

Iron-enrichment strategy for selecting electroactive microorganisms: New insight in microbial community characterization.

PIERRA Mélanie, TRABLY Eric, GODON Jean-Jacques, Alessandro A. CARMONA-MARTINEZ,
BERNET Nicolas

D'après l'article en préparation pour «Bioresource Technology»

Highlights:

- Efficient iron-enrichment strategy for saline ARB pre-selection with only one step required.
- Helpful method to select *Geobacteraceae*, known as DMRB and sometimes electricigens.
- Selection of *Geokalibacter subterraneus*, a recently found electroactive bacteria.
- Increase and further decrease of electroactivity efficiency due to a divergence in microbial selection between DMRB and ARB.

Abstract:

Bioelectrochemical systems (BES) use the particular characteristic of electroactive biofilms to transfer electrons to a solid external acceptor (anode). Previous studies have faced some difficulties in obtaining repeatable performances from diverse natural sources of inocula, due to different compositions of microbial communities found in the mature electroactive biofilms capable of producing significant high current densities higher than 1 A/m², specially under high saline conditions. Different enrichment methods have been proposed for the development of efficient electroactive biofilms. Some of them are based on the hypothesis that anode-respiring bacteria (ARB) are mostly iron-respiring bacteria. Few studies have been performed focusing on the evolution of microbial communities along this enrichment strategy. In this work, we compare such an enrichment strategy in saline condition, favoring charge transport in bioelectrochemical systems, to the direct selection of

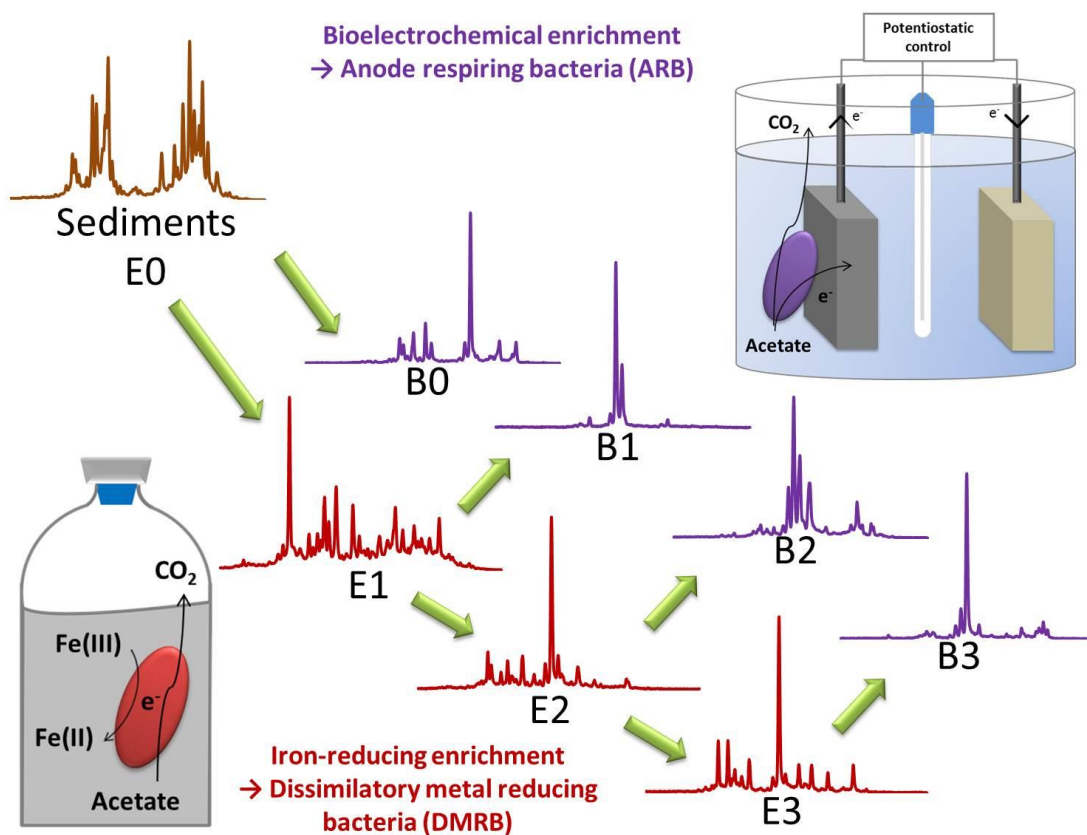
ARN on an electrode. In a first experimental stage, sediments were used to inoculate a saline medium containing Fe(III) ions. Secondly, part of the enriched community was transferred to a potentiostatically controlled system as inoculum to form an electroactive biofilm on a graphite anode. Successive enrichment steps with Fe(III) were conducted to observe the effect of the enrichment strategy on the electrochemical performance and bacterial community structure.

As result, this procedure selected *Geothalibacter subterraneus* after only one enrichment step, providing a practical preliminary selection tool for electroactive bacteria whereas further iron enrichment steps showed divergent selection of communities for respiration on anode or iron linked with decrease of electrochemical performances of biofilms.

Key words:

Enrichment cultures, Iron, BioElectrochemical Systems, *Geothalibacter subterraneus*, *Marinobacterium* sp.

Graphical abstract:



IV.2.2.1. INTRODUCTION

Bioelectrochemical systems (BES), such as Microbial Electrolysis Cells (MEC) or Microbial Fuel Cells (MFC), use the ability of electroactive bacteria to transfer/accept electrons to/from a solid external electron acceptor/donor such as an anode or a cathode, respectively (Pant et al., 2012). The transferred electrical current can be used for the direct production of electricity in MFCs or for the recovering of hydrogen or other products in MECs. Various anode respiring bacteria (ARB) embedded in electroactive biofilms can directly transfer electrons to/from electrode materials (Patil et al., 2012).

While microbial characterisation of several microbial BESs showed the predominance of *Geobacter sulfurreducens* in electroactive biofilms, (Holmes, et al., 2004; Badalamenti et al., 2013), analyses of diverse enriched anodic biofilms revealed many different dominant members within these biofilm communities. An example of such microbial diversity is shown by the found ARBs usually associated to α , β , γ , δ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* and *Actinobacteria* (Liu et al., 2010).

Previous studies showed the presence of anode respiring bacteria although different environmental samples were used as source of microorganisms such as freshwater and marine sediments, salt marshes, anaerobic sludge, wastewater treatment plant sludge and mangrove swamp sediments (Liu et al., 2010; Miceli et al., 2012).

In a natural environment, ARB use a variety of extracellular electron acceptors like iron and manganese (Lovley, 1993; Nealson and Saffarini, 1994). Indeed, studies showed that bacteria isolated from electroactive biofilms are able to couple the oxydation of different substrates with the reduction of metallic oxides, mainly ferric oxides. As electroactivity of bacteria involves their ability to exchange electrons with a solid electrode, the first bacteria studied in pure culture in those systems, *Shewanella putreficiens*, had been chosen because of its ability to reduce solid ferric oxides (Kim, Hyun, et al., 1999; Kim, Kim, et al., 1999). Organisms that have the ability to couple the oxydation of different substrates with the reduction of metallic oxides are called Dissimilatory Metal-Reducing Bacteria (DMRB). This property is a physiological characteristic of microorganisms from the *Geobacteraceae* family (Holmes et al., 2002).

Different enrichment techniques have been used to form high current density electroactive biofilm : the use of a continuous effluents from BES (Huang and Logan, 2008; Sleutels et al., 2011), the scraping and dispersion of electroactive biofilm (Kim, Min, et al., 2005; Miceli et al., 2012; Ketep et al., 2013), the chemical enrichment of DMRB (Kim et al., 2005; Wang et al., 2010) and the placement of the fresh electrode in the vicinity of an already active biofilm anode (Kim et al., 2005).

Previous studies have been performed to select an electroactive biofilm consortium in order to get a stable and efficient anodophilic consortium (Kim et al., 2005; Wang et al., 2010). Kim et al. (2005) studied the effect of the different enrichment strategies described above to improve electricity production in microbial fuel cells (MFC). Using anaerobic sludge as inoculum, this study shows a 50% decrease of current production with cell suspension obtained after the 25th serial transfer of the anaerobic culture in a ferric citrate medium, than when using unacclimated anaerobic sludge. As expected, the startup of the enrichment process was most successful with the biofilm grown from an inoculum originated from bioanodes (scaping/resuspending or using a nearby anodic biofilm). Wang et al. (2010) study was based on a selection of DMRB using a previously developed method for organic matter mineralization with reduction of ferric iron (Lovley et Phillips, 1986). They showed a decrease of lag phase and an increase of Coulombic efficiency from 19% and 23% with biofilm obtained respectively from activated sludge and the original biofilm to 34% with the enriched inoculum. So this study provided good results to improve BES performances but no information about the microorganisms involved.

Till now, most of the enrichment strategies consist in the re-use of an existing electroactive biofilm (Kim, Min, et al., 2005; Wang et al., 2010; Miceli et al., 2012) or effluent originated from a running BES (Huang and Logan, 2008; Sleutels et al., 2011). These techniques imply to run a BES reactor before getting an efficient electroactive biofilm. The iron-enrichment strategy could provide a less energy consuming and easier to prepare technic to pre-select ARBs. Therefore, the enrichment method in this study was chosen in order to select ARB with a capability to use solid iron oxides as electron acceptor before inoculating a BES.

In this work, an enrichment method was developed to select microorganisms able to reduce solid iron oxides as good candidates to be electroactive. The aim of this study was to determine the effect of successive iron-reducing enrichment culture stages on microbial communities and electroactivity performances of the biofilm. The novelty is the description of microbial communities during the enrichment process, an analysis usually ignored in several studies that mainly focused in improving the overall performance of the system without the full understanding obtained by a microbial analysis. The biofilm growth and liquid iron enrichment were performed in saline conditions (35 g_{NaCl}/L), using saline sediment as inoculum, already adapted to high salt concentrations conditions, to provide better conductivity in BES.

