
ETUDE DU BIOFILM ÉLÉCTROACTIF

L'objectif de ce chapitre est de caractériser le développement de biofilms électroactifs dans le cadre du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne. Plus précisément, ce chapitre s'attache à décrire le processus de sélection d'un consortium électroactif permettant un bon transfert d'électrons vers l'anode, et à évaluer son adaptation aux conditions spécifiques des effluents de fermentation. Ce consortium électroactif a été sélectionné en condition saline, nécessaire à l'obtention d'une conductivité élevée, et ce à partir d'un inoculum salin. Une méthode de pré-enrichissement dans un milieu contenant du Fe(III) comme seul accepteur final d'électrons a été étudiée et comparée à l'enrichissement direct de bactéries électroactives sur anode. Enfin, une étude de la dynamique de colonisation de l'anode a été réalisée afin d'établir si les espèces majoritaires de bactéries électrogènes obtenues précédemment s'implantaient de façon séquentielle ou simultanée.

IV.1. SELECTION ET IDENTIFICATION DE MICROORGANISMES ELECTRO-ACTIFS

IV.1.1. AVANT-PROPOS

Les microorganismes électroactifs impliqués dans les systèmes bioélectrochimiques (BES) tels que les piles à combustibles microbiennes (MFC – « Microbial Fuel Cells ») ou les cellules d'électrolyse microbiennes (MEC – « Microbial Electrolysis Cells ») sont actuellement très étudiés et l'optimisation des procédés comme la recherche de consortia électroactif plus performant est d'un intérêt majeur pour les futures applications industrielles (Logan, 2009; Lovley, 2012). Dans le cadre de cette thèse, un consortia type a été recherché pour assurer le couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne.

Dans les systèmes bioélectrochimiques, le transfert de charges joue un rôle très important et l'influence de la salinité dans le compartiment anodique fait l'objet de récentes études (Liu, Cheng, et al., 2005b; Lefebvre et al., 2012; Rousseau et al., 2013). Liu et al., (2005a) ont observé qu'une augmentation de 1,7 à 6,8 g_{NaCl}/L induisait une augmentation de 85% de la densité de puissance en utilisant des eaux usées domestiques comme inoculum. Plus récemment, Lefebvre et al. (2012) ont signalé une augmentation des densités de puissance en pile à combustibles microbienne en utilisant des concentrations plus élevées en NaCl de 0,0 à 20,0 g_{NaCl}/L. Dans ce cas, une salinité plus importante s'avérait être préjudiciable pour la performance globale des BES, signifiant que l'activité électroactive des biofilms obtenus à partir d'eaux usées domestiques pouvait être fortement diminuée pour des salinités relativement faibles (de l'ordre de 20-30 g_{NaCl}/L). L'amélioration des performances a été donc très limitée en termes de gamme de salinité au cours de ces études, pour lesquelles les inocula utilisés pour la sélection d'espèces électroactives sur anode étaient essentiellement d'origine non salée. Récemment, Rousseau et al. (2013) ont montré une influence positive de la salinité sur les performances électroactives du biofilm pour des salinités de l'ordre de 20 g_{NaCl}/L avec des biofilms formés à partir de sédiments issus d'un environnement salin.

De plus, la culture en milieu salin de biofilms électroactifs permettrait le traitement d'effluents salins encore peu traités tels que les effluents d'industries de la pêche, du pétrole et du cuir ou certaines eaux usées rejetées par les usines de traitement d'eau potable. Ces effluents difficiles à traiter par les procédés biologiques conventionnels présentent un risque

important de salinisation des sols et des eaux de surface et souterraines (Lefebvre et al., 2010, 2012; Pierra et al., 2013).

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail a été d'identifier de nouvelles sources de consortia bactériens électroactifs. Pour cela, la sélection de biofilms électroactifs a été réalisée dans des conditions salines. Ainsi, cette étape a été testée en milieu salin (30 g_{NaCl}/L) avec une salinité proche de celle constatée dans la majeure partie des mers et océans, qui devraient ainsi représenter une salinité optimale pour la croissance d'une plus grande variété d'organismes.

De plus, la sélection de bactéries électroactives à partir de ces sédiments salins produirait un consortium efficace pour travailler dans des BES à des salinités plus élevées que celles habituellement appliquées. Ainsi des inocula anaérobies en incluant des sédiments issus de milieux salins.

Les biofilms ont été formés en utilisant un système à 3 électrodes avec une électrode de travail en graphite polarisée à +0.2V/Ag/AgCl. Différentes sources d'inocula issus de milieux anaérobies ont été utilisées à différents pH afin de sélectionner des populations électroactives comme décrit dans le *Tableau IV-1* ci-dessous (sédiments d'égout de salins de Gruissan mais aussi vinasses, compost, sol). Les pH choisis ici se rapprochaient des pH des milieux de prélèvement des inocula. L'électrolyte utilisé (milieu réactionnel) était composé d'oligo-éléments, d'eau de mer ou d'une solution de NaCl à 30 g_{NaCl}/L. Les plus performants, en termes de production de courant, sont les sédiments de l'étang de Gruissan (4.2 A/m², dans l'eau de mer à pH 7) et un échantillon de sol (2.0 A/m² dans l'eau de mer à pH 6).

Tableau IV-1 : Recherche d'inocula pour la formation d'un biofilm électroactif dans un système à 3 électrodes avec une électrode de travail en graphite polarisée à +0.2V/AgAgCl.

Inoculum	pH	temps de latence (j)	Jmax (A/m ²)
Fermenteur	5,5	-	0
Curet	5,5	-	0
Vinasses	6	-	0
Compost	6	-	0
Sol	6	9	2
Mélange (vinasses + compost + sol)	6	21	0,1
Sédiments de l'étang de Gruissan	7	2	4,2

Ces premières expériences ont permis d'obtenir de bonnes densités de courants notamment avec l'inoculum de sol (2 A/m^2) et celui des sédiments de l'étang de Gruissan (4.2 A/m^2) à des pH respectifs de 6 et 7. Les faibles pH semblent empêcher la formation d'un biofilm électroactif. Ces résultats sont cohérents avec la littérature dans laquelle la majorité biofilms électroactifs sont formés à partir de sols et de sédiments d'eaux douces ou salines (Lovley, 2006b). Dans une étude précédente effectuée dans des conditions salines ($20 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$), Erable et al. (2009) ont montré une production efficace de courant ($2,5 \text{ A/m}^2$) en utilisant un biofilm naturel marin fixé sur une électrode en graphite polarisée à $-0,1 \text{ V/ESC}$ et alimenté avec de l'acétate à 10 mM . L'intérêt d'utiliser des sédiments salins comme source de micro-organismes électroactifs est ici vérifié avec l'obtention d'une densité de courant de 4.2 A/m^2 pour le biofilm obtenu à partir des sédiments de l'étang de Gruissan. Plus récemment, Rousseau et al. (2013) ont observé, en utilisant un inoculum issu d'un milieu salin, une augmentation de la production de densité de courant dans des conditions salines dans un système à potentiel contrôlé alimenté avec 40 mM d'acétate. Une densité de courant de 85 A/m^2 a même été obtenue à $45 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ sur un feutre de graphite. Une diminution de la production de densité de courant a ensuite été observée à $60 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ mais elle restait encore élevée (30 A/m^2). Une caractérisation des communautés microbiennes de ce type de biofilms développés en conditions salines apporterait un éclairage nouveau et sans doute nécessaire à la compréhension des résultats observés en termes de densités de courant.

