
FERMENTATION EN MILIEU SALIN

Dans le but d'augmenter la salinité et donc la conductivité dans l'électrolyseur microbien dans le cadre du couplage des deux procédés pour la production d'hydrogène, l'objectif de ce chapitre est d'étudier l'impact de la salinité sur la fermentation. Pour cela, un inoculum déjà adapté au sel a été utilisé. Dans un premier temps, l'effet de la salinité sur la fermentation a été étudié à pH 8, proche du pH d'origine de l'inoculum. Puis, il a été étudié à pH 6, proche du pH utilisé en fermentation pour produire du biohydrogène. Dans cette étude, les paramètres de la fermentation ainsi que les communautés microbiennes sélectionnées sont étudiés.

III.1. ETUDE DE LA PRODUCTION FERMENTAIRE D'HYDROGENE EN MILIEU SALE

III.1.1. AVANT-PROPOS

Dans les systèmes bioélectrochimiques, le transfert de charges joue un rôle très important, notamment le transfert ionique entre les compartiments anodique et cathodique. Dans ce sens, la salinité de l'électrolyte fait l'objet d'études récentes (Lefebvre et al., 2010; Xiao and Roberts, 2010; Rousseau et al., 2013) qui montrent son influence positive sur les performances électroactives du biofilm. Dans le cadre du couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne, la conductivité dans le compartiment anodique pourrait être amenée par les effluents de sortie de fermenteur traitant des effluents salins. Néanmoins, la faisabilité de la production de biohydrogène par fermentation en milieu salé a été très peu étudiée.

D'autre part, la demande en termes de traitement des effluents salins est non négligeable. En effet, les eaux usées salées qui peuvent, entre autre, être générées par les industries de la pêche, du pétrole et du cuir, peuvent contenir de grandes quantités de matières organique à traiter (Lefebvre and Moletta, 2006). De plus, les eaux usées rejetées par les usines de traitement d'eau potable à l'aide de membrane échangeuse d'ions et d'osmose inverse peuvent également contenir de grandes quantités en sel (Lefebvre and Moletta, 2006). Globalement, les eaux usées à forte teneur en sel représentent 5% des besoins mondiaux de traitement des effluents (Lefebvre and Moletta, 2006). Le rejet de ces eaux usées dans l'environnement entraîne des risques élevés de salinisation des sols et des eaux de surface comme souterraines. Une dilution préalable de ces eaux avant traitement biologique entraîne une forte consommation en eau et, en conséquence, une augmentation des coûts d'exploitation. Le traitement de ces effluents par voie biologique en dépit de leur forte salinité offrirait une alternative économiquement et environnementalement viable. De plus, dans le cadre du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne, les effluents de sortie de fermenteurs offriraient de bonnes conditions de salinité et donc de conductivité en électrolyse microbienne.

D'un point de vue microbiologique, beaucoup d'espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Escherichia* ont été décrites comme productrices d'hydrogène

en cultures mixte et en milieu non-salin (Guo et al., 2010). Seules quelques études ont porté sur la fermentation d'effluents salins en cultures pures et en cultures mixtes (Simankova et al., 1993; Zheng et al., 2005; Alshiyab et al., 2008; Liu and Wang, 2012). Zheng et al. (2005) ont mis en exergue une diminution progressive des rendements de conversion d'hydrogène de $0,597 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Sucrose}} \cdot \text{j}$ à $0,089 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Sucrose}} \cdot \text{j}$ avec une augmentation de la concentration en NaCl de 0 à $30 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ dans milieu acide (pH 6) avec des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement. Les études en cultures pures, en conditions salines ($>20 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$) et à pH 7, ont permis de montrer les capacités de production de biohydrogène fermentaire de *Bacillus megaterium* (Liu and Wang, 2012), *Halocella cellulolytica* (Simankova et al., 1993) et *Clostridium acetobutylicum* (Alshiyab et al., 2008). Ces résultats en culture pure montrent qu'une production d'hydrogène est réalisable, principalement en condition de pH neutre ou alcalin, contrairement aux conditions de pH usuelles en fermentation.

Dans le cadre du couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne, nous nous sommes intéressés à l'influence de la salinité sur le procédé de fermentation, dans le but de définir des conditions « intermédiaires » favorables aux deux procédés et d'évaluer la faisabilité du couplage de procédés au traitement d'effluents salins. Deux séries d'expériences ont été réalisées à des concentrations croissantes en sel de $3\text{-}75 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ à pH 6 et pH 8 et en utilisant des sédiments salins comme inoculum.

L'étude présentée ci-après a ainsi été réalisée avec pour inoculum des sédiments de salins (salins de Saint Martin à Gruissan dans l'Aude). Ces sédiments sont anaérobies et présentent la particularité de contenir des espèces bactériennes déjà adaptés à un milieu salin ($70 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ dans les sédiments). De plus, le pH mesuré des sédiments in situ est plutôt alcalin (7.5-8), ce qui correspond au pH optimal relevé pour les espèces productrice d'hydrogène en condition saline décrites dans la littérature. Cette étude a donc été réalisée à pH 8 et en condition saline (jusqu'à $75 \text{ g}/\text{L}$) afin de limiter la pression de sélection sur l'inoculum de départ et conformément aux études réalisées en cultures pures (Simankova et al., 1993; Alshiyab et al., 2008; Liu and Wang, 2012), puis à pH 6, pH optimal pour la production de biohydrogène dans les conditions standards (Zheng et al., 2005; Guo et al., 2010).

III.1.2. PRODUCTION D'HYDROGENE PAR FERMENTATION EN CONDITIONS SALINES A PH 8

Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions

PIERRA Mélanie, TRABLY Eric, GODON Jean-Jacques, BERNET Nicolas

D'après l'article publié dans « International Journal of Hydrogen Energy », 2013

(DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.08.035)

Abstract

Dark fermentation is an intermediate microbial process occurring along the anaerobic biodegradation of organic matter. Saline effluents are rarely treated anaerobically since they are strongly inhibited by high salt concentrations. This study deals with the characterization of microbial communities producing hydrogen under moderate halophilic conditions. A series of batch experiments was performed under anaerobic conditions, with glucose as substrate (5 g L^{-1}) and under increasing NaCl concentrations ranging from 9 to $75 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. A saline sediment of a lagoon collecting salt factory wastewaters was used as inoculum. Interestingly, a gradual increase of the biohydrogen production yield according to NaCl concentration was observed with the highest value ($0.9 \pm 0.02 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$) obtained for the highest NaCl concentration, ie. $75 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, suggesting a natural adaptation of the sediment inoculum to salt. This work reports for the first time the ability of mixed culture to produce hydrogen in moderate halophilic environment. In addition, maximum hydrogen consumption rates decreased while NaCl concentration increased. A gradual shift of the bacterial community structure, concomitant to metabolic changes, was observed with increasing NaCl concentrations, with the emergence of bacteria belonging to *Vibrionaceae* as dominant bacteria for the highest salinities.

Key words: Biohydrogen, CE-SSCP, Dark fermentation, Pyrosequencing, Salinity, Vibrionaceae,

III.1.2.1. INTRODUCTION

The actual increasing interest in hydrogen (H_2) as a promising clean and sustainable energy carrier is mainly due to its high energy density (122 kJ g^{-1}) as well as the high efficiency of fuel cells to convert H_2 to electricity for transportation purposes (Hawkes et al., 2007; Hallenbeck, 2009; Guo et al., 2010). Nowadays, most of the hydrogen produced worldwide is generated by natural gas reforming. However, producing hydrogen from fossil fuel produce more than twice carbon oxide equivalent compared to biohydrogen and contribute to resource depletion (Das and Veziroglu, 2001; Hajjaji et al., 2013). Developing alternatives technologies to produce hydrogen from renewable energy sources and minimizing their environmental impact are therefore of high priority. Producing hydrogen in biological processes is considered more environmentally friendly and sustainable than from conventional techniques. Particularly, dark fermentation is a process that aims at producing biohydrogen and treating organic waste at the same time (Hallenbeck and Benemann, 2002; Hawkes et al., 2007; Rittmann, 2008; Hallenbeck, 2009; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo et al., 2010). During anaerobic digestion of those compounds, several microbial metabolism pathways outcompete for hydrogen which is a key intermediate in the trophic chain, as electron carrier (Figure III-1). When applying specific operating conditions (low pH, high substrate/inoculum ratio), consumption and concurrent routes for hydrogen production can be avoided (Guo et al., 2010).

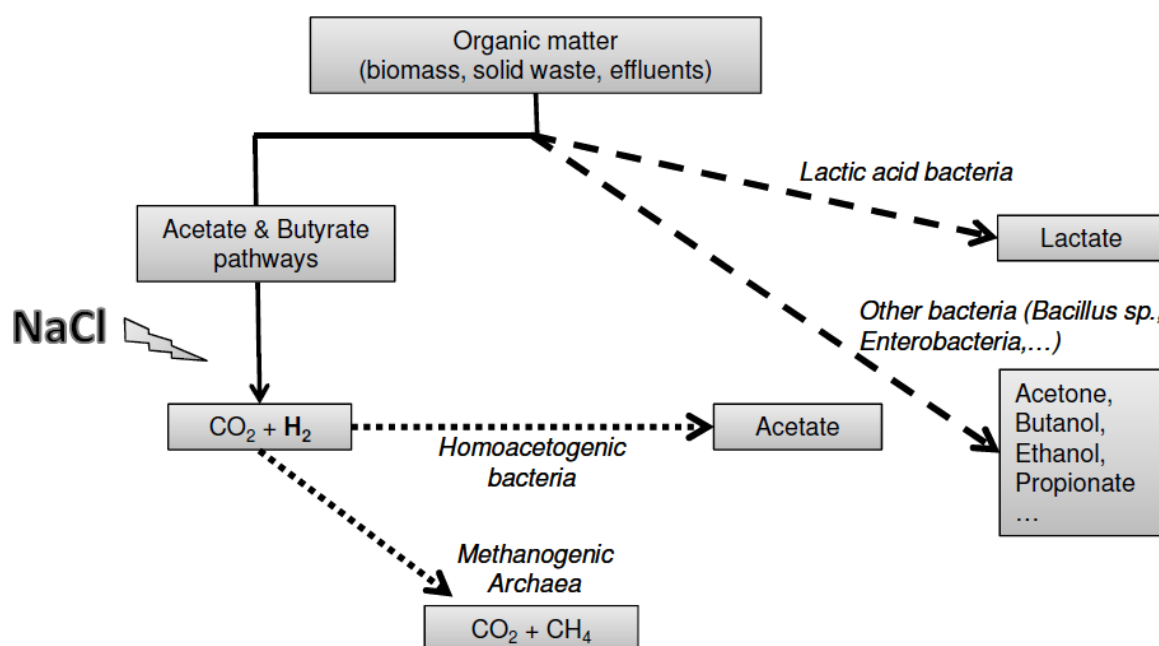


Figure III-1 : General pathways for hydrogen production. Bold arrows are represented for hydrogen production pathways, dotted arrows for hydrogen consumption pathways and dashed arrows for hydrogen production concurrent routes (adapted from Guo et al. (2010)).

Moreover, saline wastewaters, that can be generated by fish, seafood, petroleum and leather industries, may contain large amounts of organic matter that have to be treated (Lefebvre and Moletta, 2006; Xiao and Roberts, 2010). Wastewaters discharged from drinking water treatment plants using ion-exchange membrane and reverse-osmosis processes may also contain high amounts of salts (Xiao and Roberts, 2010). Overall, saline wastewaters represent more than 5% of the worldwide effluent treatment requirements (Lefebvre et al., 2007). Discharging those saline wastewaters directly to the environment leads to high risks of soil, surface water and groundwater salinization. In most cases, high salinity wastewaters have to be diluted before any biological treatment to reduce their salinity. Indeed, a high salinity can disturb the osmotic balance across microbial cell walls and cause plasmolysis of microbial cells, making unefficient any biological treatment (Oren, 2001; Vallero et al., 2003). Dilution of saline wastewaters implies a high increase in water consumption of the treatment bioprocess and, as a consequence, its operating costs.