IV.2.2.2. MATERIALS AND METHODS

Sediments from a salt plant were used to inoculate a medium containing Fe(III) as sole electron acceptor in order to select bacteria reducing Fe(III) to Fe(II). The enriched community was then used as inoculum in electrochemical cells equipped with a three-electrode setup to form an electroactive biofilm on a graphite anode. This procedure was reiterated three times in four replicates to observe the effect of the succession of enrichment culture stages on both bioelectrochemical performances and electroactive biofilm community structure.

IV.2.2.2.1. Inoculum

The initial seed sediment was collected from a wastewater collection ditch in a salt plant, in the Salin de Saint Martin, Gruissan (France). The sediments were stored at lab temperature before inoculation. The pH of the sediments was 8.5. After centrifugation (20,000g, 10 min), the supernatant of the sediments had a salinity of 67.4 g_{NaCl}/L.

IV.2.2.2.2. Iron-reducing enrichment cultures

Sediments were diluted (10% v/v) in a final working volume of 500 mL with a solution containing MES buffer (100mM) and modified Starkey mineral solution (Rafrafi et al., 2013) containing the following: 5g/L K₂HPO₄, 2g/L NH₄Cl, 0.2g/L Yeast extract, 55mg/L MgCl₂, 6H₂O, 7mg/L FeSO₄(NH₄)₂SO₄·6H₂O, 1mg/L ZnCl₂, 2H₂O, 1.2mg/L MnCl₂, 4H₂O, 0.4mg/L

CuSO_4 , 5 H_2O , 1.3mg/L CoSO_4 , 7 H_2O , 0.1mg/L BO_3H_3 , 1mg/L $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$, 4 H_2O , 0.05mg/L NiCl_2 , 6 H_2O , 0.01mg/L Na_2SeO_3 , 5 H_2O , 60mg/L CaCl_2 , 2 H_2O . Fe(III)-oxides (100mM) was added as electron acceptor and acetate (10mM) as electron donor. NaCl and deionized water were added to get a final NaCl concentration of 35 g/L to assure saline conditions. The initial pH was adjusted to 7 using NaOH (1M). To ensure anaerobic conditions, each bottle was flushed with high purity nitrogen gas for 30 minutes after inoculation. Composition of headspace was checked and oxygen relative abundance was less than 1.0%. Reactors were incubated at 37°C till the whole acetate consumption.

Two-milliliter aliquots were periodically collected and centrifuged (20,000g, 10 min). Pellets and supernatant were stored at -20°C for further chemical and microbiological analyses.

The conversion of Fe (III) to Fe (II) was assessed spectrophotometrically with a ferrozine assay of HCl-extractable Fe(II) (Lovley and Phillips, 1988, Wang et al., 2010).

IV.2.2.2.3. Bioelectrochemical enrichment

The sediments and each step of the iron-enriched culture were used to grow an electroactive biofilm in four replicates in a three electrode system (*Figure IV-4*). This electrochemical reactor were carried out under potentiostatic control (VSP Bio-Logic SA) monitored with a computer (EC Laboratory v.10.1 software, Bio Logic SA). The arrangement, as previously described (Ketep et al., 2013), consisted of a graphite working electrode, a saturated calomel electrode (SCE) as reference electrode and a platinum grid counter electrode. The anodes were geometrically defined graphite planar working electrodes with the following dimensions: 2.5 x 2.5 x 0.2 cm (Goodfellow). Electrical connection consisted in 2 mm diameter and 12 cm long titanium rods (Goodfellow). The working electrodes were cleaned before use using a P800 sandpaper and rinsed with 99% purity ethanol. Cathode (counter electrodes) were Platinum Iridium grid (90%/10%) (Heraeus) cleaned by heating in a blue flame. The graphite working electrode potential was fixed using a SCE electrode (+0.2V vs SCE).

Inocula were added to the culture medium (10% v/v in a final working volume of 500mL) containing 50mM MES buffer and modified Starkey mineral medium described above.

Electroactive biofilms were collected for microbial characterization for each replicate after the whole acetate consumption using a scalpel.

Current production was monitored online using a potentiostat (EC Laboratory v.10.1 software, Bio Logic SA). Maximum current densities j_{max} ($/m^2$) of mature microbial biofilms were calculated considering the total immersed electrode surface area since electroactive biofilms covered both sides of the electrode with the same microbial community profile (CE-SSCP patterns)

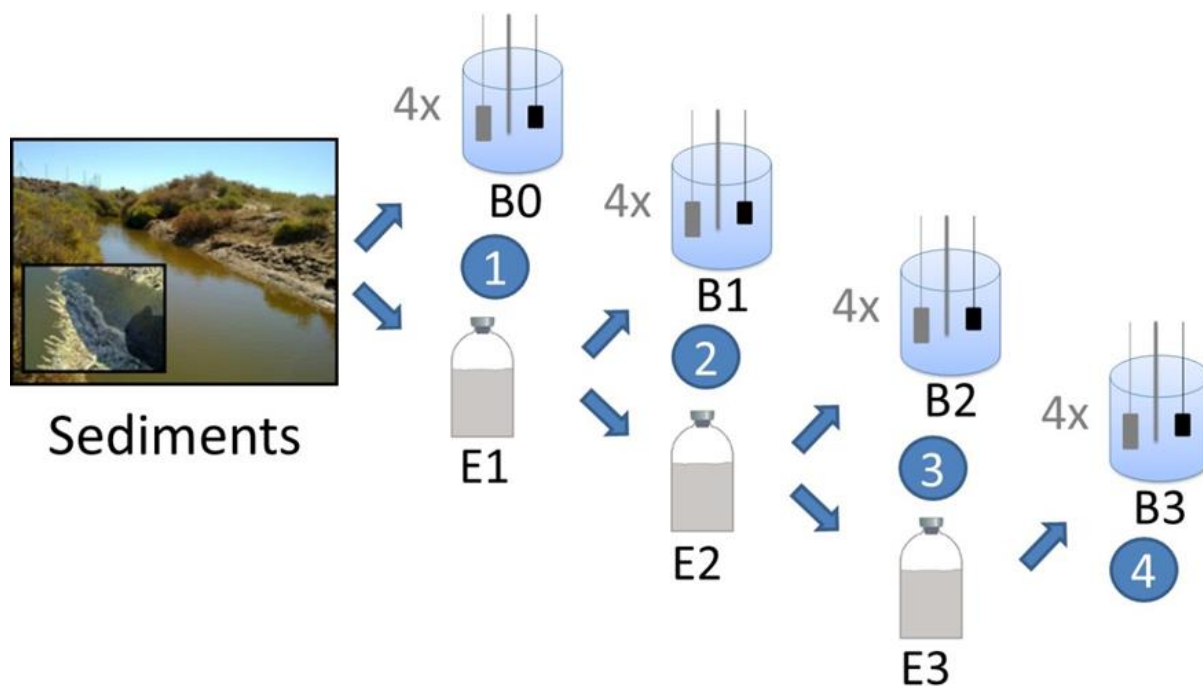


Figure IV-4 : Scheme of successive enrichments steps to grow electroactive biofilms.

Sediments were used to inoculate a liquid enrichment medium containing Fe(III) in which a bacterial community E1 was obtained and 4 replicates of electrochemical systems equipped with a 3 electrode setup, in which bacterial community B0 was obtained. This procedure was reiterated using the successive enriched communities E1, E2 and E3 to grow respectively B1, B2, B3 biofilms.

IV.2.2.2.4. Chemical analyses

Acetic acid (C2), was analyzed with a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-3900 Varian). An internal standard was mixed with each sample. An autosampler was used to perform analysis. A syringe automatically takes 0.5 μ L of the mix and places it in the injector, heated to 250°C. The column used is an ELITE FFAP, 15000x0.53 mm (Perkin Elmer), the temperature is maintained at 120°C. The carrier gas is nitrogen (N₂) and the flame ionization detector gas is hydrogen (H₂).

IV.2.2.2.5. Data analysis

To characterize electroactive performance of the biofilm, transmitted charge for each reactor was fitted to a modified Gompertz equation as previously described (Quéméneur et al., 2011) (Figure IV-5):

$$Q(t) = Q_{max} \cdot \exp(-\exp(V_{max} \cdot \exp(1) / Q_{max} (\lambda - t) + 1))$$

Where Q: Charge (C) ; V_{max} : maximum transferred charge rate (C/day); λ : lag phase (day) ; t: incubation time (day),

Coulombic efficiency, i.e. the amount of coulombs trapped in electrical current generation relative to the maximum reachable assuming the whole substrate oxidation, was calculated for each reactor according to (Call et al. 2009).

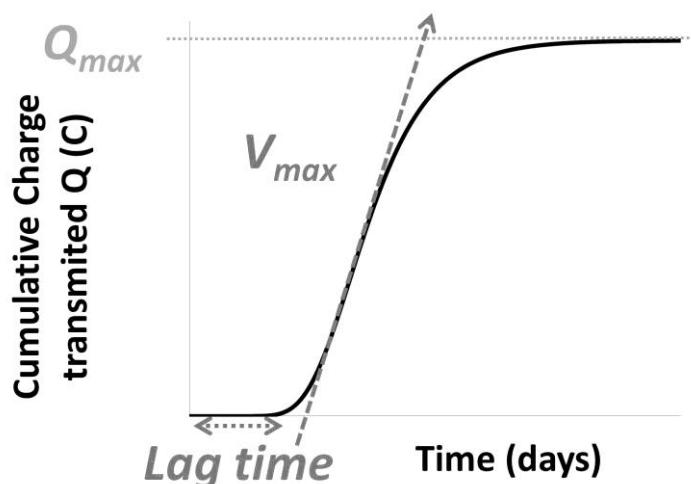


Figure IV-5 : Representation of electron transfer dynamics from a mixed culture cultivated with acetate as substrate in electrochemical systems equipped with a 3 electrode setup.