Dans un deuxième temps, un inoculum type à utiliser dans le cadre du couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne a été défini et la capacité d'adaptation des consortia aux conditions de fonctionnement en MEC a été évaluée sur les biofilms ainsi obtenus. Suite aux tests préliminaires, il a donc ensuite été décidé de sélectionner des bactéries électroactives à partir de 2 types d'inoculum : les sédiments de l'étang de Gruissan et les sédiments des salins de Gruissan (qui ont été testés à pH 7). L'originalité de cette étude a été d'utiliser des sédiments salins, déjà adaptés à une concentration en sel importante, dans un milieu de culture salin. Les biofilms ont été étudiés en termes de performances électroactives (densité de courant, rendement faradique, temps de latence), mais aussi en termes de composition des communautés microbiennes.

Ainsi, dans l'étude présentée dans le premier article en IV.1.2, des biofilms électroactifs ont été sélectionnés sur anodes dans des conditions salines sous différentes conditions de pH et de donneur d'électrons (avec de l'acétate et du butyrate comme substrat) (phase 1). Dans le cadre du couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne, les expériences en phase 1 ont été réalisées à pH neutre ou acide, en présence d'acétate ou d'un mélange d'acétate et de butyrate qui correspondent respectivement aux conditions standards utilisées dans les systèmes bioélectrochimiques (Logan, 2012) et à la composition de la sortie d'un fermenteur de production de bioH₂ (Guo et al., 2010). Deux sédiments salins différents ont ensuite été testés dans une deuxième série d'expérience (phase 2) pour inoculer les réacteurs électrochimiques à potentiel contrôlé dans les conditions ayant donné les meilleures performances d'électroactivité en phase 1. Les communautés microbiennes des biofilms ont ensuite été caractérisées par PCR-CE-SSCP et 454 pyroséquençage.

IV.1.2. CROISSANCE DE BIOFILMS ELECTROACTIFS ET PRODUCTION DE COURANT ELEVEES DANS DES CONDITIONS SALINES, SELECTION DE GEOALKALIBACTER SUBTERRANEUS

Electrochemical growth of high current producing biofilms under saline conditions drives the efficient selection of *Geoalkalibacter subterraneus*

Mélanie Pierra, Eric Trably, Jean-Jacques Godon, Alessandro A. Carmona-Martínez, Nicolas Bernet

Article soumis dans «*Journal of Applied Microbiology*»

Running headline: Selection of *Glk. subterraneus* in electroactive biofilms

Abstract

Aims: The objective of this work was to assess the electrochemical and microbiological characterization of anodic biofilms derived from saline sediments under well potentiostatically controlled conditions in a bioelectrochemical system (BES) operated in saline conditions (35 g_{NaCl} l⁻¹).

Methods and Results: The performance of anodic biofilms was studied in terms of biofilm formation lag-phase, maximum current density production and coulombic efficiency. Additionally, microbial communities were characterized by using PCR-SSCP and 454 pyrosequencing. Potentiostatically controlled reactors were used for the growth of electroactive biofilms fed with only acetate or a mixture of acetate and butyrate at two pH values: 7.0 or 5.5. Two inocula were tested: sediments from a salt lake and from a salt-producing platform. High current densities, up to 8.5 A m⁻², were obtained in graphite planar electrodes as a consequence of a strong electrochemical driven selection wherein only one or two species of ARB were selected as main dominant bacteria in anodic biofilms.

Conclusions: Efficient electroactive biofilms could be grown under saline conditions with the selection of *Geoalkalibacter subterraneus* and/or *Desulfuromonas* spp. as dominant species.

Significance and Impact of the Study: This study reveals the high selection in electrochemically driven biofilms of anode-respiring bacteria from saline inocula and under saline conditions. The enrichment of such halophilic biofilms provides an alternative for the treatment of saline wastewaters, usually limited by technical or economic constraints.

Keywords Bioelectrochemical systems, Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP), 454 Pyrosequencing, *Geoalkalibacter subterraneus*, *Desulfuromonas spp.*, Saline wastewater

IV.1.2.1. INTRODUCTION

Microorganisms embedded in electroactive biofilms are able to convert organic matter into electrical current in bioelectrochemical systems (BES) (Logan et Regan 2006; Arends et Verstraete 2012; Lovley 2012) for the production of electricity in microbial fuel cells (MFCs) (Rabaey et Verstraete 2005; Logan et Regan 2006; Rozendal *et al.* 2006) or the production of hydrogen in microbial electrolysis cells (MECs).

Several anode respiring bacteria (ARB) embedded in electroactive biofilms are able to directly transfer electrons to/from electrode materials (Patil et al., 2012) and the study of their electrode interactions has allowed a progressively increase of the current densities achieved in BESs up to 390 A m^{-2} (Chen *et al.* 2012).

On the other side, it has been extensively found that ARB are related to α , β , γ , δ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* and *Actinobacteria* (Chaudhuri et Lovley 2003; Holmes *et al.* 2004; Zuo *et al.* 2008; Liu *et al.* 2010). While wastewater is commonly the source of microorganisms in BESs for the development of electroactive biofilms, its applications are consequently limited to the treatment of domestic wastewater (Lefebvre *et al.* 2010). Hence, the selection of halophilic ARB embedded in microbial biofilms is an essential prerequisite for the treatment of saline wastewaters (SWWs) that represent a high risk of soil, surface and groundwater salinization (Lefebvre *et al.* 2010, 2012; Pierra *et al.* 2013).

On the other hand, although it is known that saline conditions could increase the conductivity of electrolyte solutions and facilitate the proton transport with the consequent increment of the overall BES performances (Lefebvre *et al.* 2012), this has been rarely tested. Liu (2005a) observed that an increment from 1.7 to $6.8 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ l}^{-1}$ induced an 85% increase in power densities (Liu *et al.* 2005a) in domestic wastewater based BESs. More recently, Lefebvre (2012) reported an increase of power densities by progressively using higher concentrations of NaCl from 0.0 up to $20.0 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ l}^{-1}$. Higher salinity concentration

proved to be detrimental for the overall BES performance, meaning that ARB enriched from domestic wastewater were affected at relatively low salinities (Lefebvre *et al.* 2012).

Interestingly, previous studies assessing the impact of salinity on bioelectrochemical activity of ARB were conducted by using domestic wastewater as inoculum (Lefebvre *et al.* 2012; Liu *et al.* 2005a), although saline sediments can be a better source of suitable halophilic ARB for such studies in BES systems (Bond *et al.* 2002; Lovley 2006; Erable *et al.* 2009; Miceli *et al.* 2012). The selection of ARB from such saline sediments for the formation of electroactive biofilms would produce an efficient consortium to work in BESs under high salinity concentrations that are not usually tested.

In a previous study performed under saline conditions ($20 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$), Erable (2009) showed an efficient current production of 2.5 A m^{-2} using a natural marine biofilm on a graphite electrode polarized at -0.1 V/SCE and fed with 10 mM acetate. Recently, Rousseau (2013) observed an increase of current density production under saline conditions in a potentiostatically controlled system fed with 40 mM acetate. A current density of 85 A m^{-2} was obtained at $45 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ l}^{-1}$ on a porous carbon felt anode. A decrease of current production was then observed at $60 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ l}^{-1}$ but the performance was still significant (30 A m^{-2}). However, the lack of information on the microbial communities in such a saline biofilm hinders the overall understanding of the produced current densities.