Although Na⁺ concentration has a strong inhibitory effect on anaerobic digestion processes (Feijoo et al., 1995; Oren, 2001; Lefebvre et al., 2007), natural microbial communities can nevertheless well adapt to high salt concentrations to finally exhibit efficient activity for anaerobic treatment of saline wastewaters (Lefebvre and Moletta, 2006). Some anaerobic microbial communities were reported as halophilic (Mosquera-Corral

and Sanchez, 2001; Lefebvre et al., 2006), whereas some others were non-halophilic and had to be adapted by increasing salt concentrations prior to using them as inoculum (Guerrero et al., 1997; Gebauer, 2004; Lefebvre et al., 2007).

While many species from *Clostridium*, *Enterobacter* and *Escherichia* genera have been described in the literature as hydrogen-producing bacteria in mixed cultures in non halophilic environment (Hawkes et al., 2007; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo et al., 2010; Quéméneur et al., 2010, 2012; Quéméneur, Hamelin, Benomar, et al., 2011; Quéméneur, Hamelin, Latrille, et al., 2011), only few studies have dealt with dark fermentation of saline effluents in pure and mixed cultures (Zheng et al., 2005; Kivisto et al., 2010). Regarding fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions with pure cultures, only few bacteria such as *Bacillus megaterium* (Liu and Wang, 2012), *Halocella cellulolytica* (Simankova et al., 1993) and *Clostridium acetobutylicum* (Alshiyab et al., 2008) were reported previously to produce H_2 at pH 7 and under saline conditions up to 2% w/v NaCl (Simankova et al., 1993; Alshiyab et al., 2008; Liu and Wang, 2012). Interestingly, Alshiyab et al. (Alshiyab et al., 2008) showed that hydrogen productivity of *Clostridium acetobutylicum* decreased by 18% while increasing NaCl concentration from 0 to 5 g_{NaCl} L⁻¹. Simankova et al. (Simankova et al., 1993) reported that a halophilic bacteria, *Halocella cellulolytica*, isolated from hypersaline lagoons with high NaCl concentrations (50 to 200 g_{NaCl} L⁻¹), was also capable of hydrogen production of about 4 mmol_{H₂} L⁻¹ during microcrystalline cellulose breakdown. Liu et al. (Liu and Wang, 2012) studied the capability of *Bacillus megaterium* (*Bacillus* sp B2) to produce hydrogen within a range of 4 to 70% g_{NaCl} L⁻¹. They observed a maximum hydrogen production of 1.65 mol_{H₂} mol_{Glucose}⁻¹ in marine conditions (30 g_{NaCl} L⁻¹). Kivisto et al. (Kivisto et al., 2010) showed that *Halanaerobium saccharolyticum* sspp. *saccharolyticum* (Hssa) and *senegalensis* (Hsse) produced respectively 0.6 and 1.6 mol_{H₂} mol_{Glycerol}⁻¹, at pH 7 and 150 g_{NaCl} L⁻¹. Similarly, Brown et al. (Brown et al., 2011) described *Halanaerobium hydrogeniformans* as a fermentative hydrogen producer in haloalkaline conditions at pH11 and 70 g_{NaCl} L⁻¹. Those results emphasize that hydrogen producers do exist and can produce hydrogen efficiently in pure cultures under halophilic conditions, mainly in neutral or alkaline conditions unlike classical dark fermentation processes that are operated under acid conditions.

The aim of the present study is to evaluate the capability of mixed cultures to produce biohydrogen by dark fermentation under increasing NaCl concentrations. Experiments were

performed in mixed culture, inoculated with a microbial ecosystem adapted to saline conditions, to provide new insights about using dark fermentation in moderate halophilic condition for producing hydrogen and treating saline waste streams at the same time, that cannot be feasible with pure cultures. A series of batch experiments was thus carried out with increasing NaCl concentrations from 9 to 75 g.L⁻¹ at pH 8, and using a saline sediment well adapted to halophilic conditions as inoculum.

III.1.2.2. MATERIALS AND METHODS

III.1.2.2.1. Source of inoculum

The seed sediment used for hydrogen production was sampled in a lagoon collecting wastewaters from a salt factory. The sediments were filtrated through a 2 mm sieve and stored at lab temperature before inoculation. The initial pH of the sediments was 8.5 and the salinity 67.4 g_{NaCl} L⁻¹.

III.1.2.2.2. Hydrogen production in batch tests

Hydrogen production experiments were performed in 600 mL glass bottles in batch conditions. About 1.5 g of the seed sediment was added to the culture medium to obtain a final concentration of 300 mg_{VS} L⁻¹ (final working volume of 200 mL). The culture medium was composed of 100mM phosphate buffer, 5 g L⁻¹ glucose and a solution oligoelements with the following final concentrations : 7.50 g L⁻¹ FeCl₂, H₂O, 0.30 g L⁻¹ H₃BO₃, H₂O, 0.59 g L⁻¹ MnSO₄, H₂O, 0.13 g L⁻¹ CoCl₂, 6H₂O, 0.35g L⁻¹ ZnCl₂, 0.13 g L⁻¹ NiCl₂,6H₂O, 0.075 g L⁻¹ CuCl₂,2H₂O, 0.13 g L⁻¹ NaMoO₄,2H₂O , 0.8 g L⁻¹ NH₄Cl. The initial pH was adjusted to 8 using NaOH (1M). All batch tests were carried out in triplicate. To ensure anaerobic conditions, each bottle headspace was flushed and purged with nitrogen gas after inoculation for 5 min. Composition of headspace gas was checked and oxygen content was less than 0.5% in all bottles. Then, the bottles were capped with a rubber stopper and incubated at 35°C for more than 20 days. Two-milliliter aliquots were periodically collected and centrifuged (20,000g, 10 min). Supernatants and pellets were stored at -20°C. Supernatants were used for further chemical analysis and pellets for DNA extraction.

III.1.2.2.3. Chemical analyses

Volatile fatty acids (VFA) composition, *ie.* acetic (C2), propionic (C3), butyric and iso-butyric (C4 and iC4), valeric and iso-valeric (C5 and iC5) and caproic (C6) acids was determined with a gas chromatograph (GC-3900 Varian) equipped with a flame ionization detector. The concentrations of non-VFA metabolic products such as ethanol, lactate and formate were measured by HPLC analysis and refractometric detection, as previously described (Quéméneur et al., 2012).

Biogas production volume was periodically estimated by measuring the gas pressure in headspace. Biogas composition (CH₄, CO₂, H₂ and N₂) was determined using a gas chromatograph (Clarus 580, Perkin Elmer) coupled to Thermal Catharometric detection (TCD), as described elsewhere (Quéméneur et al., 2012).

III.1.2.2.4. Data analysis

To assess accurately H₂ production performances, cumulative H₂ production curves were fitted to a modified Gompertz equation for each batch experiment, as proposed by Quéméneur et al. (Quéméneur et al., 2011) :

$$H_2(t) = H_{2\max} \cdot \exp(-\exp(V_{\max} \cdot \exp(1) / H_{2\max} (\lambda - t) + 1))$$

where H_{2max} corresponds to the maximum experimental H₂ yield (in mol_{H2} mol_{Glc}⁻¹), V_{max} : the maximum H₂ production rate (in mol_{H2} mol_{Glc}⁻¹ day⁻¹), λ the lag phase (in days), and t the incubation time (in days) (see Figure III-2).

Specific H₂ consumption rates R_c (in d⁻¹) (Figure III-2) were estimated from the H₂ decrease in cumulative H₂ values at H_{2max} time and at the end of the experiment, that was then normalized according to the corresponding H_{2max} value.

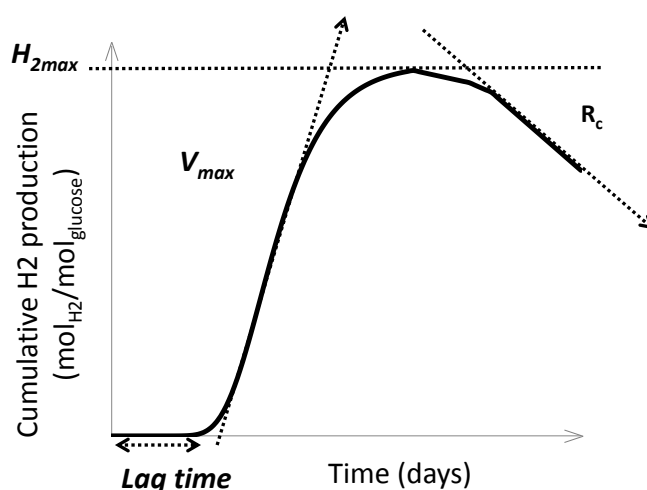


Figure III-2 : Representation of H₂ production dynamics from a mixed culture cultivated with glucose as substrate in batch.

The estimated values of H_{2max} , V_{max} and Lag time correspond to the H₂ production potential (molH₂ molGlc⁻¹), the maximum H₂ production rate (molH₂ molGlc⁻¹ day⁻¹) and the lag phase time (day), respectively. The R_c value corresponds to the H₂ consumption rate and was estimated by the H₂ decrease measured experimentally between the H_{2max} time and the end of the experiments, and then normalized according to H_{2max} value.

III.1.2.2.5. DNA extraction, PCR amplification and CE-SSCP fingerprinting

Molecular fingerprinting of the bacterial communities were performed for the samples taken at the time of maximal hydrogen production (H_{max}) for each reactor. After centrifugation (20,000g, 10 min) of 2mL sample aliquots, genomic DNA was extracted and purified from the pellets using a PROMEGA Wizard® Genomic DNA kit. The DNA amount and purity in extracts were measured by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan). Then, 16S rRNA genes were amplified using universal primers for bacteria, named W49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' *Escherichia coli* position 330) (Wéry et al., 2008) and 5'-fluorescein phosphoramidite labeled W104 (5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' *Escherichia coli* position 533) (Wéry et al., 2008). Each PCR (Polymerase Chain Reaction) mixture (50μL) contained 5μL of 10x Pfu Turbo DNA buffer, 200 nMf of dNTP, 500 nMf of each primer, 2.5 U μL⁻¹ of Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene) and 10 ng of genomic DNA. Reactions were performed in Mastercycler thermal cycler (Eppendorf). The 16S rRNA genes were amplified as follows : initial denaturing at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles performed at 94°C for 30 s, 61°C for 30 s and 72°C for 30 s, with a final elongation at 72°C for 10 min. Reactions were stopped by cooling the mixture to 4°C.

PCR products were then separated by capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). This method allows the separation of DNA fragments that have about the same size but different base compositions (Sen et al., 2008). For this, one microliter of the appropriate dilution of PCR products was mixed with 18.925 μL of formamide and 0.075 μL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were heat-denatured at 95°C for 5 min and immediately re-cooled directly on ice for 5 min. CE-SSCP electrophoresis was performed in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) in 50 cm capillary tubes filled with conformation analysis polymer, corresponding buffer and 10% glycerol (Applied Biosystems). Samples were eluted at 12kV and 32°C for 30 min.

For bacterial identification, pyrosequencing of the DNA samples using a 454 protocol was performed (Research and Testing Laboratory (Lubbock, USA)).