The estimated values correspond to the charge Coulombic efficiency (%), the maximum current production rate (C/d) and the lag phase time (day), respectively.

IV.2.2.2.6. DNA extraction and PCR amplification

Molecular analyses of bacterial communities were performed after acetate consumption in each biofilm reactor and enriched culture. Genomic DNA was extracted and purified from the biofilm using a previously described protocol (Godon et al., 1997). Then, the total extracted DNA was purified with a QiAmp DNA microkit (Qiagen, Hilden, Germany). To evaluate success of DNA extraction, DNA amount and purity were confirmed by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). Then, 16S rRNA genes were

amplified with using universal primers for bacteria W49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' *Escherichia coli* position 330) (Wéry et al., 2008) and 5'-fluorescein phosphoramidite named W104 (5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' *Escherichia coli* position 533) (Wéry et al., 2008). Each PCR mixture (50 μ L) contained 5 μ L of 10x Pfu Turbo DNA buffer, 200 nMf of dNTP, 500 nMf of each primer, 2.5 U μ L⁻¹ of Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene) and 10 ng of genomic DNA. Reactions were carried out 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.

IV.2.2.2.7. CE-SSCP electrophoresis and statistical analyses

PCR products were separated by capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). With this technique, DNA fragments of the same size but with different compositions are separated (Wéry et al., 2008).

An appropriate dilution of PCR products (1 μ L) was mixed with 18.925 μ L of formamide and 0.075 μ L of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Then, samples were heat-denatured at 95°C for 5 min and immediately re-cooled on ice for 5 min. CE-SSCP electrophoresis was carried out in a ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) with four 50 cm capillary tubes filled with a conformation analysis polymer (Applied Biosystems) into the corresponding buffer and 10% glycerol. Samples have been eluted at 12kV and 32°C for either 30 min (Wéry et al., 2008).

To consider inter-sample electrophoretic variability, the CE-SSCP profiles were aligned with the internal standard (ROX). CE-SSCP profiles were then normalized using the *Statfingerprints* library (Michelland et al., 2009) from R software version 2.9.2 (R. Development Core Team, 2010) with a standard procedure described elsewhere (Fromin et al., 2007). To obtain similarity matrices, genetic distances between bacterial communities were evaluated using Euclidean distances and were statistically compared using a principal component analysis (PCA).

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

IV.2.2.3. RESULTS AND DISCUSSION

IV.2.2.3.1. Iron-reducing enrichment cultures

IV.2.2.3.1.1 *Iron conversion*

Electron transfer from acetate to the reduction of Fe(III) into Fe(II) was assessed. This ratio increased progressively from 4.7 to 8.0 mol_{Fe(II)}/mol_{acetate} which corresponded to the maximum stoichiometric conversion rate, for the chemical enrichments E1 and E3, respectively. Wang et al. (2010) reported a similar trend with iron reducing enrichment cultures of successive electroactive biofilms operated with mixed cultures. They reported a conversion of 7.6 mol_{Fe(II)}/mol_{acetate}. Roden & Lovley (1993) previously reported the same conversion rate (7.6 mol_{Fe(II)}/mol_{acetate}) in an iron reducing pure culture of *Desulfuromonas acetoxidans*, also known as an electroactive bacteria (Bond et al., 2002). The latter value is very close to the theoretical value of electrons released after complete acetate oxidation. The values obtained in the present study are in strong accordance with these previous studies. Moreover, the increase in acetate conversion for Fe(III) reduction into Fe(II) ratio in this present study suggests that successive iron-reducing enrichment steps led to a microbial community more efficient for this respiration pathway for each step. Therefore, the bacteria selected along the enrichment steps used an increasing part of the electrons released from acetate breakdown for iron reduction instead of other purposes such as biomass production (Logan, 2009).

IV.2.2.3.1.2 *Microbial community*

A significant bacterial selection occurred all along the iron-reducing enrichment steps with the predominance of two bacterial species sub dominant in the original microbial community (see Figure IV-7). Their relative abundance percentage can be found in Figure IV-6A. *Geobacteraceae* species (including *Geoalkalibacter subterraneus* and a *Geobacteraceae* species) were selected with a decrease of the abundance of *Clostridiaceae* species along the enrichment steps. *Geoalkalibacter subterraneus* is known as ARB (Miceli et al., 2012; Badalamenti et al., 2013; Carmona-Martínez et al., 2013) and DMRB (Holmes et al., 2002; Greene et al., 2009), which is in agreement with the targeted effect of our iron-reducing enrichment.

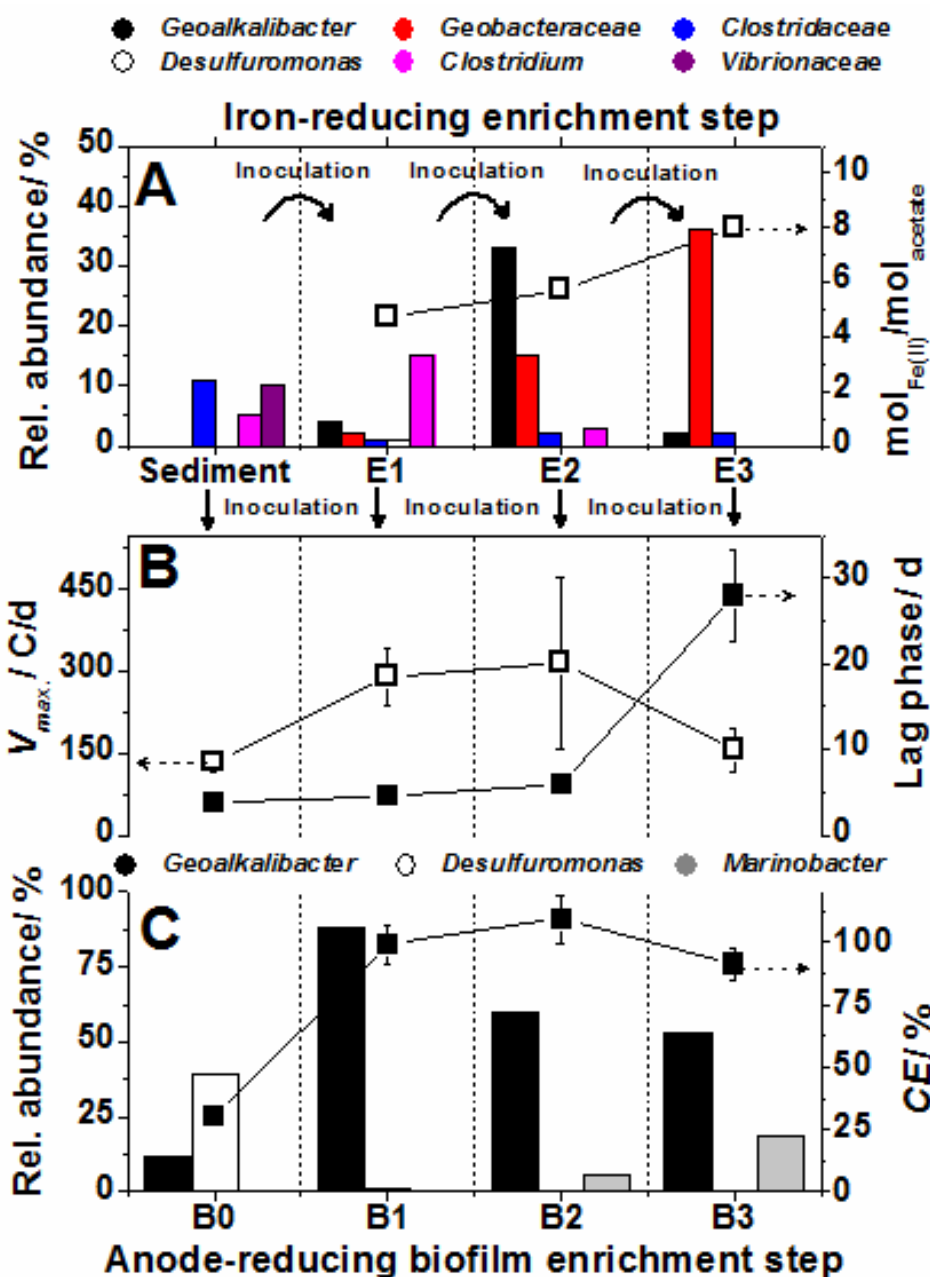


Figure IV-6 : Iron/anode enrichment parameters and relative abundance of main bacteria in microbial communities

(found as >9% in one of enriched bacterial community) identified by pyrosequencing analysis in enrichment cultures wherein E1, E2 and E3 correspond respectively to the 1st, 2nd and 3rd enrichment steps and biofilms wherein B0, B1, B2, B3 correspond to the biofilms obtained respectively with sediments, E1, E2, E3 as inoculum. Relative abundance was defined as the number of sequences affiliated with that taxon divided by the total number of sequences. (A) Relative abundances of main bacteria (found at more than 9 % in at least 1 bacterial community) in E1, E2, E3 and their abundances in the original inoculum E0. Conversion acetate electrons into Fe(II) is presented in $\text{mol}_{\text{Fe(II)}}/\text{mol}_{\text{acetate}}$ (B) maximum charge production rate (V_{max} in C/d) and lag phase (in days) before exponential phase of charge curve of anodic biofilms (C) Coulombic efficiency (CE in %) and relative abundance of main bacteria in the bioelectrochemical enriched biofilms (found at more than 9 % in at least 1 bacterial community).