In the present work, the enrichment of electroactive biofilms under saline conditions under different conditions of pH and electron donor (Phase 1) is reported. Since this work is part of a project aiming at feeding BES with dead-end metabolites from dark fermentation effluents, the pH tested were neutral or acidic pH for conditions in BES (Logan, 2012) and dark fermentation (Guo *et al.* 2010) respectively. Acetate alone or a mixture of acetate and butyrate were used as electron donors. Additionally, two different saline sediments were tested to inoculate potentiostatically controlled electrochemical reactors in the conditions showing the best performance in phase 1 in terms of current production (Phase 2). Biofilms were then extensively analyzed to describe the high selection that occurred in the anodic biofilm. This selection was quantitatively and easily characterized by the use of PCR-SSCP and 454 pyrosequencing. An approach used for the first time for the characterization of highly enriched ARB in anodic biofilms (Harnisch and Rabaey 2012).

IV.1.2.2. MATERIAL AND METHODS

IV.1.2.2.1. Origin of the Inoculum

As briefly explained above, the inocula used here were sampled from two different locations: Inoculum 1, sediments collected at a salt lake beach and Inoculum 2, seed sediments from a lagoon collecting wastewaters from a salt factory (Salins de Saint Martin, Gruissan, France). Both inocula presented similar physicochemical properties, i.e., pH of 7.8 ± 0.2 ; $36.1 \pm 3.5 \text{ g}_{\text{VS}} \text{ g}_{\text{sediments}}^{-1}$ and a value of conductivity of $93.6 \pm 12.1 \text{ mS cm}^{-1}$.

IV.1.2.2.2. Experimental set-up: potentiostatically controlled electrochemical reactors

Experiments were carried out using electrochemical reactors under potentiostatic control (VSP Bio-Logic SA) monitored with a computer (EC Laboratory v.10.1 software, Bio Logic SA). The set-up, based on a previously described arrangement (Ketep *et al.*, 2013), consisted of a working electrode (graphite), a reference electrode (Ag/AgCl) and a counter electrode (platinum grid). The anodes were geometrically well defined graphite planar working electrodes with the following dimensions: 2.5x2.5x0.2 cm (Goodfellow). To ensure the electrical connection, 2 mm diameter and 12 cm long titanium rod (Goodfellow) were used. The working electrodes were cleaned before use using a P800 sandpaper and rinsed with 99% purity ethanol. Cathode or counter electrodes were Platinum Iridium grid (90%/10%) (Heraeus) cleaned by heating in a blue flame. The potentials of working electrodes were controlled using an Ag/AgCl electrode (potential +0.197 vs. SHE).

Inocula were added into the culture media (10% v/v for a final working volume of 400mL) containing 50mM of MES buffer and mineral solution (Rafrafi *et al.* 2013) ($0.5 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $2 \text{ g l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $0.2 \text{ g l}^{-1} \text{ Yeast Extract}$, $55 \text{ mg l}^{-1} \text{ MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $7 \text{ g l}^{-1} \text{ FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $1.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.4 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $1.3 \text{ mg l}^{-1} \text{ CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BO}_3\text{H}_3$, $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.05 \text{ mg l}^{-1} \text{ NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $0.01 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $60 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Reactors were fed with acetate (10 mmol l^{-1}) or a mixture of acetate (5 mmol l^{-1}) and butyrate (5 mM) as described in Tableau IV-2. Deionized water (reactors B7, B8, B9) or sea water (reactors B1, B2, B3, B4, B5, B6) were used in order to get a final salinity equivalent to $30 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$. The initial pH was adjusted to 5.5 or 7.0 using NaOH (1 mol l^{-1}).

To ensure anaerobic conditions, all reactors were flushed with nitrogen gas for 30 minutes after inoculation. Reactors were incubated at 37°C. The anode potential was fixed at +0.2V vs Ag/AgCl during chronoamperometry (CA).

CA maximum current densities j_{max} ($A\ m^{-2}$) 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). Coulombic efficiencies (CE) were calculated for each experiment according to (Call et al. 2009).

IV.1.2.2.3. Chemical analyses

Volatile Fatty Acids (VFA) consumption (*i.e.* acetic (C2) and butyric (C4) acids) was determined with a gas chromatograph (GC-3900 Varian) equipped with a flame ionization detector. Sample analysis was performed using an auto sampler. A syringe automatically takes 0.5 μ l of the mix and places it in the injector, heated at 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.1.2.2.4. DNA extraction, PCR amplification and CE-SSCP fingerprinting

All DNA from biofilms obtained was extracted and the microbial community on biofilms and inoculum 2 was characterized using capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP) and sequenced using pyrosequencing. Molecular analyses of bacterial communities were performed on each electroactive biofilm. Genomic DNA was extracted and purified using a previously described protocol (Godon *et al.* 1997). Total extracted DNA was purified using a QiAmp DNA microkit (Qiagen, Hilden, Germany). Extracts' amount and purity of DNA were confirmed by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). Then, the 16S rRNA genes were amplified using universal primers for bacteria, named W49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' *Escherichia coli* position 330) and 5'-fluorescein phosphoramidite labeled W104 (5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' *Escherichia coli* position 533), according to Wéry (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 performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf). The 16S rRNA genes were amplified

as follows: initial denaturing step 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.

A capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP) method was used for PCR products fingerprinting. CE-SSCP is a method that separates DNA fragments with the same size but having different secondary conformation rearrangement according to their base compositions (Wéry *et al.* 2008). To perform CE-SSCP fingerprinting, 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 re-cooled directly in 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 10% glycerol, conformation analysis polymer and corresponding buffer (Applied Biosystems). Samples were eluted at 12kV and 32°C for 30 min, as described elsewhere (Wéry *et al.* 2008).

On DNA samples selected from CE-SSCP profiles, pyrosequencing was performed using a 454 protocol for bacterial identification (Research and Testing Laboratory (Lubbock, USA)). Sequences of most abundant bacteria found in each biofilm were deposited in the NCBI genbank database under the following accession numbers for the main abundant bacteria selected in anodic biofilms (listed as “sequence number” for “biofilm designation”): KF573509 for B1; KF573510 for B2; KF573511 for B3; KF573512 and KF573513 for B4; KF573514 for B5; KF573515 for B6; KF573516 for B7; KF573517 and KF573518 for B8 and KF573519 for B9.

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 elsewhere. (Fromin *et al.* 2007). Simpson diversity index (Simpson, 1949) 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) (Quéméneur *et al.* 2011).

IV.1.2.3. RESULTS

IV.1.2.3.1. Phase 1: enrichment of electroactive biofilms under saline conditions

Representative CA curves are presented in Figure IV-1 to exemplary show how lag phase and maximum current density were calculated. Additionally, it is shown the time at which biofilm sampling for microbial community analysis took place.

By using the same inoculum source (Inoculum 1), two pH values and two different electron donors (see Phase 1 in Tableau IV-2) j_{max} ranged from 1.9 to 4.2 A m⁻², for reactors B1 to B4, respectively. CEs varied between 11 % (B1) to 70 % (B4) for respective (mixture of acetate and butyrate fed, pH 7) and (acetate fed, pH 7) conditions. The low CE achieved could be an indication of the use of the supplied substrate for biosynthesis instead of its direct conversion into current (Logan et Regan 2006). Among those 4 reactors, the highest j_{max} (4.2 A m⁻²) was obtained at neutral pH with acetate as sole carbon source, with the highest CE (70 %) and shortest lag phase (1.46 days). Hence, further experiments were performed with the best conditions found in Phase 1 (see below).

