in industrial fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 2, 273–280. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(80\)90096-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(80)90096-4)
- Mugnai, G., Borruso, L., Mimmo, T., Cesco, S., Luongo, V., Frunzo, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., Cappitelli, F., Villa, F., 2021. Dynamics of bacterial communities and substrate conversion during olive-mill waste dark fermentation : Prediction of the metabolic routes for hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 319, 124157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124157>
- Nasr, N., Velayutham, P., Elbeshbishy, E., Nakhla, G., El Nagggar, M.H., Khafipour, E., Derakhshani, H., Levin, D.B., Hafez, H., 2015. Effect of headspace carbon dioxide sequestration on microbial biohydrogen communities. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 9966–9976. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.077>
- Navigant, 2019. The optimal role for gas in a net-zero emissions energy system.
- Nicolaou, S.A., Gaida, S.M., Ñ, E.T.P., Papoutsakis, E.T., 2010. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing : From biofuels and chemicals , to biocatalysis and bioremediation. *Metab. Eng.* 12, 307–331. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.03.004>
- Nikolaidis, P., Poullikkas, A., 2017. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 67, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>
- Nikrad, M.P., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M., 2016. The subzero microbiome: Microbial activity in frozen and thawing soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw081>
- Noblecourt, A., 2017. Etude sur l'effet de l'accumulation d'acides gras volatils au cours d' un procédé de production d'hydrogène par voie biologique anaérobie, mise au point et utilisation d'un bioréacteur à membrane.
- Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., Fontanille, P., 2018. Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresour. Technol.* 247, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.199>
- Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., Santa-Catalina, G., Trably, E., Fontanille, P., 2017. High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *Int. J.*



- Hydrogen Energy 42, 24656–24666. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.037>
- Noguer, M.C., Escudié, R., Bernet, N., Trably, E., 2022. Populational and metabolic shifts induced by acetate , butyrate and lactate in dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.163>
- Nunes Ferraz Júnior, A.D., Pages, C., Latrille, E., Bernet, N., Zaiat, M., Trably, E., Ferraz, N., Latrille, E., Bernet, N., Zaiat, M., Trably, E., 2020. Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen production rate and yield. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 11011–11023. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.064>
- Oh, S.E., Zuo, Y., Zhang, H., Guiltinan, M.J., Logan, B.E., Regan, J.M., 2009. Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 9347–9353. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.084>
- Oshiro, M., Hanada, K., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2010. Efficient conversion of lactic acid to butanol with pH-stat continuous lactic acid and glucose feeding method by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1177–1185. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2673-5>
- Osman, A.I., Deka, T.J., Baruah, D.C., Rooney, D.W., 2020. Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks. *Biomass Convers. Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00965-x>
- Ottesen, E., 2009. Molecular Community Analysis of Acetogenic Bacteria in the Guts of Higher Termites : Community Structure in Termites with Diverse Feeding Strategies.
- Ottesen, E.A., Leadbetter, J.R., 2011. Formyltetrahydrofolate synthetase gene diversity in the guts of higher termites with different diets and lifestyles. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3461–3467. <https://doi.org/10.1128/AEM.02657-10>
- Owen, W.F., 1986. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Ugeskr. Laeger* 148, 3443–3446.
- Paillet, F., Barrau, C., Escudié, R., Trably, E., 2020. Inhibition by the ionic strength of hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 5854–5863. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.019>
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* 74, 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Palomo-Briones, R., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Trably, E., Razo-Flores, E., 2019. Enhancement of mass transfer conditions to increase the productivity and efficiency of dark fermentation in continuous reactors. *Fuel* 254, 115648. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115648>
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., Trably, E., 2017. Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Appl. Energy* 198, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051>

- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N.E., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Razo-Flores, E., 2018. Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium-Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2465–2475. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8737-7>
- Pampulha, M.E., 1990. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid 375–380.
- Park, J.O., Liu, N., Holinski, K.M., Emerson, D.F., Qiao, K., Woolston, B.M., Xu, J., Lazar, Z., Islam, M.A., Vidoudez, C., Girguis, P.R., Stephanopoulos, G., 2019. Synergistic substrate cofeeding stimulates reductive metabolism. *Nat. Metab.* 1, 643–651. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0077-0>
- Park, W., Hyun, S.H., Oh, S.-E., Logan, B.E., Kim, I.S., 2005. Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases biological hydrogen production. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4416–4420. <https://doi.org/10.1021/es048569d>
- Parkash, S., 2003. *Refining Processes Handbook - Chapter 2 : Distillate Hydrotreating* 29–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-075067721-9/50002-5>
- Parthiba Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H., 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresour. Technol.* 249, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.105>
- Patel, S.K.S., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H.J., Lee, J., Kalia, V.C., 2014. Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 14663–14668. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.084>
- Pauss, A., Andre, G., Perrier, M., Guiot, S.R., 1990. Liquid-to-Gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1636–1644.
- Pauss, A., Guiot, S.R., 1993. Hydrogen monitoring in anaerobic sludge bed reactors at various hydraulic regimes and loading rates. *Water Environ. Res.* 65, 276–280. <https://doi.org/10.2175/wer.65.3.13>
- Pawar, S.S., Van Niel, E.W.J., Niel, E.W.J. Van, 2013. Thermophilic biohydrogen production: How far are we? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7999–8009. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5141-1>
- Payot, S., Guedon, E., Gelhaye, E., Petitdemange, H., 1999. Induction of lactate production associated with a decrease in NADH cell content enables growth resumption of *Clostridium cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose. *Res. Microbiol.* 150, 465–473. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)00110-2)
- Pérez-rangel, M., Barboza-corona, J.E., Navarro-díaz, M., Escalante, A.E., Valdez-vazquez, I., 2021. The duo *Clostridium* and *Lactobacillus* linked to hydrogen production from a lignocellulosic substrate. *Water Sci. Technol.* 83, 3033–3040. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.186>
- Pérez-Rangel, M., Valdez-Vazquez, I., Martínez-Zavala, S.A., Casados-Vázquez, L.E., Bideshi, D.K., Barboza-Corona, J.E., 2022. Evaluation of inhibitory compounds produced by