The sequences of the most abundant bacteria found for each salt concentration was deposited in the NCBI genbank database under the accession number : KC905780 for the 39% abundant bacteria at 9 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$, KC905779 for the 27% abundant bacteria at 9 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$, KC905778 for the 36% abundant bacteria at 19 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$, KC905777 for the 19% abundant bacteria at 29 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$; KC905776 for the 36% abundant bacteria at 38 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$; KC905775 for the 26% abundant bacteria at 38 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$; KC905774 for the 22% abundant bacteria at 48 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$; KC905773 for the 79% abundant bacteria at 58 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$; KC905772 for the 92% abundant bacteria at 75 $\text{g}_{\text{NaCl}}\text{L}^{-1}$.

III.1.2.2.6. Statistical analyses of CE-SSCP fingerprints

CE-SSCP profiles were aligned with an internal standard, ROX, to consider the inter-sample electrophoretic variability. The CE-SSCP profiles were normalized using the Statfingerprints library (Michelland et al., 2009) in R software version 2.9.2 (R. Development Core Team, 2010), with a standard procedure described by Fromin et al. (Fromin et al., 2007). The genetic distances between bacterial communities were assessed using Euclidean distances to obtain similarity matrices. Genetic distances between samples were analyzed by principal component analysis (PCA). Linear correlations between PCA ordination of bacterial communities and environmental parameters were established using the *envfit* function of the *vegan* library (Oksanen et al., 2010). Average CE-SSCP profiles were calculated for each condition, and corresponded to the average abundance of individual peaks from replicates.

The Simpson diversity index was evaluated to estimate the complexity of the community by assessing the number of species (number of peaks) as well as the relative abundance (area under each peak) (Simpson, 1949).

III.1.2.3. RESULTS AND DISCUSSION

III.1.2.3.1. Hydrogen production performances according to NaCl concentrations

Throughout the batch experiments, no CH₄ was detected in head space, and only H₂ and CO₂ were found as gaseous products. The Gompertz model showed a good fit with the experimental H₂ production data, with determination coefficients r^2 over 0.994 for all batch tests. Figure III-3 presents the hydrogen production parameters according to NaCl concentrations. The maximum hydrogen production yield (H_{2max}) decreased from 0.65 (± 0.01) mol_{H₂} mol_{Glucose}⁻¹ to 0.42 (± 0.02) mol_{H₂} mol_{Glucose}⁻¹ when NaCl concentrations increased from 9 g_{NaCl} L⁻¹ to 19 g_{NaCl} L⁻¹. This result was consistent with previous studies that showed an inhibition of fermentative hydrogen production at low NaCl concentrations (less than 30 g_{NaCl} L⁻¹) with the same substrate (glucose) (Zheng et al., 2005; Alshiyab et al., 2008). Alshiyab et al (Alshiyab et al., 2008) showed that *Clostridium butylicum* presented a decrease of hydrogen productivity (18% less) from 0 to 5 g_{NaCl} L⁻¹ at slight lower pH and temperature conditions (pH 7, 30°C). Similarly, Zheng et al (Zheng et al., 2005) showed a continuous decrease of the hydrogen production rate from 0.597 mol_{H₂} mol_{Sucrose}⁻¹ d⁻¹ to 0.089 mol_{H₂} mol_{Sucrose}⁻¹ d⁻¹ with the increase of NaCl concentration from 0 to 30 g_{NaCl} L⁻¹ in a more acidic medium (pH 6) with heat-treated anaerobically digested sludge. In the present study, the first loss in hydrogen production (35% for 9 to 19 g_{NaCl} L⁻¹) is consistent with these results, but the use of a not heat-treated inoculum made possible the selection of microbial populations that are halophilic tolerant, fermentative and hydrogen-producing rather than sporulating *Clostridium* strains, known to be inhibited by high NaCl concentrations.

By increasing NaCl concentration, maximum hydrogen production (H_{2max}) increased constantly up to a maximum value of 0.90 (± 0.02) mol_{H₂} mol_{Glucose}⁻¹ at 75 g_{NaCl} L⁻¹. Interestingly, this NaCl concentration (75 g L⁻¹) was very close to the natural salinity of the sediment used as inoculum (67 g L⁻¹). This suggested that the hydrogen-producing fermentative bacteria present in the inoculum were already adapted to such high NaCl concentrations.

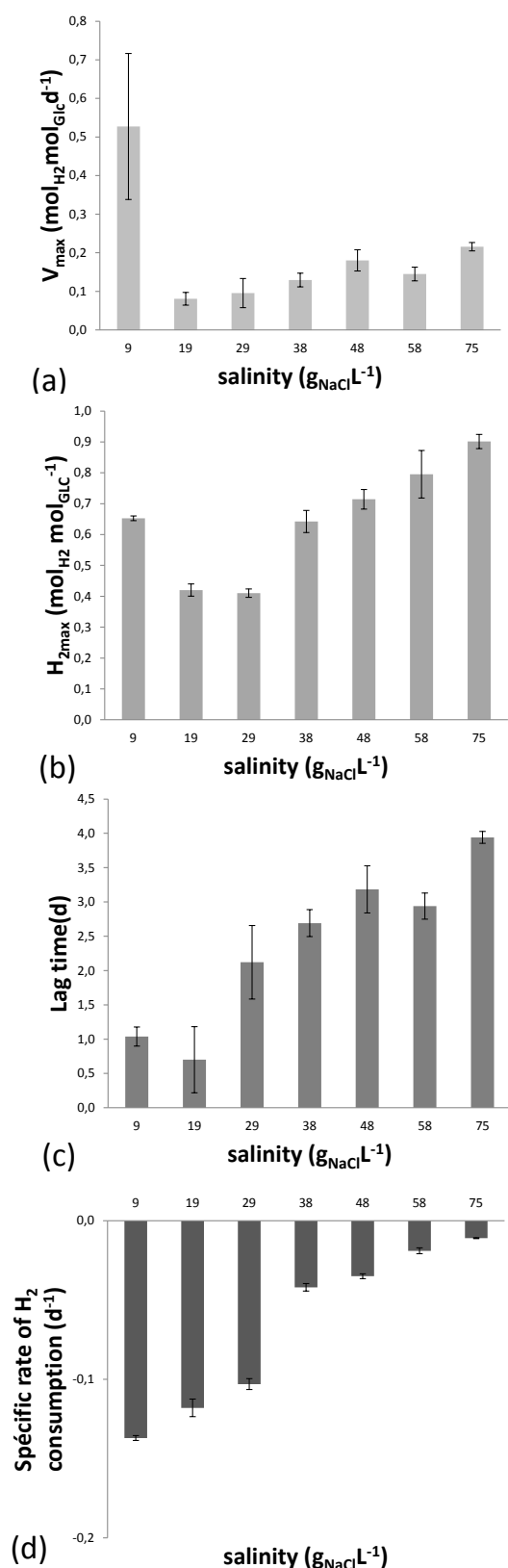


Figure III-3 : Hydrogen production parameters of the modified Gompertz model according to NaCl concentrations.

(a) maximum hydrogen production rate, (b) hydrogen production yield and (c) lag phase (d) H₂ consumption rate.

Moreover, a decrease of the specific H₂ consumption rate was observed while increasing salinity, suggesting that hydrogen-consumers were more specifically impacted by high NaCl concentrations. Thus, the highest H_{2max} value was observed for the highest NaCl concentration (see Figure III-3). However, at NaCl concentrations above 9g_{NaCl} L⁻¹, the maximum hydrogen production rates (V_{max}) were significantly impacted with a sharp decrease from 0.53 ± 0.19 mol_{H₂} mol_{Glc}⁻¹ d⁻¹ at 9g_{NaCl} L⁻¹ to 0.08 ± 0.02 mol_{H₂} mol_{Glc}⁻¹ d⁻¹ at 19g_{NaCl} L⁻¹ (Figure III-3). All batch tests were run at the same time. At 9g_{NaCl} L⁻¹ hydrogen was much faster than the ones with NaCl concentration up to 19 g_{NaCl} L⁻¹. Since the exponential phase was shorter, the number of points on the curves was reduced when fitting the data to the Gompertz model: This implied a higher error on V_{max} estimation by the model. The maximum hydrogen production rate obtained in this work at 9g_{NaCl} L⁻¹ is in accordance with previous studies (Quéméneur et al., 2011; Quéméneur et al., 2011). Indeed, Quemeneur et al. (Quéméneur et al., 2011) obtained a maximum hydrogen production rate of 0.57 ± 0.15 mol_{H₂} mol_{Glc}⁻¹ d⁻¹ in similar conditions with no salt addition and using a heat-treated anaerobically-digested sludge at pH 5.5. On sucrose, Quemeneur et al. (Quéméneur et al., 2011) showed an

increase of the maximum hydrogen production rate from $0.56 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Sucrose}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ to $1.31 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Sucrose}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ due to an increase of the pH value from 4 to 6 in a non saline medium and with a heat-treated anaerobically-digested sludge.

Additionally, by increasing NaCl concentrations, a significant increase of the lag phase was observed from 0.70 to 3.94 days (Figure III-3). A low amount of microorganisms capable of hydrogen production in the initial inoculum as well as a longer generation time of these micro-organisms could affect the lag phase. Moreover, previous studies reported an increase in lag phase due to the time for osmotic adaptation of microorganisms to maintain their osmotic pressure through the cytoplasmic membrane (Oren, 2001). Indeed, the ionic strength, determined by ions species and concentrations, is an important factor for bacteria growth (Van Niel et al., 2003; Alshiyab et al., 2008). A high level of ionic strength can result in cell lysis due to a high osmolarity environment caused by NaCl or other ions that trigger a cell dehydration through the cytoplasmic membrane (Feijoo et al., 1995; Oren, 2001). Hydrogen producing cells have to be halotolerant or capable to adapt to salt to produce hydrogen in saline environment (Oren, 2001).

III.1.2.3.2. Shift of microbial fermentative metabolism with NaCl concentration

Figure III-4 presents the distribution of the soluble metabolites produced concomitantly with H_2 . At a physiological NaCl concentration of $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, the production of acetate and butyrate as major fermentation products suggests that *Clostridium* spp were the dominant bacteria in the mixed culture. Hydrogen production is also presented on Figure III-4. As the theoretical rate of H_2 production through the acetate and butyrate pathways is 2 moles H_2 per mole of acetate or butyrate, the experimental observation of this ratio reflects whether hydrogen is entirely produced by the acetate and butyrate pathways (value close to 2) or if H_2 is concomitantly consumed by homoacetic or other hydrogen-consuming bacteria causing an overproduction of acetate (lower than 2). Hydrogen consumption results either from homoacetogenesis producing only acetate from H_2 and CO_2 or from caproate formation from H_2 and equimolar amounts of acetate and butyrate. In Figure III-4, a clear consumption pathway is shown with no caproate production, meaning that hydrogen consumption was likely due to the activity of homoacetogenic bacteria already present in the inoculum.