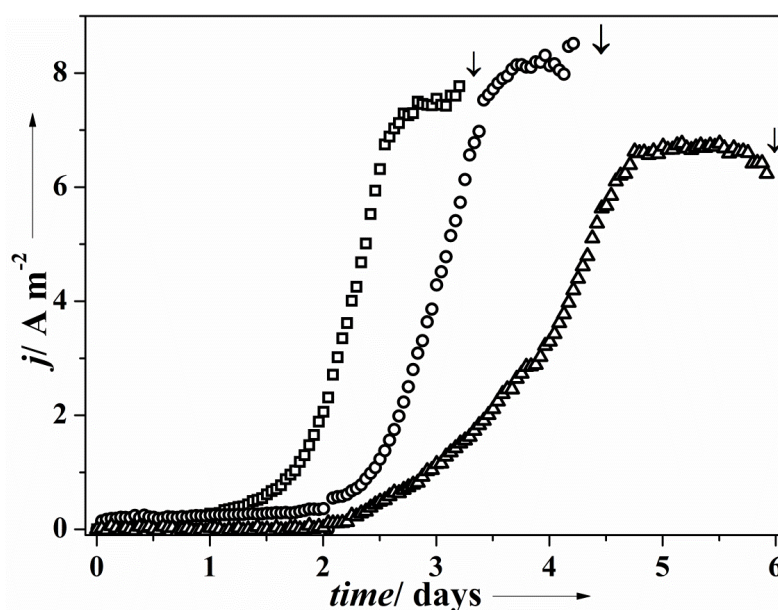


Figure IV-1 : Representative chronoamperometric batch cycles of electrochemically derived biofilms B7(Δ), B8(\square) & B9(\circ).

Experiments realized under saline conditions (30 g l⁻¹ NaCl) and pH 7.0 at graphite planar electrodes (15 cm²). Applied potential: +200 mV vs. Ag/AgCl. Inoculum site 2 and acetate as carbon source. Arrows indicate anodic biofilm collected for microbial analysis. Solid and dashed horizontal lines indicate lag and exponential growth phases, respectively.

IV.1.2.3.2. Phase 2: enhancement of current density (j_{max}) and Coulombic efficiency (CE)

Five additional potentiostically controlled electrochemical reactors were inoculated with sediments from a salt lake or from an industrial salt-producing platform (see Phase 2 in Tableau IV-2). In average, for reactors fed with acetate at pH 7, j_{max} were $7.6 \pm 0.9 \text{ A m}^{-2}$ and $5.0 \pm 1.1 \text{ A m}^{-2}$ and CEs were $63.3 \pm 12.3 \%$ and $75.7 \pm 4.9 \%$ with reactors inoculated with sediments from the salt factory (inoculum site 2) and the salt lake (inoculum site 1), respectively. It can be clearly observed from the overall performance of electrochemical reactors in terms of j_{max} and CE that experiments performed in phase 2 outperformed those of phase 1, mainly due to the use of well controlled physicochemical conditions (such as pH, temperature and anodic potential) that allow the enrichment of ARB from saline sediments. On the other side, the lag-phase could be clearly decreased from phase 1 to 2 in less than 1 day thanks to the experience gathered in phase 1 and due to the use of well controlled experimental conditions as outlined before.

Tableau IV-2 : Performance of electrochemically derived biofilms grown under saline conditions

Experimental conditions*	Lag phase/d	j_{max} / A m^{-2}	CE/ %	Main dominant species identified in the biofilm [†]
Phase I, effect of pH, substrate and type of salinity on biofilm formation and performance				
B1, pH 7.0, In 1, Ac-Bu, Sea water	2.94	1.9	11	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (86.09%)
B2, pH 5.5, In 1, Ac-Bu, Sea water	9.36	2.2	21	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (98.29%)
B3, pH 5.5, In 1, Ac, Sea water	8.71	2.7	12	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (99.16%)
B4, pH 7.0, In 1, Ac, Sea water	1.46	4.2	70	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (39.32%) <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (46.72%)
Phase II, effect of inoculum on biofilm formation and performance				
B5, pH 7.0, In 1, Ac, Sea water	2.20	4.5	80	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (95.43%)
B6, pH 7.0, In 1, Ac, Sea water	1.77	6.3	78	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (98.59%)
B7, pH 7.0, In 2, Ac, NaCl	1.86	6.7	60	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (72.86%)
B8, pH 7.0, In 2, Ac, NaCl	0.27	7.7	53	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (20.08%) <i>Desulfuromonas</i> spp. (58.18%)
B9, pH 7.0, In 2, Ac, NaCl	1.90	8.5	77	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> (91.24%)

* Construction of experimental unit name. B1-9: biofilm number, pH: 7.0 or 5.5, Inoculum site: 1 or 2, Substrate: acetate (Ac) or butyrate (Bu) and type of salinity adjustment: sea water or NaCl; [†]Names in italics correspond to the closest phylogenetical known sequence depending on the percentage of identity. Numbers in parenthesis represent the relative abundance values for each species obtained from 454 pyrosequencing analysis.

IV.1.2.3.3. Structure and composition of anodic bacterial communities

16S rRNA gene-based CE-SSCP fingerprint profiles of the biofilms are presented in Figure IV-2. Simpson diversity index was also calculated to describe the level of species diversity in an environment (Braun *et al.* 2011; Simpson 1949).

These community profiles exhibited simple structures with an average Simpson index of 0.86 ± 0.06 . In comparison, the inoculum was more diverse with a Simpson diversity index of 0.98 ± 0.002 . Only one or two main peaks were present as main dominant bacteria for each anodic biofilm. This confirms the high selection of ARB occurring in anodic biofilms of well potentiostically controlled BESs; a phenomenon described in previous studies (Bond *et al.* 2002; Freguia *et al.* 2010; Harnisch *et al.* 2011). Analysis of 16S ribosomal DNA genes by 454 pyrosequencing showed a pronounced dominance of microorganisms from the delta subgroup of *Proteobacteria* colonizing the anodes. From 85.4% to 97.0% of the 16S DNA sequences from microorganisms colonizing the anodes were related to this subgroup. Furthermore, 83.5% to 98.6% of the sequences relative abundance increase was due to few clusters of bacteria affiliated to *Desulfuromonadaceae* spp. (*Desulfuromonas* spp.) and to *Geobacteraceae* spp. (*Geoalkalibacter subterraneus*, *Geoalkalibacter* spp and *Geobacteraceae* (unknown genus) (see Tableau IV-2).

Finally, most abundant species found in all electroactive biofilms were closely related and were up to 97% similar to *Desulfuromonas* spp and *Geoalkalibacter subterraneus* in both sediment-inoculated reactors. The later ARB, only reported in a recent BESs study Miceli (2012) showing *Geoalkalibacter* dominated biofilms derived from environmental anaerobic samples. Even after the high selection found in the experiments presented here, no specific trend in terms of ratio of main bacteria could be noticed in the selection of bacteria among conditions tested.