- bacteria isolated from a hydrogen-producing bioreactor during the self-fermentation of wheat straw. *J. Appl. Microbiol.* 133, 1989–2001. <https://doi.org/10.1111/jam.15708>
- Persson, M., Svenarud, P., Flock, J.I., Van Der Linden, J., 2005. Carbon dioxide inhibits the growth rate of *Staphylococcus aureus* at body temperature. *Surg. Endosc. Other Interv. Tech.* 19, 91–94. <https://doi.org/10.1007/s00464-003-9334-z>
- Plangklang, P., Reungsang, A., Pattra, S., 2012. Enhanced bio-hydrogen production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15525–15532. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.186>
- Poirier, S., Steyer, J.P., Bernet, N., Trably, E., 2020. Mitigating the variability of hydrogen production in mixed culture through bioaugmentation with exogenous pure strains. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 2617–2626. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.116>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2011. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* 6, 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Prabhu, R., Altman, E., Eitemana, M.A., 2012. Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8564–8570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02443-12>
- Pratt, S., Liew, D., Batstone, D.J., Werker, A.G., Morgan-Sagastume, F., Lant, P.A., 2012. Inhibition by fatty acids during fermentation of pre-treated waste activated sludge. *J. Biotechnol.* 159, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.02.001>
- Press release Hydrogen Council, 2017. Hydrogen, Scaling Up - Hydrogen Council. <https://hydrogencouncil.com/en/>.
- Pu, Y., Tang, J., Wang, X.C., Hu, Y., Huang, J., Zeng, Y., Ngo, H.H., Li, Y., 2019. Hydrogen production from acidogenic food waste fermentation using untreated inoculum: Effect of substrate concentrations. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 27272–27284. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.230>
- QSE Consult SARL, EREP SA, E.E. pour l'ADEME., 2021. Les solutions de déconditionnement des biodéchets emballés et leurs performances.
- Québec, C. de la science de la biodiversité du, n.d. Distances and Ordination [WWW Document]. URL [https://wiki.qcbs.ca/\\_media/lecture6a\\_distances\\_ordination.pdf](https://wiki.qcbs.ca/_media/lecture6a_distances_ordination.pdf) (accessed 9.11.22).
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.P., Trably, E., 2011. Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 3870–3879. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.100>
- Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Ortoni, M.T., Steyer, J.P., 2013. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 4975–4985. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.008>
- Ramírez-Morales, J.E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., Ruiz-Filippi, G., 2015.

- Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Sci. Technol.* 71, 1271–1285. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B.E., Zhao, L., Xie, T., Zhao, X., 2007. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ. Microbiol.* 9, 1112–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01234.x>
- Repaske, R., Repaske, A.C., Mayer, R.D., 1974. Carbon dioxide control of lag period and growth of *Streptococcus sanguis*. *J. Bacteriol.* 117, 652–659. <https://doi.org/10.1128/jb.117.2.652-659.1974>
- Reungsang, A., Sreela-Or, C., Plangkang, P., 2013. Non-sterile bio-hydrogen fermentation from food waste in a continuous stirred tank reactor (CSTR): Performance and population analysis. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 15630–15637. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.138>
- Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Amezquita-García, H.J., Cano-Gómez, J.J., Magnin, J.P., Rivas-García, P., 2019. Evaluation of feeding strategies in upflow anaerobic sludge bed reactor for hydrogenogenesis at psychrophilic temperature. *Int. J. Hydrogen Energy* 4, 12346–12355. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.215>
- Roe, A.J., O’Byrne, C., McLaggan, D., Booth, I.R., 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: A problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 148, 2215–2222. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2215>
- Russell, J.B., 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x>
- Ryan, P., McHugh, S., Golden, T., Colleran, E., 2006. INVESTIGATION OF HOMOACETOGENIC BACTERIAL ACTIVITY DURING MESOPHILIC, THERMOPHILIC AND PSYCHROPHILIC ANAEROBIC DIGESTION, ESAI Colloquium Proceedings 2005.
- Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Sabino, Y.N.V., Fochat, R.C., Lima, J.C.F., Ribeiro, M.T., Arcuri, P.B., da Costa Carneiro, J., Machado, M.A., de Lima Reis, D.R., Ferreira Machado, A.B., Húngaro, H.M., Ribeiro, J.B., Paiva, A.D., 2019. Antibacterial activity and lantibiotic post-translational modification genes in *Streptococcus* spp. isolated from ruminal fluid. *Ann. Microbiol.* 69, 131–138. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1407-2>
- Salem, A.H., Brunstermann, R., Mietzel, T., Widmann, R., 2018. Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 4856–4865. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.114>
- Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y., Logan, B.E., 2006. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res.* 40, 1167–1172. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.024>
- Sánchez-Andrea, I., Guedes, I.A., Hornung, B., Boeren, S., Lawson, C.E., Sousa, D.Z., Bar-Even,