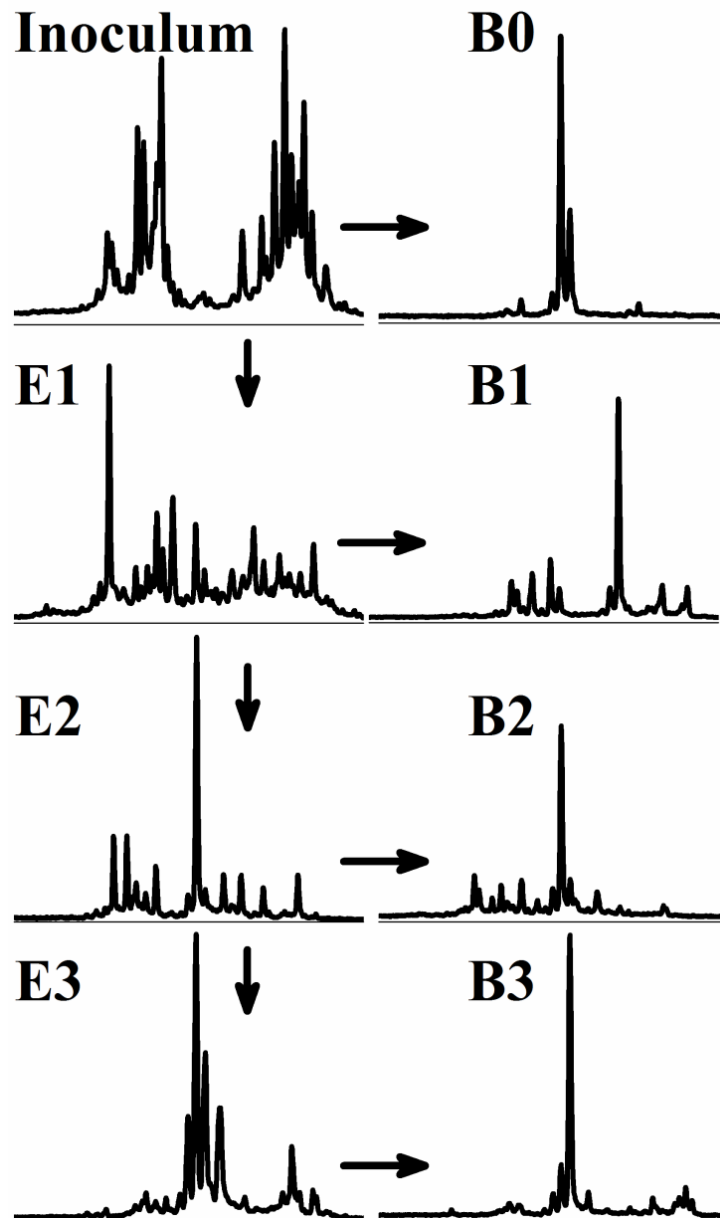


Figure IV-7 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from sediment, enriched cultures (E1, E2, E3) and biofilms (B0, B1, B2, B3) mixed cultures.

The profiles correspond to samples taken before inoculation of electrochemical cells for sediments, E1, E2 and E3 or at the maximum charge production for biofilms (B0, B1, B2, B3). The X and Y axes of each peak represent respectively the relative peak electrophoresis migration distance and the relative peak intensity (Arbitrary Units). Arrows presents the enrichment of microbial communities.

IV.2.2.3.2. Anode-reducing enrichments

IV.2.2.3.2.1 Maximum electron transfer rate (V_{max})

The maximum electron transfer rate (V_{max}), described in *Figure IV-5*, represents the maximum rate of electron transfer from the anode to the cathode per unit of time performed by the biofilm. This parameter represents the capacity of electron transfer of the biofilm. From *Figure IV-6B* it can be clearly seen that V_{max} increased with the anode-reducing biofilm enrichment steps up to 300 C/d in B2. However, for enrichment step E3 the biofilm formed B3 V_{max} significantly decreased down to 150 C/d. This is likely due to the selection of less or non-electroactive bacteria after several enrichment steps. These bacteria indeed might outcompete for the substrate consumption with electrogenic biofilm. These results might also be due to a dilution effect of the highly electroactive bacteria present in the sediment among the iron-reducing enrichment cycles procedure.

IV.2.2.3.2.2 Lag phase

The lag phase is presented in *Figure IV-6B* and corresponds to the time before reaching the exponential phase of the charge curve. In the experiments presented here, the lag phase of the anodic biofilms was slightly extended for enrichments B0, B1 and B2. This means that the anodic biofilm formation for all experimental units took about 4 to 6 days to begin. This is in good agreement with previous experiments on anodic biofilm formation (Wang et al., 2010; Patil et al., 2011). In contrast to B0, B1 and B2, the B3 experiment showed a very long lag phase of about 28 days likely due to a difference between bacteria selected on the anode biofilms and in iron-reducing enrichment. Indeed, a possible explanation for this increase may be the lack of electroactive bacteria in the further iron-reducing enrichment steps due to dilution among successive iron-enrichment steps. This dilution effect resulted in a longer lag phase for electron transfer to the anode (Wang et al., 2010).

IV.2.2.3.2.3 Coulombic efficiency (CE)

The fraction of electrons available in the substrate that ends up as electrical current in the system is denominated as Coulombic efficiency (CE) (Sleutels et al., 2011). CE is an indication of the actual amount of coulombs harvested from substrate oxidation and transferred by the biofilm to the anode. Consequently, increasing the Coulombic efficiency is one of the most

important challenges in BESs, since as much as possible of the available energy (electrons) from the organic substrate has to be transferred to the anode, and afterwards into valuable chemicals, to create an economically feasible process (Hamelers et al., 2010). In our study, the CE increased with the iron-reducing enrichment procedure inocula (E1) from $30.4 \pm 3.8\%$ (B0) to $99.0 \pm 7.5\%$ (B1) and $109.1 \pm 9.9\%$ (B2) and then rather decreased to $97.1 \pm 6.3\%$ (B3 inoculated with B3). Interestingly, the CE increased continuously to reach the maximum value of substrate conversion as it was observed for the rate of acetate conversion for Fe(III) reduction into Fe(II). These observations are evidences of high efficiency of the enrichment procedures based on both anode and iron reduction. The Coulombic efficiency of B2 was higher than 100%. This was likely due to the oxidation of hydrogen produced at the anode (Lalurette et al., 2009; Miceli et al., 2012) since a significant percentage of hydrogen was detected in the gas phase of our experiments, e.g. at the maximum of current production, biogas was composed of CO₂ 8.4 %, H₂ 42.12 %, N₂ 33.26 % and CH₄ 11.30 %. This increase in CE is consistent with Wang et al. (2010) who reported an increase of Coulombic efficiencies in a biofilm due to the iron-reducing enrichment procedure. This increase can be due to the selection of electroactive bacteria and to the decrease in the relative abundance of non ARB initially present in the inoculum of the anodic biofilm. Wang et al. (2010) study presented a similar trend with an increase of Coulombic efficiency from 19% and 23% with activated sludge inoculated biofilm and the original scrapped/resuspended biofilm, respectively, up to 34% with the iron-enriched biofilm. This can also be due to the absence of electron acceptors initially present in the sediments environment that were removed with dilution of the enriched inoculum. In our work, a single step of iron-enrichment seems to be efficient to achieve high Coulombic efficiency, i.e. to successfully convert acetate into electrons.

IV.2.2.3.2.4 Current density

Interestingly, no increase in maximal current density (j_{max}) was observed after the first anode-reducing biofilm step. Although CEs increased progressively through enrichment steps from B0 to B2, the current density decreased from B0 to B3 with respectively 4.5 ± 0.7 A/m² and 1.6 ± 0.8 A/m². These results suggested the presence of essential nutrients in the inoculum E0 that are required to achieve a high current density of B0. Their removal hindered the biofilm to produce as much current density as in B0. The diluting effect of E0 along the iron-enrichment steps supports such hypothesis of ARB starvation. There are similarities between this phenomenon shown with successive iron-reduced enrichment

cultures and previous studies where current densities had not been recovered among successive batch cycles of the same biofilm (Holmes, Nicoll, Bond, et al., 2004b; Badalamenti et al., 2013; Parameswaran et al., 2013). Moreover, in Kim et al. (2005) study, the voltage obtained in a MFC inoculated with a 25th time iron-enriched inoculum was 50% lower than the one obtained with the original unacclimated inoculum.

IV.2.2.3.2.5 Microbial community

IV.2.2.3.2.5.1 Selection in biofilm microbial community

Microbial community structures presented a high decrease of diversity in iron-reducing enrichment cultures and in anode-reducing enrichment biofilms compared to the inoculum (see Figure IV-7). The most striking result to emerge from the CE-SSCP profiles is that the anodic bacterial community was composed of only 1 or 2 dominant species. This finding is in agreement with previous studies in which systems inoculated with sediments presented a high simplification of the bacterial community in anode-reducing enrichment processes and a majority of *δ-Proteobacteria* (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002; Miceli et al., 2012). However several studies reported a highly diverse microbial community with bacteria belonging to *Firmicutes*, *γ*-, *β*- and *α-Proteobacteria*, especially for systems inoculated with non-saline sediments (Rabaey et al., 2004; Lu et al., 2012). In conclusion, our results suggest that very well controlled (pH=7, 37°C, fixed potential) and also very specific (salinity, medium composition) conditions caused a high selection of bacteria both in anode-respiration enrichment process and in liquid iron-reducing enrichments.

IV.2.2.3.2.5.2 Divergence of bacterial communities

Figure IV-8 presents the results of a principal component analysis (PCA) where the genetic distances between CE-SSCP profiles representing the bacterial communities were compared, according to the experimental conditions. The profiles are compared by using the Euclidian distances between CE-SSCP patterns. On PCA, the closer are the points, the more similar are the microbial communities. In this PCA, both iron-reducing enrichment cultures (squares) and electrochemically enriched biofilms (circles) are presented. In addition, a trend of the positive correlation between the optimum performances (Figure IV-6) and the similarity between chemical and electrochemical microbial community structure was observed. (Figure IV-8). For example, for the best performing biofilm (B2) in terms of Coulombic efficiency, the corresponding enrichment microbial community, i.e. inoculum E2, is very close to the biofilm

community profile (Figure IV-8). Furthermore, the divergence in microbial community composition between a liquid enrichment culture and the biofilm produced from this culture was likely linked to the increase of the lag phase (Figure IV-6), especially for biofilm B3 inoculated with the enrichment culture E3.