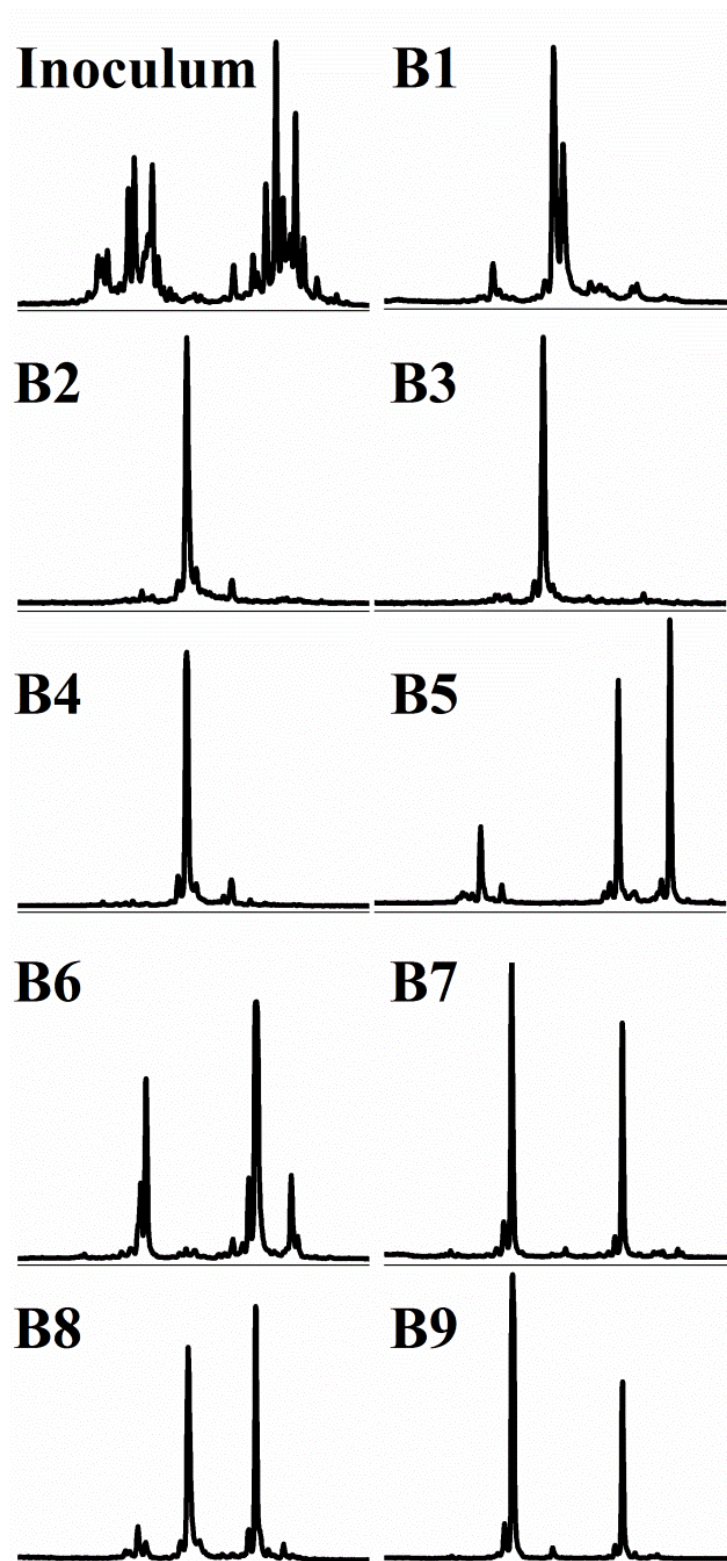


Figure IV-2 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from electroactive biofilms R1 to R9 grown in different operating conditions (see Tableau IV-1).

The X and Y axes of each peak represent respectively the relative peak electrophoresis migration distance and the relative peak intensity (Arbitrary Units)

IV.1.2.4. DISCUSSION

IV.1.2.4.1. Role of electron donor: acetate alone or a mixture of acetate and butyrate

When added alone, acetate proved to be an effective electron donor for bacteria that compose the electroactive biofilm enriched from sediments in terms of lag-phase, j_{max} and CE (see Tableau IV-2). This is consistent with previous studies showing an efficient enrichment procedure from environmental samples and with acetate as the sole carbon source (Erable *et al.* 2009; Miceli *et al.* 2012; Bond *et al.* 2002; Holmes *et al.* 2004). Freguia (2010) showed that in BES fed with a mixture of more than 7 different volatile fatty acids (VFAs), acetic and propionic acids were the preferential electron donors for ARB enriched in microbial biofilms. However, when BESs were fed with a single VFA, each of these could be removed, but particularly i-butyrate did not provide significant current generation. On the other side, Liu (2005b) showed that an enriched electroactive biofilm in a MFC fed with acetate generated 66% higher power density than with butyrate suggesting that acetate is a preferential substrate. When comparing the results presented here with those of Freguia (2010) and Liu (2005b) in which acetate has been the preferential substrate for current production in BESs fed with several substrates, one could hypothesize the following: the competition with other non ARB for an specific substrate or a better degradability of acetate in comparison to other VFAs could have been hindering the ability of ARB to efficiently convert the provided substrate into current.

IV.1.2.4.2. Role of pH: neutral and acidic conditions

The pH value is an important parameter for microbial electron transfer. During the substrate oxidation process that occurs within the anodic microbial biofilm, electrons and protons are produced (Rabaey et Verstraete 2005). In a two chamber BES where anode/anolyte and cathode/catholyte are physically separated, e.g, by an ion exchange membrane (Rozendal *et al.* 2007), protons are released to the media and migrate to the cathode chamber to react with molecules of water and electrons resulting from the external driven flow from the anode to the cathode, finally producing reduced compounds. Therefore an unbalance of the desired pH in both anode and cathode environments could cause irreversible anodic biofilm degradation or severely affect the oxygen reduction reaction (Patil *et al.* 2011). In the work presented here, overall performance was significantly higher at pH 7.0 than at pH 5.5 when

operated under the same conditions in terms of CE (see Tableau IV-2). For reactors fed with acetate, CEs were 70% and 12% at pH 7.0 and 5.5, respectively. For reactors fed with a mix of acetate and butyrate, CEs were 11% and 21% at respective pH 7.0 and pH 5.5. These results were expected as pH in the inocula was close to 7. Hence, the microbial communities derived from the sediments have successfully adapted to this pH environment. This is also consistent with previous results in which electroactive biofilms showed a better performance in terms of CE at neutral pH. For example, Patil *et al.* (2011) showed that a higher performance was obtained at neutral pH using wastewaters as inoculum. Taking together, the results presented here corroborate the findings of a great deal of the previous BES studies comparing the effect on biofilm formation and performance. However, the saline environment proposed here for the enrichment of high current producing ARB significantly expands the possible applications of BESs.

IV.1.2.4.3. Anodic bacterial community composition and distribution

16S rRNA gene-based CE-SSCP fingerprints of the anodic enriched biofilms are presented in Figure IV-2. On CE-SSCP profiles, each peak is representative of a phylotype. It should be noted that the phenomenon of co-migration can generate a same peak for different, but genetically closed species. This technique provides a good overview on the microbial community structure in the biofilm. In the study presented here, the comparison between CE-SSCP profiles of the inoculum used and the one of the derived biofilms allows to clearly see the impact of the bioelectrochemical enrichment process on the anode on the microbial community (*i.e.*, anodic fixed potential, available source of electron donor, controlled temperature, etc.). Overall, CE-SSCP profiles of derived biofilms present only a few peaks which can be understood as the result of a simplified microbial community with the emergence of only one or two main dominant ARB. This illustrates the high selectivity of the procedure utilized by using a polarized electrode. A result that is consistent with previous studies showing a high bacteria selection and a decrease of diversity (Harnisch *et al.* 2011; Miceli *et al.* 2012; Torres *et al.* 2009).