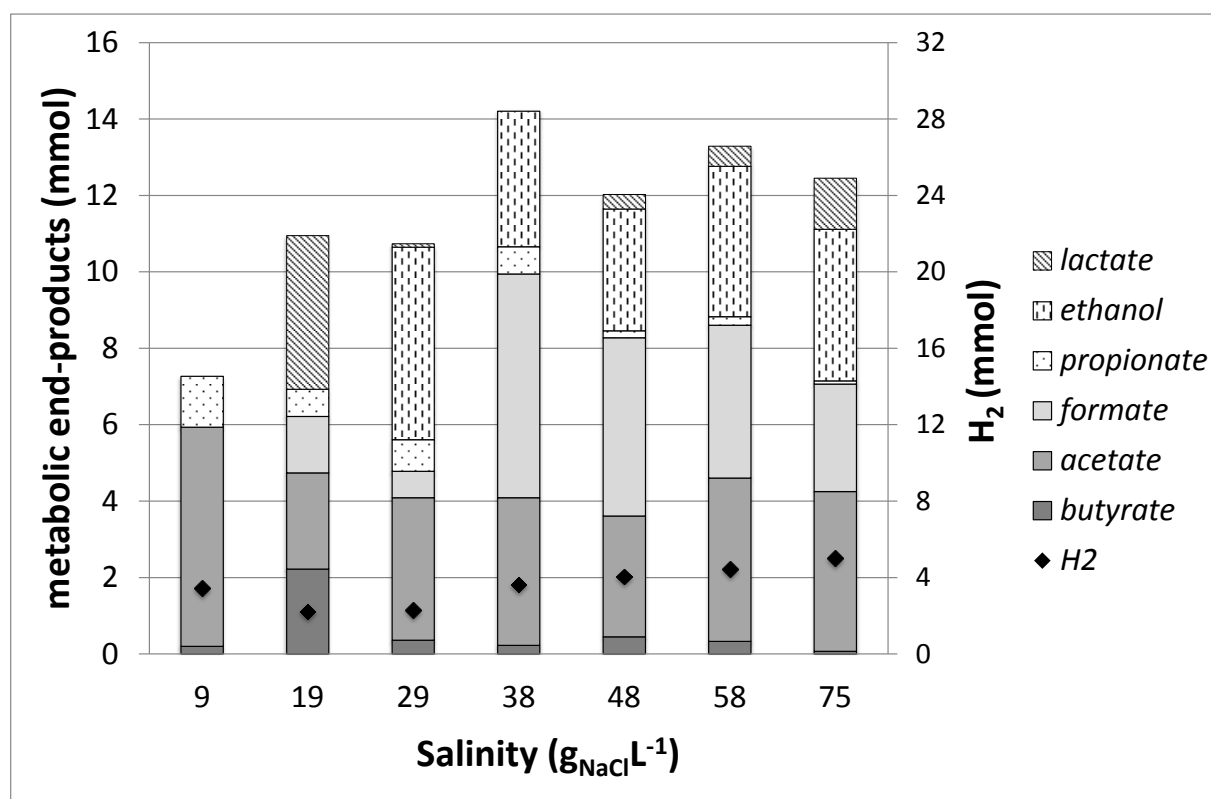


Figure III-4 : Metabolic end-product distribution (in mmoles) and maximal H₂ production (in mmoles) according to NaCl concentrations. The values correspond to the average of three replicates

Furthermore, increasing NaCl addition led to an increase of formate production, and in higher proportion above 38 gNaCl L⁻¹. The formate metabolic pathway which produces concomitantly hydrogen occurs when enteric facultative anaerobes such as *Escherichia coli* are involved (Hallenbeck and Benemann, 2002). However, accumulation of formate was likely due to an increase of glucose conversion to formate, and the lack in formate dehydrogenase activity or inhibition of microorganisms able to use formate for their own growth such as methanogens. Increasing salt concentration led also to an increase of the lactate concentration. Lactate pathway can be either a concurrent route for hydrogen production (Noike et al., 2002) or the result of an alternative metabolic route of hydrogen-producing bacteria under environmental stress (Hawkes et al., 2007). This means that lactic bacteria were probably still active in such moderate halophilic environment as it was previously shown by Roling et al. (Roling et al., 1999) with *Tetragenococcus halophila* a salt-tolerant bacteria capable of mixed acid fermentation at 100 gNaCl L⁻¹. Furthermore, ethanol production increased from 0 to 5.04 mmol between 19 and 29 gNaCl L⁻¹, respectively, and remained then stable for higher salinities. As a result, the ethanol route, which is a concurrent route of fermentative hydrogen production (Hawkes et al., 2007; Guo et al.,

2010), was induced by highly moderate salt concentration, likely by modifying the overall metabolism of hydrogen-producing bacteria. Kivisto et al. (Kivisto et al., 2010) showed that halophilic bacteria *Halanaerobium saccharolyticum* (Hssa) produced low amount of ethanol by glycerol fermentation. Liu et Wang (Liu and Wang, 2012) showed that ethanol and acetate were the major soluble products of a pure culture of *Bacillus megaterium* from glucose in a dark fermentation process operated within a range of 4 to 70 g_{NaCl} L⁻¹. In contrast, Zheng et al. (Zheng et al., 2005) showed that the ethanol fraction did not change significantly by increasing NaCl concentrations from 0 to 30 g_{NaCl} L⁻¹ in mixed culture with glucose as substrate.

Nevertheless, the propionate pathway seemed to be strongly inhibited by NaCl as a decrease of propionate production from 1.33 to 0.09 mmol occurred from 9 to 75 g_{NaCl} L⁻¹, respectively. No inhibition of the hydrogen consumption rate was observed in previous studies even though Zheng et al. (Zheng et al., 2005) showed that the propionate fractions did not change significantly with NaCl concentration from 0 to 30 g_{NaCl} L⁻¹ in mixed culture with glucose as substrate.

III.1.2.3.3. Shift of the bacterial community composition towards the emergence of *Vibrio* subspecies as main hydrogen-producing bacteria in moderate halophilic environment

First, the 16S rRNA gene-based CE-SSCP fingerprint profiles of the cultures operated at different NaCl concentrations are presented in Figure III-5 and each profile correspond to the average of three replicates determined at the maximum H₂ production time. Overall, these profiles presented very simple communities structures with an average Simpson diversity index of 0.88±0.05, and the emergence of only one or two main peaks as main dominant bacteria for each salt concentration. A clear shift in bacterial communities was observed from 19 g_{NaCl} L⁻¹ up to the highest NaCl concentration, which is consistent with the results obtained on the distribution pattern of microbial metabolites and hydrogen production performances. According to the literature dealing with fermentative hydrogen producing bacterial community (Quéméneur et al., 2011; Quéméneur et al., 2012), the inoculum was more diverse than the profiles obtained within the reactors, with a Simpson diversity index of 0.98 for the inoculum bacterial community.

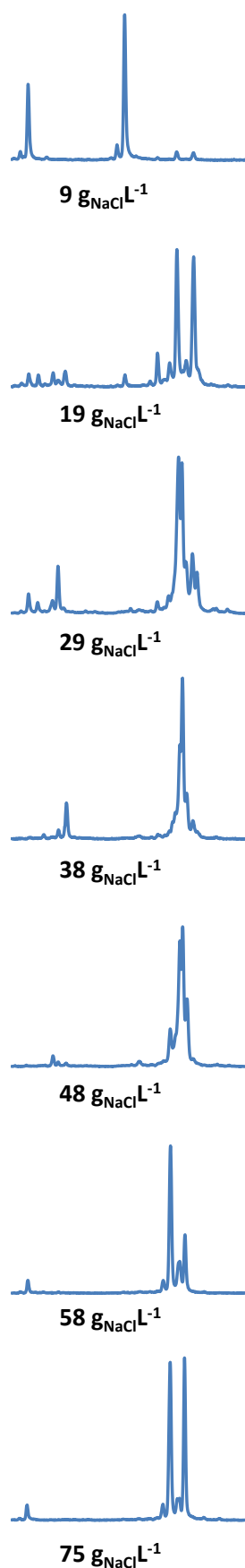


Figure III-5 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from H_2 -producing mixed cultures supplemented with different NaCl concentration.

The profiles correspond to samples taken at the maximum H_2 production time. The X and Y axes of each peak represent respectively the relative peak electrophoresis migration distance and the relative peak intensity (Arbitrary Units).

Figure III-6 presents the principal component analysis (PCA) comparing the genetic distances between CE-SSCP profiles representing the bacterial communities at the maximum H_2 production time, according to the experimental conditions (Quéméneur et al., 2012). As shown in Figure III-6, the individual profiles were highly similar under a same condition, suggesting a high reproducibility of the experiments. Moreover, samples could be clustered according to the dominant species in association with a salinity, with one group at $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, one group for samples ranging from 19 to $48 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, and a last group from 58 to $75 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. These results suggested that salinity was an important factor to select different specific species in non saline conditions (cluster 1 at $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$), in conditions closed to marine ones (cluster 2 from 19 to $48 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$) and in high halophilic conditions (cluster 3 from 58 to $75 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$). Changes in lag-phase ($p < 0.001$) and maximal H_2 production value ($H_{2\text{max}}$) ($p < 0.001$) correlated significantly with the genetic distance between samples. These results show that genetic differences between bacterial communities can be directly correlated to their metabolic activity. This tendency can be observed in Figure III-4 where three distinct behaviours are clearly distinguished. In Figure III-4, the cluster 1 presents acetate and butyrate production pathways and propionate consumption pathway. Cluster 2 shows additional formate production and ethanol consumption pathways. Cluster 3 presents acetate, butyrate and formate production pathways and ethanol and lactate consumption pathways with an interesting inhibition of propionate consumption pathway due to sodium chloride concentration.

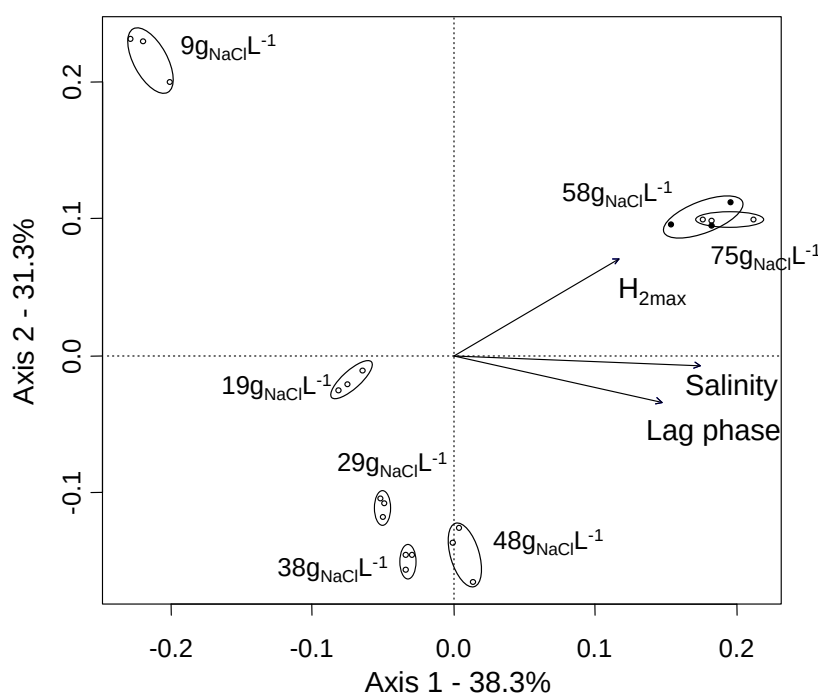


Figure III-6 : Principal Component Analysis (PCA) biplot of CE-SSCP profiles. For each salinity, triplicates were clustered with ovals. The first two principal components (Axis1 and Axis2) explained 69,6% of the genetic variation. Significant linear correlations between changes in genetic profiles and changes in environment parameters are indicated by arrows: lag phase ($p < 0,001$), salinity ($p < 0,001$) and H_{2max} ($p < 0,001$).

One DNA sample of each triplicate was then sequenced by pyrosequencing. *Tableau III-1* presents the percentage of species representing 1% or more of the bacterial community and *Figure III-7* shows the phylogenetic distribution of bacterial orders found at the maximum hydrogen. These results are in accordance with PCA results as the addition of NaCl changed substantially global bacterial community structures. *Figure III-7* shows a clear shift in microbial community composition in favor of *Vibrionales* with increasing NaCl concentration. Indeed, relative abundances of *Clostridium*, *Enterobacter* and *Escherichia* species decreased as the salinity increased, and *Vibrio* spp. supplanted gradually these species (*Tableau III-1*). In non-halophilic conditions, the most abundant species were affiliated to genera *Clostridium*, *Enterobacter* and *Escherichia* spp. In moderate halophilic conditions, i.e. $38 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, bacteria belonging to *Bacteroidales* (43%) and *Vibrionales* (43%) orders were the main dominant bacteria (*Figure III-7*). At higher salinities, *Vibrio* spp. was the main bacteria found. The proportion of *Vibrio* spp. within the microbial community increased gradually with increasing salt concentration to reach up to 92% at $75 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. In Cluster 3, a singular strain was identified which belongs to the family of *Vibrionaceae*. The sequence of this main strain presents a similarity percentage lower than 95% when compared to reference sequences.