Regarding the differences in microbial communities, a correlation was observed between microbial community structures in iron/anode reducing enrichment cultures and changes in anode-reducing performances. This suggests that there was a difference between extracellular electron transfer respiration in anode-reduction enrichment and in iron-reduction enrichment cultures. The two mechanisms probably require slightly different physiologies and with selecting the bacteria on a DMRB media, a specific consortium for Fe(III) respiration was selected that does not fit for a respiration on anode. Nevertheless, one step of enrichment is efficient to reach successful substrate conversion in terms of Coulombic efficiency as described above.

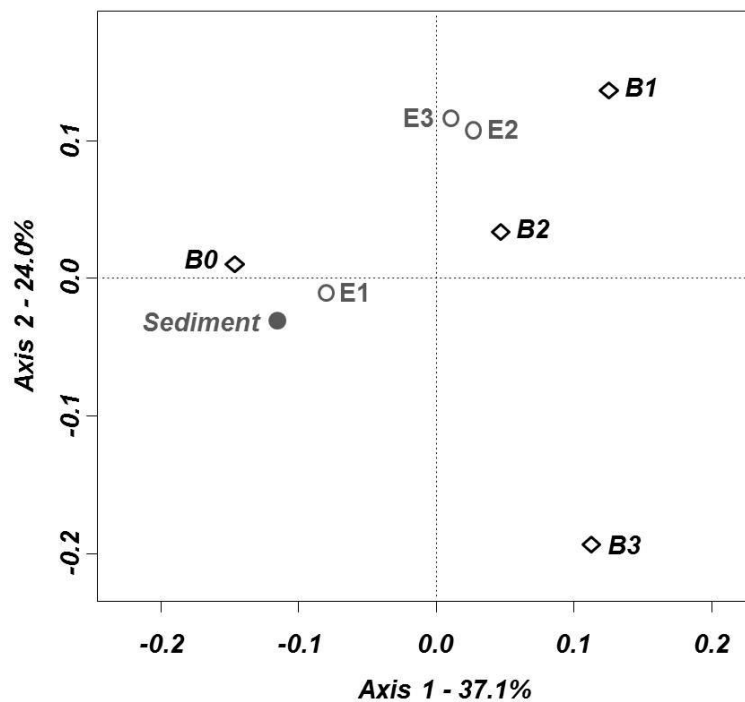


Figure IV-8 : Principal Component Analysis (PCA) biplot of CE-SSCP profiles.

For each biofilm (B0, B1, B2, B3), an average of the 4 replicate profiles is presented (\diamond). CE-SSCP profiles of the sediment originate inoculum E0 (\bullet) and of iron-enrichments microbial communities (E1, E2 E3) are also presented (\circ). The first two principal components (Axis1 and Axis2) explained 61.1% of the genetic variation.

IV.2.2.3.2.5.3 Identification of *Desulfuromonas* sp. and *Geoalkalibacter subterraneus*

In electroactive biofilms (Figure IV-6C), *Desulfuromonas* sp. was selected in B0. This finding is consistent with other research where a majority of δ -*Proteobacteria* was found in anode-reducing biofilms inoculated with sediments (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002; Miceli et al., 2012) with systems inoculated with sediments. Bond et al. (2002) showed that 71% of the 16S RNA gene sequences from a MFC anodic biofilm inoculated with marine sediment belonged to δ -*Proteobacteria* and 70% from a single cluster of bacteria that belongs to the family *Geobacteraceae*, related to *Desulfuromonas acetoxidans*. In similar conditions, Tender et al. (2002) found 76% of the 16S rRNA gene sequences were δ -*Proteobacteria* and 59% with more than 95% of similarity to *Desulfuromonas acetoxidans*.

Interestingly, *Geoalkalibacter subterraneus* was selected as main bacteria in biofilm B1 to biofilm B3, and the most dominant microorganisms colonizing the anodes were affiliated to *Desulfuromonas* spp. and *Geoalkalibacter* spp. genera in B0. Within the delta subgroup of *Proteobacteria*, many species, including *Desulfuromonas* and *Geoalkalibacter*, are able to oxidize organic compounds and reduce insoluble Fe(III) oxides at the same time (Pfennig and Biebl, 1976; Bond et al., 2002). This study shows that the ARB found here are most probably able to transfer the ability that they have in natural environment using other insoluble final electron acceptors such as iron or magnesium oxides to the electrode materials as final electron acceptors (Richter, Lanthier, Nevin, Lovley, et al., 2007). Interestingly, in all biofilms of our study, an enrichment of *Geoalkalibacter subterraneus* was observed. Consequently, it can be assumed that for the ARB found here, and especially for *Geoalkalibacter subterraneus* that provided good electron transfer in biofilm B1, the ability to reduce insoluble electron acceptors (such as iron oxides) does confer the capacity to transfer electrons to an anode. However this ability is not always transferrable (Richter et al., 2007).

While *Desulfuromonas* spp. has been widely described in the literature as an ARB (Bond et al., 2002; Dumas et al., 2008b; Nevin et al., 2008, 2009; Call et al., 2009; Marsili et al., 2010; Wei et al., 2010; Nercessian et al., 2012), only one recent study found bacteria genetically related to *Geoalkalibacter subterraneus* as a dominant ARB in mixed culture in the microbial population of electroactive microbial biofilms inoculated with shoreline and mangrove sediments (Miceli et al., 2012). Miceli (2012) and co-workers showed that *Geoalkalibacter* was dominant in highly electroactive biofilms exhibiting j_{max} up to 8.9 A/m².

In addition, a mechanism of direct anodic electron transfer was recently evidenced by two different research groups using a pure culture of *Geoalkalibacter subterraneus* (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013). Those studies in pure cultures provided electrochemical characterizations of *Geoalkalibacter subterraneus* (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013). In those studies, *Geoalkalibacter subterraneus* provided high current densities of $4.68 \pm 0.54 \text{ A/m}^2$ and 3.3 A/m^2 , respectively. These demonstrate that other members of the *Geobacteraceae* family than the ARB model *Geobacter sulfurreducens* have the ability to produce high current densities in pure culture. This provides new insight for research in extracellular electron transfer respiration as *Geoalkalibacter subterraneus* is an efficient new anode respiring bacteria that presents good skill to favour this mechanism (Miceli et al., 2012; Badalamenti et al., 2013; Carmona-Martínez et al., 2013). Moreover, we show that only one step enrichment culture to select DMRB based on iron respiration is efficient to select *Geoalkalibacter subterraneus*, known as both DMRB (Holmes et al., 2002; Greene et al., 2009) and ARB (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013).

IV.2.2.3.2.5.4 *Geoalkalibacter* vs. *Geobacteraceae*

In this study, selection of *Geoalkalibacter subterraneus* from iron-enrichment culture permitted to increase biofilm performances from the biofilms inoculated with the first iron-reducing enrichment (B1) compared to the biofilms inoculated with the sediment (B0) (Figure IV-6). The most abundant bacterium of the biofilm obtained with the first enrichment E1 was 99% similar to *Geoalkalibacter subterraneus*, and 89% to the *Geobacteraceae* detected as most abundant in the second enrichment step E2. This bacterium belonging to *Geobacteraceae* presents good skills to reduce Fe(III) as many *Geobacteraceae* but has probably a low capacity to transfer this property to graphite anode respiration, as previously described for other DMRB (Richter et al, 2007). Therefore, the emergence of this *Geobacteraceae* in the detriment of *Geoalkalibacter subterraneus* can be correlated to the decrease of electroactive efficiency of biofilms after the first enrichment step.

IV.2.2.3.2.5.5 Emergence of *Marinobacterium* sp.

An increasing divergence is observed between the bacterial communities obtained in liquid enrichment cultures and the biofilms grown from these enrichments. The emergence of *Marinobacterium* sp., a δ -*Proteobacteria*, obligate aerobe and not-known as electroactive bacteria, in biofilms B3 obtained after the third iron-enrichment step (E3) is associated to the decrease of electroactivity of biofilms after the second enrichment step.

Marinobacterium sp. was retrieved in a previous study of efficient electro-active biofilms formed from natural biofilms scraped from a floating bridge (Erable et al., 2009) and associated with bacteria related to *Bacteroidetes*, *Halomonas*, certain species of *Idiomarina* and *Pseudoidiomarina*. To the best of our knowledge, this bacterium has not been studied in pure culture in electrochemical systems or reported as a dominant population in any efficient electroactive biofilm. *Marinobacterium* species have been isolated from various sources related to marine environments such as marine sediment, coastal areas, and coral mucus (Choi et al., 2012). *Marinobacterium* sp. were reported to produce siderophore, Fe(III) chelators for iron capitation (Weber et al., 2006; Amin et al., 2012). This property could explain its selection in an iron-enriched medium.