As described before, the microorganisms colonizing the anodes were affiliated to delta subgroup of proteobacteria. Furthermore, from 83.5% to 98.6% of the sequences were only affiliated to two genera: *Desulfuromonas* spp. and *Geoalkalibacter* spp. Among 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 (Bond *et al.* 2002; Pfennig et Biebl 1976). This study shows that the ARB found here are able to use the electrode material as an electron acceptor as they would behave in natural environment using other insoluble final electron acceptors such as iron or magnesium oxides (Greene *et al.* 2009). Consequently, it can be then proposed that in the ARB found here, especially for *Geoalkalibacter*, the capacity to reduce insoluble electron donors (such as iron oxides) does confer the ability to transfer electrons to electrode materials. Ability not always present in iron reducing bacteria (Richter *et al.* 2007).

It was previously shown that microbial composition of electroactive biofilms is highly dependent on the substrate nature (Chae *et al.* 2009; Freguia *et al.* 2010; Kiely *et al.* 2011). Freguia *et al.* (2010) showed that in an electroactive biofilm from a MFC fed with butyric acid, the microbial communities greatly differed from the MFC fed with acetic acid. A lack of *Geobacteraceae* in butyrate fed-system suggested that this group of microorganisms was not able to harvest electrons from butyrate oxidation. In contrast, a high abundance of *Pseudomonas* and gram-positive *Bacillus* species suggested that these species were probably responsible for butyric acid conversion into current (Freguia *et al.* 2010). According to Chae (2009), a higher CE was found when the anodic biofilm was enriched from an anaerobic digester sludge fed with acetate (72.3%) than with butyrate (43.0%) at pH 7. This is consistent with results at neutral pH fed with acetate (67.9 ± 16.2 %) and with an acetate and butyrate mix (11%) (see Tableau IV-2). In Freguia *et al.* (2010), microbial communities were also different with the predominance of α , β and δ -*Proteobacteria* and *Firmicutes*, with a majority of β -*Proteobacteria* in butyrate-fed biofilm and the predominance of α , β and δ *Proteobacteria* with a majority of β and δ -*Proteobacteria* in acetate-fed biofilm. In the present study, the main dominant bacteria in each biofilm were related to *Geoalkalibacter subterraneus* and *Desulfuromonas spp.* (Tableau IV-2).

Regarding the type of ARB bacteria selected and their predominance in the anodic microbial community, the following was observed. The selection of *Geoalkalibacter subterraneus* could be due to the saline nature of the inoculum since this bacterium preferentially grows under these saline conditions (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013).

A plausible explanation for the high microbial selection in anodic biofilms found here could come from the analysis of the constant experimental conditions imposed by, e.g. a

fixed anodic applied potential, temperature and pH (among others) that assure well controlled microbial and environmental conditions for ARB to easily attach to the electrode surface while using it as a final electron acceptor (Rabaey *et al.* 2010).

Whereas *Desulfuromonas* spp has been widely described in the literature as an ARB (Bergel *et al.* 2012; Bond and Lovley 2003; Bond *et al.* 2002; Call *et al.* 2009; Dumas *et al.* 2008; Holmes *et al.* 2004; Logan and Regan 2006; Marsili *et al.* 2010; Miceli *et al.* 2012; Nevin *et al.* 2008, 2009; Qu *et al.* 2012; Wei *et al.* 2010), members of *Geoalkalibacter* genus have only recently been found in an electroactive biofilms (Miceli *et al.* 2012). Miceli (2012) showed that *Geoalkalibacter* dominated highly enriched biofilms producing significant j_{max} (4.2 to 8.9 A m⁻²). More precisely, *Geoalkalibacter subterraneus* was found for the first time in electroactive biofilms from mixed culture. In addition, anodic electron transfer was independently evidenced by two different research groups using a pure culture of *Geoalkalibacter subterraneus* (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013).

Moreover, the random character of the dominance or co-dominance of those two bacteria (*Geoalkalibacter subterraneus* and *Desulfuromonas* spp) suggests that syntrophic interactions could exist among these two bacteria in the early stage of biofilm formation, i.e. when biofilm is sampled after the first chronoamperometric cycle as in the experimental procedure presented here.

Desulfuromonas acetoxidans an ARB that was firstly isolated from marine sediments (Bond *et al.* 2002) is able to survive in freshwater environment (Vandieken *et al.* 2006) and is known to grow anaerobically by oxidizing acetate with the reduction of elemental sulfur or Fe(III) (Pfennig et Biebl 1976; Roden et Lovley 1993). An organism close to *Desulfuromonas acetoxidans* was repeatedly identified in enriched anodes by Bond *et al.* (2002). In their work, a pure culture of *Desulfuromonas acetoxidans* provided a current density of 0.157 A m⁻² on a graphite electrode poised at 0.2 V/AgAgCl (Bond *et al.* 2002). Our results are consistent with that previous publication of Bond *et al.* (2002). However, the biofilms enriched here presented much higher current densities. This difference can be due to discrepancy between their and our experimental procedure. In the present study we work in a potential controlled device instead of an MFC.

Geoalkalibacter subterraneus is a δ -proteobacteria. It is closely related to *Geobacter* and belongs to the same *Geobacteraceae* family (90% of similarity). It is considered to be an alkalitolerant (or either alkaliphilic) and able to use a wide panel of organic acids as electron

donors such as acetate and ethanol (Greene *et al.* 2009). Only a recent study reported the finding in mixed culture of organisms related to *Geokalibacter subterraneus* as a dominant ARB in the population of electroactive microbial biofilms enriched from shoreline and mangrove sediments (Miceli *et al.* 2012).

The two biofilms reported by Miceli (2012) mainly containing *Geokalibacter* reached from 3.87 to 8.73 A m⁻² from the first CA growth cycle on a graphite electrode polarized at -0.3 V vs. Ag/AgCl (Miceli *et al.* 2012). Our results are in good agreement with those reported by Miceli *et al.* (2012) even if applied potentials differ.. The very similar j_{max} value reached in the present study in comparison with those of Miceli *et al.* (2012) can likely be due to the saline conditions used in both cases (from 20 to 30 g_{NaCl} L⁻¹). Additionally, inocula in both studies were collected from places with a high salt content. While in Miceli (2012) salt water sediments and anaerobic sediments from a beach were used, here electrochemically derived biofilms enriched with *Geokalibacter subterraneus* as the main ARB were obtained from two different types of inocula: sampled sediments from a lagoon collecting wastewaters in a salt factory (Inoculum 1) and sediments from a salt lake beach (Inoculum 2).

In addition, recent electrochemical characterizations of *Geokalibacter subterraneus* in pure culture support our results to explain that the experimental conditions used here (such as a saline growth medium: 30 g_{NaCl} l⁻¹) can stimulate the enrichment of an halophilic ARB as *Geokalibacter subterraneus* (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013). Besides the study of the development of *Geokalibacter subterraneus* anodic biofilms under saline conditions, both research groups showed that it is indeed possible to obtain high conversion of organic matter into current even under these conditions (higher than 4 A m⁻²).