Tableau III-1: Taxonomic classification of bacterial taxonomic distribution (in %) according to the salt concentration, and obtained by pyrosequencing.

Bacterial orders are presented in boldcase while species or closest known phylogenetical level in italics. Names in italics correspond to the closest physiogenetical known sequence depending on the percentage of identity (*I*) to reference sequence (species if $I > 97\%$; genus if $97\% \geq I > 95\%$; family if $95\% \geq I > 90\%$; order if $90\% \geq I > 85\%$). Relative abundance was defined as the number of sequences affiliated with that taxon divided by the total number of sequences per sample. Phyla, classes, and genera making up less than 1% of total composition in all libraries were grouped as “others”.

% ORDER / species (closest physiogenetical known sequence)	9gNaCl/L	19gNaCl/L	29gNaCl/L	38gNaCl/L	48gNaCl/L	58gNaCl/L	75gNaCl/L
ALTEROMONADALES	1	19	6	2	1	0	0
<i>Pseudoalteromonas sp</i>	1	19	6	2	1	0	0
BACTEROIDALES	0	0	19	5	26	16	2
<i>Bacteroidaceae (unk genus)</i>	0	0	1	0	4	0	0
<i>Bacteroidales (unk family)</i>	0	0	16	4	19	15	2
<i>Porphyromonadaceae (unk genus)</i>	0	0	2	1	3	1	0
CLOSTRIDIALES	44	28	29	43	17	2	2
<i>Clostridiaceae (unk genus)</i>	4	9	14	1	0	2	2
<i>Clostridiaceae unclassified (unk genus)</i>	0	0	1	36	0	0	0
<i>Clostridiales (unk family)</i>	0	0	1	6	0	0	0
<i>Clostridium (unk species)</i>	39	1	0	0	0	0	0
<i>Clostridium cochlearium</i>	0	1	1	0	0	0	0
<i>Clostridium sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	0	5	1	0	0	0	0
<i>Oscillibacter valericigenes</i>	0	12	11	0	17	0	0
ENTEROBACTERIALES	47	2	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter hormaechei</i>	4	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter sp</i>	27	1	0	0	0	0	0
<i>Escherichia (unk species)</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	8	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia sp</i>	7	1	0	0	0	0	0
FUSOBACTERIALES	0	0	1	0	0	0	0
<i>Propionigenium maris</i>	0	0	1	0	0	0	0
VIBRIONALES	3	47	38	43	47	79	92
<i>Vibrio nereis</i>	0	0	13	26	22	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	11	4	1	0	0	0
<i>Vibrio proteolyticus</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Vibrio sp</i>	2	36	19	16	17	0	0
<i>Vibrio tubiashii</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Vibrionaceae (unk genus)</i>	0	0	0	0	8	79	92
Others	5	4	7	7	9	3	4

Species belonging to genera *Clostridium*, *Enterobacter* and *Escherichia* are well-known as highly efficient H₂ producers, often isolated from mixed cultures able to produce hydrogen by dark fermentation in mesophilic conditions (Hawkes et al., 2007; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo et al., 2010; Quéméneur et al., 2010, 2012; Quéméneur, Hamelin, Benomar, et al., 2011; Quéméneur, Hamelin, Latrille, et al., 2011), which corroborates the results

obtained for low saline conditions ($9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$). However, the abundance of these bacteria was significantly lower at any concentration above $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. This is consistent with previous reports of Alshiyab et al. (Alshiyab et al., 2008) who studied the effect of salt addition to fermentation medium on hydrogen production. Their study was carried out at low NaCl concentrations from 0 to $5 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. They showed that NaCl negatively impacted glucose degradation by *Clostridium acetobutylicum*, causing a productivity loss of 18% from 0 to $5 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. Zheng et al. (Zheng et al., 2005) showed a decrease of 64% of H_2 yield with heat-treated anaerobic mixed cultures when increasing the salt concentration from 0 to $8.4 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. This decrease in hydrogen yield led to similar low values of biohydrogen yield from $1.70 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ to $0.61 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ for respective NaCl concentration of $3 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$ and $30 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$ that is consistent with our observations of $0.65 (\pm 0.01) \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ at $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. In contrast, at such low NaCl concentration, Lee et al. (Lee et al., 2012) showed a decrease of hydrogen production when Na^+ ion concentration increased. They studied the effect of salt concentration on metabolic pathways in dark fermentation from 0 to $12 \text{ g}_{\text{Na}^+} \text{ L}^{-1}$ using an acid-treated anaerobic sludge as inoculum. These results are not in accordance with our results, maybe because of several differences in experimental conditions. Indeed, acid pretreatment of the inoculum could have led to select spore-forming bacteria, such as members of *Clostridiales* order, which was probably detrimental to hydrogen production at higher salt concentration, as same as our results suggested. Moreover, in our study, no pretreatment was used and the inoculum originating from a saline source was used under similar conditions of salinity (for $70 \text{ g}_{\text{Na}^+} \text{ L}^{-1}$ conditions) and pH (pH 8).

Poorly referenced in the literature, hydrogen production from marine bacteria was previously observed with *Bacillus megaterium* belonging to the *Bacillales* order and isolated from sludge of an intertidal zone of a bathing beach in Tianjin (China) (Liu and Wang, 2012). Liu et al. (Liu and Wang, 2012) showed that *Bacillus megaterium* could be applied to biohydrogen production using both marine and fresh organic water. Best performances of *Bacillus megaterium* were obtained at pH 7, 37°C and $30 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$ within a range of 4 and $70 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$ with a hydrogen production rate of $1.65 (\pm 0.04) \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$. At salt concentration higher than $50 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, Brown et al. (Brown et al., 2011) described a new alkaliphilic bacterium, *Halanaerobium hydrogeniformans*, isolated from haloalkaline anaerobic sediments of Soap Lake in Washington State. They showed that *Halanaerobium hydrogeniformans* was capable of hydrogen production in haloalkaline conditions, at pH 11 and $70 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. Simankova et al. (Simankova et al., 1993) isolated also *Halocella cellulolytica*,

from cyanobacterial mats and anaerobic sediments of the saline lagoons of lake Sivash (Crimea) of variable salinities. *Halocella cellulolytica* was able to produce hydrogen by dark fermentation from a large variety of substrates, including glucose, and produces acetate, ethanol, lactate, H_2 and CO_2 as fermentation products with cellulose as substrate. The optimal growth parameters for this strain were pH 7, $150 \text{ g}_{NaCl} \text{ L}^{-1}$, 39°C . *Halocella cellulolytica* produced more than $4 \text{ mmol}_{H_2} \text{ L}^{-1}$ during microcrystalline cellulose breakdown. Oh et al. (Oh et al., 2003) showed recently that five *Vibrio* spp, isolated from anaerobic granular sludge, produced efficiently hydrogen with 1.22 and $1.12 \text{ mol}_{H_2} \text{ mol}_{Glucose}^{-1}$ with acetate and ethanol as main metabolites (Figure III-4). Those *Vibrio* spp presented high H_2 conversion properties among 34 isolates but they were not studied under moderate halophilic conditions.

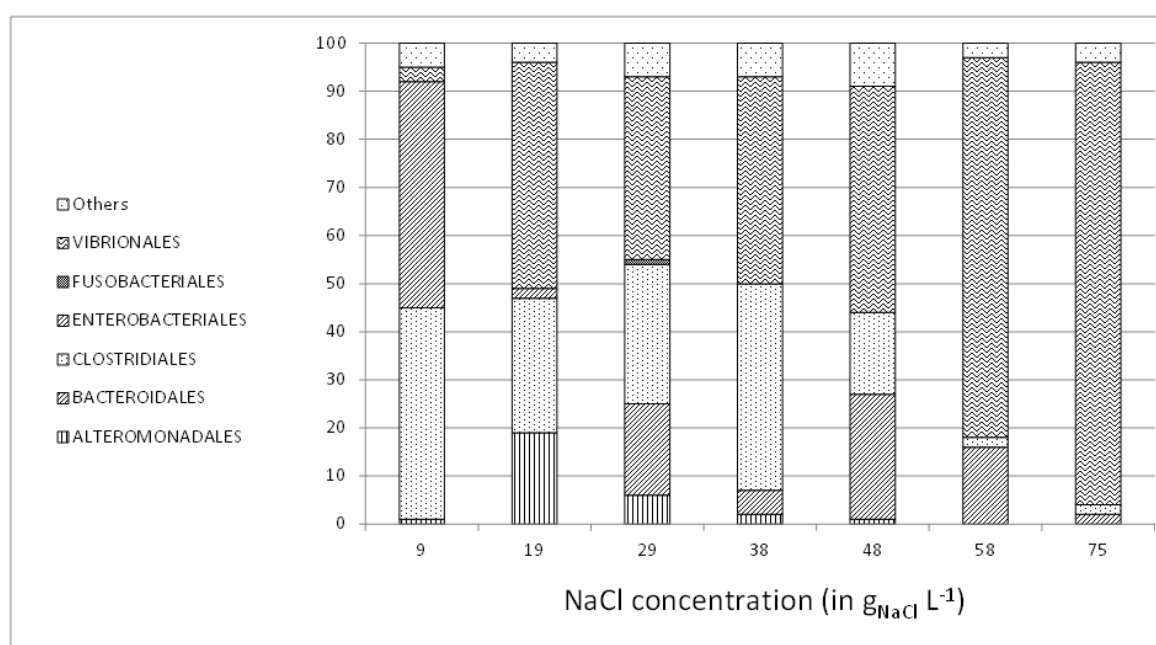


Figure III-7 : Phylogenetic distribution of bacterial orders found at the maximum hydrogen production time and for different NaCl concentrations.

Finally, the composition of bacterial communities at $9 \text{ g}_{NaCl} \text{ L}^{-1}$ was similar to that reported in previous dark fermentation studies (Cheng et al., 2008; Lin et al., 2008; Quéméneur et al., 2010, 2012; Quéméneur et al., 2011). Nevertheless, at $38 \text{ g}_{NaCl} \text{ L}^{-1}$ *Clostridiales* spp. was in co-dominance with *Vibrio* spp. Then, the bacterial community changed with increasing NaCl concentration until *Vibrio* spp. became largely dominant (92%) at $75 \text{ g}_{NaCl} \text{ L}^{-1}$. At $58 \text{ g}_{NaCl} \text{ L}^{-1}$ and $75 \text{ g}_{NaCl} \text{ L}^{-1}$ (Cluster 3), a singular strain was identified with a percentage of identity to references sequences lower than 95%. This strain belongs to *Vibrionaceae* and was able to produce hydrogen in high halophilic environment.

III.1.2.4. CONCLUSION

The aim of the present study was to evaluate the impact of moderate halophilic conditions on fermentative hydrogen production as well as microbial communities by increasing NaCl concentrations, with simultaneous objectives of producing biohydrogen and treating organic pollutants from saline effluents. Salt concentration presented a strong selective pressure on the structure of the bacterial communities, characterized by the emergence of a new species affiliated to the family of *Vibrionaceae*. *Vibrio* spp exhibited the highest hydrogen yields at the highest NaCl concentrations ($0.90 \pm 0.02 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ at $75 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$), compared to $0.65 \pm 0.01 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ at $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$, likely due to lower hydrogen consumption rates.