IV.2.2.4. CONCLUSION

After one step of iron-enrichment in a liquid medium containing Fe(III) as the lonely electron acceptor, the selection of *Geoalkalibacter subterraneus*, a recently characterized electroactive bacterium that provides good electroactive skills and which is adapted to saline conditions was obtained. Then, the divergence in microbial community composition, associated with a decrease of electroactive efficiency, suggests that respiration on Fe(III) and on anode are different and presumably require rather dissimilar skills. The findings of this study suggest that only one iron-enrichment step should be proceeded using this strategy

IV.2.3. DISCUSSION

Une étape d'enrichissement a permis de sélectionner *Geoalkalibacter subterraneus*, espèce électroactive nouvellement caractérisée, et d'augmenter le rendement faradique du biofilm. Ceci peut être dû à la suppression ou plutôt à la dilution de microorganismes qui pourraient être en compétition pour le substrat dans le milieu et d'accepteurs d'électrons alternatifs présents dans les sédiments. Cependant l'analyse des communautés microbiennes du biofilm aux différentes étapes d'enrichissement montre qu'il existe dès le premier biofilm B1 obtenu avec l'enrichissement E1 un changement dans la composition microbienne par rapport au biofilm B0 obtenu avec les sédiments. En effet, alors que *Desulfuromonas acetoxidans* était majoritaire dans B0, c'est *Geoalkalibacter subterraneus* qui devient majoritaire dès le premier enrichissement dans B1. Ceci peut être attribué à la sélection préférentielle de *Geobacteraceae* pour la respiration sur Fe(III) dans les enrichissements, propriété reconnue chez les espèces de la famille des *Geobacteraceae*.

Alors que l'espèce la plus abondante dans le biofilm B1 obtenu à partir du premier enrichissement est à 99% similaire à *Geoalkalibacter subterraneus*, l'espèce obtenue par enrichissement à partir de la deuxième étape d'enrichissement (E2) puis majoritaire dans le troisième enrichissement (E3) appartient à la famille des *Geobacteraceae* et n'est qu'à 89% similaire à *Geoalkalibacter subterraneus*. Il est donc probable que les étapes successives d'enrichissement mènent à la sélection d'une espèce appartenant aux *Geobacteraceae*, mais qui n'est pas capable, contrairement à *Geoalkalibacter subterraneus*, de transférer cette propriété de transfert d'électrons à la respiration sur anode comme cela a été précédemment montré pour d'autres organismes (Richter et al, 2007).

La divergence de sélection microbienne au cours des étapes d'enrichissement associée avec la diminution de l'efficacité électroactive du biofilm laisse supposer que les respirations sur Fe(III) requièrent des propriétés différentes chez les microorganismes et mènent à la sélection de microorganismes plus adaptés à la respiration sur Fe(III) que sur anode de graphite à potentiel imposé. Ceci est en accord avec les résultats de Kim et al. (2005) qui ont noté une diminution de 50% des performances électroactives (en termes de densité de puissance produite en MFC) après 25 étapes d'enrichissement sur Fe(III). Les résultats de notre étude suggèrent qu'une seule étape d'enrichissement sur Fe(III) soit réalisée dans le but d'inoculer une anode. Ceci afin de ne pas obtenir une communauté microbienne trop spécialisée dans la respiration sur Fe(III). Cette méthode d'enrichissement est une technique

simple qui ne nécessite pas la mise en œuvre d'un système bioélectrochimique au préalable. Elle peut constituer une étape de pré-sélection en milieu liquide de bactéries électroactive pour inoculer une anode.

Cette méthode a ici été utilisée sur un inoculum déjà connu et qui contenait *Geodalkalibacter subterraneus*. Il serait intéressant de vérifier s'il est possible d'enrichir de bactéries électroactives avec d'autres sources d'inoculum moins favorables.

IV.3. DYNAMIQUE DE COLONISATION DES ELECTRODES

IV.3.1. AVANT-PROPOS

Dans la littérature, lors d'expériences réalisées en batch, le biofilm anodique formé est prélevé au maximum de production de densité de courant, c'est à dire quand l'électroactivité du biofilm est maximale (Torres et al., 2009; Harnisch et al., 2011; Miceli et al., 2012), ou à la fin du batch, correspondant à la consommation totale du substrat (Parameswaran et al., 2010; Liu, Wang, et al., 2012).

De même, dans les expériences conduites dans le cadre de cette thèse, nous avons prélevé le biofilm aux deux stades de croissance décrits précédemment, en utilisant le même inoculum (sédiments des salins de Saint-Martin, Gruissan) comme indiqué en *Figure IV-9* :

- 1) Au maximum de densité de courant pour les biofilms B7, B8 et B9 dans la partie IV.1 (Sélection et identification de microorganismes électro-actifs)
- 2) A consommation totale du substrat pour le biofilm B0 (formé dans les mêmes conditions que B7, B8 et B9 décrits précédemment) dans la partie IV.2 (Enrichissement de micro-organismes réduisant le Fe(III) et impact sur le biofilm électroactif)

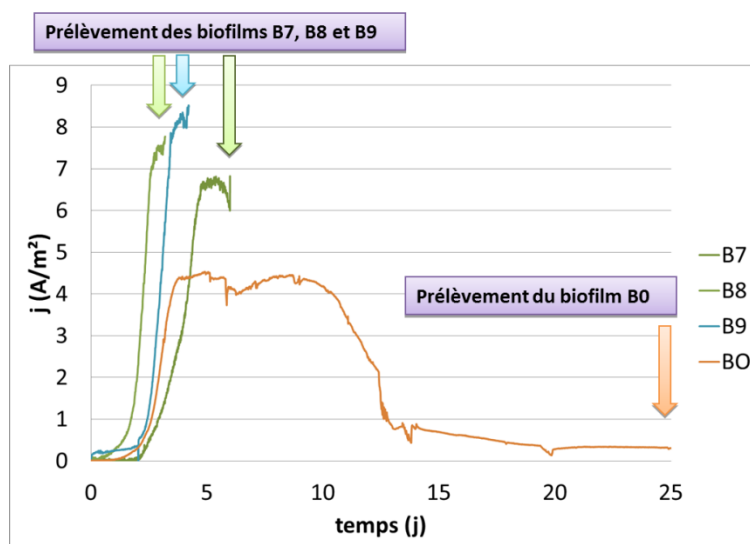


Figure IV-9 : Chronoampérométries réalisées sur les biofilms B7, B8 et B9 en partie IV.1 et B0 en partie IV.2.

Les moments de prélèvements sont indiqués par des flèches. B7, B8, B9 ont été prélevés à leur maxima de production de courant et B0 a été prélevé après consommation totale du substrat.

Le *Tableau IV-3* présente les bactéries prédominantes dans les biofilms électroactifs dans chacun des cas évoqués précédemment (B0, B7, B8, B9).

Tableau IV-3 : Bactéries majoritaires, en abondances relatives, dans les biofilms B7, B8 et B9 en partie IV.1 et B0 en partie IV.2. Les densités de courant et rendement faradiques sont également indiqués en A/m² et %.

Biofilms	$j_{\max}/ A m^{-2}$	CE/ %	Bactéries majoritaires identifiées dans le biofilm (Pourcentage d'abondance relative)
B7 (Partie IV.1)	6.7	60	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (72,86%)
B8 (Partie IV.1)	7.7	53	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (20,08%) <i>Desulphuromonas</i> spp. (58,18%)
B9 (Partie IV.1)	8.5	77	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (91.24%)
B0 (Partie IV.2)	4.5	30	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (12,00%) <i>Desulphuromonas</i> spp. (39,50%)

Geoalkalibacter subterraneus et *Desulphuromonas* ssp. étaient majoritaires ou co-majoritaires dans les différents biofilms obtenus. Alors que ces deux espèces sont retrouvées en co-dominance lors de prélèvements aux maxima de production de densité de courant et après consommation totale du substrat dans les biofilms B8 et B0, seule *Geoalkalibacter* était dominante dans deux biofilms prélevés au maximum de production de courant dans les biofilms B7 et B9. Nous avons voulu vérifier le caractère aléatoire ou séquentiel de cette prédominance ou co-prédominance dans le biofilm.

Lors de la formation du biofilm électroactif, la mesure au cours du temps de la charge transférée à l'anode par le biofilm permet de suivre l'activité de la communauté microbienne en termes de transfert d'électrons. On peut assimiler la courbe de charge cumulée transférée à l'anode (Q en coulomb(C)) en fonction du temps à une courbe de croissance microbienne dont le taux de croissance est limité par la concentration en substrat. Nous nous sommes ici intéressés à la caractérisation des populations microbiennes au cours de cette croissance du biofilm.

Cette étude vise à prélever le biofilm électroactif aux différents stades de sa formation afin d'étudier sa dynamique de colonisation et de vérifier si les deux espèces majoritaires obtenues systématiquement, *Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulphuromonas* ssp., s'implantent de façon séquentielle ou simultanée sur l'anode.

IV.3.2. MISE EN ŒUVRE

Afin de réaliser cette étude, nous avons utilisé un dispositif N-Stat. Le N-stat permet d'obtenir des biofilms électroactifs de compositions microbiennes identiques dans un même réacteur. Le réacteur comprenait 4 électrodes de graphite de dimension 2.5cm x 2.5cm, une grille de platine de dimension 5 cm x 5cm et une électrode de référence au calomel saturé (ECS). Chaque électrode de graphite était polarisée à +0.2V / ECS.

Des sédiments des salins de Saint-Martin à Gruissan ont été utilisés pour inoculer le réacteur N-Stat à 10% v/v dans un volume liquide de 500 mL contenant du tampon MES (50mM), le milieu Starkey modifié et du chlorure de sodium à 35 g_{NaCl}/L. Le réacteur était alimenté avec 1,2 g/L d'acétate. Le pH était fixé à 7 avec de la soude à 1M et la température était maintenue à 37°C avec un bain-marie.

La *Figure IV-10* présente le dispositif N-Stat. Les électrodes de graphites ont été utilisées dans ce dispositif pour obtenir des biofilms identiques dans un même milieu. Ces électrodes ont été successivement retirées du réacteur pour prélever les biofilms à différents stades de colonisation de l'anode Dynacol 1, Dynacol 2, Dynacol 3 et Dynacol 4.