- A., Claassens, N.J., Stams, A.J.M., 2020. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nat. Commun.* 11, 5090. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18906-7>
- Sander, R., 2015. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 4399–4981. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Saravanane, R., Murthy, D.V.S., 2000. Application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment: a review. *Environ. Manag. Heal.* 11, 97–117. <https://doi.org/10.1108/09566160010321424>
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schuchmann, K., Müller, V., 2016. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4056–4069. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-16>
- Schuerger, A.C., Nicholson, W.L., 2006. Interactive effects of hypobaria, low temperature, and CO<sub>2</sub> atmospheres inhibit the growth of mesophilic *Bacillus* spp. under simulated martian conditions. *Icarus* 185, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2006.06.014>
- Sedewitz, B., Schleifer, K.H., Gotz, F., 1984. Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 160, 462–465. <https://doi.org/10.1128/jb.160.1.462-465.1984>
- Shafaat, H.S., Rüdiger, O., Ogata, H., Lubitz, W., 2013. [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 986–1002. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.015>
- Shen, G.J., Annous, B.A., Lovitt, R.W., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1996. Biochemical route and control of butyrate synthesis in *Butyribacterium methylotrophicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 355–362. <https://doi.org/10.1007/s002530050696>
- Singh, A., Müller, B., Fuxelius, H.H., Schnürer, A., 2019. AcetoBase: a functional gene repository and database for formyltetrahydrofolate synthetase sequences. *Database (Oxford)*. 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1093/database/baz142>
- Singh, A., Nylander, J.A.A., Schnürer, A., Bongcam-Rudloff, E., Müller, B., 2020. High-Throughput Sequencing and Unsupervised Analysis of Formyltetrahydrofolate Synthetase (FTHFS) Gene Amplicons to Estimate Acetogenic Community Structure. *Front. Microbiol.* 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02066>
- Singh, S., Jain, S., Ps, V., Tiwari, A.K., Nouni, M.R., Pandey, J.K., Goel, S., 2015. Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 51, 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.040>
- Singh, T., Alhazmi, A., Mohammad, A., Srivastava, N., Haque, S., Sharma, S., Singh, R., Yoon, T., Gupta, V.K., 2021. Integrated biohydrogen production via lignocellulosic waste:

- Opportunity, challenges & future prospects. *Bioresour. Technol.* 338, 125511. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125511>
- Siqueira, M.R., Reginatto, V., 2015. Inhibition of fermentative H<sub>2</sub> production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. *Renew. Energy* 80, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.070>
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S.H., Kobayashi, T., Xu, K.Q., Lakner, G., Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2016. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 3820–3836. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- Sivagurunathan, P., Sen, B., Lin, C.Y., 2014. Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 19232–19241. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.260>
- Slonczewski, J.L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T.A., 2009. Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea, *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05501-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05501-5)
- Song, Z.X., Li, W.W., Li, X.H., Dai, Y., Peng, X.X., Fan, Y.T., Hou, H.W., 2013. Isolation and characterization of a new hydrogen-producing strain *Bacillus* sp. FS2011. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 3206–3212. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.001>
- Sonnleitner, A., Peintner, C., Wukovits, W., Friedl, A., Schnitzhofer, W., 2012. Process investigations of extreme thermophilic fermentations for hydrogen production: Effect of bubble induction and reduced pressure. *Bioresour. Technol.* 118, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.046>
- Srikanth, S., Venkata Mohan, S., 2014. Regulating feedback inhibition caused by the accumulated acid intermediates during acidogenic hydrogen production through feed replacement. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 10028–10040. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.152>
- Stams, A.J.M., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271–294.
- Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R.K., Schmidt, T.M., 2015. rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43, D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1996. *Aquatic Chemistry - Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, News.Ge.
- Sukontasing, S., Tanasupawat, S., Moonmangmee, S., Lee, J.S., Suzuki, K.I., 2007. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2151–2154. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65109-0>
- Suresh, A., Grygolowicz-Pawlak, E., Pathak, S., Poh, L.S., Abdul Majid, M. bin, Dominiak, D., Bugge, T.V., Gao, X., Ng, W.J., 2018. Understanding and optimization of the flocculation

- process in biological wastewater treatment processes: A review. *Chemosphere* 210, 401–416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.021>
- Suzuki, R., Shimodaira, H., 2006. Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22, 1540–1542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>
- Swanson, Ogg, 1969. Carbon dioxide regulation of formate hydrogenlyase in *Escherichia Coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 567–575.
- Szymanowska-Powałowska, D., Kubiak, P., 2015. Effect of 1,3-propanediol, organic acids, and ethanol on growth and metabolism of *Clostridium butyricum* DSP1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3179–3189. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6292-4>
- Tanisho, S., Kuromoto, M., Kadokura, N., 1998. Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 23, 559–563. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(97\)00117-1](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(97)00117-1)
- Tao, Y., 2016. Production of Butyrate from Lactate by a Newly Isolated *Clostridium* sp. BPY5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 361–374. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-1999-6>
- Tapia-Venegas, E., Cabrol, L., Brandhoff, B., Hamelin, J., Trably, E., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G., 2015. Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8295–8308. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6832-6>
- Tapia-Venegas, Estela, Ramirez-Morales, J.E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., Lay, C.H., Chu, C.Y., Leu, H.J., Marone, A., Lin, C.Y., Kim, D.H., Trably, E., Ruiz-Filippi, G., 2015. Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>
- Temudo, M.F., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: Impact of the pH and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1669-x>
- Tharani, D., Ananthasubramanian, M., 2021. Process intensification in separation and recovery of biogenic volatile fatty acid obtained through acidogenic fermentation of organics-rich substrates. *hemical Eng. Process. Process Intensif.* 169, 108592. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108592>
- Thauer, R.K., 1977. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180. <https://doi.org/10.1108/eb027807>
- The European commission, 2011. Commission regulation (EU) No 142/2011.
- Tholozan, J.L., Tozuel, J.P., Samain, E., Grivet, J.P., Prensier, G., Albagnac, G., 1992. *Clostridium neopropionicum* sp. nov., a strict anaerobic bacterium fermenting ethanol to propionate through acrylate pathway. *Arch. Microbiol.* 157, 249–257.
- Tohno, M., Kobayashi, H., Tajima, K., Uegaki, R., 2012. Strain-dependent effects of inoculation