This work reports for the first time the ability of mixed cultures to produce biohydrogen under halophilic conditions that can be found in numerous salty waste streams that have not been used so far. Interestingly, a lowering of the hydrogen consumption rates was observed precluding of further development of efficient bioprocesses for hydrogen production with low consumption rates, and therefore higher stability. Overall, these results give new possibilities of technological development for treating saline effluents and producing biohydrogen efficiently

III.1.3. PRODUCTION D'HYDROGENE PAR FERMENTATION EN CONDITIONS SALINES A PH 6

Suite à la première partie sur la fermentation en milieu salin à pH 8, cette deuxième série d'expériences a été réalisée à pH 6, pH optimal pour la production de biohydrogène par fermentation dans la littérature (Zheng et al., 2005; Guo et al., 2010) pour une gamme de salinité comprise dans un intervalle de 3 à 70g_{NaCl}/L.

III.1.3.1. MISE EN ŒUVRE

Comme dans l'étude à pH 8, l'inoculum utilisé était des sédiments de salins (salins de Saint Martin à Gruissan dans l'Aude), issus d'un fossé collectant les effluents des salins. Ces sédiments ont été filtrés à 2 mm à l'aide d'un tamis. Le pH initial des sédiments était de 8.5 et la salinité de 67,4 g/L. Environ 1,5g d'inoculum ont été ajoutés au milieu pour obtenir une concentration finale de 300 mg_{MV}/L dans un volume liquide final de 200 mL dans des bouteilles de 600 mL. Le pH a été ajusté grâce à une solution tampon de MES (acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique) à 100 mM. La solution d'oligoéléments utilisée était la même que dans les expériences à pH 8 avec les concentrations finales suivantes : 7,50 g/L FeCl₂·H₂O, 0,30 g/L H₃BO₃·H₂O, 0,59 g/L MnSO₄·H₂O, 0,13 g/L CoCl₂·6H₂O, 0,35 g/L ZnCl₂, 0,13 g/L NiCl₂·6H₂O, 0,075 g/L CuCl₂·2H₂O, 0,13 g/L NaMoO₄·2H₂O, 0,8 g/L NH₄Cl. Le pH initial a été ajusté avec une solution de soude NaOH (1M). Les expériences ont été réalisées en triplicats. Afin d'assurer l'anaérobiose, l'espace de tête de chaque bouteille a été purgé à l'azote pendant 5 minutes après inoculation. Les bouteilles ont ensuite été fermées avec un bouchon muni d'un septum et incubées à 35°C pendant plus de 20 jours. Un échantillon d'un volume de 2 mL a ensuite été prélevé périodiquement et centrifugé à 20 000g pendant 10 minutes. Le surnageant et le culot de centrifugation ont ensuite été stockés à -20°C pour des analyses chimiques d'AGV et de métabolites et pour l'extraction de l'ADN l'étude des structures de communautés microbiennes par PCR-CE-SSCP.

III.1.3.2. PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE EN FONCTION DE LA SALINITE A PH 6

Aucune production de méthane n'a été détectée pendant la phase de production d'hydrogène et seules des productions d'hydrogène et de dioxyde de carbone ont été mesurées. La production d'hydrogène en mL_{H₂}/g_{Glucose} est reportée en Figure Annexe-8 dans

l'annexe. L'utilisation du modèle de Gompertz sur la phase de production d'hydrogène a permis d'obtenir des coefficients de corrélation (r^2) supérieurs à 0,986 pour chaque bouteille.

La Figure III-8 présente le taux de conversion maximal d'hydrogène (H_{2max}) en fonction de la salinité. Ce taux (H_{2max}) varie entre $0,023(\pm 0,001)$ mol H_2 /mol $_{Glucose}$ pour 50 g $_{NaCl}$ /L et $0,637(\pm 0,013)$ pour 12 g $_{NaCl}$ /L (Figure III-8). Bien qu'aucune tendance ne soit à noter dans l'influence de la salinité sur le taux production d'hydrogène, ces résultats montrent une meilleure production d'hydrogène à des concentrations moyennes en chlorure de sodium (comprises entre 12 et 41 g $_{NaCl}$ /L) qu'à 3 g $_{NaCl}$ /L et à plus de 50 g $_{NaCl}$ /L. Ces résultats se distinguent des résultats obtenus dans la littérature qui montrent une diminution du taux de conversion de différents substrats en hydrogène avec une augmentation de la salinité du milieu. En effet, les travaux de Zheng et al. (2005) ont montré une diminution constante de la production d'hydrogène à pH 6 de 0.597 mol H_2 /mol $_{Sucrose \cdot j}$ à 0.089 mol H_2 /mol $_{Sucrose \cdot j}$ en augmentant la concentration en chlorure de sodium de 0 à 30 g $_{NaCl}$ /L. De la même façon, Alshiyab et al. (2008) ont montré une inhibition de la production d'hydrogène avec une augmentation de la salinité jusqu'à 30 g $_{NaCl}$ /L à un pH plus élevé (pH 7). Cependant dans les travaux précédents de Zheng et al. (2005) et Alshiyab et al. (2008), les inocula utilisés provenaient de milieux non salins et étaient respectivement des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement et *Clostridium acetobutylicum* en culture pure. Les différences de tendances obtenues dans nos travaux peuvent être dues à la nature très différente de l'inoculum qui est adapté à une forte salinité car issu d'un environnement salin.

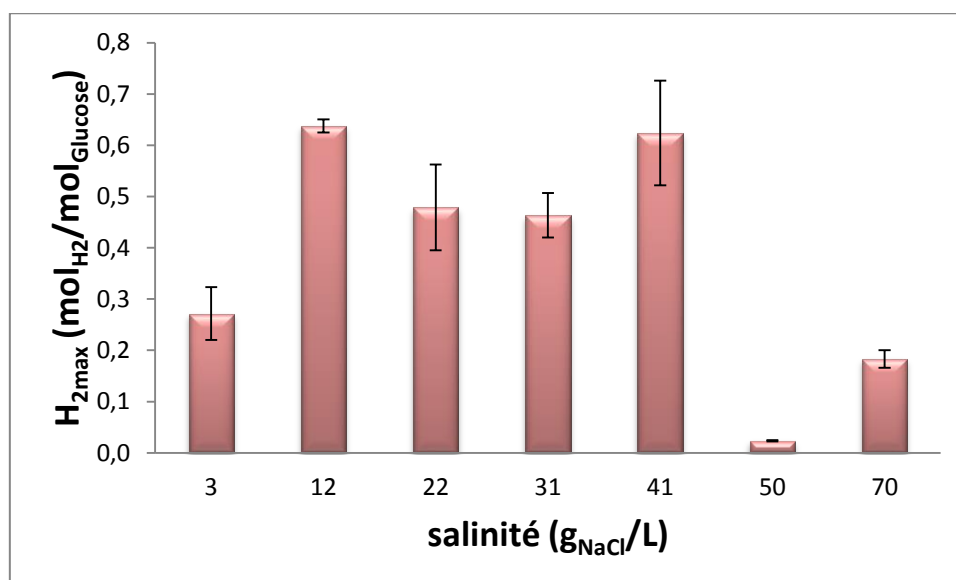


Figure III-8 : Production maximale d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz).

La Figure III-9 présente la vitesse de production maximale d'hydrogène en fonction de la salinité. Il apparaît que cette vitesse est très nettement affectée par la salinité. Une chute est observée dès 12 g_{NaCl}/L. Ceci s'accorde avec les résultats de Zheng et al. (2005). Toutefois, l'augmentation du taux de conversion maximal visible sur la Figure III-8 laisse supposer une consommation de l'hydrogène favorisée pour une faible salinité et ensuite une consommation moindre entre 12 g_{NaCl}/L et 41 g_{NaCl}/L.

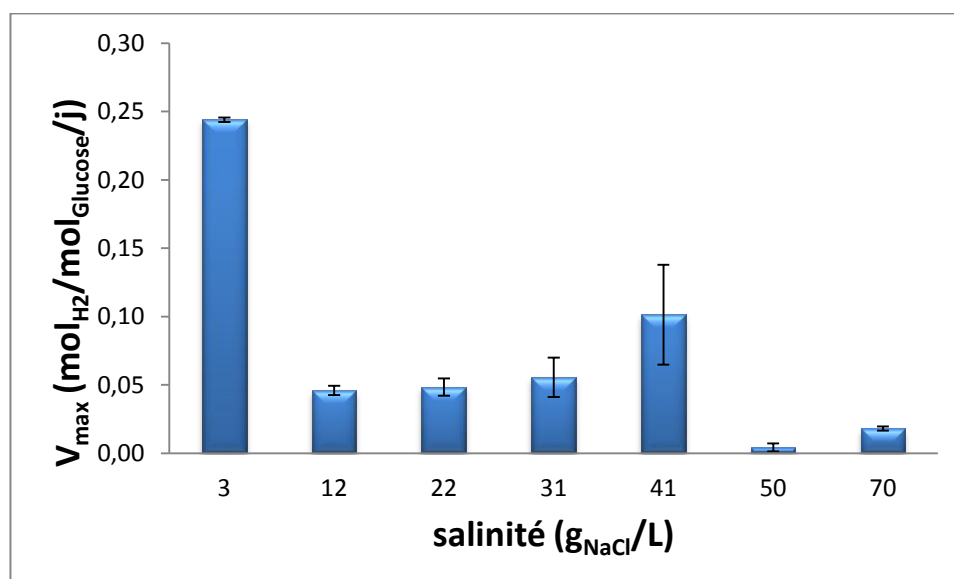


Figure III-9 : Vitesse de production maximale d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz).

La Figure III-10 présente le temps de latence pour la production d'hydrogène en fonction de la salinité. Bien qu'aucune tendance ne soit visible, il est intéressant de noter que le temps

de latence moyen à pH 6 (5.1 ± 2.2 jours)) est très supérieur au temps de latence mesuré à pH 8 (2.4 ± 1.2 jours) (Pierra et al., 2013). Ceci est probablement dû au fait que les sédiments utilisés comme inoculum ont un pH plus proche de 8 (compris entre 7,5 et 8,5) dans leur milieu naturel. Le changement de pH opéré dans la série de test à pH 6 engendre une adaptation plus lente des microorganismes à un milieu plus acide que leur environnement naturel (Yuan et al., 2012).

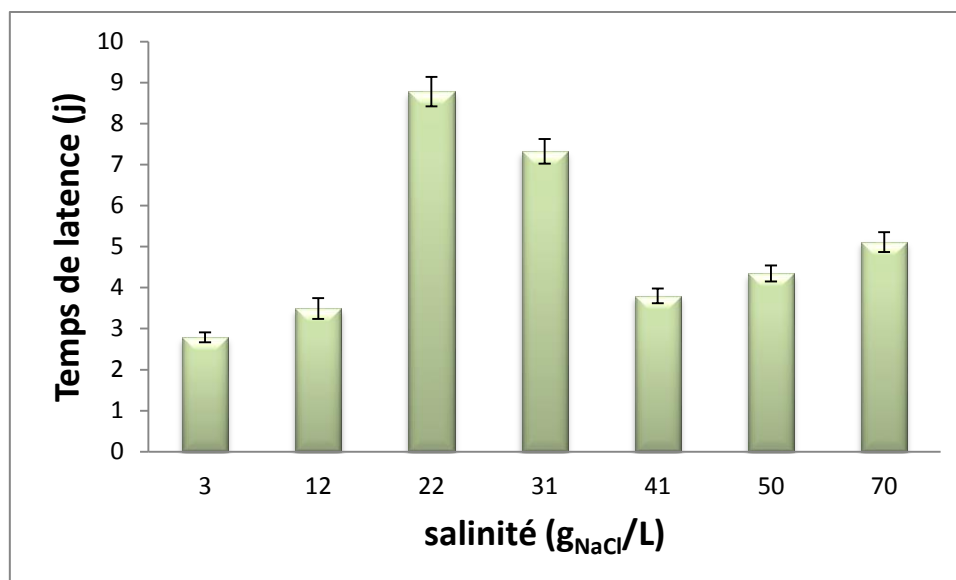


Figure III-10 : Temps de latence sur la production d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz).