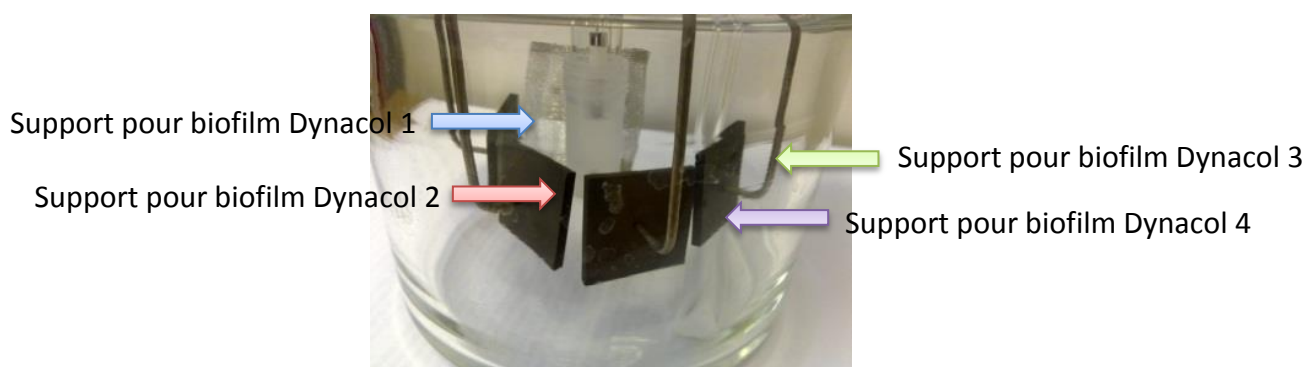


Figure IV-10 : Dispositif N-Stat utilisé contenant 4 électrodes de travail en graphite, 1 électrode de référence au calomel saturé et une contre électrode en platine (grille).

Les biofilms successifs utilisés pour analyser la composition de la communauté microbienne Dynacol 1 à 4 ont été prélevés successivement.

L'ADN total de la communauté du biofilm ainsi récupéré a été extrait pour des analyses d'empreintes moléculaires (CE-SSCP) et d'identification (pyroséquençage).

IV.3.3. RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure IV-11 présente les densités de courant obtenues pour chaque biofilm prélevé. Les courbes de chronoampérométrie des biofilms présentent une très bonne reproductibilité des productions de densité de courant dans le réacteur N-Stat utilisé. Des biofilms électroactifs présentant des densités de courant élevées ont été obtenus avec une densité de courant moyenne de $10.6 \pm 0,5 \text{ A/m}^2$. Cette valeur s'accorde avec nos résultats précédents obtenus dans les mêmes conditions où une densité de courant de $8,5 \text{ A/m}^2$ a été atteinte (dans la partie IV.1 intitulée « Sélection et identification de microorganismes électro-actifs »).

Les biofilms ont été prélevés dans la phase exponentielle de la courbe de charge (pour Dynacol 1 et Dynacol 2), en fin de phase exponentielle (Dynacol 3) et au plateau de production de charge, lorsque le substrat est consommé (Dynacol 4) (Figure IV-11).

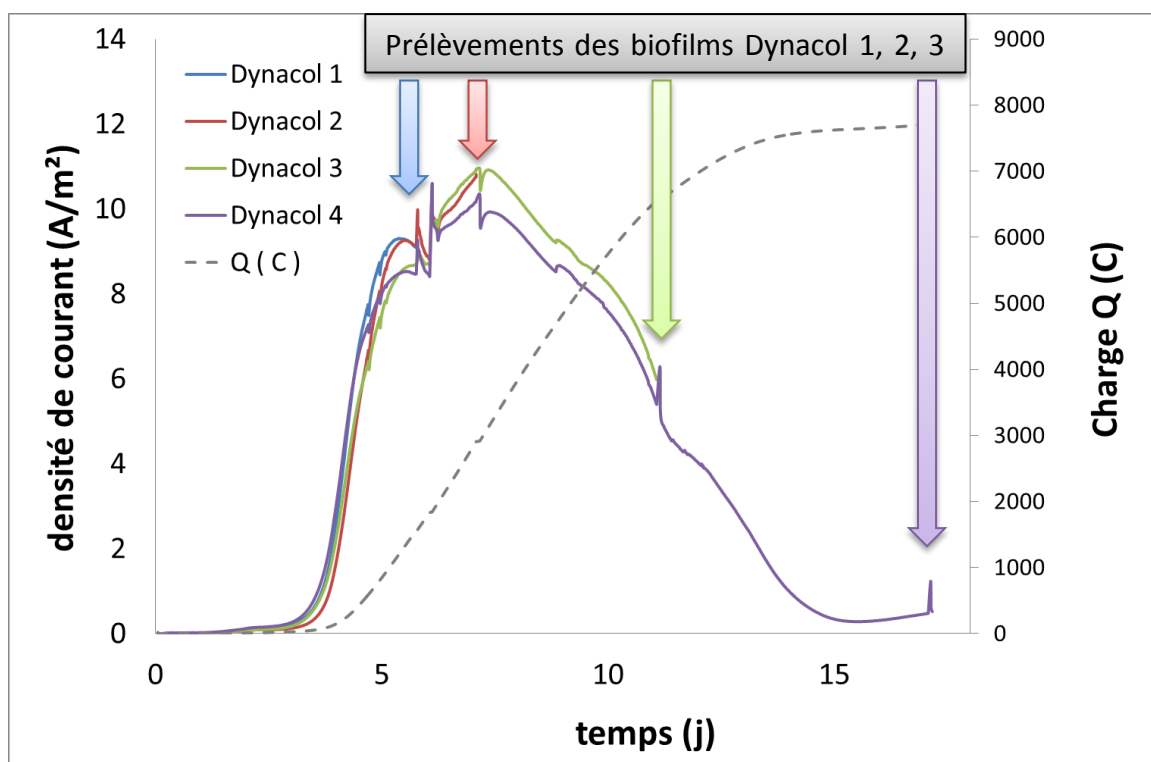


Figure IV-11 : Chronoampérométries réalisées sur les 4 électrodes Dynacol 1, 2, 3 et 4.

Chaque densité de courant est rapportée à la surface de colonisation totale d'une électrode de graphite. La courbe de charge Q en fonction du temps est reportée en pointillés pour une électrode (Dynacol 4).

Les profils de CE-SSCP des communautés microbiennes basées sur le gène ARNr16S des biofilms successivement prélevés sont présentés en *Figure IV-12*. Ces profils présentent une importante sélection microbienne, comme dans les études précédentes (parties IV.1 et IV.2) et dans la littérature avec certains systèmes électrochimiques à potentiel contrôlé (Torres et al., 2009; Harnisch et al., 2011; Miceli et al., 2012). Cette forte sélection peut être attribuée aux conditions expérimentales très spécifiques avec un accepteur d'électrons constitué par une électrode de graphite au potentiel imposé, un donneur d'électrons unique (acétate), un milieu minimum très simple, et aussi une régulation de la température à 37 °C, un pH fixé à 7 (Rabaey et al., 2010) .

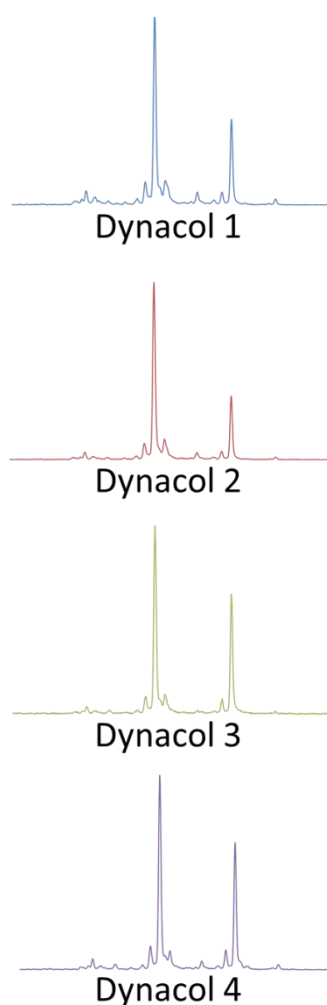


Figure IV-12 : Profils SSCP (des gènes d'ARN 16S) des communautés microbiennes des biofilms prélevés successivement (Dynacol 1, Dynacol 2, Dynacol 3 et Dynacol 4).

Les axes X et Y représentent respectivement la distance de migration de la séquence et l'intensité du pic.

D'autre part, les profils CE-SSCP obtenus au cours du temps sont superposables. Les espèces majoritaires sont donc soit identiques, soit très proches phylogénétiquement au niveau du gène ARN 16S.

De plus, la *Figure IV-13* représente les abondances relatives de chaque espèce dans les biofilms obtenus (Dynacol 1 à 4). Ces résultats obtenus par pyroséquençage s'accordent avec ceux des profils SSCP de la *Figure IV-12* et montrent une importante sélection microbienne au sein du biofilm. La composition des biofilms montre la présence de *Gealkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas* sp. en co-dominance dès les premières étapes d'attachement sur l'électrode. Ces deux espèces, qui ont été précédemment retrouvées en cultures mixtes (parties IV.1 et IV.2), ont montré de bonnes capacités à transmettre leurs électrons à une anode lorsqu'elles sont testées en culture pure (Bond et al., 2002; Badalamenti et al., 2013; Carmona-Martinez et al., 2013).

Nos résultats sont en accord avec une étude de Patil et al. (2011) dans laquelle des biofilms successifs issus d'essais en mode fed-batch présentaient une forte sélection des populations microbiennes au cours du temps dans 3 séries d'expériences à pH 6, 7 et 9. Cependant, les résultats de Patil et al. (2011) montrent une dynamique de la structure de communauté microbienne au cours des fed-batches à pH 6 et 9 qui n'apparaissent pas à pH 7. Il est intéressant de noter que les résultats présentés en *Figure IV-13* confirment cette sélection à pH 7. Le changement de structure de communauté microbienne à pH 6 et pH9 dans l'étude de Patil et al. (2011) pourrait être dû à une carence des microorganismes spécifiquement sélectionnés à ces valeurs de pH par rapport à des éléments présents dans l'inoculum de départ, mais aussi à une sélection plus diverse de microorganismes moins électroactifs qu'à pH 7. En effet, la densité de courant produite est plus élevée à pH 7 qu'aux autres pH testés par Patil et al. (2011).