- of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* on fermentation quality of paddy rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) silage. *FEMS Microbiol. Lett.* 337, 112–119. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12014>
- Uhlig, R., Poehlein, A., Fischer, R.-J., Daniel, R., Bahl, H., 2016. Genome Sequence of the Autotrophic Acetogen *Clostridium magnum* DSM 2767. *Genome Announc.* 4, e00464-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00464-16>
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., Poggi-Varaldo, H.M., 2005. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 1383–1391. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.016>
- van Andel, J.G., Zoutberg, G.R., Crabbendam, P.M., Breure, A.M., 1985. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF02660113>
- Van Ginkel, S., Logan, B.E., 2005. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9351–9356. <https://doi.org/10.1021/es0510515>
- Van Ginkel, S.W., Logan, B., 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Res.* 39, 3819–3826. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.021>
- van Niel, E.W.J., Claassen, P.A.M.M., Stams, A.J.M.M., 2003. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 255–262. <https://doi.org/10.1002/bit.10463>
- Van Vlierberghe, C., Escudié, R., Bernet, N., Frédéric, S., Carrere, H., 2021. Long term alkaline storage and pretreatment process of cover crops for anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124986>
- Vasconcelos, B.R. De, Lavoie, J., 2019. Recent Advances in Power-to-X Technology for the Production of Fuels and Chemicals 7, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00392>
- Vasconcelos, E.A.F., Leitão, R.C., Santaella, S.T., 2016. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. *Bioenergy Res.* 9, 1260–1271. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9753-z>
- Veeravalli, S.S., Lalman, J.A., Chaganti, S.R., Heath, D.D., 2017. Continuous hydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket reactors: Effect of organic loading rate on microbial dynamics and H<sub>2</sub> metabolism. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 544–551. <https://doi.org/10.1002/jctb.5032>
- Verhaart, M.R.A., Bielen, A.A.M., Oost, J. Van Der, Stams, A.J.M., Kengen, S.W.M., 2010. Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal. *Environ. Technol.* 31, 993–1003. <https://doi.org/10.1080/09593331003710244>
- Verseux, C., 2020. Bacterial Growth at Low Pressure: A Short Review. *Front. Astron. Sp. Sci.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fspas.2020.00030>



- Vignais, P.M., Billoud, B., 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chem. Rev.* 107, 4206–4272. <https://doi.org/10.1021/cr050196r>
- Villanueva-Galindo, E., Moreno-Andrade, I., 2020. Bioaugmentation on hydrogen production from food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 25985–25994. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.092>
- Wang, B., Wan, W., Wang, J., 2009. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresour. Technol.* 100, 1211–1213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.018>
- Wang, B., Wan, W., Wang, J., 2008. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 7013–7019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.027>
- Wang, H., Fang, M., Fang, Z., Bu, H., 2010. Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 8731–8735. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.131>
- Wang, J., Yin, Y., 2021. *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 34599–34625. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052>
- Wang, J., Yin, Y., 2017. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 4804–4823. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>
- Wang, Q., Li, H., Feng, K., Liu, J., 2020. Oriented Fermentation of Food Waste towards High-Value Products: A Review. *Energies* 13(21), 5638. <https://doi.org/10.3390/en13215638>
- Wang, Q., Wang, C.D., Li, C.H., Li, J.G., Chen, Q., Li, Y.Z., 2015. *Clostridium luticellarii* sp. nov., isolated from a mud cellar used for producing strong aromatic liquors. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4730–4733. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000641>
- Wang, R., Zong, W., Qian, C., Wei, Y., Yu, R., Zhou, Z., 2011. Isolation of *Clostridium perfringens* strain W11 and optimization of its biohydrogen production by genetic modification. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 12159–12167. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.105>
- Wang, S., Zhang, T., Bao, M., Su, H., Xu, P., 2020. Microbial Production of Hydrogen by Mixed Culture Technologies: A Review. *Biotechnol. J.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1002/biot.201900297>
- Wang, Y., Zhao, Q.B., Mu, Y., Yu, H.Q., Harada, H., Li, Y.Y., 2008. Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1164–1171. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.018>
- Wang, Yaqi, Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Yanping, Geng, W., 2021. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

- Whitham, J.M., Tirado-Acevedo, O., Chinn, M.S., Pawlak, J.J., Grunden, A.M., 2015. Metabolic response of *Clostridium ljungdahlii* to oxygen exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 8379–8391. <https://doi.org/10.1128/AEM.02491-15>
- Willquist, K., Claassen, P.A.M., van Niel, E.W.J., 2009. Evaluation of the influence of CO<sub>2</sub> on hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 4718–4726. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.03.056>
- Wimonsong, P., Nitorisavut, R., 2014. Biohydrogen enhancement using highly porous activated carbon. *Energy and Fuels* 28, 4554–4559. <https://doi.org/10.1021/ef500530v>
- Wong, Y.M., Wu, T.Y., Juan, J.C., 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>
- Wu, C.W., Whang, L.M., Cheng, H.H., Chan, K.C., 2012. Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresour. Technol.* 113, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.130>
- Xu, K., Liu, H., Du, G., Chen, J., 2009. Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe* 15, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.03.005>
- Xue, C., Cheng, C., 2019. Butanol production by *Clostridium*, 1st ed, *Advances in Bioenergy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2018.12.001>
- Yasin, N.H.M., Mumtaz, T., Hassan, M.A., Abd Rahman, N., 2013. Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. *J. Environ. Manage.* 130, 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.009>
- Yu, T., Chen, Y., 2019. Effects of elevated carbon dioxide on environmental microbes and its mechanisms: A review. *Sci. Total Environ.* 655, 865–879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.301>
- Zhang, S., Kim, T.-H., Lee, Y., Hwang, S.-J., 2012. Effects of VFAs concentration on bio-hydrogen production with *Clostridium Bifermentans* 3AT-ma. *Energy Procedia* 14, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.12.968>
- Zhang, Y., Zhang, F., Chen, M., Chu, P., Ding, J., Zeng, R.J., 2013. Hydrogen supersaturation in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. *Appl. Energy* 109, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.019>
- Zhao, M., Yan, Q., Ruan, W., Miao, H., Ren, H., Xu, Y., 2010. Effects of butyric acid stress on anaerobic sludge for hydrogen production from kitchen wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 866–871. <https://doi.org/10.1002/jctb.2380>
- Zhao, M.X., Ruan, W.Q., 2014. Improving hydrogen generation from kitchen wastes by microbial acetate tolerance response. *Energy Convers. Manag.* 77, 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.10.007>
- Zhao, X., Li, D., Xu, S., Guo, Z., Zhang, Y., Man, L., Jiang, B., Hu, X., 2017. *Clostridium quangxiense* sp. nov. and *Clostridium neuense* sp. nov., two phylogenetically closely