III.1.3.3. IMPACT DE LA SALINITE SUR LES VOIES METABOLIQUES FERMENTAIRES LIEES A LA PRODUCTION D'HYDROGENE A PH 6

La Figure III-11 présente les métabolites produits ainsi que l'hydrogène, en fonction de la salinité. La quantité d'hydrogène théorique produite par les voies acétate et butyrate étant de 2 moles d'hydrogène par mole d'acétate ou de butyrate, l'observation de ce ratio (rapport de la quantité d'hydrogène sur les quantités cumulées d'acétate et de butyrate) reflète si l'hydrogène est produit essentiellement par les voies acétate et butyrate (valeur proche de 2), ou s'il est simultanément consommé par des bactéries homo-acétogènes ou d'autres bactéries consommatrices d'hydrogène. Sur la Figure III-11, il apparaît que le rapport de la quantité d'hydrogène produit sur les quantités cumulées d'acétate et de butyrate est inférieur à 2. L'hydrogène est consommé pour les plus faibles salinités (<12 g_{NaCl}/L).

La consommation de l'hydrogène produit peut être due à la production d'acétate à partir d' H_2 et de CO_2 par les bactéries homoacétogènes ou à la formation de caproate à partir d'hydrogène et d'une quantité équimolaire d'acétate et de butyrate. L'absence de caproate sur la Figure III-11 élimine cette seconde voie. La consommation observée s'explique donc par une activité homoacétogène. Ces résultats s'accordent avec les résultats à pH 8. Toutefois, la nature de l'inoculum, issu de sédiments anaérobies salins, joue probablement un rôle sur ces voies car il apporte les bactéries homoacétogènes et surtout permet une inhibition de la voie caproate de consommation d'hydrogène.

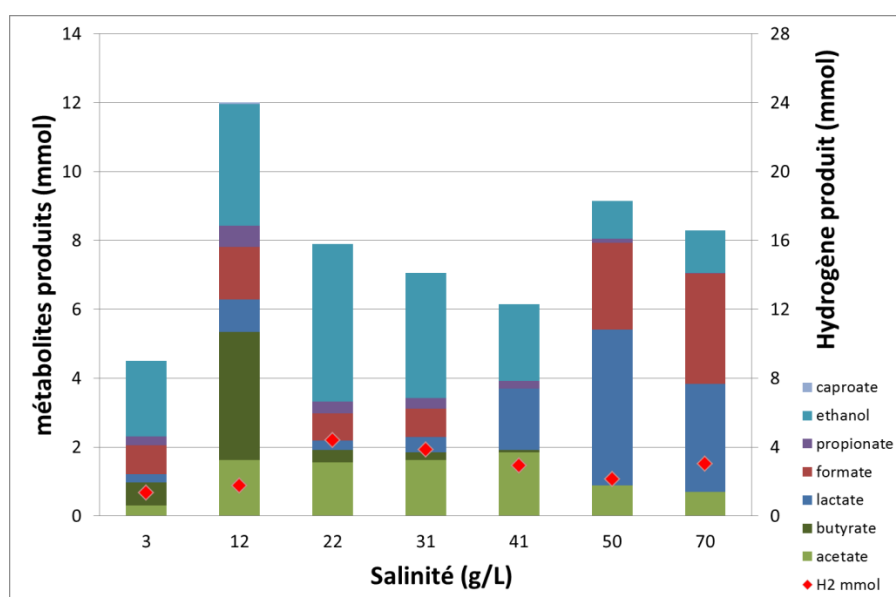


Figure III-11 : Métabolites produits (en mmoles) et production maximale d'hydrogène (en mmoles) en fonction de la salinité.

Pour les plus fortes salinités étudiées (50 et 70 g_{NaCl}/L), une augmentation importante des productions de formate et de lactate est observée. La production de formate peut être un sous-produit de la production d'hydrogène par des bactéries entériques telles que *Escherichia coli* (Hallenbeck and Benemann, 2002). Tout comme pour la série d'expériences à pH 8, la production de lactate, quant à elle, peut être due à une compétition sur la consommation de glucose avec les bactéries lactiques (Noike et al., 2002) ou à une production par les bactéries productrices d'hydrogène subissant un stress environnemental comme une carence en éléments nutritifs ou une baisse de pH due à l'accumulation de sous-produits de la fermentation (Hawkes et al., 2007).

Une absence de propionate dans les métabolites finaux à 50 et 70 g_{NaCl}/L est à noter sur la Figure 1. Ceci s'accorde avec les résultats obtenus à pH 8 qui montrent une inhibition de la voie propionate concurrente à la production d'hydrogène due à une augmentation de la

salinité. Aucune autre étude portant sur la production de biohydrogène en milieu salin n'a montré d'inhibition de la voie propionate, alors que Zheng et al. (2005) ont montré que la production de propionate ne change pas de manière significative de 0 à 30 g_{NaCl}/L en cultures mixtes.

La production d'hydrogène par la voie butyrate semble être affectée par les plus fortes salinités. La Figure III-12 présente le ratio butyrate/acétate (en moles/moles) au maximum de production d'hydrogène en fonction de la salinité pour la série d'expériences à pH 6. Bien que le ratio molaire butyrate/acétate ne présentait pas de tendance en fonction de la salinité pour les essais réalisés à pH 8, dans cette série à pH 6, la proportion d'hydrogène produit par voie butyrate diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en sel jusqu'à devenir nulle à partir de 50 g_{NaCl}/L. Une inhibition de la production d'hydrogène par la voie butyrate au profit de la voie acétate due à la salinité est probable et s'accorde avec les résultats de Zheng et al. (2005) qui ont montré une diminution de la production de butyrate et une augmentation de la production d'acétate en fermentation en milieu salin (0 à 30 g_{NaCl}/L) et en cultures mixtes.

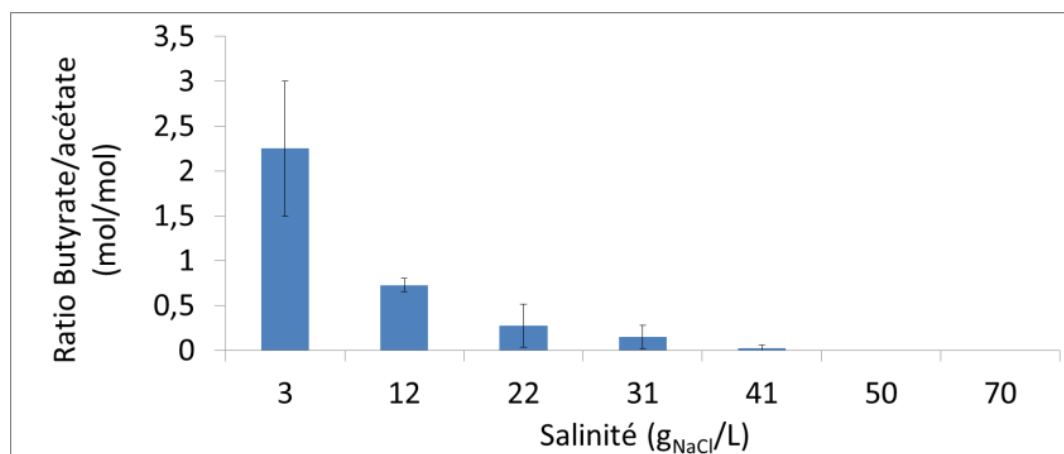
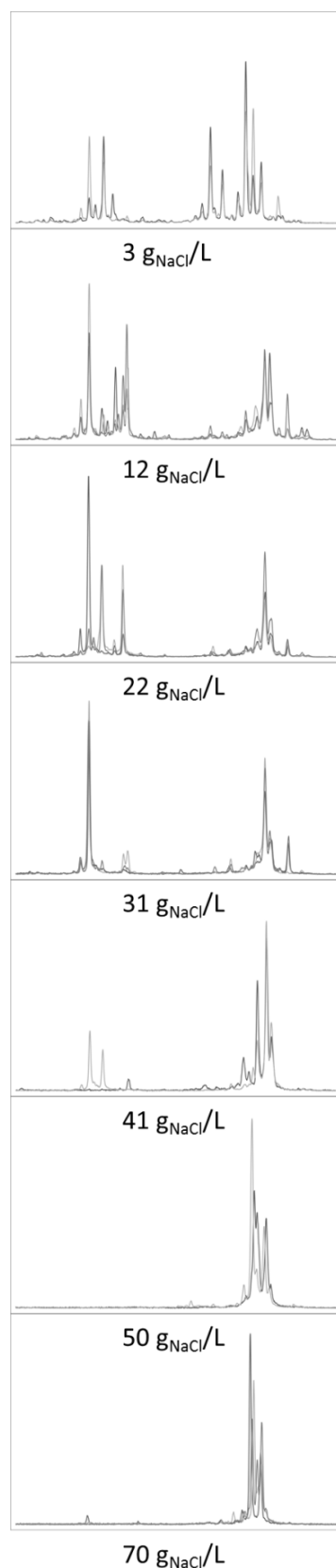


Figure III-12 : Ratio molaire butyrate/acétate au maximum de production d'hydrogène en fonction de la salinité à pH 6

III.1.3.4. IMPACT DE LA SALINITE SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES FERMENTAIRES A PH 6



Les profils CE-SSCP basés sur le gène de l'ARN 16S des espèces qui composent les différentes communautés microbiennes sont présentés en Figure III-13. En comparaison avec les résultats obtenus à pH 8, les communautés microbiennes à pH 6 présentent une plus diversité plus élevée avec un indice de diversité de Simpson de $0,93 \pm 0,04$, proche de celui de l'inoculum (0,98). L'analyse des profils CE-SSCP montre qu'il y a deux groupes de phylotypes principaux à droite et à gauche des profils. D'après les travaux d'identification par clonage-séquençage et par pyroséquençage d'espèces retrouvées en cultures mixtes menés au LBE, il est probable que le groupe situé à gauche des profils représente les clostridies. La Figure III-14 présente les abondances relatives des groupes de phylotypes «clostridies » ou des autres espèces dans les communautés microbiennes correspondant à chaque salinité. On observe une diminution significative de la proportion de clostridies avec l'augmentation de la salinité. Ceci peut être corrélé avec les résultats obtenus en termes de performances de production d'hydrogène (Figure III-8). En effet, les clostridies sont connues pour être des organismes producteurs d'hydrogène (Guo et al., 2010). Ainsi, la baisse de la production d'hydrogène à 50 et 70 g_{NaCl}/L peut être due à la disparition des clostridies à ces trop fortes salinités au profit d'autres espèces halotolérantes mais présentant des capacités réduites voire nulles pour la production d'hydrogène. Alors que Alshiyab et al. (2008) avaient montré en culture pure une diminution de 18% de la production d'hydrogène par *Clostridium acetobutylicum* en augmentant la concentration en sel de 0 à 5 g_{NaCl}/L, d'autres espèces de *Clostridium* pourraient présenter une meilleure tolérance aux milieux salés (jusqu'à 41 g_{NaCl}/L).

Figure III-13 : Profils SSCP (des gènes d'ARN 16S) en fonction de la concentration en chlorure de sodium. Les profils correspondent aux échantillons prélevés au maximum de production d'hydrogène. Les axes X et Y représentent respectivement la distance de migration de la séquence et l'intensité du pic.