In conclusion, the use of CE-SSCP for the analysis of the anodic microbial community provided a good characterization of the high ARB selection during electrochemically driven enrichment. Moreover, efficient electroactive biofilms were obtained in terms of significant high current densities up to 8.5 A m⁻² and hence, high substrate conversion as coulombic efficiency up to 82.8%, clearly indicating that most of the substrate was effectively converted into current. Interestingly, among all conditions tested, species phylogenetically closed to *Desulfuromonas* spp and *Geokalibacter subterraneus* were the main dominant anode-respiring bacteria in all anodic electroactive biofilms, alone or together. This implies a possible symbiotic effect in the early stage of biofilm formation, an effect currently under investigation in our research group.

IV.1.3. DISCUSSION

Le but de cette étude était de sélectionner et d'identifier des bactéries électroactives en cultures mixtes dans des conditions permettant le couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne. L'utilisation de la CE-SSCP pour l'analyse de la communauté microbienne à l'anode a permis de fournir une caractérisation de la structure de communauté microbienne et a montré la sélection spécifique de 1 ou 2 bactérie(s) majoritaire(s) suite à l'enrichissement sur l'électrode en condition salines et à partir de sédiments salins. Des biofilms électroactifs présentant des densités de courant élevées (jusqu'à 8,5 A/m²) ont été obtenus. Le rendement faradique a atteint jusqu'à 82,8%, ce qui indique une très bonne conversion du substrat en flux d'électrons. Ceci s'accorde avec les résultats d'Erable et al. (2009) qui ont obtenu de bonnes densités de courant (2.5 A/m²) à 20 g_{NaCl}/L en utilisant des sédiments salins comme inoculum. De la même façon, Rousseau et al. (2013) ont obtenu une augmentation des densités de courant avec l'augmentation de la salinité du milieu.

Parmi toutes les conditions testées, des espèces phylogénétiquement proches de *Desulfuromonas* spp et *Geoalkalibacter subterraneus* étaient majoritaires ou co-majoritaires dans tous les biofilms électroactifs anodiques. La forte sélection de ces espèces peut être due aux conditions expérimentales très contrôlées dont le potentiel imposé à l'anode grâce au potentiostat et le contrôle d'autres paramètres tels que le pH, la température et la composition du milieu. Ceci permet un maintien des conditions environnementales qui favorise l'attachement du biofilm en surface de l'anode et l'usage de cette électrode comme accepteur d'électrons (Rabaey et al., 2010). La présence de *Geoalkalibacter subterraneus*, qui n'a été que récemment observée dans un biofilm électroactif (Miceli et al., 2012) peut être due à la nature saline de l'inoculum, en comparaison aux études précédentes principalement inoculées avec des eaux usées et ne présentant pas une salinité élevée (Lefebvre et al., 2010). Ainsi, Miceli et al. (2012) ont montré que *Geoalkalibacter* spp prédominaient dans des biofilms présentant de fortes densités de courant (de 4.2 à 8.9 A/m²). Ces performances peuvent être attribuées au mécanisme de transfert direct d'électrons vers l'anode qui a été mis en évidence récemment par Carmona-Martínez et al. 2013 et Badalamenti et al. 2013.

Du point de vue du couplage des deux procédés de fermentation et d'électrolyse microbienne, les travaux de cette publication ont permis de d'étudier 2 conditions particulières inhérentes à chaque procédé : pH neutre ou acide et alimentation avec de l'acétate ou un mélange d'acétate et de butyrate qui correspondent respectivement aux conditions standards utilisées dans les systèmes bioélectrochimiques (Logan, 2012) et après une étape de fermentation (Guo et al., 2010).

Lorsque l'acétate a été ajouté seul comme donneur d'électrons, le rendement faradique et la densité de courant obtenus ont été plus élevés qu'avec un mélange d'acétate et de butyrate. De même, la phase de latence observée a été plus courte. Ceci vient corroborer les résultats trouvés dans la littérature avec d'autres types d'inocula et dans des conditions non salines (Liu, Cheng, et al., 2005a; Freguia et al., 2010) où l'acétate est le substrat privilégié pour la production de courant dans les systèmes bioélectrochimiques. Ceci peut être dû à une meilleure métabolisation de l'acétate en comparaison à d'autres acides organiques qui nécessitent plus d'énergie pour l'oxydation de la molécule à plus longue chaîne (Venkata Mohan and Prathima Devi, 2012).

Dans nos travaux, les performances électroactives étaient significativement plus élevées à pH 7 qu'à pH 5,5 en termes de rendement faradique. Alimenté avec de l'acétate, les rendements faradiques étaient de l'ordre de 70% et 12% à, respectivement, pH 7 et pH5.5. Alimenté avec un mélange d'acétate et de butyrate, ils étaient de 11% et 21% à respectivement pH 7 et pH5,5. Ces résultats sont cohérents avec le pH d'origine de l'inoculum, plus proche de la neutralité, et donc la sélection de bactéries plus adaptées à pH 7. Ce constat s'accorde aussi avec des études antérieures où un pH neutre permet d'obtenir de meilleurs rendements faradiques (Patil et al., 2011). Enfin, une meilleure activité électroactive à pH 7 qu'à pH5,5 de *Gealkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas* spp., retrouvées dans tous les biofilms, peut vraisemblablement être due à une adéquation avec les optima de pH de ces microorganismes. En effet, l'optimum de pH de *Gealkalibacter subterraneus* est de 7 (Greene et al., 2009) et celui de *Desulfuromonas acetoxidans* est compris entre 7,2 et 7,5 (Pfennig and Biebl, 1976).

En conclusion, cette étude aura permis de sélectionner des bactéries électroactives adaptées à un milieu salin, l'originalité étant de les sélectionner à partir de milieux salins et anaérobies. Ainsi, une bactérie récemment identifiée comme majoritaire dans des biofilms électroactifs et caractérisée en culture pure dans des systèmes bioélectrochimiques,

Geokalibacter subterraneus, aura permis d'atteindre dans ces conditions spécifiques, un bon transfert d'électrons à l'anode à partir d'acétate à pH 7. De plus la forte sélection d'une ou deux espèces majoritaires et leur caractérisation comme espèces électroactives en cultures pures permet de supposer qu'elles jouent un rôle central dans le transfert d'électrons au sein du biofilm.

Suite à cette étude et étant donné la forte sélection microbienne et la structure de communauté simplifiée du biofilm, une stratégie pour pré-sélectionner les espèces électroactives à partir d'une méthode d'enrichissement sur oxydes de Fer (III) a été mise en œuvre (IV.2). Cette méthode s'appuie une autre stratégie d'enrichissement des ARB qui a été proposée mais pour laquelle la sélection microbienne n'a pas été décrite (Kim et al., 2004; Wang et al., 2010). L'enrichissement sur Fe(III) permettrait de pré-sélectionner des ARB en milieu liquide à partir d'un inoculum pour accélérer le démarrage de la MEC.