- related hydrogen-producing species isolated from lake sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 710–715. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001702>
- Zheng, X.J., Yu, H.Q., 2005. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *J. Environ. Manage.* 74, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.08.015>
- Zheng, X.J., Zheng, Y.M., Yu, H.Q., 2005. Influence of NaCl on hydrogen production from glucose by anaerobic cultures. *Environ. Technol.* 26, 1073–1080. <https://doi.org/10.1080/09593332608618476>
- Zheng, Y., Kahnt, J., Kwon, I.H., Mackie, R.I., Thauer, R.K., 2014. Hydrogen formation and its regulation in *Ruminococcus albus*: Involvement of an electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase, of a non-electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase, and of a putative hydrogen-sensing [FeFe]-hydrogenase. *J. Bacteriol.* 196, 3840–3852. <https://doi.org/10.1128/JB.02070-14>
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J.W.C., Zhang, Y., 2018. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste : A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresour. Technol.* 248, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121>
- Zhu, Y., Yang, S.T., 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *J. Biotechnol.* 110, 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.006>
- Zhu, Y., Yang, S.T., 2003. Adaptation of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced tolerance to butyric acid in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 19, 365–372. <https://doi.org/10.1021/bp025647x>
- Zoetemeyer, R.J., Matthijsen, A.J.C.M., Cohen, A., Boelhouwer, C., 1982. Product inhibition in the acid forming stage of the anaerobic digestion process. *Water Res.* 16, 633–639. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90084-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90084-7)



## Annexes

---

<b>Annexe 1 : Mesure d'H<sub>2</sub> dissous par ampérométrie .....</b>	<b>341</b>
1. Préambule .....	341
2. Tests de suivi in situ en réacteur .....	341
3. Développement d'une cellule externe de mesure de l'H <sub>2</sub> dissous .....	342
<b>Annexe 2 : Quantité moyenne de métabolites et de glucose résiduel ± écart-type à la fin de la phase de fermentation à différentes concentrations d'acétate, de butyrate, de lactate et de chlorure. La biomasse (DCO), le bilan DCO et le pH final sont présentés. ....</b>	<b>345</b>

## Annexe 1 : Mesure d'H<sub>2</sub> dissous par ampérométrie

### 1. Préambule

Lors des fermentations productrices d'H<sub>2</sub>, un phénomène de sursaturation du milieu liquide par l'H<sub>2</sub> peut avoir lieu. Des méthodes de mesure des concentrations en H<sub>2</sub> dissous ont donc été étudiées au cours de cette thèse. Notamment, une sonde ampérométrique a été utilisée (Figure 0-1). Celle-ci fonctionnait avec une membrane perméable aux gaz qui laissait diffuser l'H<sub>2</sub> jusqu'à une électrode où se déroule une réaction d'oxydation électrochimique. Un courant proportionnel à la concentration en H<sub>2</sub> dissous est généré. La gamme de mesure de cette sonde était de 0,001 à 3 mg/L et la précision était de 2 % de la valeur mesurée.

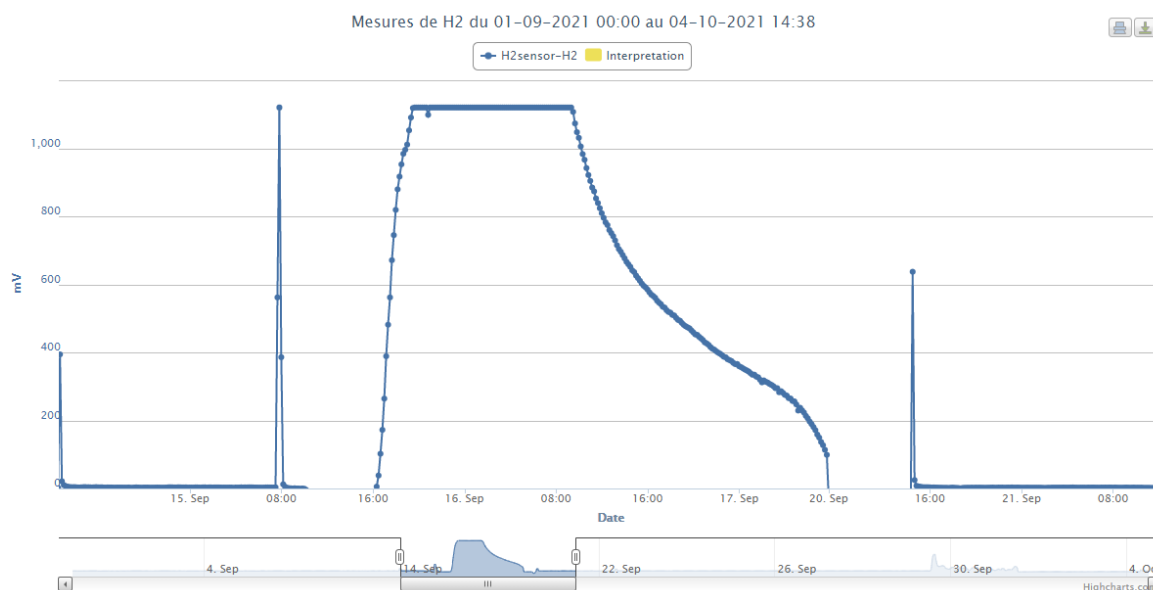


**Figure 0-1 : Illustration de la sonde ampérométrique utilisée. Source : aquams.com**

### 2. Tests de suivi in situ en réacteur

Dans un premier temps, la sonde a été utilisée directement dans un fermenteur, *in situ*, en batch. Cependant, étant donnée la gamme de mesure de la sonde et l'accumulation d'H<sub>2</sub> dans le milieu, le signal de la sonde a très rapidement été saturé à 3 mg/L (Figure 0-2) au cours de la fermentation. Il n'était donc pas possible de suivre en continu la concentration en H<sub>2</sub> dissous dans le réacteur.