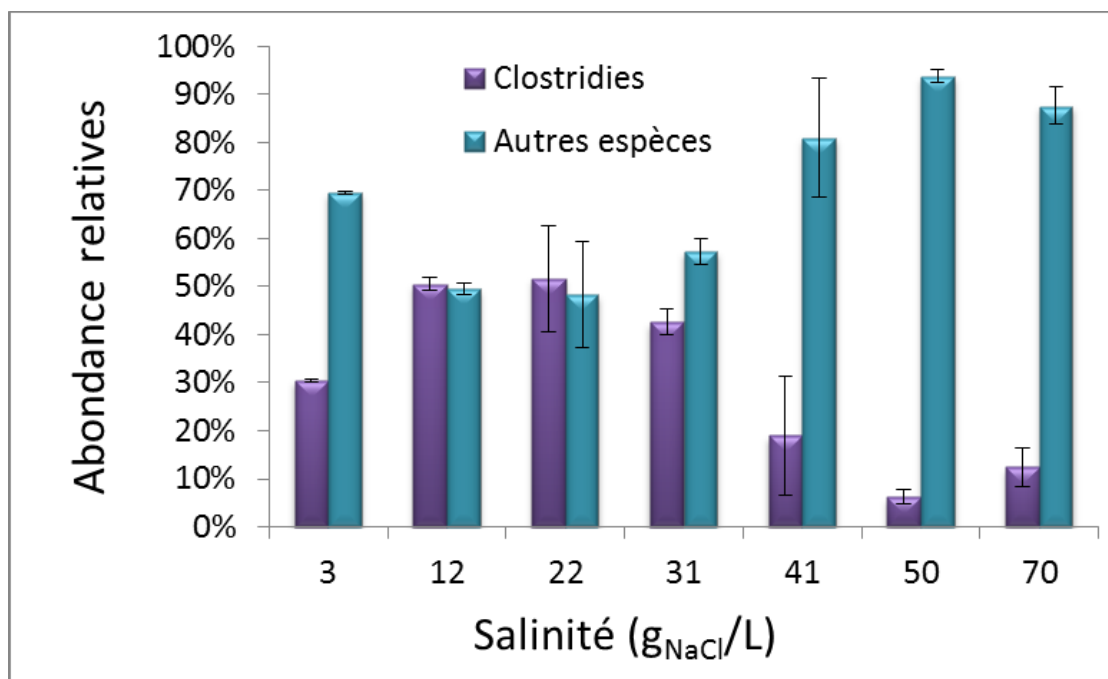


Figure III-14 : Abondances relatives cumulées des groupes de phylotypes bactériens observés sur les profils SSCP : Ces abondances calculées à partir des profils CE-SSCP donnent une identification hypothétique des groupes microbiens retrouvés à partir d'assignations observées de manière récurrentes dans les travaux du LBE

La Figure III-15 présente l'analyse en composantes principales (ACP) des profils CE-SSCP. Elle permet de comparer les distances génétiques entre les différentes communautés bactériennes. Les deux premières composantes représentent 54.5% de la variance. Aucune corrélation n'a été observée entre les structures de communauté microbiennes et les paramètres de salinité, de production d'hydrogène H_2max et de vitesse de production maximale d'hydrogène V_{max} . En comparaison avec les résultats à pH 8, les répliquats de profils SSCP sont beaucoup plus éloignés les uns des autres sur l'ACP, ce qui indique une dispersion plus importante des communautés bactériennes de ces répliquats et par conséquent, une moins bonne reproductibilité des sélections microbiennes à pH 6 qu'à pH 8.

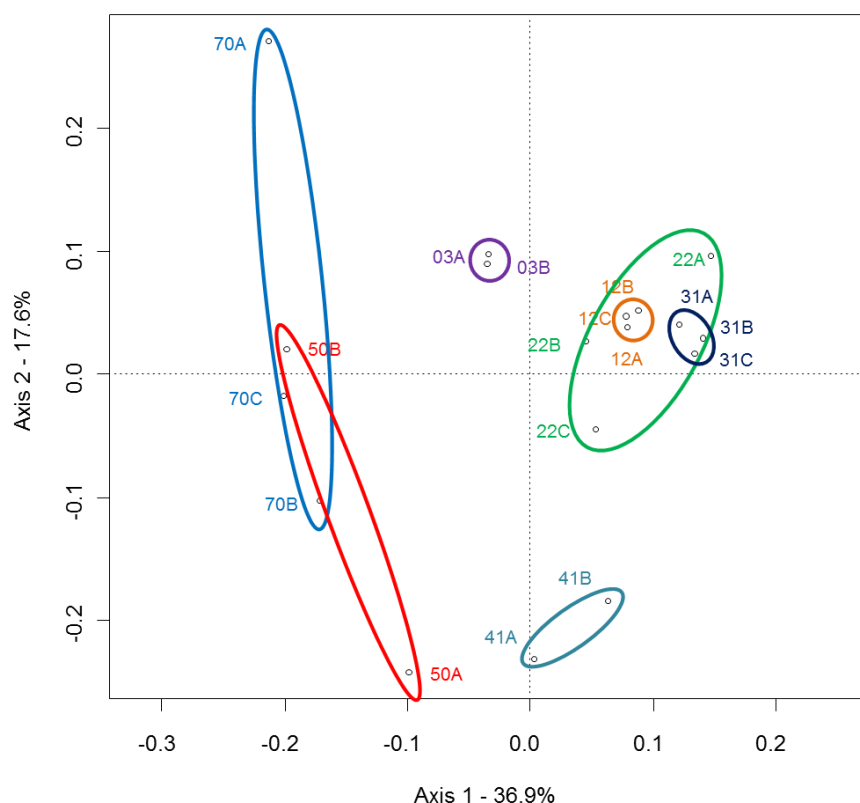


Figure III-15 : Analyse en composante principale (ACP) des profils CE-SSCP.

Pour chaque salinité, les reliquats ont été regroupés dans des ovales. Les répliquats correspondant à une condition de salinité sont indiqués par des points groupés dans des ovales en violet, orange, vert, bleu marine, turquoise, rouge et bleu pour les salinités respectives de 3 g_{NaCl}/L (03A, 03B), 12 g_{NaCl}/L (12A, 12B, 12C), 22 g_{NaCl}/L (22A, 22B, 22C), 31 g_{NaCl}/L (31A, 31B, 31C), 50 g_{NaCl}/L (50A, 50B) et 70 g_{NaCl}/L (70A, 70B, 70C).

III.1.3.5. CONCLUSION

Ces résultats en fermentation à pH 6 montrent, contrairement aux études précédentes à pH 8, une meilleure conversion du substrat en hydrogène avec un ajout de sel avec notamment un maximum de $0,637(\pm 0,013)$ pour une salinité de 12 g_{NaCl}/L . Cette augmentation du taux de conversion de glucose en hydrogène est limitée à des concentrations en chlorure de sodium proches des concentrations marines (comprises entre 12 et 41 g_{NaCl}/L). Un temps de latence plus long qu'à pH 8 a été observé et peut être attribué à une adaptation des microorganismes à un milieu plus acide que celui de leur environnement naturel. Enfin, les analyses des profils de communauté microbiennes (CE-SSCP) permettent de supposer que des espèces proches des clostridies produiraient de l'hydrogène jusqu'à 41 g_{NaCl}/L avec de meilleurs rendement qu'à 3 g_{NaCl}/L (i.e. sans ajout de sel).

III.1.4. DISCUSSION DE SYNTHÈSE SUR LE CHAPITRE III

A pH 8 comme à pH 6, la salinité s'est révélée être un paramètre important qui influence la production d'hydrogène ainsi que la composition bactérienne des communautés associées.

III.1.4.1. PRODUCTION D'HYDROGÈNE

Les expériences réalisées en milieu salin à pH 8 présentent des rendements plus élevés de production d'hydrogène à des concentrations élevées de NaCl ($0,90 \pm 0,02 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ à $75 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$), comparativement à $0,65 \pm 0,01 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ à $9 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$. Les performances en termes de conversion du glucose en hydrogène ont été inférieures à pH 6 qu'à pH 8 avec un maximum de $0,64 \pm 0,013 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ pour $12 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$. Ceci s'accorde avec les résultats existants dans la littérature rapportant une production d'hydrogène en culture pure pour des pH neutres ou alcalins pour *Bacillus megaterium* (Liu and Wang, 2012), *Halocella cellulolytica* (Simankova et al., 1993) et *Clostridium acetobutylicum* (Alshiyab et al., 2008). A pH 6, une inhibition de la production d'hydrogène par voie butyrate due à la salinité a été observée.

Aux deux valeurs de pH étudiées, la salinité induit une inhibition de la consommation d'hydrogène par les voies caproate et propionate et une production de lactate aux salinités les plus élevées. Cette dernière peut être due à une compétition sur la consommation de glucose avec les bactéries lactiques ou à une production de lactate réalisée par les bactéries productrices d'hydrogène subissant un stress environnemental. La consommation d'hydrogène observée semble le fait de bactéries acétogènes présentes dans l'inoculum.

III.1.4.2. SÉLECTION MICROBIENNE

A pH 8, l'augmentation de la salinité jusqu'à $70 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ a imposé une forte pression de sélection sur la structure des communautés bactériennes, caractérisées par l'émergence d'une nouvelle espèce affiliée à la famille de *Vibrionaceae*. Il a été observé que les *Vibrio* spp sont capables de produire de l'hydrogène dans des conditions halophiles modérés. Une nouvelle souche appartenant à la famille des *Vibrionaceae* présente de bonnes aptitudes à produire de l'hydrogène à des concentrations élevées de sel ($58\text{-}75 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$).

A pH 6, une moins bonne reproductibilité des résultats a été observée, notamment concernant les communautés microbiennes, par rapport aux tests réalisés à pH 8. De plus, la sélection microbienne a été plus importante à pH 8 qu'à pH 6 alors que l'on pouvait s'attendre à une baisse de la diversité microbienne plus significative à pH 6, valeur plus éloignée de celle de l'inoculum dans son milieu naturel. Enfin, à pH 6, des espèces proches des clostridies produiraient de l'hydrogène jusqu'à 41 g_{NaCl}/L avec de meilleurs rendement qu'à 3 g_{NaCl}/L. Ces résultats montrent, contrairement aux études précédentes, une amélioration de la production d'hydrogène à des concentrations en NaCl proches des concentrations marines (entre 12 et 41 g_{NaCl}/L) par rapport à la condition la moins saline à 3 g_{NaCl}/L. Cette tendance peut être attribuée au choix de l'inoculum ici déjà adapté à un milieu salin contrairement à ce qui a été fait précédemment avec l'utilisation de boues anaérobies comme inoculum (Zheng et al., 2005).

III.1.5. CONCLUSION SUR LE CHAPITRE III

Cette partie aura permis de montrer pour la première fois la faisabilité de la fermentation dans des conditions salines, contrairement à ce qui a été montré précédemment dans la littérature (Zheng et al., 2005) Grâce à l'utilisation de sédiments salins comme inoculum, des microorganismes adaptés à des salinités modérées ont pu être sélectionnés. Ces expériences ont permis de caractériser les voies métaboliques utilisées dans ces conditions par les différents microorganismes acteurs de cette production d'hydrogène. La fermentation saline à pH 8 notamment, avec une forte sélection de *Vibrio* spp., présente de bonnes performances en termes de rendement de conversion du substrat en hydrogène et a également l'avantage de se placer à une valeur de pH favorable à la conduite de systèmes bioélectrochimiques (BES) comme les électrolyseurs microbiens (MEC) (Patil et al., 2011).

Enfin au terme de ce chapitre, l'impact des communautés microbiennes sélectionnées sur l'activité et la maintenance des communautés bactériennes du biofilm électroactif de l'électrolyseur microbien, dans le cadre du couplage, reste en suspens. Il peut donc être envisagé d'utiliser la biomasse sélectionnée lors de la production d'hydrogène dans les deux conditions de pH testées pour observer son impact sur le biofilm électroactif. Ceci fait l'objet du Chapitre V (page 191).