NB : Dans ce chapitre, il s'est avéré que le pH neutre était fortement favorable dans l'électrolyseur microbien. Ainsi, dans la suite de ce travail nous nous intéresserons plus particulièrement aux pH proches de la neutralité (pH 7 et pH 8) même lors du couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne, et notamment dans l'étude de l'apport d'espèces exogènes issues de la fermentation sur le biofilm électroactif (Chapitre V)

IV.2. ENRICHISSEMENT DE MICRO-ORGANISMES REDUISANT LE Fe(III) ET IMPACT SUR LE BIOFILM ELECTROACTIF

IV.2.1. AVANT-PROPOS

Dans la première partie de ce chapitre (IV.1), des espèces électroactives (ARB) ont été enrichies par sélection directe sur des anodes, seuls accepteurs d'électrons du milieu. Il existe cependant d'autres méthodes d'enrichissement utilisées en amont de l'inoculation et permettant d'inoculer les électrodes avec un consortium électroactif. Dans la littérature, les méthodes couramment utilisées pour pré-sélectionner des micro-organismes électroactifs avant d'inoculer une anode sont (i) soit une récupération d'effluents issus d'un BES fonctionnant en continu (Huang and Logan, 2008; Sleutels et al., 2011), (ii) soit une récupération/dispersion d'un biofilm électroactif au préalable formé dans un BES (Kim, Min, et al., 2005; Miceli et al., 2012; Ketep et al., 2013), (iii) soit une mise en présence de l'électrode à coloniser avec une électrode contenant déjà un biofilm électroactif dans son voisinage (Kim, Min, et al., 2005), soit enfin (iv) un pré-enrichissement d'un inoculum brut dans un milieu contenant des oxydes de fer (Kim, Min, et al., 2005; Wang et al., 2010). Parmi ces techniques, la plus utilisée consiste à remettre en suspension un biofilm électroactif dans un milieu liquide avant de réinoculer une électrode (Wang et al., 2010; Miceli et al., 2012). Cette technique implique la conduite préalable d'un réacteur BES pour obtenir un biofilm électroactif efficace. Par ailleurs, le procédé consistant à réaliser un enrichissement sur oxydes de fer permet de sélectionner des micro-organismes qui peuvent utiliser des oxydes de fer solides comme accepteur final d'électrons, ce qui constitue de bons candidats pour le transfert d'électrons sur l'anode dans des systèmes BES.

Le choix d'un tel procédé d'enrichissement sur oxydes de fer paraît particulièrement adapté aux microorganismes électroactifs car l'électroactivité des bactéries implique une capacité à échanger des électrons avec un accepteur insoluble et externe comme une électrode. En effet, la première bactérie étudiée en culture pure dans ces systèmes, *Shewanella putreficiens*, avait été choisie en raison de sa capacité à réduire les oxydes ferriques solides (Kim et al., 1999). Des études ont montré que certaines bactéries isolées à partir de biofilms électroactifs étaient également capables de coupler l'oxydation de différents substrats avec la réduction des oxydes métalliques, et principalement des oxydes ferriques. Ces organismes sont appelés DMRB pour « dissimilatory metal reducing bacteria ».

Cette propriété est de plus une caractéristique physiologique des micro-organismes de la famille des *Geobacteraceae* (Holmes et al., 2002).

L'impact de cette méthode de pré-enrichissement de DMRB sur l'activité électroactive du biofilm sur anode a déjà été évalué dans des études antérieures (Kim, Min, et al., 2005; Wang et al., 2010). L'étude de Wang et al. (2010) est basée sur une sélection de DMRB en utilisant une méthode précédemment développée (Lovley and Phillips, 1986). Cette étude présente une méthode combinée de pré-sélection d'organismes électroactifs avec un enrichissement sur fer (III) à partir d'un biofilm formé au préalable au sein d'un BES. Il a néanmoins été observé une diminution de la phase de latence et une augmentation du rendement faradique de 23% à 34 % entre le biofilm d'origine (inoculé avec des boues activées) et le biofilm inoculé avec ce même biofilm enrichi. Cette étude a donc fourni de bons résultats pour améliorer les performances des BES, mais aucune information sur les micro-organismes impliqués n'a été apportée. Kim et al. (2005) ont quant à eux étudié, les effets de ces différentes stratégies d'enrichissement sur des boues anaérobies dans le cadre de la formation d'un biofilm électroactif en MFC. Après 25 cycles d'enrichissement sur fer (III), la densité de puissance fournie par le biofilm obtenu était 50% plus faible qu'avec le biofilm obtenu à partir des boues non-pré-enrichies sur Fe(III). Aucune étude sur les sélections microbiennes au cours de ces techniques d'enrichissement ont été menées. Il serait néanmoins intéressant de mieux comprendre l'effet de ces techniques sur la sélection microbienne afin d'expliquer son impact sur l'activité électroactive du biofilm obtenu.

La Figure IV-3 présente le principe du procédé de pré-sélection de bactéries électroactives par enrichissement sur oxydes de Fe(III) et de son transfert avec respiration sur anode.

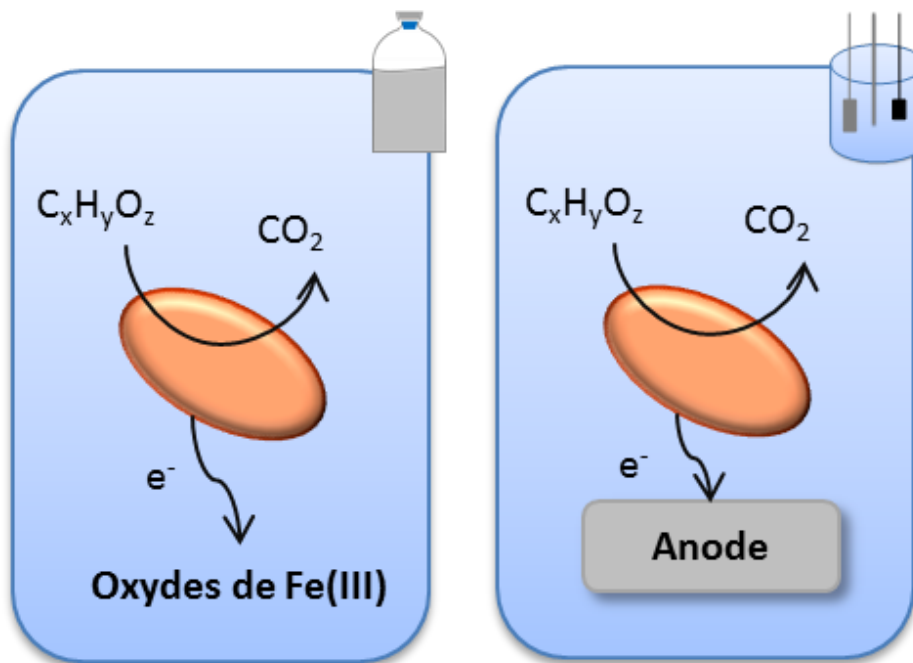


Figure IV-3 : Principe du procédé de pré-sélection de bactéries électroactives par enrichissement de DMRB sur oxydes de Fe(III).

Ce procédé tend à reproduire la réduction des oxydes métalliques, et notamment des oxydes de fer réalisée dans le milieu naturel par les DMRB (*dissimilatory metal reducing bacteria*) pour transférer cette capacité à transférer des électrons à un accepteur insoluble et externe à une électrode (anode).

Le but de cette étude était donc de déterminer l'effet des étapes de culture d'enrichissements successifs sur les structures de communautés microbiennes et sur les performances électroactives du biofilm. La nouveauté de ce travail est la caractérisation des communautés microbiennes au cours du processus d'enrichissement et l'utilisation de chaque étape de l'enrichissement pour produire un biofilm électroactif. Les enrichissements de bactéries électroactives sur anodes et de DMRB en cultures liquides enrichies en Fe(III) ont été réalisés dans des solutions salines et en utilisant comme inoculum des sédiments contenant des populations microbiennes déjà adaptées aux conditions de concentrations élevées de sel.