Par la suite, des mesures dans un réacteur continu ont été réalisées. La sonde a fini par être dégradée, et ne plus transmettre de signal. Plusieurs hypothèses ont été proposées quant au phénomène à l'origine de la dégradation de la sonde : cette dernière ne doit pas fonctionner à pression inférieure à la pression atmosphérique, or, à cause d'un problème technique la pression est descendue à 0,7 bar pendant une nuit. Le problème pouvait également provenir de la fragilité de la membrane de la sonde. En effet, la membrane était très fine et très fragile. Etant plongée dans un réacteur avec des particules en mouvement pendant plusieurs jours, la membrane a pu être abîmée. Ce test a tout de même permis d'observer que dans les conditions évaluées, lors d'une fermentation en continu (partie 4.3), la sonde ne saturait pas, la concentration en H<sub>2</sub> dissous n'était donc pas en sursaturation.



**Figure 0-2 : Suivi du signal (en mV) renvoyé par la sonde de mesure d'H<sub>2</sub> dissous placée *in situ* lors d'une fermentation en batch, en fonction du temps.**

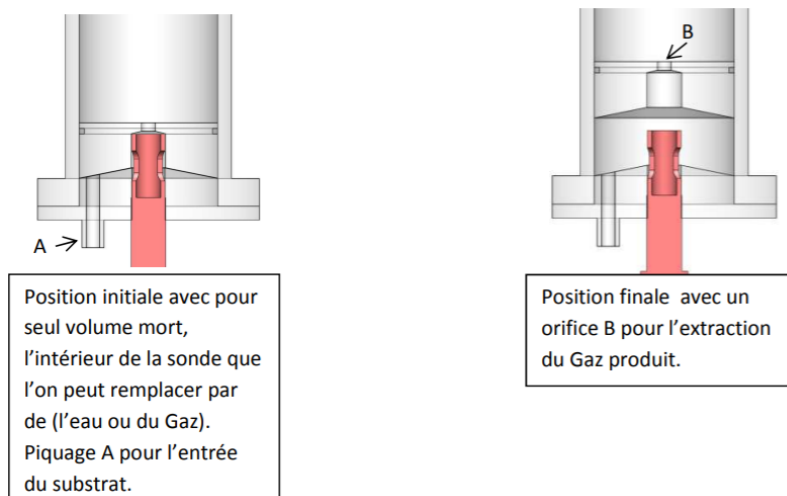
### 3. Développement d'une cellule externe de mesure de l'H<sub>2</sub> dissous

Une nouvelle sonde a été acquise, et un développement technique a été réalisé pour permettre une mesure de la concentration en H<sub>2</sub> dissous à l'extérieur du fermenteur, en *ex situ*, sans passage du milieu fermentaire à l'air libre. Une mesure *ex situ* favorisait la préservation du capteur, et permettait des mesures en H<sub>2</sub> lors des fermentations réalisées à pression inférieure à la pression atmosphérique. Cette cellule externe a été conçue au LBE de façon à rester constamment à 1 bar, à être facilement nettoyable et à être reliée par un système fermé au fermenteur.

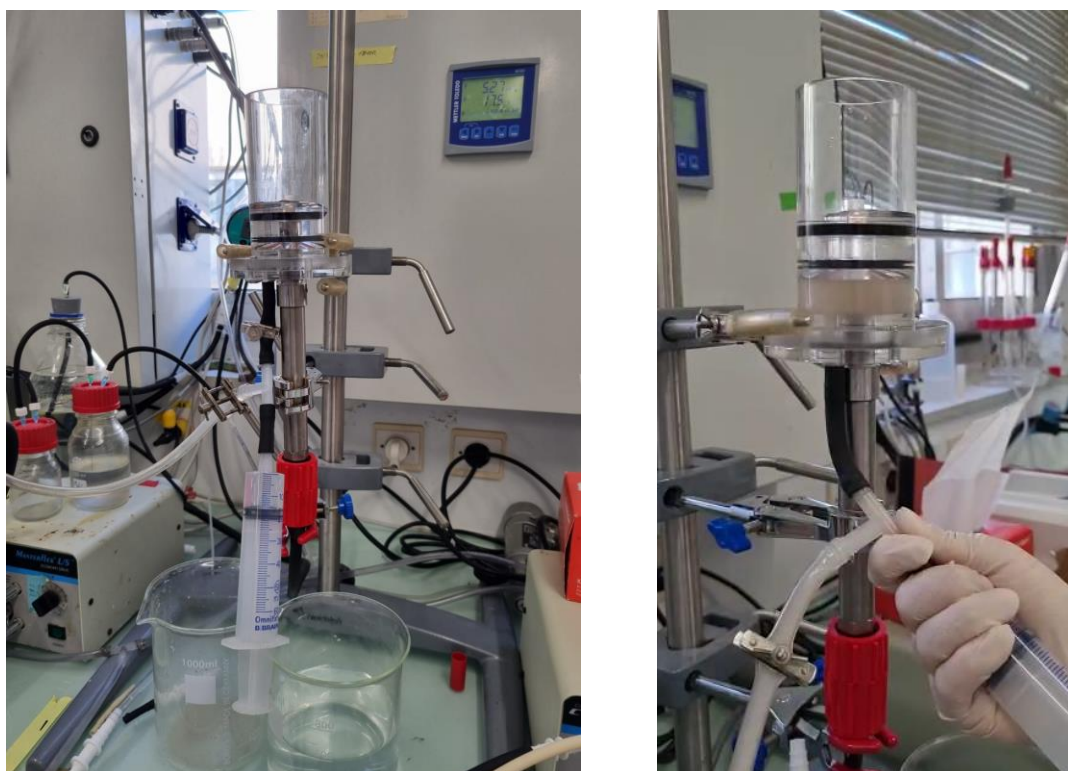
La Figure 0-3 présente une modélisation du fonctionnement de la cellule externe de la sonde H<sub>2</sub>. Dans ce dispositif, le milieu fermentaire pénètre dans la cellule par le piquage A. Un piston permet d'augmenter le volume de la cellule de mesure et de conserver dans la cellule une pression équivalente à la pression atmosphérique. Une fois le milieu fermentaire injecté, la sonde mesure dans la phase liquide la concentration en hydrogène dissous. Grâce au septum situé en position B il est également possible de mesurer le volume de gaz « dégazé » du milieu fermentaire par prélèvement, et d'analyser sa composition.