La proportion de *Malonomonas rubra*, qui compose 4% de la distribution phylogénétique dans le premier biofilm (Dynacol 1), diminue au cours de la colonisation du biofilm pour ne constituer que moins de 1% en abondance relative de la population microbienne. Une espèce proche de *Malonomonas rubra* (avec 95 % de similarité sur l'ARN 16S) a précédemment été isolée à partir de biofilms électroactifs issus de sédiments marins (en pile à combustible de laboratoire) et de sédiments de salins (en pile à combustible *in situ*) dans une étude de Holmes et al. (2004). Holmes et al. (2004) ont également montré la capacité de *Malonomonas rubra* à réduire des oxydes de fer (III) comme les DMRB qui composent

souvent les biofilms électroactifs. Il a par ailleurs été montré que *Malonomonas rubra* est très proche phylogénétiquement de *Desulfuromonas acetoxidans* (92% de similarité entre les séquences d'ARNr 16S) (Kolb et al., 1998). De plus, elle possède des cytochromes de type c similaires à ceux de la sulfato-réduction chez d'autres organismes (Kolb et al., 1998). La similarité avec une autre espèce électroactive et la présence de cytochromes c pouvant assurer le transfert d'électron vers un accepteur externe s'accorde avec l'enrichissement de *Malonomonas rubra* sur anode retrouvé ici. La diminution de la proportion de *Malonomonas rubra* au cours du temps au profit de *Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas sp.* peut être due aux conditions imposées par le système. Notamment, *Malonomonas* présente une température optimale de croissance entre 28 et 30 °C (Vandieken et al., 2006) alors que la température ici était maintenue à 37°C. La présence de *Malomonas rubra* suggère donc une étude plus approfondie de cette espèce en culture pure pour vérifier ses capacités en termes d'électroactivité et en co-culture avec d'autres espèces comme *Geoalkalibacter subterraneus* ou *Desulfuromonas sp.* pour étudier l'influence de plusieurs taux d'inoculation sur les performances du système.

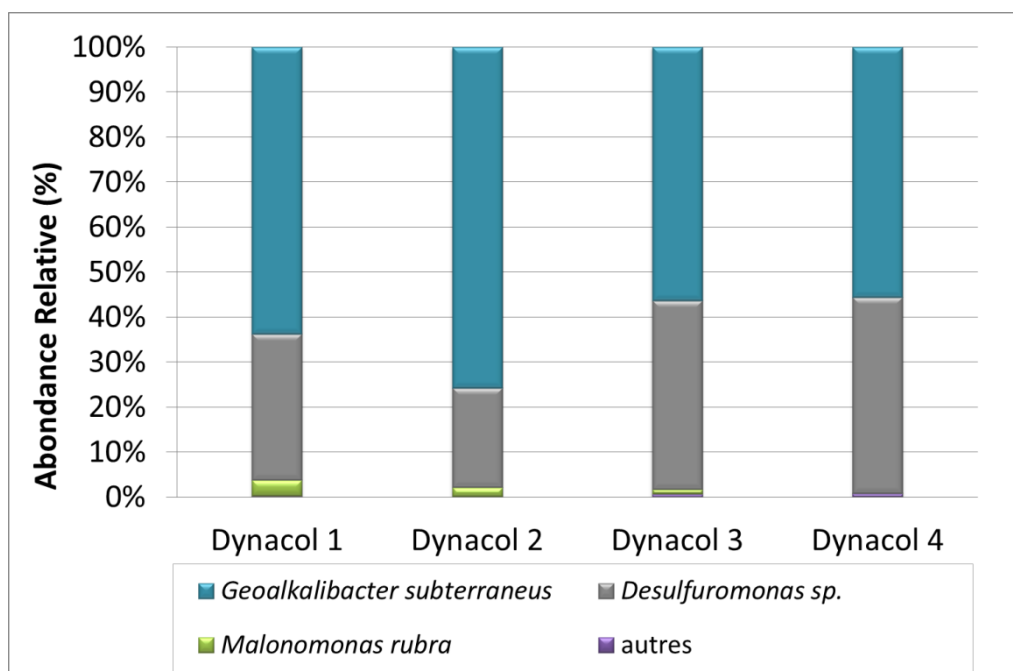


Figure IV-13 : Distribution taxonomique des bactéries phylogénétiquement les plus proches identifiées dans les différents biofilms collectés au cours de la colonisation de l'électrode.

L'abondance relative est définie par rapport au nombre de séquences affiliées à un taxon divisé par le nombre total de séquences par échantillon. Les espèces constituant moins de 1% de la population microbienne du biofilm ont été placées dans le groupe « autres ».

Finalemment cette expérience a montré que, dans des conditions contrôlées (pH 7, 37°C, 35 g_{NaCl}/L) et en utilisant des sédiments salins comme inoculum, une forte sélection des espèces électroactives *Gealkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas* sp. en co-dominance se produisait dès les premiers jours de formation du biofilm. La composition microbienne reste la même au cours de l'expérience et le prélèvement du biofilm pour la caractérisation microbienne peut donc être fait à différents stades tout en restant représentatif.

Il serait intéressant de réaliser cette même expérience dans d'autres conditions de pH pour voir si les observations de Patil et al. (2011) en fed-batch à pH 6 et pH9 peuvent être faites en batch. D'autre part, il pourrait aussi être intéressant de tester d'autres sources d'inocula puisque la composition microbienne du biofilm en dépend.

IV.4. CONCLUSION SUR LE CHAPITRE IV

L'étude des biofilms électroactifs menée dans ce chapitre a permis, dans un premier temps, d'identifier de nouvelles sources de consortia bactériens électroactifs : les sédiments salins qui ont permis d'obtenir des biofilms électroactifs performants en conditions salines. Cependant, le biofilm n'a pas présenté de bonnes capacités d'adaptation à un pH plus acide (pH 5,5), classiquement utilisé en fermentation pour la production d'hydrogène.

Ensuite, cette étude a permis de caractériser cet inoculum et d'identifier les espèces majoritaires qui le composent et notamment *Geoalkalibacter subterraneus* qui est nouvellement définie comme électroactive. Les biofilms obtenus ont atteint jusqu'à 8.5 A/m² (IV.1) en réacteur à 3 électrode et 10.6±0,5 A/m² en réacteur N-Stat à 6 électrodes (IV.3), ce qui est cohérents avec les études antérieures trouvées dans le littérature notamment avec *Geoalkalibacter subterraneus* (Miceli et al., 2012).

Une méthode d'enrichissement a ensuite été étudiée pour enrichir les DMRB (Dissimilatory Metal-Reducing Bacteria) à partir de l'inoculum de départ en partant de l'hypothèse que la capacité des DMRB à transférer des électrons à des oxydes de fer (III) était transposable à un échange d'électrons avec l'anode. L'aspect microbien de la sélection dans un milieu enrichi en fer (III) a été mis en regard avec les performances électroactives du biofilm. Cette méthode pourrait permettre de supprimer les bactéries planctoniques et les accepteurs d'électrons, initialement présent dans les sédiments, qui sont en compétition pour le substrat et avec l'électrode.

L'étude comparative de la sélection microbienne au cours des deux stratégies d'enrichissement (sur anode et sur Fe(III)) a montré une divergence de sélection microbienne qui peut être associée à une baisse des performances électroactives du biofilm après plusieurs étapes de pré-enrichissement sur Fe(III). Cependant, ici, une seule étape d'enrichissement a été nécessaire pour améliorer ces performances. Les résultats de notre étude ont montré que la méthode de pré-enrichissement sur Fe(III) doit être réalisée en très peu d'étapes pour ne pas obtenir une communauté microbienne trop spécialisée pour la respiration sur Fe(III). Cette méthode présente un intérêt majeur dans les stratégies d'inoculation de BES car elle permet de s'affranchir de la conduite préalable de réacteur, elle

fournit un inoculum liquide plus simple à manipuler qu'un biofilm et elle permet d'éviter la perte éventuelle d'activité des bactéries électroactive par repiquages successifs.

La forte sélection de ces espèces électroactives et le caractère aléatoire de leur dominance ou codominance dans le biofilm ont mené à l'étude de la dynamique de colonisation de ces espèces sur l'électrode afin d'établir si ces deux espèces majoritaires obtenues systématiquement sur anode dans les deux premières parties s'implantent de façon séquentielle. Cette étude de la dynamique de colonisation des électrodes a permis de confirmer le caractère précoce de la dominance ou codominance de espèces électroactives *Geokalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas* sp. dès l'attachement du biofilm sur l'électrode.

Finalement la forte sélection des espèces électroactives sur l'électrode avec une ou deux espèce(s) majoritaire(s) dans le biofilm pourrait être attribuée au caractère très sélectif du milieu de par sa composition, ses paramètres opératoires (pH 7, 37°C, 35 g_{NaCl}/L) et du dispositif expérimental (avec une anode à potentiel contrôlé).

Dans ce chapitre, nous avons observé une forte sélection dans chaque biofilm électroactif, et donc une forte simplification de la diversité microbienne. Un biofilm présentant une communauté microbienne diverse est pourtant plus résistant face aux perturbations exogènes biotiques ou abiotiques. Suite à ce travail, nous nous sommes donc intéressés à l'influence de l'ajout des espèces exogènes sélectionnées en fermentation dans le Chapitre III sur le biofilm électroactif en termes de performances électroactives et de perturbation des communautés microbiennes qui le composent.