Le réacteur de fermentation était relié à la cellule de mesure par des tuyaux en Néoprène. Il était alors nécessaire de combler le volume mort de ces tuyaux afin de ne pas diluer le gaz provenant du milieu fermentaire. La

Figure 0-4 présente le dispositif complet. Deux essais ont été conduits, en remplissant les tuyaux avec le milieu fermentaire. La Figure 0-5 présente le suivi du signal de la sonde H<sub>2</sub> en mV au cours de deux tests

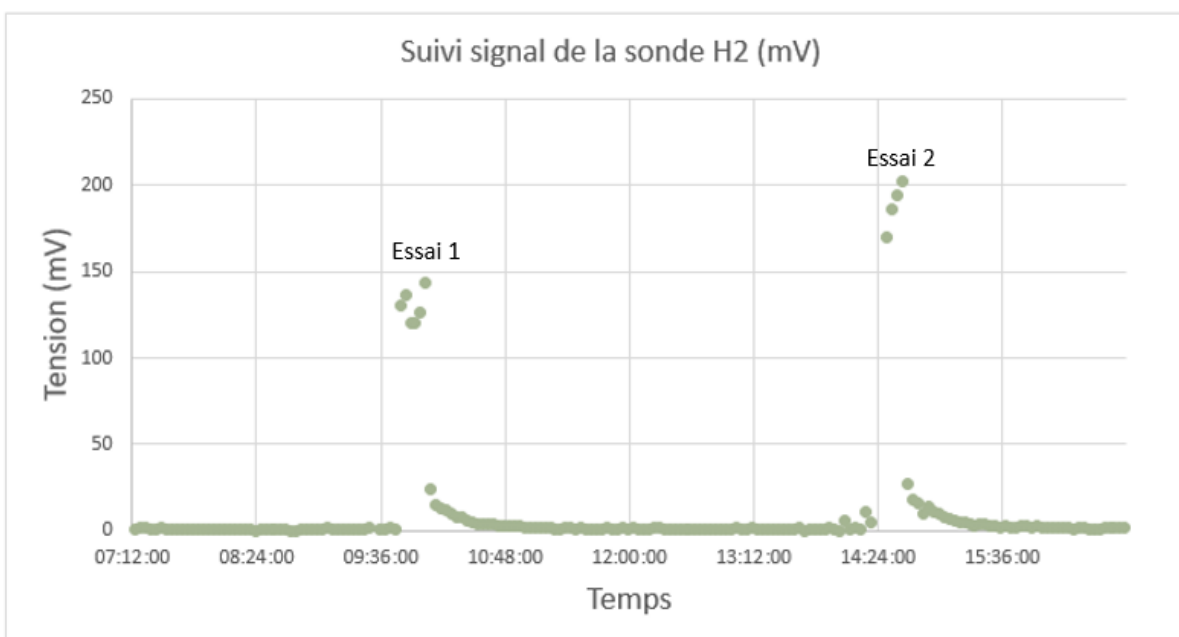


**Figure 0-3 : Modélisation de la cellule externe de mesure d' $H_2$  dissous. La sonde est représentée en rouge et la cellule en gris.**



**Figure 0-4 : Photos du dispositif de mesure de l' $H_2$  dissous en *ex situ* composé de la cellule externe, de la sonde à  $H_2$  insérée, et des tuyaux permettant d'injecter le milieu fermentaire dans la cellule.**





**Figure 0-5 : Suivi du signal de la sonde à H<sub>2</sub> en fonction du temps au cours de deux essais de mesures ex situ dans la cellule externe. Le milieu fermentaire provenait d'une fermentation en continu.**

Les résultats et concentrations en H<sub>2</sub> dissous d'après ces deux essais sont présentés en Tableau 0-1. La concentration H<sub>2</sub> dissous été mesurée à hauteur de 0,5 à 0,7 mg/L pour le 1<sup>er</sup> essai et de 0,7 à 1,0 mg/L pour le second. A l'essai n°2, une amélioration technique a été réalisée afin de diminuer l'air résiduel dans les tuyaux reliant le fermenteur à la cellule de mesure, ce qui a permis de diminuer le volume de gaz récupéré de 5 à 1 mL. Les essais ont permis de mesurer une concentration en H<sub>2</sub> dissous proche de la concentration en H<sub>2</sub> dans un système à l'équilibre, d'après la loi de Henry, *i.e.*, le milieu fermentaire n'était pas dans un fort état sursaturation au cours des fermentations étudiée. En parallèle, l'H<sub>2</sub> dissous a été mesuré avec la sonde dans un bécher à l'air libre. La mesure était alors deux fois plus faible que la mesure réalisée avec la cellule de mesure, mettant en évidence l'intérêt du développement technique réalisé.

**Tableau 0-1 : Mesures d'H<sub>2</sub> dissous ex situ au cours de deux essais de mesures ex situ dans la cellule externe. Le milieu fermentaire provenait d'une fermentation en continu.**

Essai	Volume liquide injecté en mL	Volume de dilution en mL	[H <sub>2</sub> ] théorique en mg/L d'après la loi de Henry	[H <sub>2</sub> ] mesurée en mg/L (f dilution = 0,8)	Volume gaz récupéré en mL	Composition du gaz récupéré			
						% H <sub>2</sub>	% CO <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>	% N <sub>2</sub>
1	41	10	0,66	0,50-0,68	5,1	7,52	25,38	13,55	53,55
2	40	10	0,66	0,69-1,01	1,2	5,34	32,96	10,93	51,07

Annexe 2 : Quantité moyenne de métabolites et de glucose résiduel  $\pm$  écart-type après quatre jours de fermentation avec différentes concentrations initiales en acétate, butyrate ou lactate. La biomasse (sous forme de DCO), le bilan DCO et le pH final sont présentés.

Added component	Initial concentration (mM)	Concentrations at the end of fermentation stage (mM)										COD balance (%)	Added component	Biomass	pH
		Glucose	Lactate	Formate	Acétate	Propionate	Butyrate	Ethanol	Butanol	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>				
Sodium Acetate	0	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	87 $\pm$ 3	65 $\pm$ 2	93 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0.2
	50	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	5 $\pm$ 3	50 $\pm$ 6	0 $\pm$ 1	39 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	88 $\pm$ 6	72 $\pm$ 3	94 $\pm$ 4	3 $\pm$ 7	1 $\pm$ 0	5.2 $\pm$ 0.1
	100	0 $\pm$ 0	16 $\pm$ 8	6 $\pm$ 0	96 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	31 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	75 $\pm$ 8	57 $\pm$ 7	96 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0	5.4 $\pm$ 0.2
	150	0 $\pm$ 0	34 $\pm$ 11	5 $\pm$ 1	138 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	25 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	56 $\pm$ 6	43 $\pm$ 5	95 $\pm$ 3	1 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	5.5 $\pm$ 0.1
	200	0 $\pm$ 0	50 $\pm$ 12	1 $\pm$ 2	184 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	20 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	47 $\pm$ 10	30 $\pm$ 26	97 $\pm$ 2	-3 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0	5.6 $\pm$ 0.1
	250	0 $\pm$ 0	81 $\pm$ 34	3 $\pm$ 4	231 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0	7 $\pm$ 13	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	18 $\pm$ 32	13 $\pm$ 25	97 $\pm$ 2	-3 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	5.6 $\pm$ 0.1
	300	6 $\pm$ 1	89 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1	280 $\pm$ 5	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 2*	-2 $\pm$ 4	NA	5.7 $\pm$ 0.1
Sodium Butyrate	0	0 $\pm$ 0	9 $\pm$ 7	7 $\pm$ 3	13 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	31 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	68 $\pm$ 12	53 $\pm$ 8	98 $\pm$ 5	31 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0	4.6 $\pm$ 0.2
	25	0 $\pm$ 0	21 $\pm$ 13	6 $\pm$ 0	14 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	50 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 2	65 $\pm$ 11	48 $\pm$ 9	100 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0	4.7 $\pm$ 0.1
	50	0 $\pm$ 0	14 $\pm$ 14	4 $\pm$ 0	16 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	75 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	72 $\pm$ 15	52 $\pm$ 10	93 $\pm$ 2	27 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0	4.9 $\pm$ 0.1
	100	0 $\pm$ 0	42 $\pm$ 20	1 $\pm$ 1	9 $\pm$ 3	0 $\pm$ 1	114 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2	47 $\pm$ 14	36 $\pm$ 12	99 $\pm$ 1	18 $\pm$ 6	1 $\pm$ 1	5 $\pm$ 0.1
	150	16 $\pm$ 10	42 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	155 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	28 $\pm$ 15	18 $\pm$ 10	104 $\pm$ 7	8 $\pm$ 3	2 $\pm$ 2	5.3 $\pm$ 0.1
	200	32 $\pm$ 4	36 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	192 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 3	-9 $\pm$ 9	2 $\pm$ 2	5.5 $\pm$ 0.1
	250	44 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	242 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	105 $\pm$ 2	-2 $\pm$ 8	3 $\pm$ 2	5.8 $\pm$ 0
Sodium Lactate	0	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	33 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	87 $\pm$ 3	65 $\pm$ 2	100 $\pm$ 5	4 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	4.6 $\pm$ 0.2
	50	2 $\pm$ 3	35 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	13 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1	36 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 2	76 $\pm$ 13	56 $\pm$ 9	78 $\pm$ 4*	-17 $\pm$ 2	NA	NA
	100	11 $\pm$ 4	99 $\pm$ 11	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	25 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	58 $\pm$ 7	39 $\pm$ 5	86 $\pm$ 2*	-1 $\pm$ 10	NA	NA
	150	16 $\pm$ 3	143 $\pm$ 11	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	21 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	54 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	89 $\pm$ 2*	-7 $\pm$ 10	NA	NA
	250	17 $\pm$ 4	245 $\pm$ 24	6 $\pm$ 0	9 $\pm$ 1	2 $\pm$ 4	22 $\pm$ 13	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	60 $\pm$ 22	43 $\pm$ 22	91 $\pm$ 1*	-6 $\pm$ 24	NA	NA
	300	23 $\pm$ 5	306 $\pm$ 19	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	10 $\pm$ 10	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	29 $\pm$ 25	19 $\pm$ 17	89 $\pm$ 2*	5 $\pm$ 18	NA	NA
	400	13 $\pm$ 4	462 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	94 $\pm$ 3*	62 $\pm$ 10	NA	NA

\*Sans prise en compte de la biomasse.